

Aus der Klinik und Poliklinik für
Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie
der
Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. J. Reuther

**Einfluss von niederenergetischem gepulsten Ultraschall
auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten
osteoblastärer Zellen in vitro**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität
zu Würzburg

vorgelegt von
Uwe Klammert
aus Zella-Mehlis

Würzburg, Januar 2003

Referent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. J. Reuther

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. C. Hendrich

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Mai 2003

Der Promovend ist Arzt.

Meiner Familie

Inhalt

1 Einleitung

1.1 Knochengewebe	1
1.1.1 Morphologischer Knochenaufbau	1
1.1.2 Biochemischer Knochenaufbau	3
1.1.3 Osteoblastärer Differenzierungszyklus und osteoblastentypische Marker	3
1.2 Frakturheilung, Komplikationen und Therapeutische Konzepte	10
1.2.1 Die Fraktur und ihre natürliche Heilung	10
1.2.2 Die Pseudarthrose als wichtige Komplikation	12
1.2.3 Behandlungsmöglichkeiten der Pseudarthrose	14
1.3 Niederenergetischer Ultraschall	15
1.3.1 Bisherige <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Erkenntnisse	15
1.3.2 Klinische Anwendung	18

2 Material und Methoden

2.1 Ultraschall-Versuchsapparatur	20
2.1.1 Ultraschallgerät EXOGEN SAFHS Modell 2A	20
2.1.2 Aufbau der Inkubationskammer	21

2.2 Zellkulturtechnik	22
2.2.1 Nährmedien, Zusätze und Puffer	22
2.2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien	24
2.2.3 Zell-Linien	25
2.2.4 Gewinnung von Zellen aus humaner Beckenkammpongiosa	26
2.2.5 Konservieren von Zellen in Flüssigstickstoff	27
2.2.6 Zellzählung	28
2.2.7 Beimpfen der Petrischalen und Kultivierung	28
2.3 Quantifizierung der Zellproliferation und Zellvitalität mittels WST-1-Assay	29
2.4 Ermittlung des Proteingehaltes nach Bradford	30
2.5 Bestimmung der spezifischen Alkalische-Phosphatase-Aktivität	31
2.6 Darstellung von Kalzium-Salzen: Färbung nach von Kossa	33
2.7 Zytochemische Alkalische-Phosphatase-Färbung	34
2.8 Molekularbiologische Methoden	35
2.8.1 Isolierung von mRNA aus Kulturen humaner Beckenkammzellen	35
2.8.2 Charakterisierung des Genexpressionsmusters mittels RT-PCR	38

3 Fragestellung	44
3.1 Proliferations- und Differenzierungsverhalten von Kulturen primärer, aus humaner Spongiosa isolierter Zellen unter Ultraschalleinfluss	44
3.2 Vergleich von humanen Beckenkammzellen mit mesenchymalen Zell-Linien fibroblastärer und osteoblastärer Differenzierung	44
4 Ergebnisse	45
4.1 Vergleich der Zellproliferation und Zellvitalität	45
4.1.1 Humane Beckenkammzellen	46
4.1.2 MC3T3-E1-Zell-Linie	46
4.1.3 L-929-Zell-Linie	47
4.2 Vergleich der spezifischen Alkalische-Phosphatase-Aktivität	47
4.2.1 Humane Beckenkammzellen	48
4.2.2 MC3T3-E1-Zell-Linie	49
4.3 Vergleich der Mineralisation (Färbung nach von Kossa)	49
4.4 Zytochemische Alkalische-Phosphatase-Färbung	50
4.5 Vergleich des Genexpressionsmusters	53
4.5.1 Expression osteoblastentypischer Gene im zeitlichen Verlauf	53
4.5.2 Analyse der relativen Expressionsrate	56

5 Diskussion	61
5.1 Experimentelle Grundlagen	61
5.2 Vergleich der Zellproliferation und Zellvitalität	64
5.3 Vergleich der spezifischen Alkalische-Phosphatase-Aktivität	64
5.4 Molekularbiologische Methoden	65
5.5 Wirkmechanismen von therapeutischem Ultraschall	68
6 Zusammenfassung	71
7 Literatur	72

Abkürzungen

AgNO₃	Silbernitrat
AMV Reverse Transkriptase	Avian Myoblastosis Virus Reverse Transkriptase
AP	Alkalische Phosphatase
BMP (-1, -...)	Bone Morphogenetic Protein (-1, -...)
cDNA	zu RNA komplementäre DNA
CO₂	Kohlendioxid
COX-1 (-2)	Cyclooxygenase-1 (-2)
(D)MEM	(Dulbecco´s) Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
(D)PBS	(Dulbecco´s) Phosphate-Buffered Saline
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat (N=Adenosin, Guanosin, Cytosin, Thymin)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESWL	Extrakorporale Stosswellenlithotripsie
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HCl	Salzsäure
hnRNA	heterogene nukleäre RNA
HSP 47	Heat Shock Protein 47
IGF	Insuline-like Growth Factor
MgCl₂	Magnesiumchlorid
mRNA	Messenger-RNA
Na₂CO₃	Natriumkarbonat
NAD⁺, NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidiert, reduziert)
NaOAc	Natriumacetat

NaOH	Natriumhydroxid
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
Oligo(dT)-Zellulose	Oligo-desoxy-Thymidin-Zellulose
PDGF	Plateled-derived Growth Factor
PG(E₂, I₂, ...)	Prostaglandin (E ₂ , I ₂ , ...)
Pwo DNA Polymerase	3'-5' Proofreading Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transkriptase – Polymerase-Ketten-Reaktion
TAE	Tris Acetat EDTA
Taq DNA Polymerase	Thermus aquaticus DNA Polymerase
TGF-β	Transforming Growth Factor β
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA

Abbildungen

- Abb. 1** Ultraschall-Versuchsanordnung
- Abb. 2** Ultraschall-Versuchsanordnung
- Abb. 3** densitometrische Messung der Gelelektrophoresebanden
mittels „Scion Image“
- Abb. 4** Zellvitalität der humanen Beckenkammzellen
- Abb. 5** Zellvitalität der MC3T3-E1 - Osteoblasten
- Abb. 6** Zellvitalität der L-929 - Fibroblasten
- Abb. 7** Spezifische Alkalische-Phosphatase-Aktivität
humaner Beckenkammzellen
- Abb. 8** Spezifische Alkalische-Phosphatase-Aktivität
von MC3T3-E1 - Osteoblasten
- Abb. 9** Darstellung der Mineralisation nach von Kossa,
humane Beckenkamm-Zellen, 1,6fache Vergrößerung
- Abb. 10** Zytochemische Alkalische-Phosphatase-Färbung
humaner Beckenkamm-Zellen, 20fache Vergrößerung
- Abb. 11** Zytochemische Alkalische-Phosphatase-Färbung
von MC3T3-E1 - Osteoblasten, 20fache Vergrößerung
- Abb. 12** Zytochemische Alkalische-Phosphatase-Färbung
von L-929 - Fibroblasten, 20fache Vergrößerung
- Abb. 13** Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte, GAPDH
- Abb. 14** Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte, AP
- Abb. 15** Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte, Osteokalzin
- Abb. 16** Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte, BMP-2
- Abb. 17** Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte, BMP-4

- Abb. 18** Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte, BMP-7
- Abb. 19** Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte, Typ-I-Kollagen
- Abb. 20** Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte, HSP 47
- Abb. 21** Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte, COX-2
- Abb. 22** Expression von mRNA für BMP-7 in humanem Nierengewebe
-
- Abb. 23** relative Genexpressionsrate, BMP-2
- Abb. 24** relative Genexpressionsrate, BMP-4
- Abb. 25** relative Genexpressionsrate, AP
- Abb. 26** relative Genexpressionsrate, Osteokalzin
- Abb. 27** relative Genexpressionsrate, Typ-I-Kollagen
- Abb. 28** relative Genexpressionsrate, HSP 47
- Abb. 29** relative Genexpressionsrate, COX-2

1 Einleitung

1.1 Knochengewebe

Knochengewebe ist eine hochdifferenzierte Form von Bindegewebe mit mechanischen und metabolischen Aufgaben (Speicher für Mineralien, insbesondere für Kalzium- und Phosphationen). Darüber hinaus trägt Knochen das rote Knochenmark als Stätte der Blutbildung. Wie alle reifen Binde- und Stützgewebe entwickelt sich Knochen aus embryonalem Bindegewebe, dem Mesenchym, welches aus dem mittleren Keimblatt, Mesoderm, hervorgeht.

1.1.1 Morphologischer Knochenaufbau

Jeder Knochen besteht aus einem inneren schwammartigen Trabekelwerk, der Substantia spongiosa, und einer äußeren, den Knochen umgebenden kompakten Schicht, Substantia compacta. Die spongiösen Räume und die zusammenhängenden diaphysären Knochenhöhlen enthalten Knochenmark. Die zum Knochen gehörenden Bindegewebsschichten sind das umgebende gefäßführende Periost sowie das die Markräume auskleidende Endost.

Aufgrund der Anordnung organischer Fasern (Kollagenfasern) unterscheidet man Geflechtknochen und Lamellenknochen. Im Geflechtknochen verlaufen die Kollagenfasern als unterschiedlich dicke Bündel ohne regelhafte Orientierung und strahlen in Periost sowie in ansetzende Bänder und Sehnen als Sharpey'sche Fasern ein. Geflechtknochen besitzt besondere Festigkeit gegen Zug und Biegung.

Im Lamellenknochen sind unterschiedlich viele Lamellen, voneinander abgegrenzte Knochenschichten mit 3-7 μm Dicke, konzentrisch um einen blutgefäßhaltigen Zentralkanal (Havers-Kanal) mit einem Durchmesser von 20-300 μm angeordnet. Die Einheit aus Zentralkanal und umgebenden Lamellen wird als Osteon bezeichnet und ist meist in Längsachse des Knochens ausgerichtet. Die Kollagenfasern innerhalb einer Lamelle nehmen einen zueinander parallelen, spiralartigen Verlauf mit von Lamelle zu Lamelle wechselnder Orientierung.

Im Rahmen der Skelettentwicklung und der Frakturheilung wird zunächst Geflechtknochen gebildet, welcher im allgemeinen durch höherorganisierten Lamellenknochen ersetzt wird^{20,122}.

Die spezifischen Zellen des Knochens sind die Osteozyten und deren Vorläuferzellen sowie die Osteoklasten. Aus mesenchymalen Bindegewebszellen des Knochens (lokalisiert im Periost, insbesondere im inneren Stratum osteogenicum, sowie im Endost) oder aus Stammzellen des Knochenmarkes gehen niedrigdifferenzierte Prä-Osteoblasten hervor, die sich in reife, syntheseaktive Osteoblasten und schließlich in Osteozyten umwandeln^{88,93}. Letztere kann man funktionell in mineralisierende osteoblastische und mineralfreisetzende osteolytische Osteozyten unterscheiden, gemeinsam dienen sie vor allem dem Erhaltungsstoffwechsel des Knochens bzw. der Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase. Osteoblasten besitzen ultrastrukturell einen stark entwickelten Syntheseapparat und bilden zunächst unverkalkte Knochengrundsubstanz (Osteoid), später wirken sie bei der Mineralisierung mit. Dabei mauern sich die Osteoblasten ein und werden somit zu Osteozyten.

Bei den Osteoklasten handelt es sich um mehrkernige Riesenzellen, die aus Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS) hervorgehen^{29,93}. Der Besitz von Protonenpumpen gestattet ihnen die Auflösung der Knochenhartschubstanz mittels Säure, organische Bestandteile können sie enzymatisch spalten. Aufgelöste Knochensubstanz wird von den Osteoklasten resorbiert und an die Blutbahn abgegeben.

Durch ein kontrolliertes Zusammenspiel zwischen Appositions- und Resorptionsvorgängen, also zwischen Osteoblasten- und Osteoklastentätigkeit, kann sich der Knochen durch strukturelle Umgestaltung (Remodeling) veränderten biomechanischen Erfordernissen anpassen. Knochen ist damit ein plastisches Gewebe. Makroskopisch erkennbar ist dies an der Ausrichtung der Spongiosatrabekel entlang der Druck- und Zugspannungslinien (Trajektorien). Beteiligt an der Steuerung dieser Vorgänge sind lokal wirksame Zytokine (z.B. TGF- β), systemische Hormone (z.B. PTH, Calcitonin, GH, Steroide) und die Knochenzellen selbst aufgrund ihrer mechanorezeptiven Eigenschaften^{20,70}.

1.1.2 Biochemischer Knochenaufbau

Die nichtzelluläre Substanz des Knochens (Knochengrundsubstanz, Matrix) besteht zur Hälfte aus Mineralien und zu etwa je 25% aus organischen Verbindungen und Hydratationswasser. Durch diese Kompositbauweise wird eine ideale Kombination aus Elastizität und Härte erreicht.

Der Mineralanteil setzt sich zusammen aus anorganischem Phosphat (etwa 50%) und Kalzium (etwa 35%). Damit sind 99% des Körperkalziums, etwa 1 kg, im Knochengewebe gebunden. Der restliche anorganische Anteil verteilt sich auf Karbonat (6%), Nitrat, Eisen, Natrium, Magnesium, Fluor und Spurenstoffe^{20,122}. Die Mineralien sind als Apatitkristalle, Kalziumphosphatverbindungen mit hexagonaler Kristallstruktur, organisiert. Dabei überwiegt Hydroxylapatit $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Die nadelförmigen Kristalle liegen längs der Kollagenfibrillen oder in ihnen und sind von einem Hydratmantel umgeben. Dieser erleichtert den Ionenaustausch und damit die Einlagerung bzw. die Mobilisierung von Kalzium und Phosphat⁷⁰.

Der organische Anteil der Matrix wird überwiegend von Typ-I-Kollagen gebildet (etwa 90%) sowie von verschiedenen nichtkollagenen Proteinen. Hierzu zählen z.B. Osteokalzin (bone Gla protein, etwa 2% der organischen Matrix), Osteopontin und Bone Sialoprotein (zusammen weniger als 1%), Osteonektin (etwa 2%), α_2 -HS-Glycoprotein (weniger als 1%) und in sehr geringer Konzentration weitere, nicht näher charakterisierte Proteine sowie Serumproteine (u.a. Albumin, α_1 -Antitrypsin, Transferrin, Haptoglobin, Immunglobuline) und Wachstumsfaktoren bzw. Cytokine (u.a. BMP, FGF, IGF, PDGF, TGF- β)^{125,130}. Die wichtigsten Glykosaminoglykane des Knochens sind Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat und Keratansulfat⁷⁰.

1.1.3 Osteoblastärer Differenzierungszyklus und osteoblastentypische Marker

Der osteoblastäre Differenzierungszyklus konnte anhand von Zellkulturmodellen gut charakterisiert werden. Prinzipiell können drei qualitative Perioden unterschieden werden:

- Proliferation,
- Reifung der extrazellulären Matrix und
- Mineralisation.

Mit einer Änderung der Zellmorphologie von kuboiden Präkursorzellen hin zu sternartigen und spindeligen Osteoblasten und -zyten sind verschiedene typische Syntheseprodukte assoziiert. Es besteht ein reziproker und funktioneller Zusammenhang zwischen der Beendigung der proliferativen Aktivität und der beginnenden Expression osteoblastentypischer Gene, verbunden mit Matrixreifung und Mineralisation.

Zunächst steht die Proliferation bis zum Erreichen eines konfluenten Kulturstadiums im Vordergrund. In dieser Phase werden vor allem Zellwachstums- und Zellzyklusgene exprimiert (z.B. Core- und H1-Histon-Gene, c-Myc, c-Fos). Auch Kollagen-Gene werden bereits jetzt verstärkt exprimiert, resultierend in der Synthese knochentypischen Typ-I-Kollagens. Des Weiteren wird Fibronectin sowie TGF- β von den proliferierenden Osteoblasten gebildet.

Es folgt die Phase der Matrixproduktion und -reifung, begleitet von einer zunehmenden Expression osteoblastentypischer Gene: nichtkollagene Proteine wie Alkalische Phosphatase, wenig später auch Osteokalzin und Osteopontin. Erstere hat ihr Expressionsmaximum etwa eine Woche nach Erreichen der Konfluenz, die beiden letzteren erreichen ihren Expressionsgipfel mit beginnender Mineralisation, wenn die Bildung der Alkalischen Phosphatase bereits wieder stark rückläufig ist. Im Gegensatz zu Osteokalzin zeigt Osteopontin einen biphasischen Expressionsverlauf mit submaximaler Expression bereits während der Proliferationsperiode und einem zweiten Gipfel zu Beginn der Mineralisation. Osteopontin scheint in beide Vorgänge involviert zu sein^{34,91}.

Die Expression von Alkalischer Phosphatase ist nicht nur zeitlich, sondern wohl auch funktionell an die Beendigung der Proliferation gekoppelt. Bei Hemmung der DNA-Synthese mit Hydroxyharnstoff während der Replikationsphase konnte eine gesteigerte Expression von Alkalischer Phosphatase beobachtet werden. Gleiches gilt auch für Osteopontin, nicht jedoch für Osteokalzin⁹⁴.

Bei der Subkultivierung osteoblastärer Zellen kommt es unabhängig vom Differenzierungsstadium zur Herunterregulation der jeweils exprimierten Gene und der Differenzierungszyklus wird in der Tochterkultur erneut durchlaufen^{94,95,126}.

Typ-I-Kollagen

Man unterscheidet etwa 20 Kollagentypen, für die insgesamt über 30 verschiedene, überwiegend aus Introns bestehende Gene kodieren. Typ-I-Kollagen gehört zur Gruppe der fibrillären Kollagene und stellt das Hauptkollagen des Knochens sowie des straffen und lockeren Bindegewebes dar.

Die kollagene Faser setzt sich aus parallel angeordneten Kollagenfibrillen zusammen, welche wiederum aus stäbchenförmigen Tropokollagenmolekülen bestehen. Ein Tropokollagenmolekül entspricht ultrastrukturell einer α -Tripelhelix, d.h. drei umeinandergewundenen fadenförmigen Proteinketten (sogenannte α -Ketten). Zur Kollagensynthese befähigt sind verschiedene mesenchymale Zellen wie Fibroblasten, Osteoblasten und Chondroblasten. Das primäre Translationsprodukt der mRNA sind die α -Ketten, die sich im endoplasmatischen Retikulum zu Prokollagenmolekülen (Tripelhelices) zusammenlagern und auch als solche sezerniert werden. Extrazellulär werden nichthelikale C- und N-terminale Peptidreste der Prokollagenmoleküle abgespalten, es entstehen Tropokollagenmoleküle. Diese lagern sich zu Fibrillen zusammen und werden durch Quervernetzung von Lysinseitenketten sowie durch Aggregation mit Grundsubstanz (z.B. Proteoglykane) stabilisiert.

Im Extrazellularraum unterliegen die Kollagenfasern ständigen Umbauvorgängen, wobei sich ändernde mechanische Beanspruchungen einen wichtigen Reiz darstellen^{20,70}.

Alkalische Phosphatase

Die Alkalische Phosphatase ist ein membranständiges Enzym (Ektoenzym) und liegt in Form mehrerer Isoenzyme in verschiedenen Organen und Geweben vor: im Knochengewebe, aber auch in Leber, Niere, Darm, Plazenta und Leukozyten. Für die Isoformen des Knochens, der Leber und der Niere kodiert ein gemeinsames Gen¹³⁸.

Von Osteoblasten werden drei Isoformen gebildet, möglicherweise mit speziellem Verteilungsmuster in den Knochenkompartimenten (Kompakta/Spongiosa)⁷⁵. Der Wirkmechanismus der Alkalischen Phosphatase im Knochen ist noch nicht definitiv geklärt, diskutiert werden die lokale Freisetzung anorganischen Phosphates, die Zerstörung lokaler Inhibitoren der Mineralisierung sowie das Agieren als

kalziumbindendes Protein oder Ca^{2+} -ATPase¹¹. Die Bedeutung des Enzyms für die Mineralisierung verdeutlicht das Krankheitsbild der Hypophosphatasie, einer genetisch bedingten Minderaktivität der Alkalischen Phosphatase, welche sich in einer gestörten Skelettmineralisation äußert.

Eine erhöhte Serumaktivität der knochenspezifischen Isoenzyme tritt als Ausdruck vermehrten osteoblastären Umsatzes auf:

- bei gesteigertem Knochenanbau und -umbau (Frakturheilung, Wachstum),
- bei Knochenstoffwechselerkrankungen wie der Osteomalazie,
- bei primären Knochenneubildungen und Knochenmetastasen sowie
- im Rahmen anderer Knochenerkrankungen (z.B. M. Paget)^{35,70}.

Osteokalzin

Das sehr kleine Protein wird von Osteoblasten in die extrazelluläre Knochenmatrix abgegeben und kann über γ -Carboxyglutamylreste möglicherweise Kalziumionen binden/ konzentrieren und dadurch die Bildung von Hydroxylapatit-Kristallen einleiten.

Die Synthese von Osteokalzin bzw. die γ -Carboxylierung seiner Glutamylseitenketten ist Vitamin-K-abhängig, die osteoblastäre Osteokalzinsynthese wird durch Glucocorticoide gehemmt^{11,68,70}.

Im Plasma vorkommendes Osteokalzin ist ein sensitiver und spezifischer Marker der Osteoblastenaktivität, sein Serumspiegel korreliert mit der Knochenbildung und verhält sich bei vielen Erkrankungen des Knochens analog zur Alkalischen Phosphatase. Osteokalzin wird renal eliminiert, erhöhte Plasmaspiegel finden sich daher auch bei Nierenfunktionsstörungen¹⁷.

Bone Morphogenetic Proteins

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) sind eine heterogene Gruppe zum Teil stark osteoinduktiv wirkender Proteine, viele von ihnen werden wegen ihrer sieben konservierten carboxyterminalen Cysteinreste zur TGF- β -Superfamilie gezählt¹⁰³.

Bisher sind über 40 verschiedene BMPs identifiziert und zum Teil kloniert worden. Die meisten dieser Proteine sind in sehr geringer Konzentration (im Bereich von 1 μg pro kg Knochengewebe) in der Knochenmatrix vorhanden^{72,133}.

Die verschiedenen BMPs können mit unterschiedlicher Dosisabhängigkeit und unterschiedlichem zeitlichen Verlauf Knochenneubildung induzieren. Es konnten *in vivo* und *in vitro* eine Vielzahl von Effekten nachgewiesen werden:

- Stimulation der Differenzierung von Knochenmarksstammzellen in Osteoblasten durch BMP-2^{108,129},
- Stimulation der Glycosaminoglycansynthese und der Typ-II-Kollagen-Synthese von Chondrozyten durch BMP-4^{71,73},
- Einfluss von BMP-2 auf die Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen in Osteoblasten, Knorpel- und Muskelzellen^{1,47,143},
- Proliferation und Differenzierung humaner Knochenzellen durch BMP-7⁵⁷,
- heterotope Ossifikation nach Implantation verschiedener BMPs in die Muskulatur von Versuchstieren^{64,134}. Bei den induzierten Knochenneubildungen kommt es zur Entwicklung eines Ossikels mit zentral gelegenem hämatopoetischen Knochenmark⁶⁵.

Die Stimulation der Osteogenese durch BMP-2 ist assoziiert mit einer gesteigerten Expression osteoblastärer Marker-Gene wie Alkalische Phosphatase, Typ-I-Kollagen, Osteokalzin und Osteopontin sowie BMP-3 und BMP-4¹².

Abgesehen von der Bedeutung für Knochengewebe und Osteogenese spielen BMPs auch eine wichtige Rolle für die Organogenese und Gliedmaßenentwicklung im Rahmen der Embryonalentwicklung^{132,139,141}.

Cyclooxygenase-2

Das ubiquitär vorkommende, membranständige Enzym Cyclooxygenase (COX) katalysiert die Umwandlung von Arachidonsäure in Prostaglandin H₂ (PGH₂) und deren Abkömmlinge (z.B. PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ (Prostacyclin) und Thromboxan A₂). Prostaglandine besitzen Mediatorfunktion und sind an vielfältigen physiologischen und pathologischen Vorgängen wie z.B. Tonusbeeinflussung glatter Muskulatur, Thrombozytenaggregation, Entzündungsreaktionen und Fieber beteiligt. Bezüglich der Synthese bestimmter Prostaglandine aus dem PGH₂ sowie der Verteilung spezifischer Prostaglandinrezeptoren besteht eine gewisse Gewebespezifität.

Es sind zwei Isoenzyme der COX mit nur 62% Homologie bekannt: sie unterscheiden sich vor allem durch konstitutive Synthese (COX-1) bzw. Induzierbarkeit (COX-2)^{36,69}.

Im Knochen produzierte Prostaglandine (insbesondere PGE₂) haben vielfältige Effekte auf den Knochenstoffwechsel: in relativ geringer Konzentration stimulieren sie Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten *in vitro*, während sie in hoher Konzentration die osteoblastäre Kollagensynthese hemmen. Auf Osteoklasten wirken Prostaglandine vorübergehend inhibitorisch, darüber hinaus bewirken sie jedoch die Rekrutierung und Differenzierung neuer Osteoklasten und können somit *in vivo* die Knochenresorption stimulieren¹⁰⁰.

Prostaglandine sind also in Resorptions- und Remodeling-Vorgänge des Knochens involviert und werden sowohl von Osteoblasten als auch von Endothelzellen der Knochengefäße gebildet.

Osteoblasten besitzen beide COX-Isoformen. COX-2 wird reguliert durch mechanische Einflüsse, Zytokine, Wachstumsfaktoren sowie systemische Hormone. Eine Expressionssteigerung von COX-2 zeigt sich beispielsweise unter mechanischem Stress^{48,50}, durch Interleukin-1⁸², durch TGF- β ⁹⁷, durch BMP-2⁵⁹ sowie durch PTH⁷⁴.

Unter Einfluss bestimmter Prostaglandine kommt es zur reversiblen Änderung der Osteoblastenmorphologie (Zunahme von Zellfortsätzen) sowie zu einer Vermehrung der Gap Junctions¹²³.

Ein Hinweis auf die Mitbeteiligung von Prostaglandinen bei pathologischen Knochenneubildungen im Sinne von heterotopen Ossifikationen (z.B. postoperativ, insbesondere nach endoprothetischem Hüftgelenkersatz) ergibt sich aus der prophylaktischen Wirkung von nichtsteroidalen Antiphlogistika, spezifischen COX-Inhibitoren¹⁰⁹.

Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

Als Enzym der Glycolyse katalysiert die GAPDH die Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat, wobei NAD⁺ als Oxidationsmittel dient. GAPDH ist zur Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels nötig und wird daher den sog. „house keeping enzymes“ zugerechnet. Diese zur Aufrechterhaltung basaler Zellfunktionen benötigten Gene werden im allgemeinen in etwa gleichem Umfang transkribiert (konstitutive Transkription).

Die Transkriptionsrate der regulierten Gene kann dagegen um Größenordnungen variieren und wird durch vielfältige innere und äußere Faktoren beeinflusst⁶⁹. Bei

qualitativen und semiquantitativen Untersuchungen zum Transkriptionsverhalten von Zellen kann man daher die Transkriptionsrate der regulierten Gene auf die der GAPDH beziehen.

HSP 47

Hitzeschockproteine (HSP, Stressproteine, Chaperones) sind intrazelluläre Proteine, die an instabile Konformere anderer Proteine binden und diese stabilisieren können, Einfluss auf deren Faltung und Assoziation nehmen sowie ihren Transport in andere Zellkompartimente steuern. Sie werden zum Teil konstitutiv unter physiologischen Bedingungen exprimiert und dienen der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase⁶⁹.

Unter unphysiologischen Bedingungen (z.B. erhöhte Temperatur, Einwirkung anderer Noxen) treten intrazellulär vermehrt fehlerhaft gefaltete Proteine auf. Durch nicht näher bekannte Mechanismen kommt es nun zu verstärkter Expression von HSP. Diese Stressproteine binden an beschädigte Proteine und können deren Rückfaltung bewirken sowie irreversibel geschädigte Proteine binden und deren Degradation beschleunigen¹¹¹.

Bei HSP 47 handelt es sich um ein Glykoprotein der Molekularmasse von 47 kD, welches ausschließlich im endoplasmatischen Retikulum (ER) kollagenbildender Zellen vorkommt. Unter physiologischen Bedingungen korreliert seine Expression mit der Expression verschiedener Kollagene (u.a. Typ-I-Kollagen): HSP47 assoziiert im ER mit Prokollagenmolekülen und dissoziiert im cis-Golgi-Kompartiment. Mögliche Funktionen sind die Steuerung der Translokation der Prokollagen-mRNA ins ER, Verhinderung der Aggregation unreifer Prokollagenketten, Beeinflussung der Modifikation von Prokollagen, Ausmusterung abnormalen Prokollagens sowie Transport vom ER in den Golgi-Apparat. Unter unphysiologischen Bedingungen wird vermehrt HSP47 exprimiert, während die Expression von Kollagenen abfällt⁸⁵.

Bei fibrotisierenden / sklerosierenden Prozessen verschiedener Organe (z.B. Lungenfibrose, Leberfibrose) ist sowohl die Expression von Kollagenen als auch von HSP 47 erhöht¹⁰².

In Fibroblasten von Patienten mit Osteogenesis imperfecta wurden im ER retinierte, abnorme Prokollagenmoleküle gefunden, welche mit ebenfalls erhöhten Mengen von HSP 47 assoziiert waren⁶⁰.

1.2 Frakturheilung, Komplikationen und Therapeutische Konzepte

1.2.1 Die Fraktur und ihre natürliche Heilung

Als Fraktur bezeichnet man die vollständige Durchtrennung eines Knochens durch direkte oder indirekte Gewalteinwirkung, die die Elastizität und Festigkeit des Knochens überschreitet. Bei unvollständiger Kontinuitätsunterbrechung spricht man auch von Fissur (Knochenriss) bzw. Infraktion (Spaltbruch). Dem Pathomechanismus entsprechend sind voneinander abzugrenzen: die traumatische Fraktur durch akute, auf gesunden Knochen einwirkende Gewalt, die Ermüdungsfraktur infolge chronischer Schwächung des Knochens durch rezidivierende Mikrotraumen und die pathologische Fraktur des vorgeschädigten Knochens ohne adäquate Gewalteinwirkung.

Im Frakturgebiet kommt es zunächst durch Blutung aus eröffneten Gefäßen des Knochenmarkes, des Knochens und seiner Umgebung zur Bildung eines Frakturhämatoms sowie zum Untergang von Knochenzellen und Schädigung der Knochengrundsubstanz. Da Knochen die Fähigkeit zu organotypischer Heilung besitzt, werden Defekte nicht durch minderwertiges Narbengewebe, sondern durch neugebildetes Knochengewebe ersetzt und in den vorhandenen Knochen integriert. Die Knochenneubildung kann ausgehen von Endost, Periost und Havers-System.

Bei der natürlichen Frakturheilung kommt es binnen zweier Wochen zur Ausbildung eines Granulationsgewebes mit einsprossenden Gefäßen und kollagenfaserbildenden Bindegewebszellen. Es folgt die Proliferation osteogener Zellen, die zunächst knorpelartiges Gewebe bilden, den sogenannten Knorpelkallus. Bei den Zellen handelt es sich um Osteoprogenitorzellen peri- und enchondralen Ursprungs sowie undifferenzierte medulläre Zellen. Zeitgleich verläuft die Resorption des Hämatoms und des geschädigten Knochengewebes. Nach dem Muster der enchondralen Ossifikation wird nun der Knorpelkallus kontinuierlich knöchern durchbaut, also in einen Knochenkallus aus unreifem Geflechtknochen umgewandelt. Später wird dieser Geflechtknochen unter zunehmender funktioneller Belastung in höher organisierten Lamellenknochen umstrukturiert. Dieser als Haversscher Knochenumbau bezeichnete Vorgang mit Wiederherstellung der ursprünglichen äußeren Form und inneren Struktur nimmt Monate bis Jahre in Anspruch^{122,124}.

Der geschilderte Vorgang wird als sekundäre Frakturheilung bezeichnet und ist typisch für die konservative Behandlung. Als Sonderform der sekundären Frakturheilung lässt sich die sogenannte Spalthheilung bei größerer Diastase (im Bereich weniger hundert μm) osteosynthetisch fixierter Fragmente abgrenzen.

Daneben gibt es noch die primäre Frakturheilung (auch Kontaktheilung), bei der der Frakturspalt direkt durch in Längsrichtung vorwachsende Osteone überbrückt wird. Dies setzt einen mikroskopisch engen Kontakt der Fragmente und absolute Ruhigstellung voraus und ist i.d.R. nur mittels Kompressionsosteosynthese erreichbar.

Bedingungen für eine ungestörte Frakturheilung sind ein möglichst enger Kontakt der Fragmente, eine ausreichende Durchblutung der Fragmente und der umgebenden Weichteile sowie eine kontinuierliche Ruhigstellung. Mikrobewegungen der Fragmente gegeneinander, wie sie bei konservativer Therapie unweigerlich auftreten, behindern die natürliche Knochenbruchheilung nicht, da sie die Elastizität des sich selbst stabilisierenden Kallus nicht übersteigen. Sie sollen sich im Gegenteil eher günstig auf Kallusbildung und Frakturheilung auswirken¹¹⁹.

Bei Insuffizienz eines der geforderten Faktoren wie auch bei Vorliegen einer Infektion im Frakturgebiet wird die Frakturheilung beeinträchtigt. Resultieren kann zunächst eine verzögerte Frakturheilung, definiert als fehlende knöcherne Durchbauung 4-6 Monate nach Trauma, und in letzter Konsequenz eine Pseudarthrose (Falschgelenkbildung, Nonunion)^{16,83,87}.

Auf biochemischer Ebene sind eine Vielzahl von Mediatoren und Zytokinen in die verschiedenen Vorgänge der Frakturheilung involviert. Die hierzu vorliegenden Kenntnisse sind im Detail sehr umfangreich und zum Teil widersprüchlich. Eine hohen Stellenwert besitzen beispielsweise Prostaglandine, die im Granulations- und Kallusgewebe verstärkt freigesetzt werden¹⁴⁰, es wird eine verminderte Frakturheilung nach Gabe von NSAR beobachtet⁴⁹. Auch BMPs, TGF- β , FGF, PDGF und IGFs werden von aktivierten Osteoblasten und deren Vorläuferzellen exprimiert, sie sind auf auto- bzw. parakrinem Wege an zellulären Proliferations- und Differenzierungsvorgängen im Rahmen der Frakturheilung beteiligt^{2,3,14,118}. In der frühen posttraumatischen Phase konnte beispielsweise ein deutlicher Anstieg der osteoblastären Expression von BMP-4 beobachtet werden⁸⁹.

Erwähnt seien schließlich bioelektrische Phänomene. Diese treten als unterschiedliche Ladungsverteilung (positiv auf der Zug-, negativ auf der Druckseite) im biegebeanspruchten Knochen physiologisch auf. Während der Frakturheilung kommt es zur Zunahme negativer elektrischer Ladungen im Frakturbereich gegenüber gesunden Knochenabschnitten^{5,32}.

1.2.2 Die Pseudarthrose als wichtige Komplikation

Unter Pseudarthrose (Nonunion) versteht man die länger als 6-8 Monate andauernde fehlende knöcherne Vereinigung zweier Frakturenenden bzw. Fragmente. Dabei ist der „Brückenschlag“ zwischen den Frakturenenden unterblieben und eine spontane Heilung ist nicht mehr zu erwarten. Der sistierende Knochenheilungsprozess lässt sich allerdings durch geeignete Maßnahmen reaktivieren. Im Pseudarthrosespalt findet sich meist ein gefäßloses Bindegewebe ohne osteogene Potenz; zur Ausbildung eines „echten“ Falschgelenkes mit Pseudogelenkkapsel und Gelenkflüssigkeit kommt es sehr selten und nur nach längerem Bestehen dieses Zustandes.

Man unterscheidet angeborene von erworbenen Pseudarthrosen. Erstere treten meist im Rahmen von Skelettdysplasien, z.B. fibröser Dysplasie oder Osteogenesis imperfecta, auf. Die erworbenen Pseudarthrosen lassen sich nach morphologischen bzw. radiologischen Gesichtspunkten differenzieren, oft liegt eine typische eigene Pathogenese zugrunde. Prinzipiell handelt es sich um aseptische oder um infizierte Pseudarthrosen. Bei den aseptischen unterscheidet man darüber hinaus reaktive (vitale) von inaktiven (avitalen) Pseudarthrosen.

Reaktive (vitale) Pseudarthrosen sind biologisch reaktionsfähig, es liegt eine mehr oder weniger ausgeprägte Kallusbildung vor, die Fragmentenden berühren sich und können kolbenartig aufgetrieben sein (sog. Elefantenfuß-Pseudarthrose). Hier steht kausal die insuffiziente Ruhigstellung der Fraktur bei ausreichender Durchblutung der Fragmente im Vordergrund. Die Elastizitätsreserve des Kallus wurde also überschritten.

Inaktive (avitale, atrophe) Pseudarthrosen kommen durch Avitalität der Fragmente zustande und weisen eine insuffiziente Kallusbildung auf. Ursache ist meist eine lokale Minderperfusion im Frakturbereich. Derartige Pseudarthrosen treten gehäuft nach ausgedehnten Weichteilschädigungen mit Beeinträchtigung der periostalen

Durchblutung sowie nach Stückfrakturen auf. Eine Sonderform der inaktiven Pseudarthrose ist die Defektpseudarthrose, bei der aufgrund ausgedehnter knöcherner Substanzdefekte die osteoneogenetische Potenz des interponierten Gewebes überschritten ist und die knöcherne Vereinigung der Frakturrenden unterbleibt.

Bei bakterieller Kontamination der Fraktur (offene Verletzung, intraoperativ) kann die Kallusdifferenzierung infektionsbedingt erheblich beeinträchtigt werden. Des Weiteren kommt es zu Knochenresorptionsvorgängen im Bereich des Frakturspaltes und damit zur Ausbildung einer infizierten Pseudarthrose.

Prinzipiell kommen als Ursachen von Pseudarthrosen alle mechanischen und biologischen heilungsverzögernden Faktoren in Frage, wobei häufig eine sich gegenseitig beeinflussende Kombination beider Faktoren vorliegt.

Mechanische Faktoren sind fehlender Fragmentkontakt (Knochendefekt oder Frakturdistraction mit entsprechender Weichteilinterponation) und übermäßige Beanspruchung des Regenerats (z.B. durch wiederholte Reposition, ständige Bewegung im Frakturgebiet, einmalige oder dauernde Frakturierung des Kallus), wobei besonders fortlaufende Scherung und Stauchung problematisch sind. Bei der hypertrophen Pseudarthrose kommt es zu einem regelrechten „Wettlauf“ zwischen Kallusbildung und schleichender Kallusfraktur, da die Mobilität im Frakturspalt eine suffiziente Vaskularisierung und damit eine kontinuierliche Durchbauung verhindert.

Entscheidend ist nicht die grob makroskopische Ruhigstellung, sondern die Beanspruchung der Gewebe auf mikroskopischer Ebene und ihre mechanische Resistenz. Diese ist je nach Gewebeart (Stadium des Kallus) und Lage im Kallus sehr unterschiedlich, da mit zunehmender Heilung die Elastizität des Kallusgewebes kontinuierlich abnimmt, während die Eigenstabilität steigt. Die größte Vulnerabilität des Kallus zeigt sich in der beginnenden Phase der Mineralisation: Mikrobewegungen können vom Kallusgewebe noch nicht unterbunden werden, während sie u.U. die Elastizität des Kallus bereits überschreiten. Daher steigen zunächst die Anforderungen an die Ruhigstellung mit dem Differenzierungsstadium des Kallus.

Als biologische Faktoren in Betracht kommen Durchblutungsstörungen im Bereich der Knochenfragmente mit Devitalisierung einzelner Bruchstücke, Perfusionsstörungen des Periosts und angrenzender Weichteile, Infektionen sowie allgemeine Faktoren, die die Vitalität des Gewebes herabsetzen können. Zu nennen sind

u.a. fortgeschrittenes Lebensalter, arterielle Verschlusskrankheit, Rauchen, Diabetes mellitus und medikamentöse Dauerbehandlung. So können beispielsweise Zytostatika, Glukokortikoide, Hydantoine und NSAR zu einer verzögerten Frakturheilung führen^{16,83,113}.

1.2.3 Behandlungsmöglichkeiten der Pseudarthrose

Der Goldstandard der Pseudarthrosebehandlung ist das operative Vorgehen. Daneben gibt es alternative, nichtoperative Methoden, die i.d.R. erst bei (mehrmaligem) Versagen der operativen Therapie zum Einsatz kommen: extrakorporale Applikation von Stoßwellen (ESWL), Elektrostimulation sowie in den letzten Jahren niederenergetischer gepulster Ultraschall.

Die operative Vorgehensweise wird bestimmt durch eine exakte Analyse hinsichtlich der Ursachen: bei reaktiven Pseudarthrosen genügt meist eine (Re-) Osteosynthese mit höherer Stabilität. Das Anfrischen oder Resezieren des Pseudarthrosengewebes sowie Einbringen von Spongiosa ist meist nicht erforderlich.

Inaktive Pseudarthrosen erfordern neben der Stabilisierung eine Stimulation der Knochenneubildung. Hierzu muss das Narbengewebe im Pseudarthrosespalt entfernt werden und eine Anfrischung der Frakturzone oder eine Dekortikation der Hauptfragmentenden erfolgen. Zusätzlich ist i.d.R. eine autologe Spongiosaplastik erforderlich. Bestehen nach Resektion der Pseudarthrose größere Defekte (mehrere Zentimeter), kann eine Wiederherstellung der Länge u.a. mittels Segmenttransport (Kallusdistraction) erfolgen.

Infektpseudarthrosen erfordern meist ein mehrstufiges Vorgehen: zunächst Sanierung des Infektes an Knochen und Weichteilen (radikale Entfernung schlecht durchbluteten und infizierten Knochen- und Weichteilgewebes, systemische und lokale Antibiose) und Stabilisierung der Defektzone (bei florider Infektion i.d.R. mittels externer Fixation, nach Ausheilen der Infektion oft Verfahrenswechsel auf interne Fixation), anschließend Rekonstruktion von Weichteilen zur Schaffung eines gut durchbluteten Lagers für den später zu transplantierenden Knochen und letztlich die Rekonstruktion des Knochens.

Ziele der operativen Therapie sind Ausheilung der Pseudarthrose, Beseitigung von Fehlstellungen sowie Sanierung defekter Weichteilzonen^{27,87,113}.

Trotz Weiterentwicklung der Behandlungskonzepte und Osteosyntheseverfahren ist jedoch die Rate von Knochenheilungsstörungen in den letzten Jahren mit durchschnittlich 5% konstant geblieben⁶⁶.

Seit etwa 20 Jahren wird mit ESWL hoher Energiedichte (ursprünglich entwickelt zur Lithotripsie von Nierensteinen) experimentiert. Prospektive klinische Studien verschiedener Zentren ergeben Erfolgsraten von über 50% bei aseptischen reaktiven Pseudarthrosen^{38,131}, wobei der Einsatz meist an mehrfach erfolglos voroperierten Patienten erfolgte. Der Wirkmechanismus der Stoßwellenbehandlung von Pseudarthrosen konnte noch nicht eindeutig erklärt werden. Es gibt verschiedene widersprüchliche tierexperimentelle Studien, obgleich es tierexperimentell kein der humanen Pseudarthrosensituation vergleichbares Modell gibt^{26,30}. Zu beachten sind ferner die Kontraindikationen der ESWL (Gravidität, Gerinnungsstörungen, kindliche Frakturen in Epiphysenfugennähe) sowie die geringe Erfolgsrate der ESWL bei inaktiven und durch Skelettdysplasie bedingten Pseudarthrosen¹¹².

Aufgrund der Beobachtung bioelektrischer Phänomene - wie der Stimulierung von Knochenbildung durch elektrischen Strom auf Seiten der Kathode⁷ - begann man in den 70'er Jahren mit der Behandlung von Pseudarthrosen durch elektrische Stimulation. Verschiedene Methoden der Stromapplikation (invasiv mittels implantierter, nichtinvasiv mittels perkutaner Elektroden) und Signale unterschiedlicher Eigenschaften kamen an meist mehrfach voroperierten Pseudarthrosen zum Einsatz. Über Erfolgsraten von über 70% wurde berichtet^{6,10,22}. Zu einer breiteren klinischen Anwendung dieser Methode kam es jedoch nicht.

1.3 Niederenergetischer Ultraschall

1.3.1 Bisherige *in vitro* und *in vivo* Erkenntnisse

Die Untersuchungen wurden zum Teil mit unterschiedlichen Ultraschallsignalen (Frequenz, Intensität, gepulster oder kontinuierlicher Schall) durchgeführt. Bei

Verwendung des gleichen Ultraschallgerätes (Exogen) wie in den eigenen Versuchen wird im folgenden das Ultraschallsignal nicht näher charakterisiert.

Bei MC3T3-E1-Zellen, die einmalig einer 20minütigen Ultraschallexposition (1,5 MHz gepulst, 30 mW/cm²) ausgesetzt waren, konnte im Zeitraum von bis zu 3 Stunden nach Ultraschalleinfluss eine gesteigerte Expression von COX-2-mRNA mit konsekutiver Stimulation der PGE₂-Produktion (bis auf das dreifache 60 Minuten nach Beschallung) festgestellt werden⁶¹.

Die Ultraschallbehandlung (1 MHz gepulst, 50 und 120 mW/cm²) von primären Chondrozytenkulturen führte zu einem Anstieg des Gehaltes an Aggrecan-mRNA (bei beiden Schallintensitäten etwa gleich) sowie zur Stimulation der Proteoglykansynthese. Die Proliferationsrate der Chondrozyten sowie die Exprimierung von Prokollagen-mRNA wurde durch Ultraschall nicht beeinflusst⁹⁶.

Andererseits konnte anhand von Gewebekulturen (Kalvariaknochen der Maus) eine Stimulation der Synthese von Kollagen und nichtkollagenen Proteinen durch Ultraschall (3 MHz gepulst, verschiedene Intensitäten von 0,1 bis 1,2 W/cm²) nachgewiesen werden¹⁰⁵.

Die Ultraschallbehandlung (1 MHz gepulst sowie 45 kHz kontinuierlich, verschiedenste Intensitäten) führte bei humanen Osteoblasten sowie bei humanen Fibroblasten zur erhöhten Zellproliferation sowie zu einer gesteigerten Synthese kollagener und nichtkollagener Proteine. Auch konnte eine verstärkte Produktion von Zytokinen (IL-1 β) und angiogenese-assoziierten Wachstumsfaktoren (IL-8, bFGF) nachgewiesen werden^{19,104}.

Die Ultraschallbehandlung (Exogen) von Kokulturen humaner Osteoblasten (SaOS-2) und humaner Endothelzellen (HUVEC) zeigte eine gesteigerte PDGF-AB-Sekretion (gebildet von HUVEC), während die Beschallung von HUVEC-Monokulturen keinen Einfluss auf die PDGF-AB-Sekretion hatte. Die Sekretion von VEGF (gebildet von SaOS-2) wurde weder in Mono- noch in Kokultur durch Ultraschall beeinflusst⁴⁴.

Auch scheint Ultraschall (0,75 sowie 3,0 MHz kontinuierlich, 0,5 W/cm²) einen stimulativen Einfluss auf die Neubildung und Freisetzung von Wachstumsfaktoren durch Makrophagen zu besitzen¹⁴⁶.

Einen der grundlegenden Tierversuche führte Duarte²¹ durch: bei Kaninchen mit bilateraler Fibulaosteotomie sowie bilateralen Femurdefekten (Bohrlöcher) wurde auf der ultraschallbehandelten Seite (1,65 und 4,93 MHz gepulst, 50 mW/cm²) ein rascheres Erreichen der endgültigen Kallusgröße sowie ein reiferes und belastbareres Kallusgewebe beobachtet.

Anhand eines bilateralen Fibulaosteotomiemodells am Kaninchen konnte gezeigt werden, dass Ultraschall (Exogen) zu einer signifikant schnelleren Frakturheilung führt. Gesunden Knochen entsprechende biomechanische Parameter (Torsionssteifheit, maximales Drehmoment) wurden bei ultraschallbehandelten Frakturen 1,7 mal so schnell erreicht wie bei nichtultraschallbehandelten Kontrollfrakturen (17 Tage vs. 28 Tage)⁹⁸.

Bei einem Spondylodesemodell mit autologer Spongiosa am Kaninchen konnte eine erhöhte Fusionsrate sowie eine größere mechanische Steifheit bei den ultraschallbehandelten (Exogen) Spondylodesen beobachtet werden. Bezüglich der Größe der Fusionsmasse sowie des Reifegrades des Fusionsgewebes ergaben sich keine signifikanten Unterschiede³³.

Die Anwendung von Ultraschall (Exogen) nach der transkortikalen Implantation von porösen Titanimplantaten in Femora bei Hunden führte zur Steigerung der eingewachsenen Knochenmenge sowie der Einwachstiefe des Knochengewebes in das Implantat¹²⁸.

Anhand von bilateralen genagelten Femurfrakturmodellen an Ratten konnte unter Ultraschalleinfluss (0,5 MHz sowie 1,5 MHz gepulst, 30, 50 und 100 mW/cm²) eine Erhöhung von Torsionssteifheit und maximalem Drehmoment beobachtet werden. Bei Betrachtung des Genexpressionsmusters zeigte sich ein frühzeitigerer Peak des Gehaltes an Aggrecan mRNA (signifikant) und ein gleichartiges Muster bei Alpha1(II)-Prokollagen mRNA. Der mRNA-Gehalt von AP, Osteokalzin, TGF- β sowie Alpha1(I)-Prokollagen wurde durch Ultraschallbehandlung nicht signifikant beeinflusst. Auch wurden keine Veränderungen in Kalzium- und Kollagengehalt des Kallusgewebes festgestellt^{136,144,145}.

1.3.2 Klinische Anwendung

Mehrfach wurde über die Anwendung niederenergetischen Ultraschalls in der Behandlung von Frakturen und Knochenheilungsstörungen berichtet. Im folgenden soll kurz auf klinische Studien und Kasuistiken eingegangen werden, bei denen Ultraschall der gleichen Spezifität wie in den eigenen Versuchen verwendet wurde.

In einer multizentrischen, prospektiven, doppelblinden, plazebokontrollierten klinischen Studie⁶³ konnte bei konservativ behandelten frischen distalen Radiusfrakturen (61 Colles-Frakturen) eine signifikante Beschleunigung der Heilung durch Ultraschalleinsatz erzielt werden (Beschleunigung der klinischen bzw. radiologischen Heilung um 38% bzw. 36%). Auch das primäre Repositionsergebnis (Grad der palmaren Dislokation) wurde bis Behandlungsende bei den ultraschallbehandelten Frakturen signifikant besser gewahrt.

Bei konservativ behandelten Tibiafrakturen (67 geschlossene oder erstgradig offene frische Tibiaschaftfrakturen) konnte mit einer prospektiven, doppelblinden, plazebokontrollierten Studie eine signifikante Verkürzung der klinischen und radiologischen Heilungszeit (96 vs. 154 Tage) festgestellt werden³⁹.

Zu anderen Ergebnissen bei der Ultraschallbehandlung frischer geschlossener oder erstgradig offener Tibiaschaftfrakturen kommt Emami²⁸. Er konnte keine signifikante Beschleunigung der radiologischen Heilungszeit durch Ultraschall ermitteln (113 vs. 112 Tage). Mögliche Ursachen sind die primär operative Behandlung dieser Frakturen (Marknagelung), der nicht bekannte Einfluss des Marknagels auf das Ultraschallsignal sowie die deutlich kürzere Ultraschall - Behandlungszeit (75 Tage vs. 140 Tage bei Heckman).

Die retrospektive Auswertung der Daten von weltweit 1317 Patienten mit Frakturheilungsstörungen, die mit dem Exogen-Gerät behandelt wurden, ergab durchschnittliche Heilungsraten von 86% (366 Pseudarthrosen, Heilungszeit 152 Tage) bzw. 91% (951 verzögerte Frakturheilungen, Heilungszeit 129 Tage). Die geringsten Heilungsraten wiesen Pseudarthrosen des Humerus auf, während Kahnbein-Pseudarthrosen zu 100% heilten. Diese retrospektiv gewonnenen Daten weisen hinsichtlich der Heilungsrate und der Heilungszeit keine signifikanten Unterschiede zu den Ergebnissen einer prospektiven Studie von Mayr auf^{78,79}.

Mayr⁸⁰ stellt auch drei Kasuistiken von Patienten mit Pseudarthrosen bzw. verzögerter Frakturheilung dar. Es handelt sich um mehrfach revidierte Frakturen unterschiedlicher Lokalisation, die mit wiederholtem Wechsel des Osteosynthesematerials und autologer Spongiosaplastik ohne Erfolg versorgt wurden. Mit der Ultraschallbehandlung wurde 3, 9 und 14 Monate nach der jeweils letzten Revision begonnen, ohne die Therapiemodalitäten bis zum Abschluss der Behandlung zu ändern. In den beschriebenen Fällen kam es nach wenigen Monaten zur klinischen (Beschwerdefreiheit) und radiologischen Heilung (vollständige knöcherne Konsolidierung).

Verschiedene Kasuistiken berichten über den Einsatz der Ultraschalltherapie bei Stressfrakturen der Tibia bei Leistungssportlern. Erreicht wurde eine signifikante Reduktion der Schmerzen sowie bessere funktionelle Parameter, was den Verbleib im Trainings- und Wettkampfgeschehen oder aber eine deutliche Verkürzung der Trainingspause ermöglichte^{9,45}.

Durch Ultraschalleinsatz bei insuffizienter Kallusformation im Rahmen einer Beinverlängerung mittels Kallotaxis konnte bei gleichbleibender Distraktionsrate eine Steigerung des Mineralgehaltes des Kallusgewebes erzielt werden¹²¹.

Auch zur Behandlung von Osteoradionekrose der Mandibula wurde niederenergetischer gepulster Ultraschall nach vorangehendem Debridement und Defektdeckung durch lokale Lappen erfolgreich eingesetzt³⁷. Die Rate an Mandibularesektion und Rekonstruktion konnte gesenkt werden. Das in dieser Studie verwandte Ultraschallsignal unterschied sich jedoch von den o.g. Studien, insbesondere hinsichtlich der hier größeren Intensität (1W/cm², 3MHz, gepulst).

Ökonomische Folgen einer frühzeitigen Ultraschallbehandlung wurden am Beispiel der Behandlung geschlossener und erstgradig offener Tibiafrakturen in den USA beleuchtet⁴⁰. Über eine Kostenersparnis von 40% bei primär konservativ behandelten Frakturen sowie von 33% bei allen (konservativ und primär operativ behandelten) Frakturen wurde berichtet. Ein noch größeres Einsparpotential soll sich bei Vorliegen von Risikofaktoren (insbesondere Rauchen) ergeben. Die wichtigsten Einsparquellen sind entfallende Re-Operation bei verzögerter Heilung bzw. Pseudarthrose, geringeres Krankengeld aufgrund der kürzeren Heilungszeit sowie niedrigere ambulante Folgekosten.

2 Material und Methoden

2.1 Ultraschall-Versuchsapparatur

2.1.1 Ultraschallgerät EXOGEN SAFHS Modell 2A

Geräteteile

Das SONIC ACCELERATED FRACTURE HEALING SYSTEM (SAFHS, Exogen, Dießen) besteht aus einer 220 Volt-betriebenen Zentraleinheit und einem normalerweise batteriebetriebenen Beschallungskopf. Es wurden zwei vom Hersteller modifizierte Schallköpfe verwendet, welche mit Gleichstrom (40 mA bei 10,8 V) von einem separaten Netzteil (PS-303 D, Conrad, Frankfurt) versorgt wurden. Die Zentraleinheit, über ein Glasfaserkabel mit dem Beschallungskopf verbunden, steuert die 20minütige Behandlungszeit und kontrolliert die sachgerechte Applikation des Ultraschalls. So wird beispielsweise bei mangelndem Anpressdruck des Schallkopfes, ungeeigneter Menge an aufgetragenem Ultraschall-Kontaktgel oder fehlerhafter Stromversorgung ein Warnsignal abgegeben und die Behandlung automatisch unterbrochen. Die korrekte Übertragung des Ultraschalls zur Petrischale wurde zu Beginn der Versuche durch Messungen der Firma Exogen sichergestellt. Das abgegebene Ultraschallsignal ist speziell gepulst und besonders niederenergetisch, vergleichbar mit der Intensität diagnostischen Ultraschalls.

Technische Spezifikationen des SAFHS - Ultraschallsignals

Ultraschallfrequenz	1,5 MHz
Signalimpulsdauer	0,2 ms
Repetitionsrate	1 kHz
Durchschnittliche Schallintensität	30 mW/cm ² (SATA)
Durchschnittliche Fläche/maximale Zeit	161 mW/cm ² (SATM)
Effektiv abstrahlende Fläche	3,88 cm ²
Zeitbezogene Durchschnittsleistung	117 mW
Zeitbezogene Maximalleistung	625 mW
Höchstleistung	1,25 W

2.1.2 Aufbau der Inkubationskammer

Die Ultraschallbehandlungen fanden in einer Inkubationskammer aus 4 cm starkem Styropor statt. Eine selbstgefertigte Beheizung sorgte für eine konstante Temperatur von 37°C. Hierzu wurde ein Thermostat-Unterwasserheizer (Thermal Compact, 50 Watt, Hagen Deutschland GmbH) in einen mit Aqua dest. gefüllten Hohlzylinder aus Polypropylen wasserdicht eingelassen. In der Kammer befanden sich zwei Ultraschallköpfe sowie eine Ablage für zwei nicht zu beschallende Kontrollkulturen. Für die Übertragung des Ultraschalls zur Petrischale sorgte Kontaktgel (Coupling Gel, Exogen, Dießen).



Abb. 1 und 2: Ultraschall-Versuchsanordnung

2.2 Zellkulturtechnik

2.2.1 Nährmedien, Zusätze und Puffer

Alle Medien und Reagentien wurden vor der Verwendung an Zellkulturen im Wasserbad (Köttermann, Uetze-Hänigsen) auf 37°C erwärmt.

Dulbecco's Modified Eagles Medium mit Gerinnungsfaktor 12 (DMEM / HAM'S F-12)

Dem fertigen Flüssigmedium (mit stabilem Glutamin, Biochrom, Berlin) wurden 10% FCS, 1% Penicillin-/Streptomycin-Lösung und 0,1% Fungizone-Lösung zugesetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Unmittelbar vor Gebrauch wurden je 1% Ascorbinsäure- und β -Glycerophosphat-Lösung zugefügt. Das Medium diente zur Versorgung der aus humaner Beckenkammpongiosa gewonnenen Zellen.

MEM α -Medium

Dem fertigen Flüssigmedium (ohne Ribonukleoside und Deoxyribonukleoside, mit L-Glutamin, GIBCO BRL (Life Technologies), Karlsruhe) wurden 10% FCS und 1% Penicillin-/Streptomycin-Lösung zugesetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Das Medium wurde zur Versorgung der MC3T3-E1 - Zellen verwendet.

Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)

Dem fertigen DME-Flüssigmedium (Biochrom, Berlin) wurden 10% FCS und 1% Penicillin-/Streptomycin-Lösung zugesetzt. Die Lagerung folgte bei 4°C. Das Medium diente zur Versorgung der L-929 - Fibroblasten.

FCS

Das fetale Kälberserum (steril filtriert, PAN, Aidenbach) wurde in 50 ml-Zentrifugenröhrchen aliquotiert und bei -20°C gelagert. Nach 30minütiger Inaktivierung bei 56°C wurde es dem Nährmedium mit 10%iger Konzentration [v/v] zugefügt.

Penicillin-/Streptomycin-Lösung

Die gebrauchsfertige Antibiotikalösung (steril filtriert, PAN, Aidenbach) enthält 10 mg Streptomycin sowie 10.000 Units Penicillin je 100 ml und wurde dem Nährmedium in einer Konzentration von 1% [v/v] zugesetzt. Lagerung bei -20°C .

Fungizone-Lösung

Die gebrauchsfertige Lösung (GIBCO BRL (Life Technologies), Karlsruhe) enthält Amphotericin B in einer Konzentration von 250 $\mu\text{g/ml}$. Das Antimykotikum wurde dem Nährmedium in einer Konzentration von 0,1% [v/v] zugesetzt. Lagerung bei -20°C .

Ascorbinsäure

Zur Herstellung einer Lösung mit der Konzentration 5 mg/ml wurden 250 mg L(+)-Ascorbinsäure ($M=176,13$ g/mol, Merck, Darmstadt) in 50 ml Aqua dest. gelöst und steril filtriert, anschließend in 1 ml- Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Dem Medium wurde die Ascorbinsäurelösung in der Verdünnung 1:100 [v/v] jeweils frisch zugesetzt.

β -Glycerophosphat

Eine 1 molare β -Glycerophosphatlösung wurde durch Lösen von 14,86 g β -Glycerophosphat (Dinatriumsalz mit 4,5 mol Kristallwasser, 216,0 g/mol, Sigma, Taufkirchen) in 50 ml Aqua dest. hergestellt. Nach steriler Filtration und Aliquotierung in 1 ml- Reaktionsgefäße erfolgte die Aufbewahrung bei -20°C . Dem Medium wurde die β -Glycerophosphatlösung in der Verdünnung 1:100 [v/v] jeweils frisch beigefügt.

Der Zusatz von Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat zum DMEM / HAM'S F-12 - Medium diente der Stimulation von Proliferation und Differenzierung osteoblastärer Zellen.

DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered Saline) -Puffer

Eingesetzt wurde der gebrauchsfertige Puffer (ohne Mg^{2+} , ohne Ca^{2+} , steril filtriert, PAN, Aidenbach) zum Entfernen von Mediumresten aus Zellkulturflaschen und Petrischalen, als Transport- und Spülflüssigkeit für frisch explantierte Beckenkamm-spongiosa sowie als Verdünnungsflüssigkeit.

NaCl	120 mM
KCl	2,7 mM
Phosphatpuffersalze (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4)	10 mM
pH bei 25°C	7,4

Accutase

Die gebrauchsfertige Lösung (in DPBS mit 0,5 mM EDTA, PAA, Cölbe) diene zum Ablösen von Zellen aus Petrischalen bzw. Kulturflaschen. Accutase besitzt Protease- und Kollagenase-Aktivität. Lagerung bei $-20^{\circ}C$.

Trypsin

Die Trypsin/EDTA-Lösung (10fach konzentriert, 0,5% Trypsin, 0,2% EDTA, Biochrom, Berlin) wurde mit PBS 1:10 verdünnt, in 50 ml- Zentrifugenröhrchen aliquotiert und bei $-20^{\circ}C$ gelagert. Das Reagenz wurde zum Ablösen von Primärkulturen humaner Beckenkammzellen (erste Passage) verwendet.

2.2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte

Zentrifuge	Universal 30 RF mit Ausschwingrotor (Hettich, Tuttlingen) Biofuge 13 (Heraeus, Hanau)
Brutschrank	B 5060 EK/CO ₂ , 212 Liter (Heraeus, Hanau)
Sterilbank	Lamin Air TL 2448 (Heraeus, Hanau)
Photometer	Tecan Rainbow, Software: easyWIN fitting (Tecan, Crailsheim)

Mikroskop	DMRD (Leica, Ismaning)
Pipetten	Research (Eppendorf, Hamburg); sterile Pipettenspitzen und sterile Einwegpipetten aus Polypropylene (Corning Costar, Bodenheim)
Isopropanol-Box	Cryo 1°C Freezing Container (Nalge, Darmstadt)

Verbrauchsmaterialien

Petrischalen	Falcon-Standard-Petrischale, Polystyrol, d=35 mm (Becton Dickinson, Heidelberg), verwendet für alle Zellkulturversuche
Kulturflaschen	Easy Flask, Filterkappenverschluss, 75 cm ² Kulturoberfläche, 25 ml (Nunc, Wiesbaden)
Reaktionsgefäße	1 ml (Eppendorf, Hamburg)
Zentrifugenröhrchen	50 ml, konisch, Polypropylene, Falcon (Becton Dickinson, Heidelberg)
Kryo-Röhrchen	2 ml, Polypropylene (Hartenstein, Würzburg)
Zählröhrchen	Polystyrol, d = 22 mm, h = 65 mm (Hartenstein, Würzburg)
Mikrotiterplatten	96 well, Polystyrol (Corning Costar, Bodenheim)
Film	Ektachrome 100 HC (Kodak, Stuttgart)
Neutralrot	0,5%ige Lösung in Acetatpuffer, pH 5,2 (Sigma, Taufkirchen)
Glycerogelatine	Sigma, Taufkirchen

Spezielle Materialien und Chemikalien sind bei den einzelnen Versuchen aufgeführt.

2.2.3 Zell-Linien

MC3T3-E1 murine Fibroblasten-Linie mit Potenz zur osteogenen Differenzierung *in vitro*, isoliert aus fetaler Kalvaria, immortal

L-929 murine Fibroblasten-Linie ohne osteogene Potenz, isoliert aus subkutanem Bindegewebe, immortal

2.2.4 Gewinnen von Zellen aus humaner Beckenkammpongiosa

Als Ausgangsmaterial für Primärkulturen osteoblastärer Zellen (in dieser Arbeit als „humane Beckenkammzellen“ bezeichnet) wurden Spongiosastückchen aus humanem Beckenkamm genutzt. Autologe Beckenkammpongiosa wird in der rekonstruktiven Knochenchirurgie zur Füllung ossärer Defekte und Reaktivierung von sistierenden Knochenheilungsprozessen verwendet. Bei den Spendern handelte es sich um 10-22jährige weibliche und männliche Patienten.

Die explantierten Knochenstückchen wurden in 50 ml- Zentrifugenröhrchen mit Transportmedium (25 ml DPBS, 1% Penicillin-/Streptomycin-Lösung, 15.000 i.E. Heparin) überführt und binnen einer halben Stunde wie folgt weiterverarbeitet:

- Absaugen des Transportmediums
- fünfmaliges Spülen mit 35 ml PBS, um anhaftendes Blut zu entfernen
- Zerkleinerung der Knochenstückchen mittels Skalpell
- Auslegen der Spongiosastückchen von etwa 1 mm³ Größe in Petrischalen, Überschichten mit Nährmedium, Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ -Atmosphäre
- erster Mediumwechsel nach vier Tagen, dann im zweitägigen Intervall.

Nach 14tägiger Inkubation wurden die ausgesprossenen Zellen erstmals passagiert:

- vollständiges Absaugen des Mediums und der Spongiosastückchen
- Spülen der Petrischalen mit 2 ml PBS, um nichtadhärente Zellen und Zellfragmente zu entfernen
- Ablösen der Zellen mit 1 ml Trypsin bei 5minütiger Inkubation im Brutschrank
- Aufnehmen der Zellsuspension in einer äquivalenten Menge DMEM in 50 ml-Zentrifugenröhrchen, 5 Minuten Zentrifugation bei 150 G
- Abnehmen des Überstandes, Waschvorgang: Aufnehmen des Pellets in 10 ml DMEM, 5 Minuten Zentrifugation bei 150 G
- Abnehmen des Überstandes, Resuspension des Pellets in 10 ml DMEM
- Zellzählung mit 10 µl der Zellsuspension, Verteilung der restlichen Suspension je nach Zellgehalt auf mehrere Kulturflaschen, Auffüllen mit Medium auf 25 ml.

Der Mediumwechsel erfolgte im zweitägigen Intervall. Die Ernte von Passage I und das Einfrieren der Zellen erfolgte am siebten oder achten Kultivierungstag.

2.2.5 Konservieren von Zellen in Flüssigstickstoff

Ernten und Einfrieren von Zellen

Das Einfriermedium wurde hergestellt aus 90 % Nährmedium sowie 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid, steril filtriert, Sigma, Taufkirchen) und in 50 ml-Zentrifugenröhrchen bei -20°C gelagert. Die Art des dabei verwendeten Nährmediums richtete sich nach den Anforderungen der einzufrierenden Zellen.

Das Medium wurde vollständig abgesaugt, die Zellkulturen einmal mit PBS gespült, mit Trypsin überschichtet und 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Zellsuspension wurde nun in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Nährmedium überführt und zentrifugiert (150 G, 5 min, Raumtemperatur). Nach Abnehmen des Überstandes Resuspension des Sedimentes in 10 ml Nährmedium und erneutes Zentrifugieren (Waschvorgang). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml Nährmedium aufgenommen und in ein Kryo-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 1 ml Einfriermedium wurden die Kryo-Röhrchen zunächst in einer Isopropanol-Box bei -80°C für ein bis zwei Wochen vorgekühlt und anschließend in einem Flüssigstickstoff-Tank (-196°C) gelagert.

Auftauen von Zellen

Verwendung fanden nur Zellen, die nicht länger als ein Jahr bei -196°C gelagert waren. Die aufzutauenden Kryo-Röhrchen wurden vom Flüssigstickstoff in ein 37°C -Wasserbad überführt. Die aufgetaute Zellsuspension wurde dann in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben, 10 ml Nährmedium zugefügt und zentrifugiert (150 G, 5 min, Raumtemperatur). Nach einem Waschvorgang zur Eluierung restlichen Einfriermediums wurden die Zellen resuspendiert und nach einer Zellzählung zum Anlegen neuer Kulturen verwendet.

2.2.6 Zellzählung

Die Konzentrationsbestimmung von Zellsuspensionen erfolgte mit dem CASY 1 Cell-Counter and Analyzer System, Modell TTC (Schärfe Systeme, Reutlingen). Die Zellen wurden in einem schwachen Elektrolyten (Aqua isotona III, Beckman Coulter, Krefeld) suspendiert und mit konstanter Geschwindigkeit durch eine 150 µm - Messkapillare gesaugt. Die Bestimmung erfolgte nach den Prinzipien der Widerstandsmessung (intakte Zellen fungieren als elektrische Isolatoren) und Pulsflächenanalyse. Es wurde ein Messbereich zwischen 0 und 30 µm vorgewählt und das Messfenster für lebende Zellen, orientierend an der Normalverteilung der Zellgröße, zwischen 12 und 30 µm festgelegt. Je Probe wurden automatisch vier Einzelmessungen mit Volumina von je 200 µl durchgeführt und anschließend der Mittelwert gebildet. Mittels Auswertungssoftware CASYstat (Schärfe Systeme, Reutlingen) wurde der Verdünnungsfaktor eingerechnet und die Zellzahl pro 1 ml unverdünnter Suspension angegeben.

Die Zellen wurden in ein definiertes Volumen an Nährmedium aufgenommen und die Suspension durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut homogenisiert. Von dieser Zellsuspension wurden 10 µl in ein Zählröhrchen mit vorgelegten 990 µl Aqua isotona pipettiert. Nach mehrmaligem Schwenken wurde die Messung durchgeführt.

2.2.7 Beimpfen der Petrischalen und Kultivierung

Nach Auftauen der Zellen und anschließendem Waschvorgang erfolgte die Resuspendierung in 10 ml Medium. Nach Zellzählung wurde die Zellsuspension mit Nährmedium auf die gewünschte Zielkonzentration verdünnt. Diese betrug 25.000 Zellen / ml bei den Versuchen zur Bestimmung der Alkalische-Phosphatase-Aktivität, des Proteingehaltes, der von Kossa-Färbung und der mRNA-Präparation. Bei den WST-1-Versuchen wurden 50.000 Zellen / ml eingesetzt. Die Petrischalen wurden mit 2 ml der Zellsuspension beimpft, das Medium wurde alle zwei Tage vollständig gewechselt. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre.

2.3 Quantifizierung der Zellproliferation / Zellvitalität mittels WST-1-Assay

Bei der Substanz WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisulfonat) handelt es sich um ein Tetrazolium-Salz, welches durch mitochondriale reduzierende Enzyme (NADH-Dehydrogenase) durch Öffnen des Tetrazol-Ringes zu Formazan reduziert wird. Die dabei erfolgende Farbänderung von Hellrot nach Dunkelrot gestattet eine photometrische Quantifizierung der Enzymaktivität bei einem Absorptionsmaximum des Formazans bei etwa 440 nm. Als Reduktionsmittel dient zelluläres NADH, welches zu NAD^+ oxidiert wird. Da die Anzahl vitaler Zellen einer Kultur direkt mit der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen korreliert, kann man von der gemessenen Absorption auf die Menge metabolisch aktiver Zellen, also auf Zellproliferation bzw. Zellvitalität schließen.

Nach vollständigem Absaugen des verbrauchten Mediums wurden 1000 μl frisches Medium sowie 10 μl WST-1-Reagenz (gebrauchsfertig in PBS gelöst, Roche Diagnostics, Mannheim) in die Petrischalen gegeben, es folgte eine 30minütige Inkubation im Brutschrank. Für eine gute Durchmischung des gebildeten Formazans mit dem Medium sorgte ein Schüttelgerät, auf dem die Petrischalen nach der Inkubation für eine Minute belassen wurden. Anschließend wurde mit jeweils 100 μl der Lösung die Absorption bei einer Wellenlänge von 440 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm bestimmt (Verwendung von 96-well-Mikrotiterplatten, Dreifachbestimmung). Bei allen Messreihen wurde der Leerwert (Petrischale ohne Zellen, 1000 μl Medium, 10 μl WST-1-Reagenz) mitbestimmt.

Aufbau der WST-1-Versuche

Der Test wurde mit humanen Beckenkammzellen (Passage I) sowie mit MC3T3-E1 - und L-929 - Zellen durchgeführt. Nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens wurde mit der Ultraschallbehandlung begonnen. Bei der MC3T3-E1 – sowie bei der L-929 – Linie war das 3 Tage nach Aussaat der Fall, bei den humanen Beckenkammzellen 6 Tage nach Aussaat. Bei den durchgeführten Versuchen wurden jeweils 30 Zellkulturen

beschallt, 30 Zellkulturen dienten als Kontrollen, die nicht mit Ultraschall behandelt wurden. Je 5 Kulturen einer Versuchsreihe wurden zu einer Gruppe zusammengefasst und ein- bis sechsmal beschallt (siehe Tabelle). Der WST-1-Assay wurde 24 (\pm 2) Stunden nach der jeweils letzten Ultraschallbehandlung durchgeführt.

Versuchsschema für den WST-1-Assay

Gruppe		Tag					
		1	2	3	4	5	6
MC3T3-E1, L-929	<i>humane Beckenkamm- zellen</i>						
0	0	Zellaussaat (100.000 Zellen/Petrischale)					
1-2	1-5	Zellkultivierung bis zur Konfluenz					
3	6	⚡	⚡	⚡	⚡	⚡	⚡
4	7	⊠	⚡	⚡	⚡	⚡	⚡
5	8		⊠	⚡	⚡	⚡	⚡
6	9			⊠	⚡	⚡	⚡
7	10				⊠	⚡	⚡
8	11					⊠	⚡
9	12						⊠
Summe ⚡		1	2	3	4	5	6

⚡ Ultraschallbehandlung

⊠ WST1-Assay

2.4 Ermittlung des Proteingehaltes nach Bradford

Der Proteingehalt wurde photometrisch nach der Bradford-Methode⁸ bestimmt. Als Farbstoff diente Coomassie Brilliant Blue G-250, das bei Proteinbindung (Anlagerung von Cu^{2+} an Peptidbindungen) sein Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm ändert. Anhand einer zuvor erstellten Eichgeraden mit Lösungen von Rinderserumalbumin (Sigma A-7906, FraktionV) wurden die Proteinkonzentrationen der Zellkulturen ermittelt.

Nachdem das Medium abgesaugt und die Kulturen dreimal mit 2 ml PBS gewaschen wurden, folgte eine zehnminütige Inkubation mit 1 ml Accutase im Brutschrank. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml - Reaktionsgefäß überführt und 5 Minuten zentrifugiert (150 G, Raumtemperatur). Nach einem Waschvorgang mit Medium und Abnehmen des Überstandes wurde das Zellpellet zwei bis drei Wochen bei -20°C bis zur Weiterverwendung gelagert.

Nach dem Auftauen wurden die Zellen in 1000 μl PBS resuspendiert und gevortext. Von dieser Suspension wurden 100 μl in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, 10 μl 20%iges NaOH [w/v] (Merck, Darmstadt) für die Lyse zugesetzt und 1 Stunde bei 80°C inkubiert. Nach zehnminütiger Abkühlzeit wurde das Lysat mit 10 μl 20%igem HCl [w/v] (Merck, Darmstadt) neutralisiert. Es folgte die Beimischung von 1000 μl Bradford-Reagenz und zehnminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend photometrische Bestimmung der optischen Dichte mit 200 μl der Lysat-Bradford-Mischung bei einer Wellenlänge von 592 nm (Verwendung von 96 well Mikrotiterplatten, Dreifachbestimmung). Bei jeder Messreihe wurde eine Leerwertbestimmung mit 100 μl PBS anstelle des Zell-Lysates durchgeführt.

Bradford-Reagenz 100 mg Brillant Blau G-250 (Roth, Karlsruhe)
 50 ml Ethanol p.a. absolut
 100 ml 85%ige ortho-Phosphorsäure (Roth, Karlsruhe)
 850 ml aqua bidest.

2.5 Bestimmung der spezifischen Alkalische-Phosphatase-Aktivität

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase kann photometrisch über den Umsatz von p-Nitrophenylphosphat zu p-Nitrophenol (Absorptionsmaximum bei 405 nm) anhand einer Standard-Eichgeraden bestimmt werden. Zur Erstellung der Eichgeraden wurden 0 bis 200 mM p-Nitrophenol-Lösungen verwendet.

Bezieht man die AP-Aktivität einer Zellkultur auf deren Proteingehalt, erhält man die spezifische AP-Aktivität:

$$\text{spezif. AP-Aktivität [U/mg]} = \frac{\text{AP-Aktivität } [\mu\text{mol p-NP-P/min}]}{\text{Proteinmenge nach Bradford [mg Protein]}}$$

Die bei -20°C gelagerten Zellpellets (identisch mit den zur Proteinbestimmung verwendeten Proben) wurden aufgetaut, in $1000\ \mu\text{l}$ PBS resuspendiert und gevortext. In einem neuen Reaktionsgefäß ($1,5\ \text{ml}$) wurden $100\ \mu\text{l}$ der erhaltenen Zellsuspension und $400\ \mu\text{l}$ Lysepuffer gemischt und $1\ \text{h}$ bei 37°C auf einem Schüttelgerät (GLW, Würzburg) inkubiert. Danach Verdünnen mit $100\ \mu\text{l}$ Aqua dest. und Beenden der Reaktion mit $400\ \mu\text{l}$ $50\ \text{mM}$ NaOH sowie Abzentrifugieren von Zellfragmenten ($5\ \text{min}$, $13.800\ \text{G}$, Raumtemperatur, Heraeus Biofuge 13). Mit $200\ \mu\text{l}$ des Zentrifugats erfolgte die photometrische Bestimmung bei einer Wellenlänge von $405\ \text{nm}$ (Verwendung von 96 well Mikrotiterplatten, Dreifachbestimmung). Bei jeder Messreihe wurde eine Leerwertbestimmung ($100\ \mu\text{l}$ PBS statt der Zellsuspension) durchgeführt.

Lysierungspuffer $2\ \text{mg/ml}$ p-Nitrophenylphosphat (Merck, Darmstadt) in
 $0,75\ \text{M}$ 2-Amino-2-methyl-1-propanol (Sigma, Taufkirchen)

Versuchsschema für die AP-/Bradford-Bestimmungen

Gruppe Tag	1	2	3	4	5	6
0	Zellaussaat (50.000 Zellen/Petrischale)					
1-9	Zellkultivierung					
10	⚡	⚡	⚡	⚡	⚡	⚡
11	⊠	⚡	⚡	⚡	⚡	⚡
12		⊠	⚡	⚡	⚡	⚡
13			⊠	⚡	⚡	⚡
14				⊠	⚡	⚡
15					⊠	⚡
16						⊠
Summe ⚡	1	2	3	4	5	6

⚡ Ultraschallbehandlung

⊠ Gewinnung der Zellen zur Bestimmung der spezifischen AP-Aktivität

2.6 Darstellung von Kalzium-Salzen: Färbung nach von Kossa

Die Methode nach von Kossa ist eine (histologische) Färbetechnik zur qualitativen Untersuchung der Mineralisation von Knochengewebe, welche sich auch zum Nachweis von Mineralisation in Zellkulturen eignet. Dabei werden Kalziumionen in den Karbonaten und Phosphaten der anorganischen Interzellulärsubstanz gegen Silberionen ausgetauscht, welche anschließend zu metallischem Silber reduziert werden. Kalkhaltige Areale imponieren dann als schwarz-braune Knötchen.

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellkulturen zweimal mit je 2 ml PBS gewaschen und drei Minuten mit 1 ml 3%igem [w/v] Glutardialdehyd (Merck, Darmstadt) fixiert. Es folgte zweimaliges Spülen mit je 2 ml Aqua dest. und Lufttrocknung bei Raumtemperatur. Die Präparate wurden nun mit 1 ml 5%iger [w/v] Silbernitratlösung (Merck, Darmstadt) überschichtet und eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Es schloss sich an zweimaliges Spülen mit 2 ml Aqua dest. und Zugabe von 1 ml einer Reduktionslösung, die nach zweiminütiger Inkubation abgesaugt wurde. Nach Spülen mit Aqua dest. folgte die zweiminütige Fixierung der Färberesultate mit 1 ml 5%iger [w/v] Natriumthiosulfatlösung (wasserfrei, Merck, Darmstadt), danach wurde ausgiebig mit Aqua dest. gespült. Abschließend folgte eine Gegenfärbung mit 1 ml Neutralrot, gründliches Spülen mit Aqua dest. und Eindeckung mit Glycerogelatine und einem Deckgläschen. Die Färbeergebnisse wurden fotografisch dokumentiert.

Reduktionslösung 5 g Na_2CO_3 (wasserfrei, ICN, Eschwege) in
75 ml Aqua dest. und 25 ml Formaldehydlösung (37%ige
Lösung in Wasser, stabilisiert mit 10% Methanol, Merck)

Aufbau der Versuche zur Darstellung der Mineralisation

Der Versuch wurde mit konfluenten Kulturen humaner Beckenkammzellen, Passage I, durchgeführt. Mit der Beschallung wurde am Tag 14 der Kultivierung begonnen. Es wurden 30 Zellkulturen beschallt, ebenso viele Zellkulturen dienten als nichtultraschallbehandelte Kontrollen. Jeweils 15 Kulturen (bezeichnet als Gruppe 1)

wurden dreimal, 15 weitere Kulturen (Gruppe 2) sechsmal beschallt. Die Färbung nach von Kossa wurde einen Tag nach der letzten Ultraschallbehandlung durchgeführt.

Versuchsschema für die von-Kossa-Färbungen

Gruppe	1	2
Tag		
0	Zellaussaat (50.000 Zellen/Petrischale)	
1-13	Zellkultivierung	
14	⚡	⚡
15	⚡	⚡
16	⚡	⚡
17	☒	⚡
18		⚡
19		⚡
20		☒
Summe ⚡	3	6

⚡ Ultraschallbehandlung

☒ von-Kossa-Färbung

2.7 Zytochemische Alkalische-Phosphatase-Färbung

Verwendung fand ein gebrauchsfertiger Test (ALP 86-C, Sigma Diagnostics, Taufkirchen). Nach zweimaligem Waschen mit 2 ml PBS wurden die Zellkulturen 30 Sekunden fixiert, dann mehrmals mit Aqua dest. gespült. Es folgte die Zugabe von 1 ml Färbeansatz und 15minütige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur. Anschließend wiederholtes Spülen mit Aqua dest. und Gegenfärbung mit 1 ml Neutralrot. Nach gründlichem Spülen mit Aqua dest. erfolgte die Eindeckung mit Glycerolgelatine und einem Deckgläschen. Die Färbeergebnisse wurden fotografisch dokumentiert.

- Fixans:
- 25 ml Citratlösung (Sigma Diagnostics, Taufkirchen)
 - 65 ml Aceton (Merck, Darmstadt)
 - 8 ml Formaldehyd 37% (Merck, Darmstadt)

Färbeansatz (Sigma): 100 µl alkalische FBB-Lösung
 100 µl Natriumnitrit-Lösung
 4,5 ml Aqua dest.
 100 µl alkalische Naphthol AS-BI-Lösung

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Isolierung von mRNA aus Kulturen humaner Beckenkammzellen⁴

Nach Zerstörung der Zellintegrität lässt sich aus dem homogenen Zell-Lysat die mRNA spezifisch isolieren: messenger RNA entsteht im Zellkern durch Modifizierung des primären Transkriptionsproduktes, der hnRNA. Diese posttranskriptionale Modifikation umfasst neben Anheften einer Cap-Gruppe am 5'-Ende und Herausschneiden der Introns (Spleißen) eine Polyadenylierung des 3'-Endes. Im Gegensatz zur übrigen RNA (hnRNA, tRNA, rRNA u.a.) besitzen also die mRNA-Moleküle von Säugerzellen an ihren 3'-Termini poly(A)-Sequenzen. Diese ermöglichen die affinitätschromatographische Trennung von der zellulären gesamt-RNA mittels Oligo(dT)-Zellulose. Die Abtrennung anderer Zellbestandteile (z.B. Membranen, Proteine) erfolgt zuvor durch Zentrifugation.

Materialien und Reagentien zur mRNA-Isolierung

MicroPoly(A)Pure-Kit, Ambion (ams, Wiesbaden)

Lyse-Lösung

Bindungspuffer

Waschpuffer

Verdünnungspuffer 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5

Elutionspuffer 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5

Präzipitationslösung 5 M NH₄OAc

Glycogenlösung 5 mg/ml

Nucleasefreies Wasser mit 0,1 mM EDTA

Oligo(dT)-Zellulose-Cups

Cups mit spin columns

100%iges Ethanol

Reaktionsgefäße	Safe-Lock, 1,5 ml und 2,0 ml, RNase-frei (Eppendorf, Hamburg)
Filterspitzen	RNase-frei, DNase-frei (Biozym, Hess. Oldendorf)
Zentrifuge	soweit nicht anders vermerkt Biofuge13 (Heraeus, Hanau), bei Raumtemperatur

Vorbereitend wurden Präparationslösungen und benötigte Materialien auf Eis gestellt.

- Zellernte, ein Waschvorgang
- Gabe von 250 µl Lyse-Lösung auf das Zellpellet, sofort 1minütiges Vortexen
- Zufügen von 500 µl Verdünnungspuffer, Durchmischen
- Überführen des Lysates in ein Reaktionsgefäß, Zentrifugation (13.800 G, 15 min, 4°C, Heraeus Labofuge 400 R)
- Überführen des Überstandes in ein Oligo(dT)-Zellulose-Cup, gute Suspendierung
- Überführen des Gemisches in neues Reaktionsgefäß, 60 Minuten invertieren
- 3minütige Zentrifugation bei 730 G, Verwerfen des Überstandes
- dreimal nacheinander:
 - Zugabe von 1 ml Bindungspuffer, kurzes Vortexen
 - Zentrifugation (730 G, 3 min)
 - Abnehmen und Verwerfen des Überstandes
- dreimaliger Waschvorgang:
 - Aufnahme der Oligo(dT)-Zellulose in 1ml Waschpuffer
 - Zentrifugation (730 G, 3 min)
 - Abnehmen und Verwerfen des Überstandes
- Aufnehmen der Oligo(dT)-Zellulose in 0,5 ml Waschpuffer
- Überführen in ein Spin Column, Zentrifugation (13.800 G, 15 sec)
- Verwerfen des Durchlaufes, weiterer Waschvorgang mit 0,5 ml Waschpuffer
- photometrische Vermessung des zweiten Durchlaufes bei 260 nm zur Detektion eventuell vorhandener DNA-Verunreinigungen (die Absorption sollte kleiner als 0,05 sein, Waschpuffer als Referenz)
- Überführen des Spin Column mit der an Oligo(dT)-Zellulose gebundenen mRNA in ein neues Cup, Zugabe von 100 µl Elutionspuffer (auf 70 °C vorgewärmt) auf die Zellulose, Zentrifugation (13.800 G, 15 sec)
- zum Cup mit mRNA/Elutionspuffer unter gutem Mischen nacheinander zufügen:

- 20 µl Präzipitationslösung, 1 µl Glycogenlösung und 550 µl 100%iges Ethanol
- Präzipitation über Nacht bei -20°C
- am nächsten Tag Zentrifugation der Reaktionsgefäße mit der präzipitierten mRNA (20 Minuten, 15.000 g, Hareaus Labofuge 400R, auf 4°C vorgekühlt)
- Abnahme des Überstandes, Lösen (Vortexen) des Pellets in 20µl dH₂O/0,1 mM EDTA
- Aliquotierung, Lagerung bei -80°C

Bei Verwendung für die RT-PCR erfolgte nach dem Auftauen eine weitere Verdünnung mit sterilem Aqua bidest. im Verhältnis 1:2. Von dieser endgültigen mRNA-Verdünnung (präpariertes Pellet in 60 µl H₂O) wurde für jede RT-PCR 1 µl eingesetzt.

Versuchsschema für die mRNA-Isolation aus humanen Beckenkammzellen

An sechs Versuchstagen wurden je zwei mRNA-Präparationen durchgeführt: eine für die Ultraschall-behandelten Zellkulturen, die andere für die Kontroll-Kulturen. Dabei wurden für jede Präparation jeweils 5 Petrischalen verwendet. Erste Beschallung bei Erreichen eines annähernd konfluenten Kulturstadiums (8 Tage nach Aussaat von 50.000 Zellen/Petrischale), die Kulturen wurden ein- bis sechsmal beschallt. Somit ergaben sich einschließlich der Kontrollkulturen 12 mRNA-Präparationen.

Gruppe Tag	1	2	3	4	5	6
0	Zellaussaat (50.000 Zellen/Petrischale)					
1-7	Zellkultivierung					
8	⚡	⚡	⚡	⚡	⚡	⚡
9	⊠	⚡	⚡	⚡	⚡	⚡
10		⊠	⚡	⚡	⚡	⚡
11			⊠	⚡	⚡	⚡
12				⊠	⚡	⚡
13					⊠	⚡
14						⊠
Summe ⚡	1	2	3	4	5	6

⚡ Ultraschallbehandlung

⊠ mRNA-Präparation

2.8.2 Charakterisierung des Genexpressionsmusters mittels RT-PCR¹¹⁷

Zunächst wird die präparierte mRNA mittels reverser Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, welche als Matrize für die folgende Polymerase-Kettenreaktion dient. Diese umfasst repetitive Zyklen bestehend aus Denaturierung von DNA-Doppelsträngen zu Einzelsträngen, Anheften der Primer an ihre Bindungssequenzen (Annealing) sowie Extension zu neuen Doppelsträngen (Elongation). Ein thermostabiler Mix verschiedener DNA-Polymerasen ermöglicht den kontinuierlichen Ablauf der Zyklen ohne erneuten Enzymzusatz. Reverse Transkription und Amplifizierung sind somit nach einmaliger Zugabe aller benötigten Reagentien in einem Reaktionsgefäß durchführbar.

Die Planung der Primer erfolgte mit Hilfe der Gen-Datenbank des National Institute of Health (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Die Primer wurden so gewählt, dass die komplementären DNA-Sequenzen in aufeinanderfolgenden Exons lokalisiert sind. Bei Amplifizierung genomischer DNA entstehen längere DNA-Moleküle, da das von den Exons flankierte Intron ebenfalls transkribiert wird. In der Gelelektrophorese können dann solche Syntheseprodukte durch ihre geringere Wanderungsgeschwindigkeit von den RT-PCR-Produkten aus der mRNA deutlich unterschieden werden. Letztere wurden geplant mit einer Größe von durchschnittlich 418 (346 bis 451) Basenpaaren. Es wurden Primer der Länge von 22 bis 29 Basen, durchschnittlich 25-mer, mit einem mittleren GC-Anteil von 62,8% (46 bis 81%) verwendet. Mit dem Programm „DNA Strider“ (verfügbar unter <http://www.cellbiol.com/soft.htm>) erfolgte der Ausschluss von Sekundärstrukturen, sog. Hairpins, nach folgenden Kriterien (Angabe in Basen): minimale Stiellänge: 6, erlaubte Mismatches: 2, maximale Schleifenlänge: 1.

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch MWG Biotech, Ebersberg. Die im lyophilisierten Zustand gelieferten Primer wurden in Aqua bidest. aufgenommen und nach Herstellung einer 200 µM Stammlösung bei -20°C gelagert. Anteile der Stammlösung wurden mit Aqua bidest. auf eine gebrauchsfertige 20 µM Primerlösung verdünnt, welche unmittelbar in der PCR eingesetzt wurde.

Primersequenzen [u=upstream, d=downstream]

GAPDH	5'-GAA CCA TGA GAA GTA TGA CAA CAG CC-3'	[u]
	5'-CCC TCC GAC GCC TGC TTC ACC ACC-3'	[d]
Kollagen I	5'-CCG GAG GAA TTT CCG TGC CTG GCC C-3'	[u]
	5'-CCA GGG GCT CCA GGG CGA CCT CTC TCA CC-3'	[d]
Alkalische Phosphatase	5'-GAC ACT GAA ATA TGC CCT GGA G-3'	[u]
	5'-GCC GAG TGG GCG TAG GCG GCG CTG GG-3'	[d]
Osteokalzin	5'-CGC AGC CAC CGA GAC ACC ATG AGA GCC C-3'	[u]
	5'-GCA GCT GGG ATG ATG GGG ACC CC-5'	[d]
BMP-2	5'-GTC AAG CCA AAC ACA AAC AGC GG-3'	[u]
	5'-CTA GCG ACA CCC ACA ACC CTC CAC-3'	[d]
BMP-4	5'-CCC TAA GCA TCA CTC ACA GCG GGC C-3'	[u]
	5'-CCT GAT CTC AGC GGC ACC CAC ATC CC-3'	[d]
BMP-7	5'-TCC ACG GGG AGC AAA CAG CGC AGC C-3'	[u]
	5'-GAG CTA GTG GCA GCC ACA GGC CCG G-3'	[d]
COX-2	5'-CTC AGG CAG AGA TGA TCT ACC CTC C-3'	[u]
	5'-CTG GGT AAT TCC ATG TTC CAG C-3'	[d]
HSP 47	5'-CGG CCT GGC CTT CAG CTT GTA CCA GG-3'	[u]
	5'-GGT GAC CTC GGG CAG CTT GCC GTC GG-3'	[d]

Vor Ausführung der einzelnen Versuche wurde ein dNTP-Mix zusammengestellt, der zu äquimolaren Anteilen (je 10 µM) dATP, dCTP, dGTP und dTTP enthielt. Je Reaktion wurde ein Volumen von 1 µl dNTP-Mix zugesetzt. Des weiteren wurde je 1 µl der RNA-Suspension in PCR-Reaktionsgefäße gegeben und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung der Mastermixe exemplarisch für eine Reaktion:

	Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration
Master-mix 1	steriles Aqua bidest.	18,25	
	dNTP-Mix	1	0,2 mM je dNTP
	downstream primer (20 µM)	1	0,4 µM
	upstream primer (20 µM)	1	0,4 µM
	DTT-Lösung (100 mM)	2,5	5 mM
	RNase-Inhibitor (40 U/µl)	0,25	10 U
	Total	24	
Master-mix 2	steriles Aqua bidest.	14	
	5*RT-PCR Puffer mit Mg ²⁺	10	1,5 mM MgCl ₂
	Enzym-Mix	1	
	Total	25	

Die Reaktionsgefäße für die Mastermixe wurden auf Eis gestellt und die Primer-Lösungen, die DTT-Lösung, der dNTP-Mix sowie der RT-PCR-Puffer schonend auf Eis aufgetaut. Der Enzym-Mix sowie der RNase-Inhibitor wurden als letzte Komponenten den Mastermixen zugefügt. Ebenfalls unmittelbar vor Verwendung aufgetaut und auf Eis gehalten wurden die PCR-Reaktionsgefäße mit der bereits vorgelegten Template-mRNA. In diese Gefäße wurden 24 µl Mastermix 1 sowie 25 µl Mastermix 2 pipettiert, luftblasenfrei gemischt und die Reaktion im Thermocycler laut unten stehendem Protokoll gestartet. Bei allen Ansätzen wurde eine Negativkontrolle (alle Reagentien, keine mRNA) durchgeführt, um eine mögliche Kontamination des Ansatzes (z.B. durch eingebrachte Fremd-DNA) zu detektieren.

RT-PCR-Protokoll

Bei der Erststrangsynthese (Step 1) wurden, katalysiert durch Reverse Transkriptase, mRNA-DNA-Hybridstränge gebildet. Diese wurden bei 94°C (Step 2) erstmalig aufgeschmolzen. Es folgte ein 10 mal zu durchlaufender Aufschmelz-Annealing-Synthese-Zyklus (Step 3-5). Um der sich von Zyklus zu Zyklus verringern den Nukleotidkonzentration Rechnung zu tragen folgte ein weiterer, 25maliger Aufschmelz-Annealing-Synthese-Zyklus mit einer sich um 5 Sekunden je Zyklus verlängernden Elongationszeit (Step 7-9). Die 6minütige Extensionszeit (Step 11) gewährte den Abschluss aller Synthesen nach dem letzten Annealing. Um unkontrollierte Reaktionen der Polymerasen oder andere Effekte zu unterdrücken, wurden die Reaktionsgefäße bis zur Entnahme auf 4°C gekühlt. Bis zur Visualisierung der Ergebnisse mittels Gelelektrophorese wurden die Reaktionsgefäße bei -20°C aufbewahrt.

Step 1	30 min	50°C	Reverse Transkription
Step 2	2 min	94°C	Template Denaturierung
Step 3	30 sec	94°C	Denaturierung
Step 4	45 sec	60°C	Annealing
Step 5	45 sec	70°C	Elongation
Step 6	9mal zu Step 3		
Step 7	30 sec	94°C	Denaturierung
Step 8	45 sec	60°C	Annealing

Step 9	45 sec plus 5 sec je Zyklus	70°C	Elongation
Step 10	24mal zu Step 7		
Step 11	6 min	70°C	Elongation
Step 12	bis zur Entnahme kühlen 4°C		

Analyse der RT-PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese¹¹⁶

Agarose, ein pflanzliches Polysaccharid, bildet als Gel netzähnliche Strukturen. Bei Anlegen einer Gleichspannung kommt es zur Wanderung linearer DNA-Fragmenten im elektrischen Feld und im Agarosegel zur Auftrennung entsprechend ihrer Molekularmasse. Die Visualisierung der DNA unter UV-Licht kann mit Ethidiumbromid, einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, erfolgen.

Es wurden 2%ige Agarosegele (Aufkochen von 2,0 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer) der Größe 12 cm*14 cm*0,6 cm mit 2 * 24 Taschen je Gel gegossen. 7 µl PCR-Produkt und 1 µl Auftragspuffer wurden auf Parafilm gemischt und pro Tasche aufgetragen. Als Marker diente die PCR Low Ladder (Sigma), von der 9 µl mit 1 µl Auftragspuffer gemischt und aufgetragen wurden. Vor Füllen der Geltaschen wurde das Gel mit TAE-Puffer überschichtet. An die Elektrophoresekammer wurde eine Gleichspannung von 120 Volt angelegt (5,4 V/cm), die Laufzeit betrug 60 Minuten. Es folgte eine zehnminütige Anfärbung mit Ethidiumbromid, gründliches Spülen mit Leitungswasser und Darstellung der Banden mittels UV-Kamera. Die densitometrische Auswertung der Banden erfolgte mit dem Programm „Scion Image“ (basierend auf „NIH Image“, unter <http://www.scioncorp.com> verfügbar).

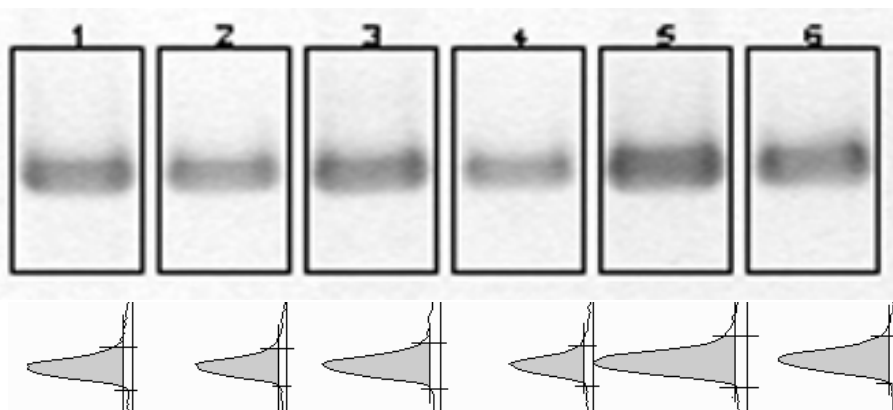


Abb. 3: densitometrische Messung der Gelelektrophoresebanden mittels „Scion Image“, Screenshot

Materialien und Reagentien für RT-PCR und Gelelektrophorese

Titan One Tube RT-PCR System (Roche, Mannheim)

Enzym-Mix	Expand High Fidelity Enzym-Mix (enthält Taq DNA-Polymerase und Pwo DNA-Polymerase) sowie AMV Reverse Transkriptase in Lagerpuffer
RT-PCR-Reaktionspuffer 5fach konzentriert mit 7,5 mM MgCl ₂ und DMSO	
RNase-Inhibitor	2000 units (40 U/μl, Roche, Mannheim)
dNTPs	Deoxynucleosidtriphosphat Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 100 mM lithium salt solution, pH 7 (Roche)
Cups für die Mastermixe	Safe-Lock, 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg)
PCR-Reaktionsgefäße	PCR SoftTubes, 0,2 ml, DNase-frei (Biozym, Hess. Oldendorf)
Filterspitzen	RNase-frei, DNase-frei (Biozym, Hess. Oldendorf)
mRNA aus humanem Nierengewebe	Human Poly A ⁺ Kidney RNA, Ambion (ams, Wiesbaden)
Thermocycler	PCR Express (Hybaid, Heidelberg)
Gelelektrophoresekammer	EasyCast Minigelsystem B2, Gelfläche 12 cm * 14 cm (PeqLab, Erlangen)
Netzteil	Power Supply, Modell 1000/500 (Bio-Rad, München)
Agarose	Geltemperatur 36°C (Sigma Diagnostics, Taufkirchen)
Marker	PCR 100 bp Low Ladder: 10 verschiedene Fragmente von 100, 200,..., 1000 Basenpaaren Länge (Sigma Diagnostics)
Auftragspuffer	50% Glycerin (Roth, Karlsruhe) in Aqua bidest., 0,25% Xylencyanol (Roth, Karlsruhe), 0,25% Bromphenolblau (Roth, Karlsruhe), steril filtriert, Lagerung bei 4°C
TAE-Puffer [50fach]	242 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck, Darmstadt), 57,1 ml Eisessig (Merck, Darmstadt), 100 ml 0,5 M EDTA (ICN, Eschwege) ad 1000 ml Aqua bidest.

Vor Verwendung wurde der Puffer mit Aqua bidest. auf die Arbeitskonzentration [1fach] verdünnt.

Ethidiumbromidbad	0,005% [v/v] einer 10 mg/ml Stammlösung (Roth, Karlsruhe)
UV-Kamera	Gel Doc 2000 (Bio-Rad, München)
Visualisierungssoftware	Multi-Analyst Version 1.1 (Bio-Rad, München)

3 Fragestellung

3.1 Proliferations- und Differenzierungsverhalten von Kulturen primärer, aus humaner Spongiosa isolierter Zellen unter Ultraschalleinfluss

Mit den vorliegenden Untersuchungen sollte der Frage nachgegangen werden, ob niederenergetischer gepulster Ultraschall mit definierter Spezifität einen Einfluss auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten osteoblastärer Zellen besitzt. Die Untersuchungen wurden modellhaft an Zellkultursystemen durchgeführt. Es sollte insbesondere festgestellt werden, ob es zu Veränderungen bezüglich der Proliferationsrate, der biochemischen Aktivität und des Genexpressionsmusters der Zellen kommt.

3.2 Vergleich von humanen Beckenkammzellen mit mesenchymalen Zell-Linien fibroblastärer und osteoblastärer Differenzierung

Bei den verwendeten primären Zellen aus humaner Beckenkamm-spongiosa handelte es sich nicht um einen uniformen Zelltypus, sondern um eine Mischkultur verschiedener mesenchymaler Zellen, vor allem Osteoblasten/-zyten und Fibroblasten/-zyten. Daher sollte noch vertiefend untersucht werden, ob verschiedene mesenchymale Zellarten in unterschiedlicher Weise auf die Ultraschallbehandlung reagieren. Hierzu wurde das Proliferationsverhalten sowie die spezifische Aktivität der Alkalischen Phosphatase bei einer Osteoblasten- und einer Fibroblasten- Linie unter Ultraschalleinfluss untersucht.

4 Ergebnisse

4.1 Vergleich der Zellproliferation und Zellvitalität

Mit dem WST-1-Test wurde der Einfluss der Ultraschallbehandlung auf die Zellviabilität verschiedener Zellkulturen erfasst. Mit der Bestimmung wurde einen Tag nach Erreichen eines annähernd konfluenten Kulturstadiums begonnen, dies war der Fall am Tag 7 (humane Beckenkammzellen) bzw. am Tag 4 der Kultivierung (MC3T3-E1, L-929). Als Kontrolle dienten jeweils nicht mit Ultraschall behandelte Kulturen.

Weder bei den aus humaner Beckenkammpongiosa gewonnenen Zellen (Abb. 4) noch bei der Osteoblasten-Linie MC3T3-E1 (Abb. 5) sowie der Fibroblasten-Linie L-929 (Abb. 6) zeigte sich eine signifikante Veränderung der Zellvitalität bzw. der Zellproliferation unter der Behandlung mit Ultraschall. An allen sechs Versuchstagen war die Irrtumswahrscheinlichkeit p (ermittelt mit dem t-Test nach Student) größer als 0,05 ($p < 0,05$ wurde als signifikant bezeichnet).

Bei allen Kulturen stieg unabhängig vom Ultraschalleinfluss die Extinktion im Beobachtungszeitraum kontinuierlich an.

4.1.1 Humane Beckenkammzellen

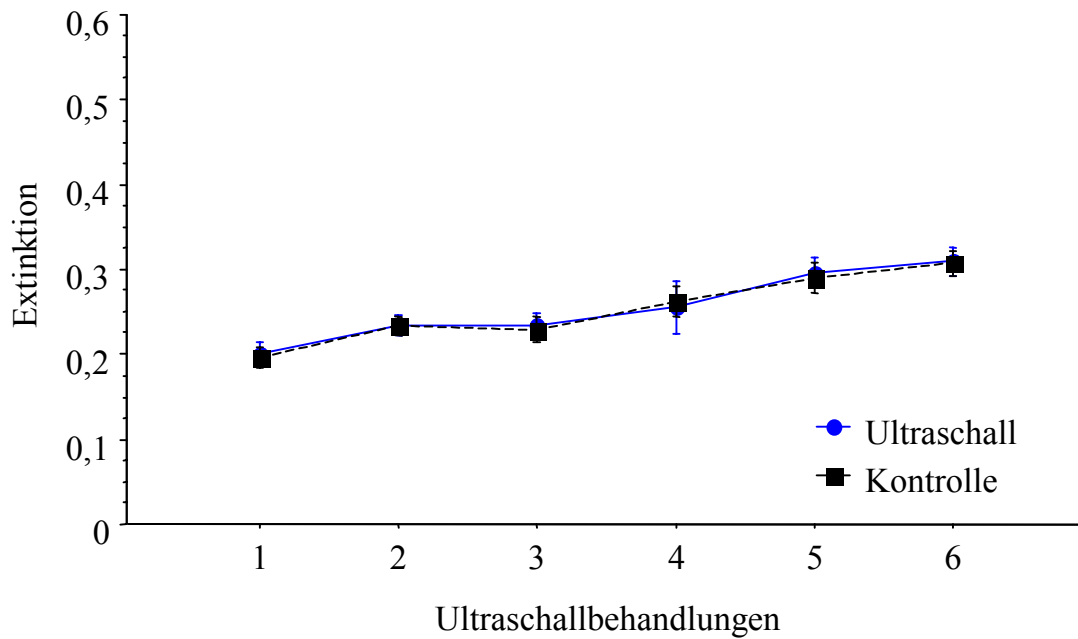


Abb. 4: Zellvitalität der humanen Beckenkammzellen.
Fehlerbalken: ± 1 Standardabweichung

4.1.2 MC3T3-E1-Zell-Linie

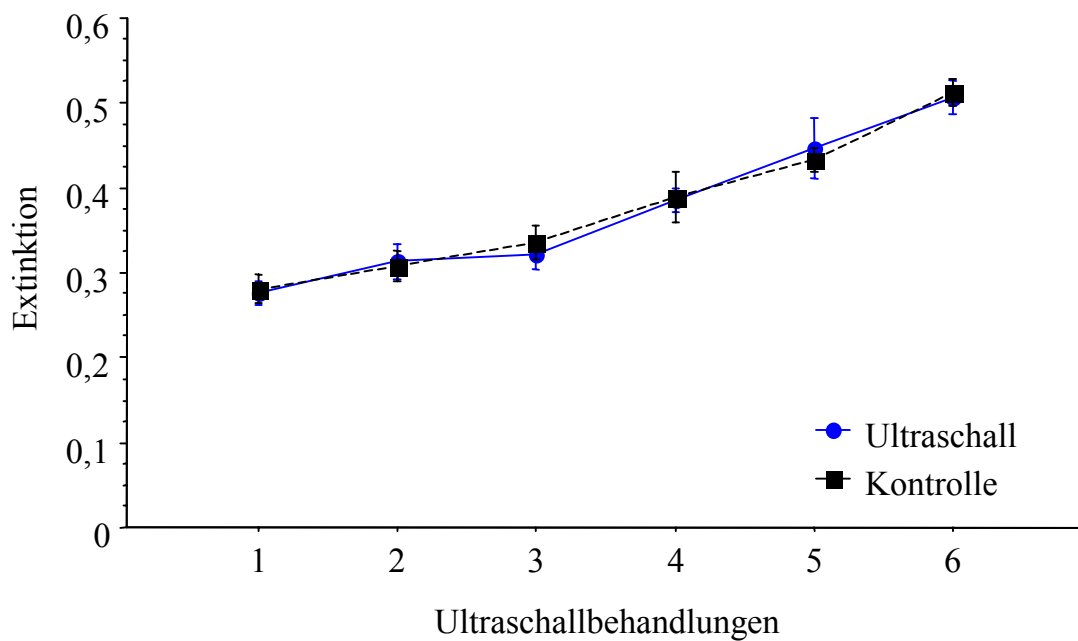


Abb. 5: Zellvitalität der MC3T3-E1 - Osteoblasten.
Fehlerbalken: ± 1 Standardabweichung

4.1.3 L-929-Zell-Linie

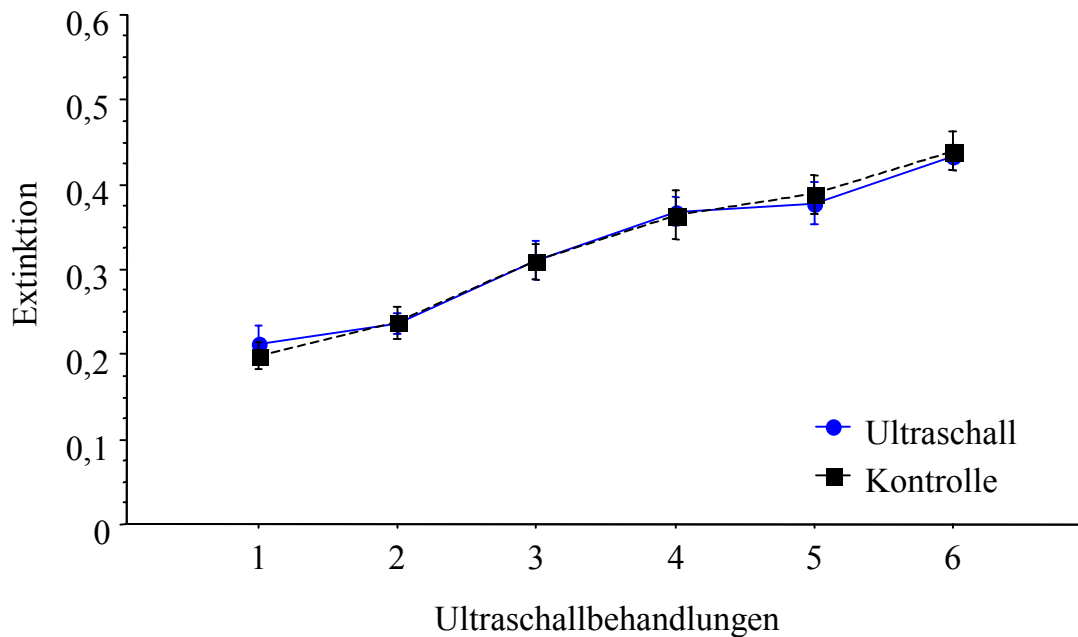


Abb. 6: Zellvitalität der L-929 - Fibroblasten.
Fehlerbalken: ± 1 Standardabweichung

4.2 Vergleich der spezifischen Alkalische-Phosphatase-Aktivität

Die spezifische AP-Aktivität wurde bei konfluenten Zellkulturen an sechs aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt, begonnen wurde jeweils am 11. Tag in Kultur.

Bei den humanen Beckenkammzellen (Abb. 7) stieg sowohl bei den beschallten wie auch bei den nicht ultraschallbehandelten Zellkulturen die spezifische AP-Aktivität im Beobachtungszeitraum nahezu kontinuierlich an. Es zeigte sich nach drei und mehr Ultraschallbehandlungen eine signifikant ($p < 0,05$) erhöhte AP-Aktivität der beschallten Zellkulturen gegenüber den Kontrollkulturen (t-Test nach Student, eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant bezeichnet). Nach der sechsten Ultraschallbehandlung (Tag 16 der Kultur) betrug die AP-Aktivität der beschallten Kulturen rund 143% der AP-Aktivität der Kontrollkulturen.

Bei den MC3T3-E1 –Osteoblasten (Abb. 8) verhielten sich ultraschallbehandelte und nicht beschallte Zellkulturen im Beobachtungszeitraum gleichartig: kontinuierlicher Anstieg der AP-Aktivität bis zum Tag 14 der Kultivierung, anschließend Abfall der Aktivität (Tag 15 und 16). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen beschallten und nicht beschallten Kulturen ($p > 0,05$) bezüglich der AP-Aktivität.

Die L-929 – Fibroblasten exprimierten zu keinem Zeitpunkt Alkalische Phosphatase, die Berechnung der spezifischen Aktivität erübrigte sich somit.

4.2.1 Humane Beckenkammzellen

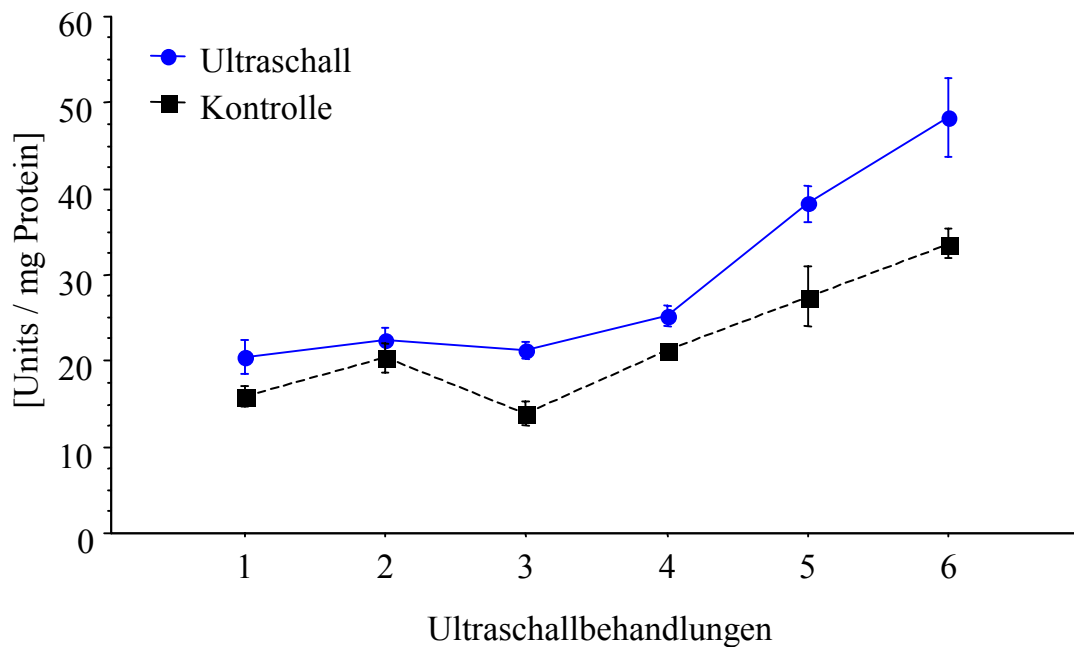


Abb. 7: Spezifische Alkalische-Phosphatase-Aktivität [Units/mg Protein] humaner Beckenkammzellen.
Fehlerbalken: ± 1 Standardabweichung

4.2.2 MC3T3-E1-Osteolasten

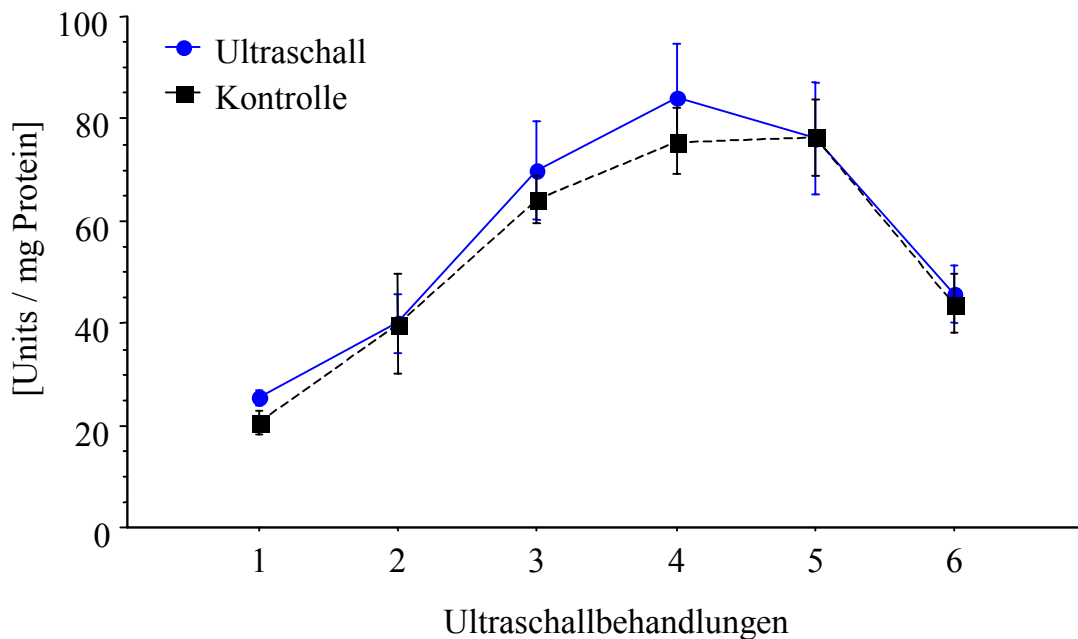


Abb. 8: Spezifische Alkalische-Phosphatase-Aktivität [Units/mg Protein] von MC3T3-E1 - Osteoblasten.
Fehlerbalken: ± 1 Standardabweichung

4.3 Vergleich der Mineralisation (Färbung nach von Kossa)

Mit der Darstellung nach von Kossa wurde der Kalzifizierungsgrad von Kulturen humaner Beckenkammzellen qualitativ-vergleichend unter dem Lichtmikroskop bei geringer Vergrößerung sowie mit bloßem Auge erfasst. Mit der Ultraschallbehandlung der Zellkulturen wurde eine Woche nach Erreichen eines etwa konfluenten Kulturstadiums, am 14. Tag in Kultur, begonnen.

Sowohl hinsichtlich der Dichte (Grad der Braunfärbung) als auch hinsichtlich der Anzahl der einzelnen Mineralisierungsareale (Nodules) konnten keine Unterschiede zwischen beschallten und nichtbeschallten Zellkulturen festgestellt werden. In Abb. 9 ist exemplarisch die Mineralisierung einer ultraschallbehandelten Zellkultur am Tag 21 dargestellt.



Abb. 9: Darstellung der Mineralisation nach von Kossa.
humane Beckenkammzellen, Tag 21 der Kultivierung,
Vergrößerung 1,6*

4.4 Zytochemische Alkalische-Phosphatase-Färbung

Die Färbung wurde zur lichtmikroskopischen Beurteilung des Differenzierungsstadiums der Zellkulturen durchgeführt. Die Plasmamembranen osteoblastärer (Alkalische-Phosphatase-exprimierender) Zellen erscheinen blau gefärbt. Nichtosteoblastäre Zellen wie Fibroblasten kommen rot zur Darstellung.

Der Anteil Alkalische-Phosphatase-positiver Zellen bei den Kulturen humaner Beckenkammzellen sowie bei der MC3T3-E1 - Linie war abhängig von der Aussaatdichte der Zellen sowie der Kultivierungsdauer. Der Anteil dieser Zellen an der Gesamtkultur wuchs im Beobachtungszeitraum von 3 Wochen kontinuierlich an, wobei die Kulturen beider Zellarten stets einen Teil Alkalische-Phosphatase-negativer Zellen aufwiesen.

In den Kulturen humaner Beckenkammzellen zeigte sich nach einwöchiger Kultivierung ein Anteil Alkalische-Phosphatase-positiver Zellen von etwa 20 % (Abb. 10), der nach

dreiwöchiger Kultivierung auf etwa 40 % anstieg. Die übrigen Zellen wiesen eine fibroblastäre Morphologie auf. Chondrozyten und Fettzellen wurden nicht beobachtet.

Bei der MC3T3-E1 – Zell-Linie war der Anteil Alkalische-Phosphatase-positiver Zellen höher bei insgesamt größerer Isomorphie der Zellen (Abb. 11).

Die L-929 - Fibroblasten-Kulturen (Abb. 12) zeigten zu keinem Zeitpunkt Alkalische-Phosphatase-positive Zellen.

Ein lichtmikroskopisch sichtbarer Einfluss der Ultraschallbehandlung auf die Zellmorphologie konnte bei allen drei Zellarten ausgeschlossen werden.

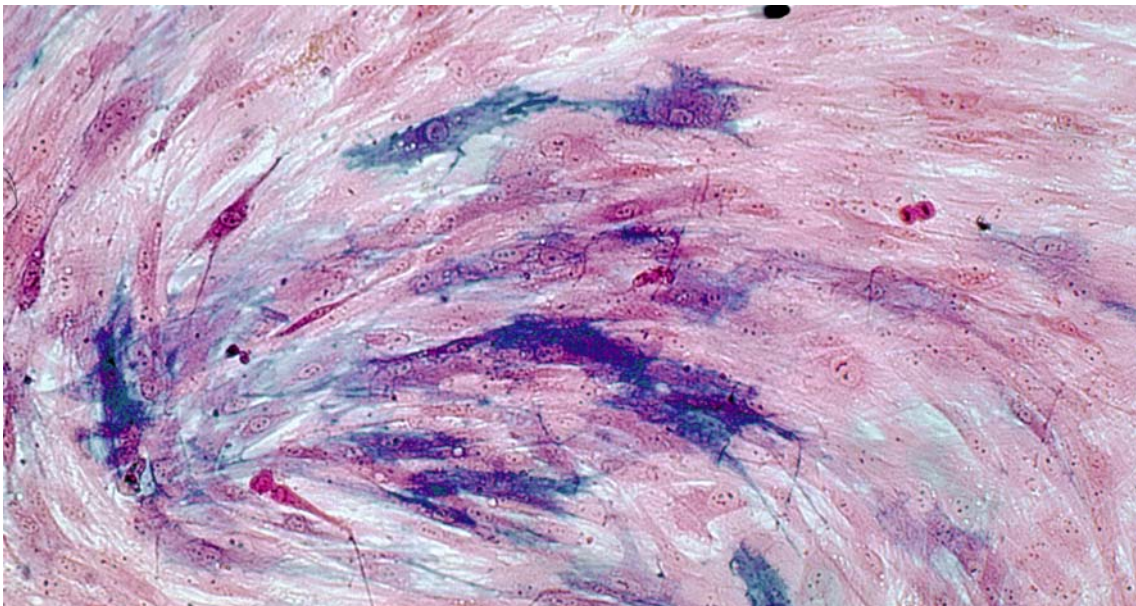


Abb. 10: Zytochemische Alkalische-Phosphatase-Färbung.
humane Beckenkamm-Zellen, 7. Kulturtag, Vergrößerung 20*

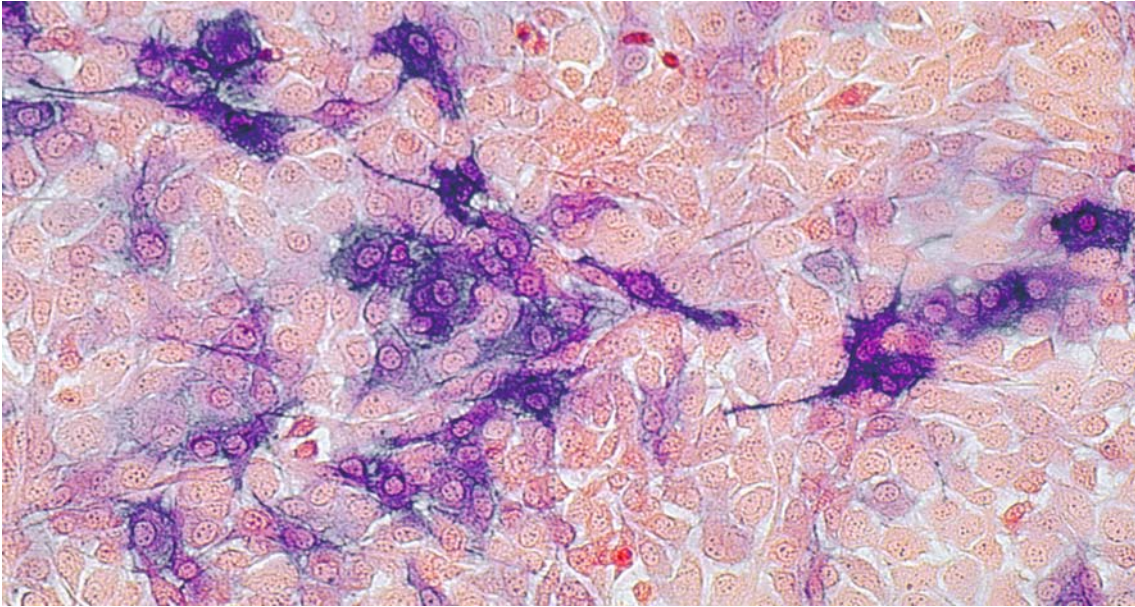


Abb. 11: Zytochemische Alkalische-Phosphatase-Färbung.
MC3T3-E1 - Osteoblasten, 7. Kulturtag, Vergrößerung 20*

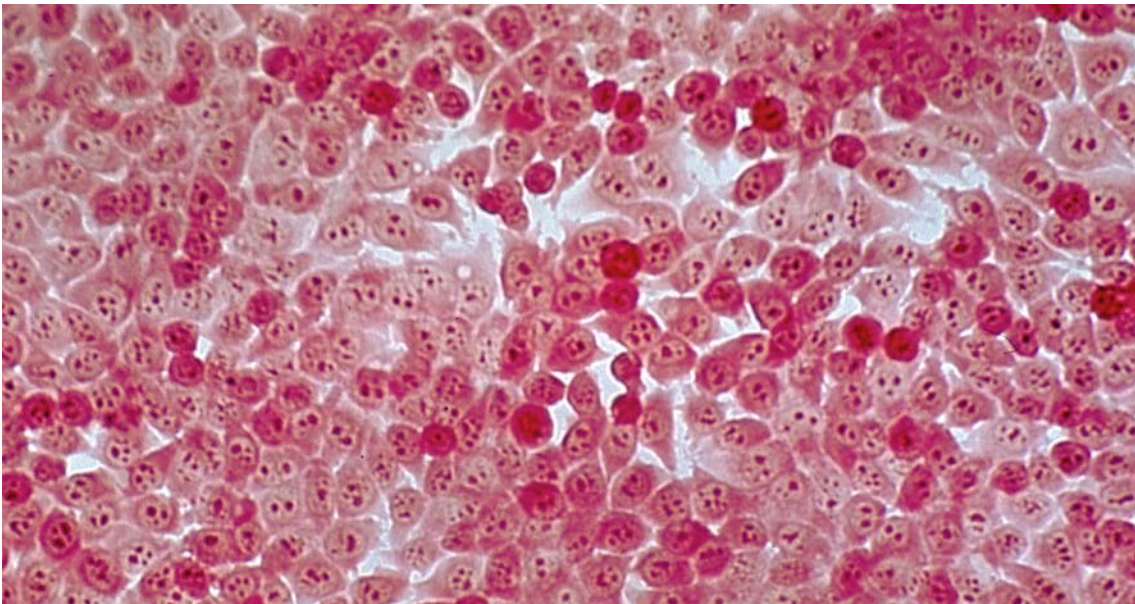


Abb. 12: Zytochemische Alkalische-Phosphatase-Färbung.
L-929 - Fibroblasten, 7. Kulturtag, Vergrößerung 20*

4.5 Vergleich des Genexpressionsmusters

4.5.1 Expression osteoblastentypischer Gene im zeitlichen Verlauf

Die dargestellten Agarosegele zeigen die mRNA-Expression osteoblastentypischer Gene im zeitlichen Verlauf (Tage 1 bis 6 der Ultraschallbehandlung). Die einzelnen RT-PCR-Produkte wurden nach dem folgendem Schema auf die Gele aufgetragen:

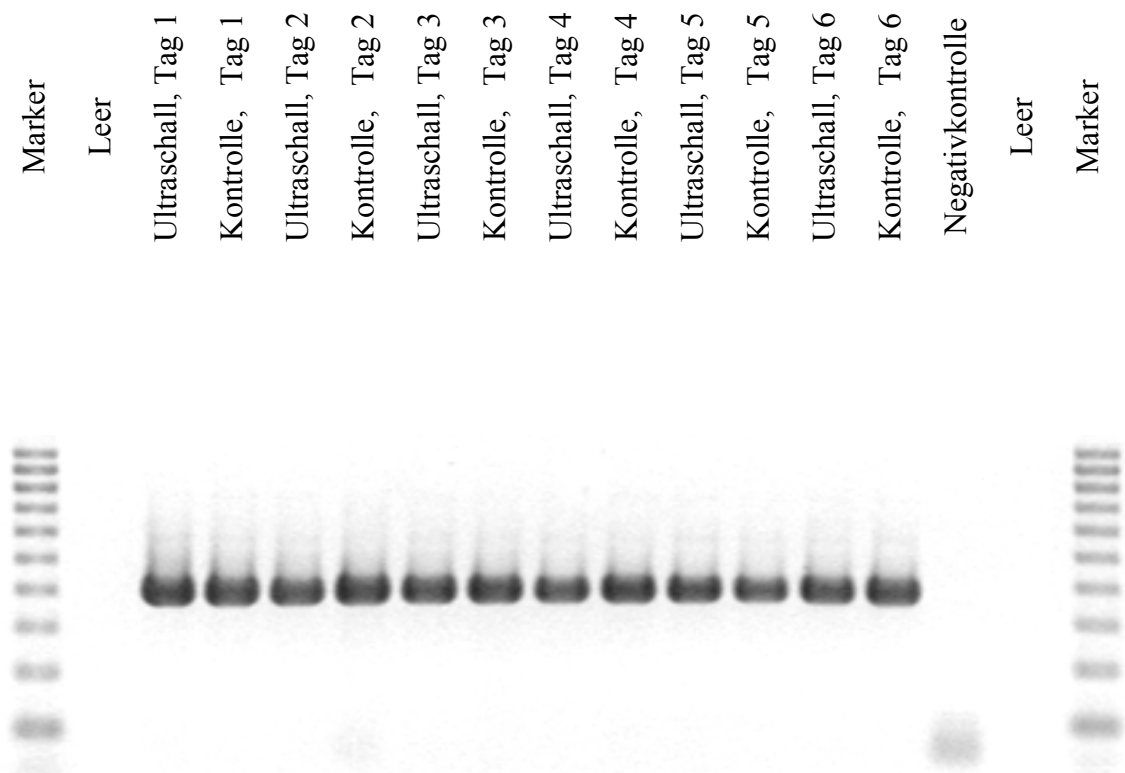


Abb. 13 Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte, **GAPDH**

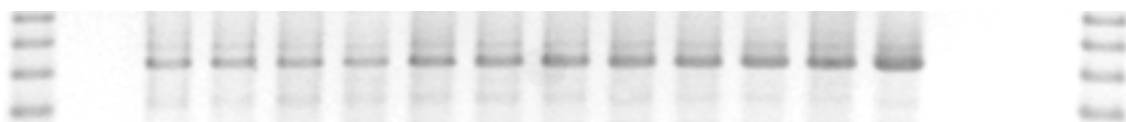


Abb. 14: Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte, **AP**

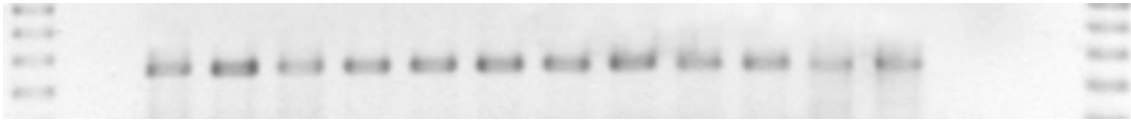


Abb. 15: Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte, **Osteokalzin**

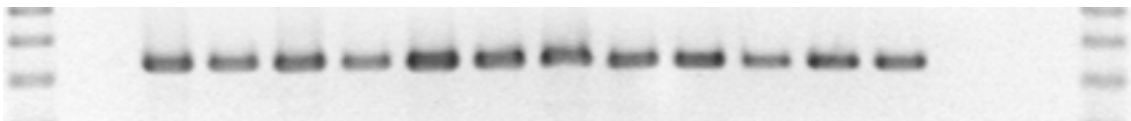


Abb. 16: Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte, **BMP-2**

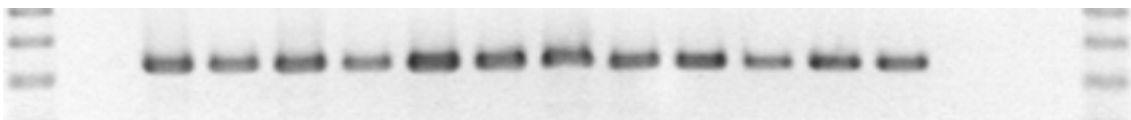


Abb. 17: Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte, **BMP-4**



Abb. 18: Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte, **BMP-7**

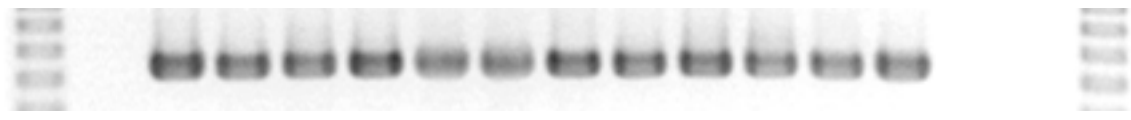


Abb. 19: Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte, **Typ-I-Kollagen**

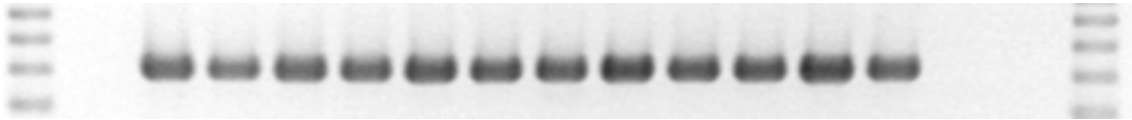


Abb. 20: Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte, **HSP 47**

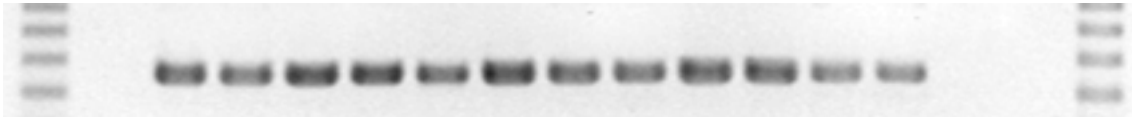


Abb. 21: Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte, **COX-2**

Bis auf BMP-7 wurden alle der untersuchten Gene im Beobachtungszeitraum (Tage 1-6 der Ultraschallbehandlung) sowohl in den Ultraschall- als auch in den Kontrollgruppen exprimiert. Eine qualitative Änderung des Expressionsverhaltens im Sinne von An- oder Abschalten der Expression der untersuchten Gene unter Einfluss von Ultraschall kann somit ausgeschlossen werden.

Um sicherzustellen, dass die fehlenden Signale bei der Expressionsanalyse von BMP-7 nicht auf fehlerhafte Oligonukleotide (RT-PCR – Primer) zurückzuführen sind, wurde als Positivkontrolle eine RT-PCR mit mRNA aus humanem Nierengewebe durchgeführt (in humanem Nierengewebe wurde die Expression von BMP-7 nachgewiesen¹³²). Die Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte ergab eine deutliche Bande in Höhe von etwa 400 Basenpaaren. Dies lässt den Schluss zu, dass die aus humanen Beckenkammzellen isolierte Gesamt-mRNA keine mRNA für BMP-7 enthielt.



Abb. 22: Positivkontrolle der BMP-7 – Primer:
Expression von mRNA für BMP-7 in
humanem Nierengewebe

4.5.2 Analyse der relativen Expressionsrate

Um eine Aussage über eine Veränderung der Expressionsrate treffen zu können, wurden die Gelelektrophorese-Banden der RT-PCR-Produkte unter Zuhilfenahme des Programmes „NIH Image“ densitometrisch ausgewertet. Die so ermittelten optischen Dichtewerte der einzelnen Banden wurden anhand der entsprechenden Dichtewerte der korrespondierenden Banden der GAPDH normiert (Ermittlung der relativen Expressionsrate).

Nachweisbare Veränderungen der relativen Expressionsrate ergaben sich bei der mRNA für BMP-2 (Abb. 23) und BMP-4 (Abb. 24). Unter Einfluss von Ultraschall wurden die entsprechenden Gene verstärkt exprimiert, am deutlichsten nach der dritten bis fünften (BMP-2) bzw. nach der dritten bis sechsten (BMP-4) Ultraschallbehandlung. Bei den übrigen osteoblastentypischen Markern ließ sich kein verändertes Expressionsverhalten unter Einfluss von Ultraschall nachweisen (Abb. 25 bis 29). Hier lagen die relativen Expressionsraten der ultraschallbehandelten Zellkulturen weitgehend im Bereich der relativen Expressionsraten der Kontrollkulturen. Die relative Genexpression dieser Marker blieb im Beobachtungszeitraum mehr oder weniger konstant, auffällig ist jedoch ein deutlicher Abfall nach der sechsten Ultraschallbehandlung bei Osteokalzin sowie bei der Cyclooxygenase-2.

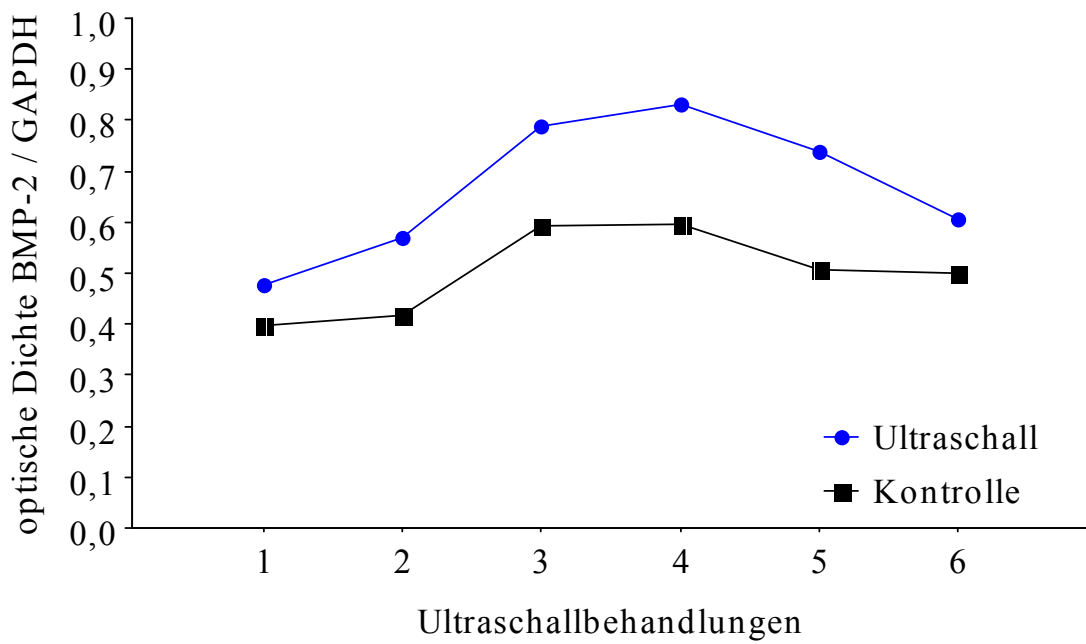


Abb. 23: relative Genexpressionsrate, **BMP-2**

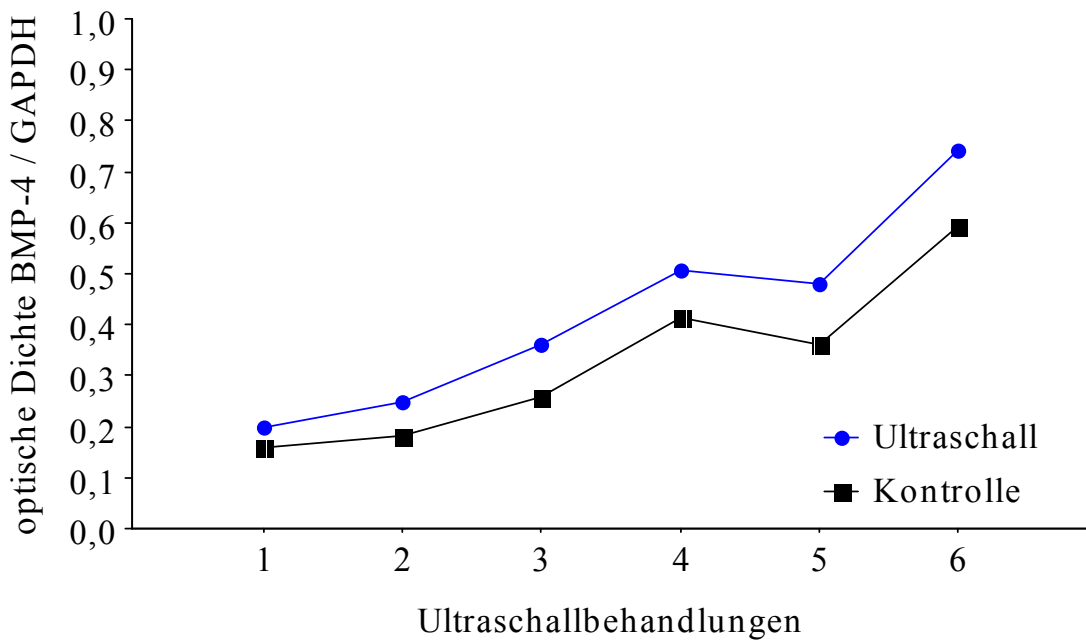


Abb. 24: relative Genexpressionsrate, **BMP-4**

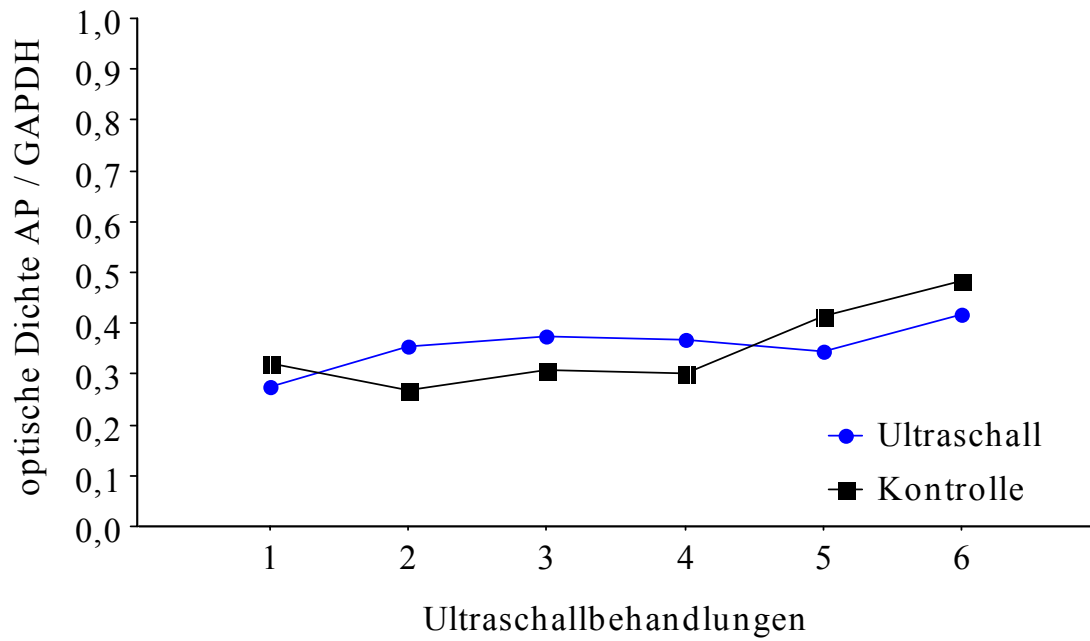


Abb. 25: relative Genexpressionsrate, AP

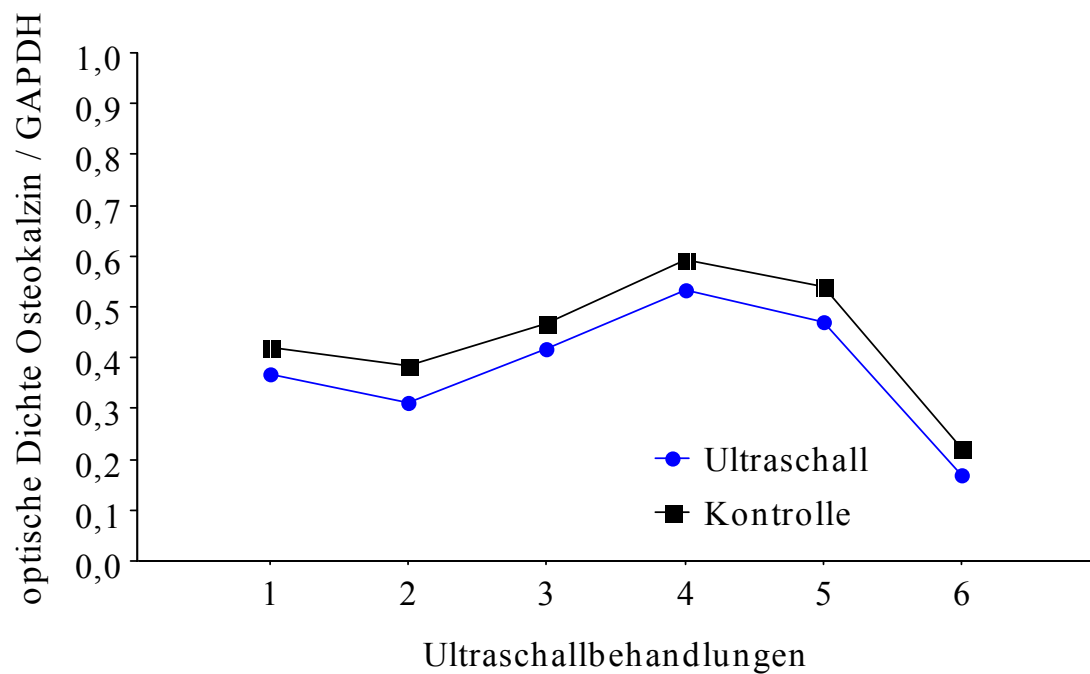


Abb. 26: relative Genexpressionsrate, Osteokalzin

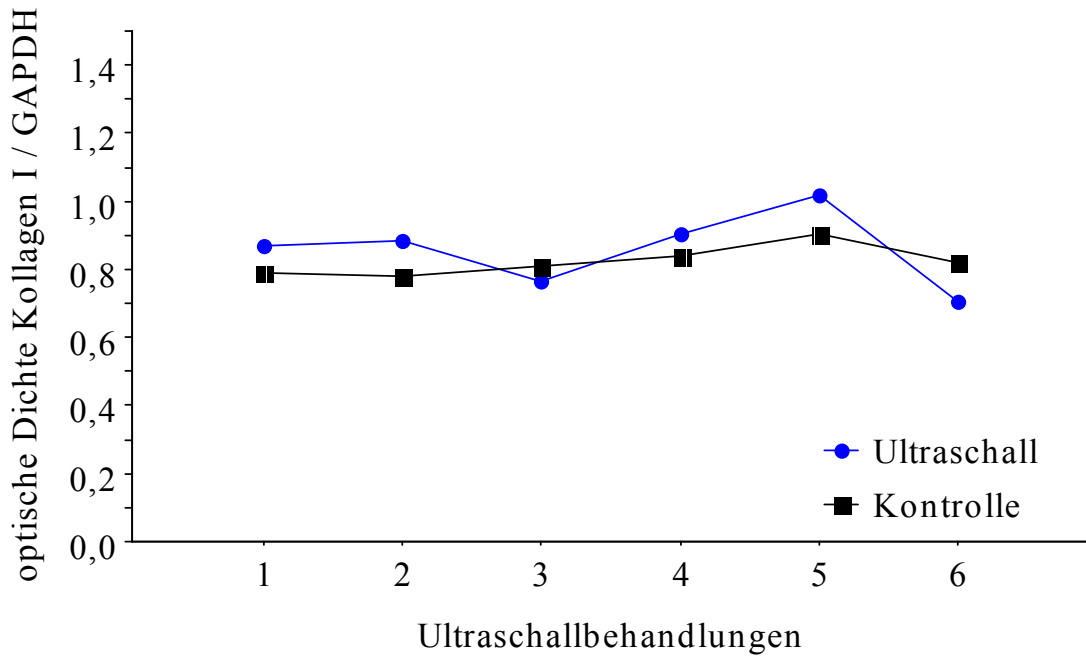


Abb. 27: relative Genexpressionsrate, **Typ-I-Kollagen**

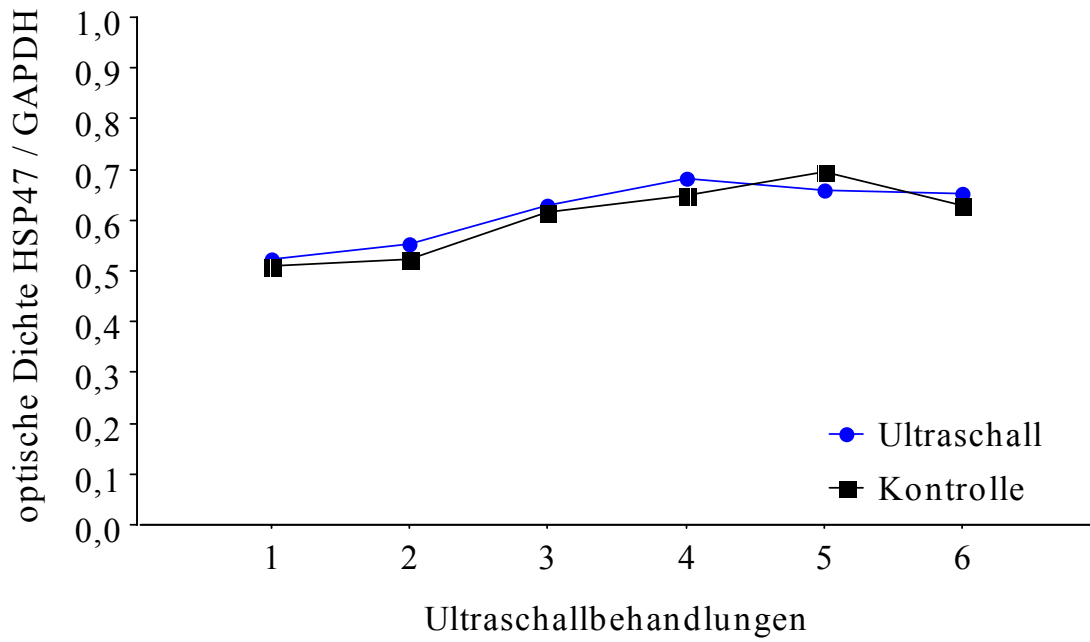


Abb. 28: relative Genexpressionsrate, **HSP 47**

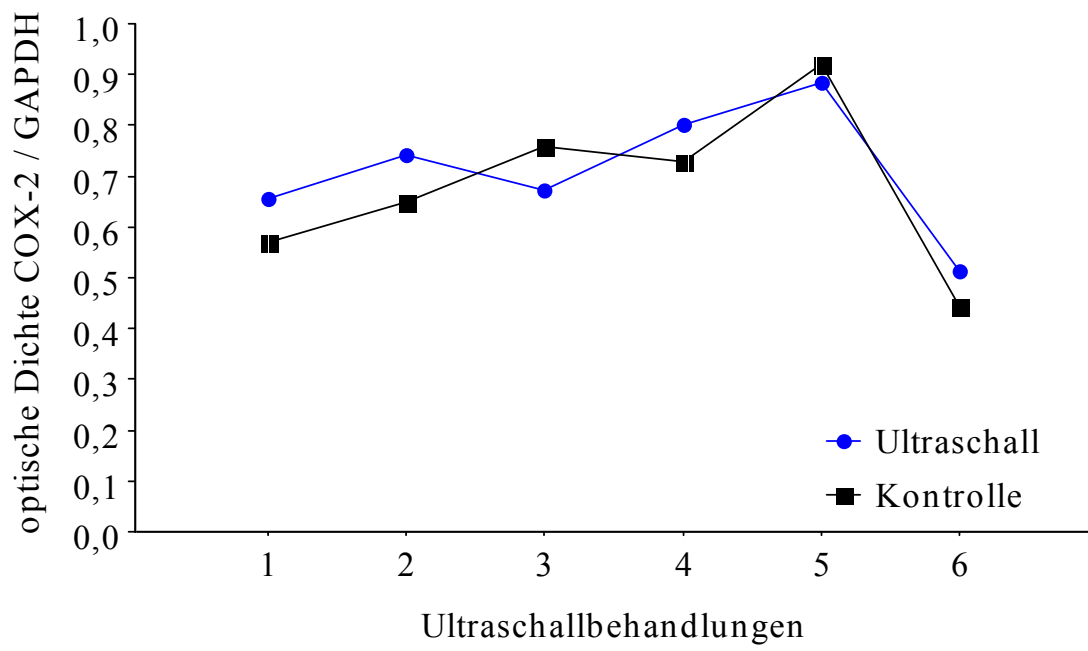


Abb. 29: relative Genexpressionsrate, COX-2

5 Diskussion

5.1 Experimentelle Grundlagen

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von *in vitro* Zellkulturmodellen die Beeinflussung von Proliferations- und Differenzierungsverhalten osteoblastärer bzw. mesenchymaler Zellen durch therapeutischen Ultraschall untersucht. Das verwendete Ultraschallsignal ist durch definierte physikalische Kenngrößen charakterisiert (siehe Abschnitt 2.1.1) und wird hier allgemein als „niederenergetischer gepulster Ultraschall“ bezeichnet.

Die zugrundeliegenden Experimente gehen auf Duarte und Xavier zurück, welche in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts anhand von Osteotomiemodellen am Kaninchen eine Beschleunigung der Knochenheilung unter Einfluss von Ultraschall vergleichbarer Spezifität nachweisen konnten^{21,142}. Eine Reihe weiterer Arbeitsgruppen, z.B. Klug und Knoch oder Dyson^{24,53,54,55,56}, kamen zu ähnlichen Ergebnissen (Osteotomiemodelle an Kaninchen und Ratten), allerdings waren die hier eingesetzten Ultraschallsignale recht unterschiedlich, meist relativ hoch-energetisch (z.B. 0,5 W/cm²).

In der vergangenen Dekade wurden zahlreiche klinische Studien zur Behandlung von Frakturheilungsstörungen / Pseudarthrosen sowie zur Beschleunigung der Frakturheilung mit niederenergetischem gepulsten Ultraschall veröffentlicht. Dabei handelte es sich in erster Linie um distale Radiusfrakturen^{13,62,63}, sowie Tibiafrakturen und –pseudarthrosen^{13,39,80}. Auch bei verzögerter Frakturheilung und Pseudarthrosen anderer Knochen (Scaphoid, Femur, Metatarsalia u.a.)^{78,79}, bei Stressfrakturen von Sportlern^{9,45} sowie im Rahmen der Kallusdistraktion¹²¹ wurde beschriebener Ultraschall eingesetzt. Die Ergebnisse wurden überwiegend als positiv bewertet: Beschleunigung der Frakturheilung, Ausheilung zuvor bestehender Pseudarthrosen, Schmerzreduktion und frühzeitigere Belastbarkeit bei Stressfrakturen sowie Steigerung der Mineralisierung im distrahierten Kallusgewebe.

Um die klinischen Ergebnisse mit grundlagenwissenschaftlichen Erkenntnissen zu korrelieren, wurden zahlreiche experimentelle Studien mit niederenergetischem gepulsten Ultraschall *in vivo* und *in vitro* durchgeführt. So berichten mehrere

Arbeitsgruppen über eine Beschleunigung der (biomechanischen) Frakturheilung (meist Femur- und Fibulafrakturmodelle an Ratten und Kaninchen, teilweise genagelt), d.h. entsprechende biomechanische Parameter wie Torsionssteifheit und maximales Drehmoment wurden schneller erreicht bzw. fielen höher aus^{98,136,145}. Da diese Experimente keine längerfristigen Nachuntersuchungen beinhalten, bleibt unbeantwortet, ob die biomechanischen Unterschiede zwischen ultraschallbehandelten- und Kontrollfrakturen dauerhaft bestehen bleiben oder ob es aufgrund von Remodeling zu einem gemeinsamen Endpunkt kommt. Berichtet wurde weiterhin über eine gesteigerte Fusionsrate von Spondylodesen am Kaninchen³³ sowie eine verbesserte knöcherne Einheilung von Titanimplantaten in Hundefemora¹²⁸. Biochemische Untersuchungen von Kallusgewebe zeigten keine Veränderungen von Kalzium- und Kollagengehalt, jedoch wurde ein verändertes Expressionsmuster knorpeltypischer Gene (akzelerierte Synthese von Aggrecan-mRNA) beschrieben, während der Anteil an knochentypischer mRNA (AP, Osteokalzin, Typ-I-Kollagen) unverändert geblieben sein soll im Beobachtungszeitraum von 21 Tagen nach Frakturierung^{144,145}.

Auch Parvizi⁹⁶ konnte nach Ultraschallbehandlung primärer Chondrozytenkulturen eine Zunahme von Aggrecan-mRNA sowie eine Stimulation der Proteoglykansynthese verzeichnen, jedoch keine Zunahme von Typ-I- und Typ-II-Prokollagen-mRNA sowie keine Proliferationssteigerung der Chondrozyten. Die Ultraschallbehandlung von MC3T3-E1 - Zellkulturen ergab eine erhöhte Synthese von COX-2-mRNA⁶¹. In Kokulturen humaner Osteoblasten und Endothelzellen konnte nach Beschallung eine vermehrte Bildung von PDGF-AB nachgewiesen werden⁴⁴. Reher und Doan beschrieben hingegen bei Kulturen humaner Osteoblasten als auch Fibroblasten eine stimulierte Zellproliferation sowie eine gesteigerte Synthese kollagener und nichtkollagener Proteine einschließlich verschiedener Wachstumsfaktoren / Zytokine (IL-8, bFGF, IL-1 β)^{19,104}. Eine verstärkte Expression von Osteokalzin, Bone Sialoprotein sowie IGF durch Ultraschallbehandlung von murinen stromalen Knochenmarkzellen (ST2-Zell-Linie) schilderte Naruse⁸⁶.

Die Ergebnisse vor allem der *in vitro* Versuche sind also teilweise durchaus widersprüchlich. Eine direkte Vergleichbarkeit der einzelnen Experimente erweist sich als problematisch. Einerseits wurde mit verschiedenartigen Ultraschallsignalen gearbeitet. Andererseits wurden unterschiedliche Behandlungsschemata gewählt:

Abweichungen bestehen hinsichtlich der Anzahl der Ultraschallbehandlungen (eine bis fünf), der Dauer der Einzelbehandlung (5 bis 20 Minuten) sowie des Behandlungsbeginnes in Bezug auf das Kulturstadium (z.B. 3 Tage nach Aussaat der Zellen oder bei Erreichen eines konfluenten Kulturstadiums). Auch die Zeitintervalle zwischen letzter Ultraschallbehandlung und Analyse wichen voneinander ab (wenige Minuten bis 24 Stunden). Nicht zuletzt wurde mit unterschiedlichen Zellen (Osteoblasten, Chondrozyten u.a.), mit Mono- und Kokulturen sowie mit humanen und murinen Zellen gearbeitet, was die Vergleichbarkeit weiter einschränkt.

Zellkulturen

Bei den Primärkulturen von aus humaner Beckenkammpongiosa isolierten Zellen handelte es sich um eine Mischpopulation mesenchymaler Zellen mit vorwiegend osteoblastärer und fibroblastärer Differenzierungsrichtung. Daher wird hier von „humanen Beckenkammzellen“ gesprochen. Um auch eine Aussage über die möglichen Zielzellen treffen zu können, wurde der Ultraschalleinfluss auf Proliferation und Differenzierung (Alkalische-Phosphatase-Aktivität) bei einer osteoblastären (MC3T3-E1) und einer fibroblastären (L-929) Zell-Linie mituntersucht.

Bei den beiden letzteren handelt es sich allerdings um Zellen muriner Herkunft, ein abweichendes Ansprechen auf Ultraschall gegenüber humanen Zellen ist nicht auszuschließen. Die MC3T3-E1- als auch die L-929-Zellen sind kleiner als die humanen Beckenkammzellen und proliferieren schneller. Daher ist ein Vergleich von Wachstums- und Differenzierungsparametern zwischen den verwendeten Zell-Linien und den humanen Zellen nur eingeschränkt möglich^{58,127}.

Ultraschall-Behandlungsplan und Versuchsausrüstung

Die Beschallung der Zellkulturen orientierte sich am vom Gerätehersteller vorgeschlagenen klinischen Behandlungsschema. Die tägliche Behandlungsdauer betrug 20 Minuten je Zellkultur. Bei jeder Versuchsreihe wurden die Zellkulturen über einen Gesamtzeitraum von bis zu sechs Tagen beschallt, wobei das Intervall zwischen aufeinanderfolgenden Behandlungen 24 (\pm 2) Stunden betrug. Andere mit diesem Ultraschallgerät arbeitende Gruppen wählten gleiche Behandlungsparameter.

Analog zu den beschallten Zellkulturen wurde mit den nicht ultraschallbehandelten Kontrollkulturen verfahren: es wurden Paare aus zu beschallenden und nicht zu beschallenden Zellkulturen gebildet, auf die (bis auf den Ultraschalleinfluss) identische Bedingungen einwirkten, da auch die Kontrollkulturen in die Inkubationskammer überführt wurden. Das Klima in der Kammer unterschied sich von dem Klima im Brutschrank nicht hinsichtlich der Temperatur, jedoch bezüglich des Wasserdampf- und CO₂- Gehaltes (Raumluft), was bei einer Beschallungszeit von 20 Minuten vernachlässigbare Auswirkungen auf den pH-Wert des Nährmediums hatte.

5.2 Vergleich der Zellproliferation und Zellvitalität

Bei allen der drei untersuchten Zellkulturen nahm im Beobachtungszeitraum unabhängig vom Ultraschalleinfluss die Anzahl vitaler Zellen zu. Das Ultraschallsignal scheint also weder bei der MC3T3-E1 - sowie L-929 - Linie, noch bei den primären Beckenkammzellen einen proliferationshemmenden oder deletären Effekt zu besitzen. Auch eine Stimulation der Zellproliferation durch die Ultraschallbehandlung kann somit ausgeschlossen werden.

Ein stimulierender Einfluss auf die Proliferation von Chondrozyten *in vitro* konnte von Parvizi⁹⁶ nicht festgestellt werden. Auch Yang berichtete über eine gleichbleibende Proliferationsrate im ultraschallbehandelten Kallusgewebe *in vivo*¹⁴⁵. Im Gegensatz dazu wurde aber auch über eine gesteigerte Proliferation von kultivierten Osteoblasten und Fibroblasten unter Einfluss von Ultraschall berichtet^{19,104}. Das hier applizierte Ultraschallsignal unterschied sich aber in Intensität und anderen Kenngrößen deutlich von dem in dieser Arbeit verwendeten Signal.

5.3 Vergleich der spezifischen Alkalische-Phosphatase-Aktivität

Hinsichtlich der Beeinflussbarkeit der spezifischen Enzymaktivität bestehen deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellkulturen. Bei der MC3T3-E1 - Linie stieg unabhängig vom Ultraschalleinfluss die Enzymaktivität zunächst kontinuierlich an, um nach einem Aktivitätsmaximum (an Tag 14 in Kultur) wieder abzufallen. Diese

Beobachtung deckt sich mit dem von Stein und Owen et al. beschriebenen osteoblastären Differenzierungszyklus *in vitro*^{94,95,126}.

Die primären Beckenkammzellen zeigten ein anderes Verhalten: die Enzymaktivität stieg im gleichen Beobachtungszeitraum praktisch kontinuierlich an, d.h. ein Aktivitätsmaximum mit anschließendem Aktivitätsabfall wurde nicht beobachtet. Hierfür könnte die langsamere Proliferationsrate (und damit ein weniger fortgeschrittenes Stadium im Differenzierungszyklus verglichen mit den MC3T3-E1 - Zellen) verantwortlich sein. Im Gegensatz zu der MC3T3-E1 - Linie zeigte die Enzymaktivität der Beckenkammzellen jedoch eine Stimulierbarkeit durch Ultraschall: nach sechsmaliger Beschallung nahm die AP-Aktivität um 43% zu.

Die Fibroblasten-Zell-Linie L-929 exprimierte zu keinem Zeitpunkt, auch nicht unter Ultraschalleinfluss, alkalische Phosphatase.

Andere *in vitro* Studien zur Beeinflussung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase osteoblastärer Zellen durch Ultraschall sind nicht verfügbar. Allerdings wurde eine veränderte Enzymaktivität durch verschiedene andere mechanische Stimuli beschrieben^{41,110}.

5.4 Molekularbiologische Methoden

Mittels RT-PCR und gelelektrophoretischer Darstellung der Syntheseprodukte lässt sich eine einfache qualitative Aussage darüber treffen, ob die isolierte Gesamt – mRNA eine spezielle mRNA für ein bestimmtes Genprodukt enthält. Somit ist auch die Beurteilung darüber möglich, ob die Einwirkung des Ultraschallsignals zu einer qualitativ veränderten Expression (im Sinne von „Anschalten“ oder „Abschalten“) der Gene der untersuchten Marker führt.

Dies war in den eigenen Versuchen nicht der Fall, denn sowohl in der Ultraschall- als auch in der Kontrollgruppe wiesen die Zellen ein qualitativ gleichartiges Genexpressionsmuster bezüglich der untersuchten Marker auf.

Darüber hinaus sollte eine semiquantitative Aussage darüber getroffen werden, ob es zu einer Veränderung des Grades der Genexpression im Sinne von „Hochregulieren“ oder „Herunterregulieren“ durch Einwirken von Ultraschall kommt.

Hierzu wurden die Gelelektrophoresebanden densitometrisch quantifiziert, wobei die Dichte der Banden mit der Menge der eingesetzten mRNA korreliert. Anschließend wurden diese Dichtewerte auf den korrespondierenden Wert der konstitutiv (also praktisch unverändert) exprimierten GAPDH normiert (relative Expressionsrate). Mit dieser Methode kann man abschätzen, ob eine Zunahme oder Abnahme der Expression eines bestimmten Gens vorliegt.

Ein deutlicher Anstieg der relativen Expressionsrate war bei BMP-2 und BMP-4 zu verzeichnen, insbesondere nach mehrfacher (drei- bis sechsmaliger) Ultraschallbehandlung. Da die meisten BMPs bei Osteogenesevorgängen und Frakturheilungsprozessen eine wichtige Rolle spielen¹⁴¹, könnte die klinische Wirkung des Ultraschallsignals auf einer Induktion von Knochenwachstumsfaktoren aus mesenchymalen Zellen (z.B. Osteoblasten) im Frakturgebiet beruhen. Diese könnten dann einerseits sich selbst, andererseits mesenchymale Vorläuferzellen, auf auto- bzw. parakrine Weise zur Knochenbildung bzw. zur osteogenen Differenzierung stimulieren.

Obgleich BMP-7 mehrfach im Knochengewebe nachgewiesen wurde^{103,133,141}, exprimierten die osteoblastären Zellen *in vitro* keine entsprechende mRNA. Möglicherweise ist die Expression an ein bestimmtes, hier nicht durchlebtes Differenzierungsstadium der Zellen gebunden. Am Modell der Distraktionsosteogenese konnte *in vivo* gezeigt werden, dass mechanischer Stress zwar die Expression von BMP-2 und BMP-4, nicht jedoch die Expression von BMP-7 induziert¹²⁰. Weiterhin wurde über eine gesteigerte osteoblastäre Expression von TGF- β unter Ultraschalleinfluss berichtet¹¹⁴.

Eine Veränderung des Expressionsverhalten der übrigen Marker (Typ-I-Kollagen, AP, Osteokalzin, COX-2, HSP 47) unter Einfluss von Ultraschall konnte nicht festgestellt werden. Entweder wurden diese Marker unverändert exprimiert, oder aber die Änderungen des Expressionsverhaltens waren nur von kurzer Dauer bzw. setzten später ein und wurden aufgrund des Versuchsdesigns nicht erfasst. Denn die Isolierung der mRNA wurde stets 24 Stunden nach einer Ultraschallbehandlung durchgeführt. Es ist beispielsweise durchaus denkbar, dass sich nach dieser Zeit ein zuvor veränderter mRNA – Level wieder normalisiert hat. Entsprechende Beobachtungen wurden anhand der COX-2 mRNA beschrieben: eine verstärkte Expression begann 15 Minuten nach Ultraschallbehandlung, gipfelte nach 60 Minuten

und war bereits nach 180 Minuten wieder dem Niveau der Kontrollgruppe angeglichen⁶¹. Die einzelnen Marker können durchaus über unterschiedliche zeitliche Expressionsgipfel nach einer Stimulierung verfügen. Diese zeitlichen Gipfel sind möglicherweise auch abhängig von der Art des Stimulus und im einzelnen nicht umfassend bekannt.

Über eine unter Ultraschall unveränderte Kollagenexpression (Alpha1(I)-Prokollagen) wurde mehrfach berichtet, sowohl *in vitro* an Chondrozytenkulturen⁹⁶ wie auch *in vivo* in Kallusgewebe^{144,145}, bisher jedoch nicht an Kulturen osteoblastärer Zellen.

Veröffentlichungen zum Expressionsverhalten von HSP 47 unter Ultraschalleinfluss existieren praktisch nicht, bekannt ist aber die Assoziation mit der Expression von Typ-I-Kollagen^{60,102}. So wird unter unphysiologischen Bedingungen vermehrt HSP47 exprimiert, während die Expression von Kollagen abfällt⁸⁵. Die Zellen werden also durch den Ultraschall vermutlich nicht in einem unphysiologischen Ausmaß gestresst, wofür auch die gleichbleibende Zellviabilität (WST-1-Assay) spricht.

Das Expressionsverhalten von AP unter Einwirken von Ultraschall wurde bisher nur im Rahmen eines *in vivo* Versuches beschrieben. Hierbei wurde über einen unveränderten AP mRNA – Gehalt von Kallusgewebe berichtet^{144,145}. Obwohl im eigenen Versuch die spezifische Enzymaktivität unter Ultraschall anstieg, wurde die Expressionsrate von AP mRNA nicht heraufgesetzt. Hierfür sind verschiedene Erklärungen denkbar. Da es sich bei der AP um ein membranständiges Enzym (Ektoenzym) handelt, könnte die Aktivitätserhöhung auf einem verstärkten Einbau von enzymtragenden intrazellulären Vesikeln in die Zellmembran beruhen. Hierfür wäre keine verstärkte Neusynthese des Enzyms erforderlich. Andererseits könnte auch, wie bereits erörtert, eine tatsächliche Induktion im Sinne von erhöhter Transkription und anschließender Neusynthese dem Nachweis aus methodischen Gründen entgangen sein.

Bezüglich Osteokalzin konnte in den eigenen Versuchen keine Stimulierbarkeit der mRNA Expression durch Ultraschall festgestellt werden. Dies deckt sich mit *in vivo* Versuchen anhand von Kallusgewebe^{144,145}. Andererseits konnte an der murinen stromalen Knochenmarkzell-Linie ST2 nach Ultraschallbehandlung eine gesteigerte Bildung von Osteokalzin mRNA nachgewiesen werden⁸⁶.

Auch die relative Expressionsrate von COX-2 mRNA blieb in den eigenen Versuchen praktisch unverändert. Im Gegensatz dazu wurde über eine verstärkte Expression von COX-2 mRNA innerhalb von 15 bis 60 Minuten nach Ultraschallbehandlung von Osteoblastenkulturen berichtet⁶¹. Das Zeitfenster zwischen Beschallung und mRNA – Präparation wich in dieser Studie deutlich von den eigenen Versuchen ab (siehe oben).

5.5 Wirkmechanismen von therapeutischem Ultraschall

Auf welche Art und Weise Zellfunktionen durch Ultraschall beeinflusst werden, ist letztendlich nicht genau bekannt. Es gibt jedoch eine Reihe von Phänomenen, die prinzipiell dafür in Frage kommen können und generell in thermale und nonthermale Effekte eingeteilt werden.

Die Energie des Ultraschalls (mechanische Energie) wird vom Gewebe absorbiert und dabei zum Teil in thermische Energie umgewandelt. So führt höherenergetischer Ultraschall, wie er z.B. in der physikalischen Therapie (mit Intensitäten von meist 200-1000 mW/cm²) zum Einsatz kommt, zu einer signifikanten Temperaturerhöhung im Gewebe. Derartige thermale Effekte können bei der Verwendung niederenergetischen Ultraschalls (Schallintensitäten von 100 mW/cm² oder weniger) weitgehend ausgeschlossen werden^{18,23}. So kommt es bei der Frakturbehandlung mit niederenergetischem gepulsten Ultraschall im Kallusgewebe lediglich zu einem Temperaturanstieg von 0,01 bis 0,1 °C nach 20minütiger Behandlung^{21,98}. Im folgenden wird auf die nonthermalen Ultraschalleffekte eingegangen.

Im Schallfeld kommt es aufgrund von Druckschwankungen zur Pulsation (Kompression und Expansion) gasgefüllter Bläschen („Microbubbles“) von wenigen µm Größe (sogenannte Kavitation). Diese Gasbläschen können in Resonanzfrequenz schwingen und somit zu einer lokalen Verstärkung der Schallenergie führen. Pulsieren sie viele Zyklen unter Beibehaltung ihrer durchschnittlichen Größe, spricht man von „stabiler Kavitation“. Dabei wird Ultraschallenergie absorbiert und in Wärme sowie sphärische Wellen umgewandelt. Außerdem wird die umgebende Flüssigkeit (im

Gewebe oder *in vitro*) in Bewegung gesetzt, es kommt zum sogenannten „Microstreaming“. Bei relativ hohen Ultraschallintensitäten, z.B. mehrere W/cm^2 , können die Bläschen unter Freisetzung hoher thermischer Energie und Druckbildung plötzlich kollabieren, sogenannte „transiente Kavitation“. Hierbei kann es auch zur Bildung von freien Radikalen kommen. Die Folgen sind Gewebedesintegration und Nekrose. Geschilderte Phänomene wurden *in vitro* beobachtet, *in vivo* sind sie nicht sicher belegt^{25,76,77,137}. Sowohl Kavitation als auch „Mikrostreaming“ könnten Scherkräfte auf biologische Membranen ausüben und deren Eigenschaften wie z.B. Permeabilität beeinflussen^{18,23}.

Beschrieben wurden auch mechanosensitive Ionenkanäle („Stretch Receptors“), die ihre Leitfähigkeit bei auf die Zelle einwirkendem mechanischen Stress ändern¹¹⁵. So kommt es beispielsweise unter Ultraschalleinfluss zu einer Erhöhung der Kalziumaufnahme in Fibroblasten⁸⁴.

Möglicherweise ist auch das Zytoskelett an der Umsetzung von einwirkenden mechanischen Kräften in modifizierte zelluläre Vorgänge beteiligt^{81,135}.

Die Umwandlung von Ultraschallenergie in piezoelektrische Potentiale beschrieb Klug⁵⁵ und postulierte, dass diese Potentiale die während der natürlichen Knochenbruchheilung auftretenden Frakturpotentiale³² verstärken.

Anschließend können sich dann mittels nachgeschalteter intrazellulärer Signalkaskaden zelluläre Vorgänge wie z.B. Genexpression ändern⁹⁰. Beschrieben wurde eine gesteigerte osteoblastäre Expression von „Early-Response-Genes“ wie *c-fos*⁶⁷ und *COX-2*^{31,46,50}. Ebenso kommt es unter mechanischem Stress^{15,106} wie auch unter Einwirkung niederenergetischen gepulsten Ultraschalls¹¹⁴ zu erhöhten cAMP-Spiegeln sowie zur Sekretion von Stickstoffmonoxid^{52,99} und von Prostaglandinen^{50,101}. Nach diesen frühen Ereignissen kommt es zu einer veränderten Expression weiterer „mechanosensitiver“ Gene wie z.B. Osteopontin, Osteokalzin, Kollagen Typ I und IGF-1. In den Promotorregionen einiger mechanosensitiver Gene konnte man Motive wie CRE („Cyclic AMP Response Element“) oder SSRE („Shear Stress Responsive Element“) nachweisen^{42,51,90,92,107}.

Die meisten dieser Erkenntnisse wurden anhand von *in vitro* Modellen gewonnen. Ob unter Einwirkung von mechanischem Stress *in vivo* die selben Vorgänge ablaufen, ist nicht bekannt.

Auch die Identität der eigentlichen Ultraschall-responsiblen Zellen ist noch nicht definitiv geklärt. In Frage kommen verschiedene mesenchymale Zelltypen, insbesondere knochenbildende^{44,61} und knorpelbildende^{43,96} Zellen. Aber auch weitgehend undifferenzierte mesenchymale Vorläuferzellen bzw. Stammzellen⁸⁶ oder aber die Interaktion verschiedener Zelltypen kommt hierfür in Frage.

Dies wäre eine weitere Erklärung, warum die Kulturen humaner Beckenkammzellen, die eine Kokultur verschiedener mesenchymaler Zellen darstellen, unter Ultraschalleinwirkung ein zum Teil verändertes Verhalten aufwiesen (Alkalische Phosphatase – Aktivität), während die MC3T3-E1 – Osteoblasten (Monokultur) diese Veränderungen nicht zeigten.

6 Zusammenfassung

Niederenergetischer gepulster Ultraschall wird seit mehreren Jahren erfolgreich zur Therapie von verzögert heilenden Frakturen und Pseudarthrosen eingesetzt. Die Wirksamkeit wurde anhand verschiedener klinischer Studien demonstriert, die genauen Wirkmechanismen sind weniger gut verstanden.

Ziel dieser Untersuchung war es, den Einfluss von Ultraschall auf verschiedene mesenchymale Zellen anhand von Zellkulturen zu untersuchen. Die Parameter Zellproliferation bzw. Zellvitalität, Zellmorphologie, Aktivität der Alkalischen Phosphatase und Genexpressionsmuster wurden betrachtet. Bei den verwendeten Zellen handelte es sich um primäre Zellen aus humanem spongiösen Knochen („humane Beckenkammzellen“) sowie um die murine Osteoblasten-Linie MC3T3-E1 und um die murine Fibroblasten-Linie L929. Die Ultraschallbehandlung dauerte 20 Minuten täglich und wurde an bis zu sechs aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt.

Keine der drei untersuchten Zellarten zeigte eine Änderung des Proliferationsverhaltens bzw. der Zellvitalität. Für Veränderungen der Zellmorphologie sowie der Mineralisierung gab es keinen Anhalt. Bei den humanen Beckenkammzellen wurde eine Steigerung der spezifischen Alkalische-Phosphatase-Aktivität beobachtet, nach sechsmaliger Ultraschallbehandlung betrug sie 143% der Aktivität der Kontrollkulturen. Die MC3T3-E1-Osteoblasten wiesen keine Veränderung ihrer Alkalische-Phosphatase-Aktivität auf, die L929-Fibroblasten exprimierten zu keinem Zeitpunkt, auch nicht unter Ultraschall, dieses Enzym.

Weiterhin wurde das Genexpressionsmuster der humanen Beckenkammzellen mittels mRNA-Isolierung und RT-PCR untersucht. Als Markergene dienten Alkalische Phosphatase, Typ-I-Kollagen, Osteokalzin, BMP-2, BMP-4, BMP-7, COX-2 und HSP 47. Abgesehen von BMP-7 wurden alle der genannten Gene sowohl in der Ultraschall- als auch in der Kontrollgruppe exprimiert. Eine qualitative Änderung des Expressionsmusters unter Ultraschall kann somit ausgeschlossen werden. Die semiquantitative Analyse ergab eine erhöhte Expressionsrate von BMP-2 und BMP-4, während die anderen Marker praktisch unverändert blieben.

7 Literatur

- 1 **Ahrens, M., Ankenbauer, T., Schröder, D., Hollnagel, A., Mayer, H., Gross, G. (1993):**
Expression of Human Bone Morphogenetic Proteins-2 or -4 in Murine Mesenchymal Progenitor C3H10T1/2 Cells Induces Differentiation into distinct Mesenchymal Cell Lineages.
DNA Cell Biol 12: 871-880
- 2 **Andrew, J.G., Hoyland, J., Andrew, S.M., Freemont, A.J., Marsh, D. (1992):**
Demonstration of TGF- β 1 mRNA by In Situ Hybridisation in Normal Human Fracture Healing.
Calcif Tissue Int 52: 74-78
- 3 **Andrew, J.G., Hoyland, J., Freemont, A.J., Marsh, D. (1993):**
Insulinlike Growth Factor Gene Expression in Human Fracture Callus.
Calcif Tissue Int 53: 97-102
- 4 **Aviv, H., Leder, P. (1972):**
Purification of Biologically Active Globin Messenger RNA by Chromatography on Oligothymidylic Acid-Cellulose.
Proc Nat Acad Sci USA 69: 1408-1412
- 5 **Basset, C.A.L., Becker, R.O. (1962):**
Generation of Electrical Potentials by Bone in response to Mechanical Stress.
Science 137: 1063
- 6 **Basset, C.A.L., Mitchell, S.N., Gaston, S.N. (1982):**
Pulsing Electromagnetic Fields Treatment in Ununited Fractures and Failed Arthrodeses.
JAMA 247: 623-628
- 7 **Basset, C.A.L., Pawluk, R.J., Becker, R.O. (1964):**
Effects of Electric Currents in Bone in vivo.
Nature 204: 652-654

- 8 Bradford, M.M. (1976):**
A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.
Anal Biochem 72: 248-254
- 9 Brand, J.C. Jr, Brindle, T., Nyland, J., Caborn, D.N., Johnson, D.L. (1999):**
Does Pulsed Low Intensity Ultrasound allow early return to normal activities when Treating Stress Fractures?
Iowa Orthop J 19: 26-30
- 10 Brighton, C.T., Pollack, S.R. (1985):**
Treatment of recalcitrant Non-Union with a Capacitively Coupled Electrical Field. A preliminary report.
J Bone Joint Surg [Am] 67: 577-585
- 11 Calvo, M.S., Eyre, D.R., Gundberg, C.M. (1996):**
Molecular Basis and Clinical Application of Biological Markers of Bone Turnover.
Endocr Rev 17: 333-368
- 12 Chen, D., Harris, M.A., Rossini, G., Dunstan, C.R., Dallas, S.L., Feng, J.Q., Mundy, G.R., Harris, S.E. (1997):**
Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) Enhances BMP-3, BMP-4, and Bone Cell Differentiation Marker Gene Expression During the Induction of Mineralized Bone Matrix Formation in Cultures of Fetal Rat Calvarial Osteoblasts.
Calcif. Tissue Int. 60: 283-290
- 13 Cook, S.D., Ryaby, J.P., McCabe, J., Frey, J.J., Heckman, J.D., Kristiansen, T.K. (1997):**
Acceleration of Tibia and Distal Radius Fracture Healing in patients who smoke.
Clin Orthop 198-207
- 14 Cornell, C.N., Lane, J.M. (1992):**
Newest Factors in Fracture Healing.
Clin Orthop Rel Res Issue 277: 297-311

- 15 Davidovitch Z., Shanfeld J.L., Montgomery P.C., Lally E., Laster L., Furst L., Korostoff E. (1984):**
 Biochemical Mediators of the Effects of Mechanical Forces and Electrical Currents on Mineralized Tissues.
 Calcif Tissue Int 36 Suppl 1: 86-97
- 16 Debrunner, A.M. (1994):**
 Orthopädische Krankheiten
 In: Debrunner, A.M. (Hrsg.): Orthopädie, Orthopädische Chirurgie: Die Störungen des Bewegungsapparates in Klinik und Praxis., 3. Auflage
 Verlag Hans Huber, Bern-Göttingen-Toronto-Seattle: 61-73
- 17 Deftos, L.J. (1991):**
 Bone Proteine and Peptide Assays in the Diagnosis and Management of Skeletal Disease.
 Clin Chem 37: 1143-1148
- 18 Dinno, M.A., Dyson, M., Young, S.R., Mortimer, A.J., Hart, J., Crum, L.A. (1989):**
 The Significance of Membrane Changes in the safe and effective use of Therapeutic and Diagnostic Ultrasound.
 Phys Med Biol 34: 1543-1552
- 19 Doan, N., Reher, P., Meghji, S., Harris, M. (1999):**
 In vitro effects of Therapeutic Ultrasound on Cell Proliferation, Protein Synthesis, and Cytokine Production by Human Fibroblasts, Osteoblasts, and Monocytes.
 J Oral Maxillofac Surg 57: 409-419
- 20 Drenckhahn, D., Kugler, P., Rahn, B. A., Putz, R. (1994):**
 Systematik der Gewebe
 In: Drenckhahn, D., Zenker, W. (Hrsg.): Benninghoff, Anatomie. Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen., 15. Auflage
 Urban und Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore: 109-197
- 21 Duarte, L.R. (1983):**
 The Stimulation of Bone Growth by Ultrasound.
 Arch Orthop Trauma Surg 101: 153-159

- 22 Dunn, A.W., Rush, G.A. (1984):**
Electrical Stimulation in Treatment of Delayed Union and Nonunion of Fractures and Osteotomies.
South Med J 77: 1530-1534
- 23 Dyson, M. (1987):**
Mechanisms Involved in Therapeutic Ultrasound.
Physiotherapy 73: 116-120
- 24 Dyson, M., Brookes, M. (1983):**
Stimulation of Bone Repair by Ultrasound.
Ultrasound Med Biol Suppl 2: 61-66
- 25 Edmonds, P.D., Sancier, K.M. (1983):**
Evidence for Free Radical Production by Ultrasonic Cavitation in Biological Media.
Ultrasound Med Biol 9: 635-639
- 26 Ekkernkamp, A., Bosse, A., Haupt, G., Pommer, A. (1992):**
Der Einfluß der extrakorporalen Stoßwellen auf die standartisierte Tibiafraktur am Schaf.
In: Ittel, T., Sieberth, G., Matthiaß, H. (Hrsg.): Aktuelle Aspekte der Osteologie., Springer, Berlin-Heidelberg-New York: 307-310
- 27 Ekkernkamp, A., Muhr, G., Josten, C. (1996):**
Die infizierte Pseudarthrose.
Unfallchirurg 99: 914-924
- 28 Emami, A., Petren-Mallmin, M., Larsson, S. (1999):**
No Effect of Low-intensity Ultrasound on Healing Time of Intramedullary Fixed Tibial Fractures.
J Orthop Trauma 13: 252-257
- 29 Fishman, D.A., Hay, E.D. (1962):**
Origin of Osteoclasts from Mononuclear Leucocytes in Generating New Limbs.
Anat Rec 143: 329-338
- 30 Forriol, F., Solchaga, L., Moreno, J.L., Canadell, J. (1994):**
The Effect of Shock Waves on mature and healing cortical Bone.
Int Orthop 18: 325-329

- 31 Forwood, M.R. (1996):**
Inducible Cyclo-oxygenase (COX-2) Mediates the Induction of Bone Formation by Mechanical Loading in vivo.
J Bone Miner Res 11: 1688-1693
- 32 Friedenberg, Z.B., Smith, H.G. (1969):**
Electrical Potentials in Intact and Fractured Tibia.
Clin Orthop 63: 222-225
- 33 Glazer, P.A., Heilmann, M.R., Lotz, J.C., Bradford, D.S. (1998):**
Use of Ultrasound in Spinal Arthrodesis. A Rabbit Model.
Spine 23: 1142-1148
- 34 Glimcher, M.J. (1985):**
Role of Collagen and Phosphoproteins in the Calcification of Bone and other Collagenous Tissues.
In: Rubin, R.P., Weiss, G.B., Putney, J.W. (ed.): Calcium in Biological Systems, Plenum Press, New York: 607-616
- 35 Golub, E.E. (1996):**
Enzymes in Mineralizing Systems: state of the art.
Connect Tissue Res 35: 183-188
- 36 Hackenthal, E. (1997):**
Antirheumatika und Myotonolytika
In: Oberdisse, E., Hackenthal, E., Kuschinsky, K. (Hrsg.): Pharmakologie und Toxikologie, 1. Auflage
Springer, Berlin-Heidelberg-New York: 245-257
- 37 Harris, M. (1992):**
The Conservative Management of Osteoradionecrosis of the Mandible with Ultrasound Therapy.
Br J Oral Maxillofac Surg 30: 313-318
- 38 Haupt, G. (1997):**
Use of Extracorporeal Shock Waves in the treatment of Pseudarthrosis, Tendinopathy and other Orthopedic Diseases.
J Urol 158: 4-11

- 39 Heckman, J.D., Ryaby, J.P., McCabe, J., Frey, J.J., Kilcoyne, R.F. (1994):**
Acceleration of Tibial Fracture Healing by Non-invasive, Low-intensity Pulsed
Ultrasound.
J Bone Joint Surg Am 76: 26-34
- 40 Heckman, J.D., Sarasohn-Kahn, J. (1997):**
The Economics of Treating Tibia Fractures. The Cost of Delayed Unions.
Bull Hosp Jt Dis 56: 63-72
- 41 Hillsley, M.V., Frangos, J.A. (1995):**
Alkaline Phosphatase in Osteoblasts is Down-Regulated by Pulsatile Fluid Flow.
Calcif Tissue Int 60: 48-53
- 42 Hsieh H.J., Li N.Q., Frangos J.A. (1991):**
Shear Stress Increases Endothelial Platelet-Derived Growth Factor mRNA Levels.
Am J Physiol 260: 642-646
- 43 Huang, M.H., Yang, R.C., Ding, H.J., Chai, C.Y. (1999):**
Ultrasound Effect on level of Stress Proteins and Arthritic Histology in
Experimental Arthritis.
Arch Phys Med Rehabil 80: 551-556
- 44 Ito, M., Azuma, Y., Ohta, T., Komoriya, K. (2000):**
Effects of Ultrasound and 1,25-Dihydroxyvitamin D3 on Growth Factor Secretion
in Co-cultures of Osteoblasts and Endothelial Cells.
Ultrasound Med Biol 26: 161-166
- 45 Jensen, J.E. (1998):**
Stress Fracture in the World Class Athlete: a case study.
Med Sci Sports Exerc 30: 783-787
- 46 Joldersma, M., Burger, E.H., Semeins, C.M., Klein-Nulend, J. (2000):**
Mechanical Stress Induces COX-2 mRNA Expression in Bone Cells from Elderly
Women.
J Biomech 33: 53-61

- 47 Katagiri, T., Yamaguchi, A., Ikeda, T., Yoshiki, S., Wozney, J.M., Rosen, V., Wang, E.A., Tanaka, H., Omura, S., Suda, T. (1990):**
The Non-Osteogenic Mouse pluripotent Cell Line, C3H10T1/2, is Induced to Differentiate into Osteoblastic Cells by Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2.
Biochem Biophys Res Commun 172: 295-299
- 48 Kawata, A., Mikuni-Takagaki, Y. (1998):**
Mechanotransduction in Stretched Osteocytes - Temporal Expression of immediate early and other Genes.
Biochem Biophys Res Commun 246: 404-408
- 49 Keller, J., Bünger, C., Andreassen, T.T., Bak, B., Lucht, U. (1987):**
Bone Repair Inhibited by Indomethacin.
Acta Orthop Scand 58: 379-383
- 50 Klein-Nulend, J., Burger, E.H., Semeins, C.M., Raisz, L.G., Pilbeam, C.C. (1997):**
Pulsating Fluid Flow stimulates Prostaglandin Release and Inducible Prostaglandin G/H Synthase mRNA Expression in primary Mouse Bone Cells.
J Bone Miner Res 12: 45-51
- 51 Klein-Nulend, J., Helfrich, M.H., Sterck, J.G., MacPherson, H., Joldersma, M., Ralston, S.H., Semeins, C.M., Burger, E.H. (1998):**
Nitric Oxide Response to Shear Stress by Human Bone Cell Cultures is Endothelial Nitric Oxide Synthase Dependent.
Biochem Biophys Res Commun 250: 108-114
- 52 Klein-Nulend, J., Semeins, C.M., Ajubi, N.E., Nijweide, P.J., Burger, E.H. (1995):**
Pulsating Fluid Flow Increases Nitric Oxide (NO) Synthesis by Osteocytes but not Periosteal Fibroblasts--Correlation with Prostaglandin Upregulation.
Biochem Biophys Res Commun 217: 640-648
- 53 Klug, W. (1983):**
Stimulation of Fracture Healing by Ultrasound - Animal Experimental Study.
Beitr Orthop Traumatol 30: 670-680

- 54 Klug, W., Franke, W.G., Knoch, H.G. (1986):**
Scintigraphic Control of Bone-fracture Healing under Ultrasonic Stimulation: an Animal Experimental Study.
Eur J Nucl Med 11: 494-497
- 55 Klug, W., Knoch, H.-G. (1987):**
Durch Ultraschall Stimulierung der Knochenbruchheilung.
Ultraschall Klin Prax 2: 185-189
- 56 Knoch, H.-G. (1967):**
Konservative Behandlungsmöglichkeiten durch Ultraschall bei verzögerter Kallusbildung.
Beitr Orthop 14: 720-723
- 57 Knutsen, R., Wergedal, J.E., Sampath, T.K., Baylink, D.J., Mohan, S. (1993):**
Osteogenic Protein-1 Stimulates Proliferation and Differentiation of Human Bone Cells in vitro.
Biochem Biophys Res Commun 194: 1352-1358
- 58 Kodama, H.A., Amagai, Y., Sudo, H., Kasai, S., Yamamoto, S. (1981):**
Establishment of a Clonal Osteogenic Cell Line from Newborn Mouse Calvaria.
Jpn J Oral Biol 23: 899-901
- 59 Koide, M., Murase, Y., Yamato, K., Noguchi, T., Okahashi, N., Nishihara, T. (1999):**
Bone Morphogenetic Protein -2 Enhances Osteoclast Formation mediated by Interleukin-1 alpha through Upregulation of Osteoclast Differentiation Factor and Cyclooxygenase-2.
Biochem Biophys Res Commun 259: 97-102
- 60 Kojima, T., Miyaishi, O., Saga, S., Ishiguro, N., Tsutsui, Y., Iwata, H. (1998):**
The Retention of Abnormal Type I Procollagen and Correlated Expression of HSP47 in Fibroblast from a Patient with Lethal Osteogenesis Imperfecta.
J Pathol 184: 212-218
- 61 Kokubu, T., Matsui, N., Fujioka, H., Tsunoda, M., Mizuno, K. (1999):**
Low Intensity Pulsed Ultrasound Exposure Increases Prostaglandin E2 Production via the Induction of Cyclooxygenase-2 mRNA in Mouse Osteoblasts.
Biochem Biophys Res Commun 2: 284-287

- 62 Kristiansen, T.K. (1990):**
The Effect of Low Power Specifically Programmed Ultrasound on the Healing Time of Fresh Fractures using a Colles' Model.
J Orthop Trauma 4: 227-228
- 63 Kristiansen, T.K., Ryaby, J.P., Mc Cabe, J., Frey, J.J., Roe, L.R. (1997):**
Accelerated Healing of Distal Radius Fractures with the use of specific, Low-intensity Ultrasound. A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study.
J Bone Joint Surg Am 79: 961-973
- 64 Kübler, N. (1995):**
Osteoinduktive Implantate- experimentelle Grundlagen und klinische Anwendung in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Habilitationsschrift
Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie
- 65 Kübler, N. (1997):**
Osteoinduktion und -reparation.
Mund Kiefer Gesichtschir 1: 2-25
- 66 Kuner, E.H., Berwarth, H., Lücke, S.V. (1996):**
Behandlungsprinzipien bei aseptischen Pseudarthrosen.
Orthopädie 25: 394-404
- 67 Lean J.M., Mackay A.G., Chow J.W., Chambers T.J. (1996):**
Osteocytic Expression of mRNA for c-fos and IGF-I: an immediate Early Gene Response to an Osteogenic Stimulus.
Am J Physiol 270: 937-945
- 68 Lian, J.B., Grundberg, C.M. (1988):**
Osteocalcin - Biochemical Considerations and Clinical Applications.
Clin Orthop 226: 267-291
- 69 Löffler, G., Petrides, P.E. (1997):**
Stoffwechsel der Zelle: Weitergabe und Realisierung der Erbinformationen
In: Löffler, G., Petrides, P.E. (Hrsg.): Biochemie und Pathobiochemie, 5. Auflage
Springer, Berlin-Heidelberg-New York: 203-355

- 70 Löffler, G., Petrides, P.E. (1997):**
Stoffwechsel spezifischer Gewebe
In: Löffler, G., Petrides, P.E. (Hrsg.): Biochemie und Pathobiochemie, 5. Auflage
Springer, Berlin-Heidelberg-New York: 731-1089
- 71 Luyten, F.P., Chen, P., Paralkar, V., Reddi, A.H. (1994):**
Recombinant Bone Morphogenetic Protein-4, Transforming Growth Factor- β 1,
and Activin A Enhance the Cartilage Phenotype of Articular Chondrocytes in
vitro.
Exp Cell Res 210: 224-229
- 72 Luyten, F.P., Cunningham, N.S., Ma, S., Muthukumaran, N., Hammonds,
R.G., Nevins, W.B., Wood, W.I., Reddi, A.H. (1989):**
Purification and Partial Amino Acid Sequence of Osteogenin, a Protein Initiating
Bone Differentiation.
J Biol Chem 264: 13377-13380
- 73 Luyten, F.P., Yu Y.M., Yanagishita, M., Vukicevic, S., Hammonds, R.G.,
Reddi, A.H. (1992):**
Natural Bovine Osteogenin and Recombinant Human Bone Morphogenetic
Protein-2B are Equipotent in the Maintenance of Proteoglycans in Bovine
Articular Cartilage Explant Cultures.
J Biol Chem 267: 3691-3695
- 74 Maciel, F.M., Sarrazin, P., Morisset, S., Lora, M., Patry, C., Dumais, R., de
Brum-Fernandes, A.J. (1997):**
Induction of Cyclooxygenase-2 by Parathyroid Hormone in Human Osteoblasts in
Culture.
J Rheumatol 24: 2429-2435
- 75 Magnusson, P., Larsson, L., Magnusson, M., Davie M.W., Sharp C.A. (1999):**
Isoforms of Bone Alkaline Phosphatase: Characterisation and Origin in Human
Trabecular and Cortical Bone.
J Bone Miner Res 14: 1926-1933
- 76 Maulik, D. (1989):**
Biologic Effects of Ultrasound.
Clin Obstet Gynecol 32: 645-659

- 77 Maxwell, L. (1992):**
Therapeutic Ultrasound: Its Effects on the Cellular and Molecular Mechanisms of Inflammation and Repair.
Physiotherapy 78: 421-426
- 78 Mayr, E., Frankel, V., Rüter, A. (2000):**
Ultrasound - an alternative Healing Method for Nonunions?
Arch Orthop Trauma Surg 120: 1-8
- 79 Mayr, E., Rudzki, M.M., Rudzki, M., Borchardt, B., Häusser, H., Rüter, A. (2000):**
Does Low Intensity, Pulsed Ultrasound Speed Healing of Scaphoid Fractures?
Handchir Plast Chir 32: 115-122
- 80 Mayr, E., Wagner, S., Ecker, M., Rüter, A. (1999):**
Die Ultraschalltherapie bei Pseudarthrosen.
Unfallchirurg 102: 191-196
- 81 Mezzini, M.C., Toma, C.D., Schaffer, J.L., Gray, M.L., Gerstenfeld, L.C. (1998):**
Osteoblast Cytoskeletal Modulation in Response to Mechanical Strain in vitro.
J Orthop Res 16: 170-180
- 82 Min, Y.K., Rao, Y., Okada, Y., Raisz, L.G., Pilbeam, C.C. (1998):**
Regulation of Prostaglandin G/H Synthase-2 Expression by Interleukin-1 in Human Osteoblast-like Cells.
J Bone Miner Res 13: 1066-1075
- 83 Mommsen, U., Schumpelick, V. (1999):**
Allgemeine Traumatologie.
In: Schumpelick, V., Bleese, M., Mommsen, U. (Hrsg.): Chirurgie, 4. Auflage
Enke, Stuttgart: 1155-1202
- 84 Mortimer, A.J., Dyson, M. (1988):**
The Effect of Ultrasound on Calcium Uptake in Fibroblasts.
Ultrasound Med Biol 14: 499-506

- 85 Nagata, K. (1998):**
Expression and Function of Heat Shock Protein 47: a Collagen-specific Molecular Chaperone in the Endoplasmic Reticulum.
Matrix Biol 16: 379-386
- 86 Naruse, K., Mikuni-Takagaki, Y., Azuma, Y., Ito, M., Oota, T., Kameyama, K., Itoman, M. (2000):**
Anabolic Response of Mouse Bone-marrow-derived Stromal Cell Clone ST2 Cells to Low-intensity Pulsed Ultrasound.
Biochem Biophys Res Commun 268: 216-220
- 87 Niethard, F., Pfeil, J. (1997):**
Orthopädie
In: Bob, A., Bob K. (Hrsg.): Duale Reihe, 3. Auflage
Hippokrates, Stuttgart: 220-221, 309-317
- 88 Nijweide, P.J., van der Plas, A., Olthof, A.A. (1988):**
Osteoblastic Differentiation.
Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissues.
Ciba Foundation Symposium, Wiley
- 89 Nomura, S., Hirota, S., Nakase, T., Hirakawa, K., Takaoka, K (1994):**
Expression and Lokalisation of BMP-4 mRNA during Embryogenesis and Fracture Healing.
1st International Conference on Bone Morphogenetic Proteins., Baltimore
- 90 Nomura, S., Takano-Yamamoto, T. (2000):**
Molecular Events caused by Mechanical Stress in Bone.
Matrix Biol 19: 91-96
- 91 Nomura, S., Wills, A.J., Edwards, D.R., Heath, J.K., Hogan, B.L.M. (1988):**
Developmental Expression of 2ar (Osteopontin) and SPARC (Osteonectin) RNA as revealed by in situ Hybridization.
J Cell Biol 106: 441-450

- 92 Ogasawara, A., Arakawa, T., Kaneda, T., Takuma, T., Sato, T., Kaneko, H., Kumegawa, M., Hakeda, Y. (2001):**
Fluid Shear Stress-Induced Cyclooxygenase-2 Expression is mediated by C/EBP beta, cAMP-Response Element-Binding Protein, and AP-1 in Osteoblastic MC3T3-E1 Cells.
J Biol Chem 276: 7048-7054
- 93 Owen, M. (1978):**
Histogenesis of Bone Cells.
Calcif Tissue Res 25: 205-207
- 94 Owen, T.A., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L.M., Wilming, L., Tassinari, M.S., Kennedy, M.B., Pockwinse, S., Lian, J.B., Stein, G.S. (1990):**
Progressive Development of the Rat Osteoblast Phenotype In Vitro: Reciprocal Relationships in Expression of Genes Associated With Osteoblast Proliferation and Differentiation During Formation of the Bone Extracellular Matrix
J Cell Phys 143: 420-430
- 95 Owen, T.A., Aronow, M.S., Barone, L.M., Bettencourt, B., Stein, G.S., Lian, J.B. (1991):**
Pleiotropic Effects of Vitamin D on Osteoblast Gene Expression are related to the Proliferative and Differentiated State of the Bone Cell Phenotype: Dependency upon Basal Levels of Gene Expression, Duration of Exposure, and Bone Matrix Competency in normal Rat Osteoblast Cultures.
Endocrinology 128: 1496-1504
- 96 Parvizi, J., Wu, C.C., Lewallen, D.G., Greenleaf, J.F., Bolander, M.E. (1999):**
Low-intensity Ultrasound Stimulates Proteoglycan Synthesis in Rat Chondrocytes by Increasing Aggrecan Gene Expression.
J Orthop Res 17: 488-494
- 97 Pilbeam, C., Rao, Y., Voznesensky, O., Kawaguchi, H., Alander, C., Raisz, L., Herschman, H. (1997):**
Transforming Growth Factor - beta1 Regulation of Prostaglandin G/H Synthase-2 Expression in Osteoblastic MC3T3-E1 Cells.
Endocrinology 138: 4672-4682

- 98 Pilla, A.A., Mont, M.A., Nasser, P.R., Khan, S.A., Figueiredo, M., Kaufman, J.J., Siffert, R.S. (1990):**
Non-invasive Low-intensity Pulsed Ultrasound Accelerates Bone Healing in the Rabbit.
J Orthop Trauma 4: 246-253
- 99 Pitsillides A.A., Rawlinson S.C., Suswillo R.F., Bourrin S., Zaman G., Lanyon L.E. (1995):**
Mechanical Strain-Induced NO Production by Bone Cells: a Possible Role in Adaptive Bone (Re)Modeling?
FASEB J 9: 1614-1622
- 100 Raisz, L.G., Pilbeam, C.C., Fall, P.M. (1993):**
Prostaglandins: Mechanisms of Action and Regulation of Production in Bone.
Osteoporos Int 3: 136-140
- 101 Rawlinson S.C., el-Haj A.J., Minter S.L., Tavares I.A., Bennett A., Lanyon L.E. (1991):**
Loading-Related Increases in Prostaglandin Production in Cores of Adult Canine Cancellous Bone in vitro: a Role for Prostacyclin in Adaptive Bone Remodeling?
J Bone Miner Res 6: 1345-1351
- 102 Razzaque, M.S., Taguchi, T. (1999):**
The possible role of Colligin / HSP47, a Collagen-binding Protein, in the Pathogenesis of Human and Experimental Fibrotic Diseases.
Histol Histopathol 14: 1199-1212
- 103 Reddi, A.H. (1994):**
Bone and Cartilage Differentiation.
Curr Opin Genet Dev 4: 737-744
- 104 Reher, P., Doan, N., Bradnock, B., Meghji, S., Harris, M. (1998):**
Therapeutic Ultrasound for Osteoradionecrosis: an in vitro comparison between 1 MHz and 45 kHz machines.
Eur J Cancer 34: 1962-1968
- 105 Reher, P., Elbeshir, E.-N. I., Harvey, W., Meghji, S., Harris, M. (1997):**
The Stimulation of Bone Formation in vitro by Therapeutic Ultrasound.
Ultrasound Med Biol 23: 1251-1258

- 106 Reich K.M., Gay C.V., Frangos J.A. (1990):**
Fluid Shear Stress as a Mediator of Osteoblast Cyclic Adenodine Monophosphate Production.
J Cell Physiol 143: 100-104
- 107 Resnick N., Collins T., Atkinson W., Bonthron D.T., Dewey C.F., Gimbrone M.A. (1993):**
Platelet-Derived Growth Factor B Chain Promotor Contains a cis-acting Fluid Shear-Stress-Responsive Element.
Proc Natl Acad Sci U S A 90: 4591-4595
- 108 Rickard, D. J., Sullivan, T. A., Shenker, B. J., Leboy, P. S., Kazhdan, I. (1994):**
Induction of rapid Osteoblast Differentiation in Rat Bone Marrow Stromal Cell Cultures by Dexamethasone and BMP-2.
Dev Biol 161: 218-228
- 109 Ritter, M.A., Sieber, J.M. (1985):**
Prophylactic Indomethacin for the Prevention of Heterotopic Bone Formation following Total Hip Arthroplasty.
Clin Orthop 196: 217-225
- 110 Roelofsen, J., Klein-Nulend, J., Burger, E.H. (1995):**
Mechanical Stimulation by Intermittend Hydrostatic Compression Promotes Bone-specific Gene Expression in vitro.
J Biomech 28: 1493-1503
- 111 Rokutan, K., Hirakawa, T., Teshima, S., Nakano, Y., Miyoshi, M., Kawai, T., Konda, E., Morinaga, H., Nikawa, T., Kishi, Kyoichi (1998):**
Implications of Heat Shock / Stress Proteins for Medicine and Disease.
J Med Invest 44: 137-147
- 112 Rompe, J.-D., Eysel, P., Hopf, C., Vogel, J., Küllmer, K. (1997):**
Extrakorporale Stoßwellenapplikation bei gestörter Knochenheilung.
Unfallchirurg 100: 845-849
- 113 Runkel, M., Rommens, P.M. (2000):**
Pseudarthrosen.
Unfallchirurg 103: 51-63

- 114 Ryaby, J.T., Mathew, J., Duarte-Alves, P. (1992):**
Low Intensity Pulsed Ultrasound Affects Adenylate Cyclase and TGF- β Synthesis
in Osteoblastic Cells.
Trans Orthop Res Soc 7: 590
- 115 Sachs, F. (1991):**
Mechanical Transduction by Membrane Ion Channels: a mini review.
Mol Cell Biochem 104: 57-60
- 116 Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989):**
Gel Electrophoresis of DNA.
In: Molecular Cloning, 2nd Edition
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: 6.3-6.60
- 117 Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989):**
In Vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction.
In: Molecular Cloning, 2nd Edition
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: 14.15-14.34
- 118 Sandberg, M., Aro, H.T., Vuorio, E.I. (1993):**
Gene Expression During Bone Repair.
Clin Orthop Rel Res 292-312
- 119 Sarmiento, A., Latta, L.L., Tarr, R.R. (1984):**
The Effects of Function in Fracture Healing and Stability.
Instr Course Lect 33: 83-106
- 120 Sato, M., Ochi, T., Nakase, T. (1999):**
Mechanical Tension-Stress Induces Expression of BMP-2 and -4, but not BMP-6,
-7 and GDF-5 mRNA during Distraction Osteogenesis.
J Bone Miner Res 14: 1084-1095
- 121 Sato, W., Matsushita, T., Nakamura, K. (1999):**
Acceleration of Increase in Bone Mineral Content by Low-intensity Ultrasound
Energy in Leg Lengthening.
J Ultrasound Med 18: 699-702

- 122 Schiebler, T.H. (1996):**
Knochen und Knochenverbindungen
In: Schiebler, T.H. (Hrsg.): Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen., 4. Auflage
Springer, Berlin-Heidelberg-New York: 191-217
- 123 Shen, V., Rifas, L., Kohler, G., Peck, W.A. (1986):**
Prostaglandins Change Cell Shape and Increase Intercellular Gap Junctions in Osteoblasts cultured from Rat Fetal Calvaria.
J Bone Miner Res 1: 243-249
- 124 Simmons, D.J. (1976):**
Fracture Healing.
In: Bourne, G. H. (ed.): The biochemistry and physiology of bone.
Academic Press, London: 283-330
- 125 Stanford, C.M., Keller, J.C. (1991):**
The Concept of Osseointegration and Bone Matrix Expression.
Crit Rev Oral Biol Med 2: 83-101
- 126 Stein, G.S., Lian, J.B., Gerstenfeld, L.G., Shalhoub, V., Aronow, M., Owen, T., Markose, E. (1989):**
The Onset and Progression of Osteoblast Differentiation is Functionally Related to Cellular Proliferation.
Connect Tissue Res 20: 3-13
- 127 Sudo, H., Kodama, H.A., Amagai, Y., Yamamoto, S., Kasai, S. (1983):**
In vitro Differentiation and Calcification in a new Clonal Osteogenic Cell Line derived from Newborn Mouse Calvaria.
J Cell Biol 96: 191-198
- 128 Tanzer, M., Harvey, E., Kay, A., Morton, P., Bobyn, J.D. (1996):**
Effect of Noninvasive Low Intensity Ultrasound on Bone Growth into Porous-coated Implants.
J Orthop Res 14: 901-906

- 129 Thies, R. S., Bauduy, M., Ashton, B. A., Kurtzberg, L., Wozney, J. M., Rosen, V. (1992):**
Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 induces Osteoblastic Differentiation in W-20-17 Stromal Cells.
Endocrinology 130: 1318-1324
- 130 Urist, M.R., Nillsson, O.S., Hudak, R., Huo, Y.K., Rasmussen, J., Hirota, W., Lietze, A. (1985):**
Immunologic Evidence of a Bone Morphogenetic Protein in the milieu interieur.
Ann Biol Clin Paris 43: 755-766
- 131 Vogel, J., Hopf, C., Eysel, P., Rompe, J.D. (1997):**
Application of Extracorporeal Shock-Waves in the treatment of Pseudarthrosis of the lower extremity.
Arch Orthop Trauma Surg 116: 480-483
- 132 Vukicevic, S., Latin, V., Chen, P., Batorsky, R., Reddi, A. H., Sampath, T. K. (1994):**
Localization of Osteogenic Protein-1 (Bone Morphogenetic Protein-7) during Human Embryonic Development: high affinity binding to basement membranes.
Biochem Biophys Res Commun 198: 693-700
- 133 Wang, E.A., Rosen, V., Cordes, P., Hewick, R.M., Kriz, M.J., Luxenburg, D.P., Sibley, B.S., Wozney, J.M. (1988):**
Purification and Characterization of other distinct Bone-inducing Factors.
Proc Natl Acad Sci USA 85: 9484-9488
- 134 Wang, E.A., Rosen, V., D'Alessandro, J.S., Bauduy, M., Cordes, P., Harada, T., Israel, D.I., Hewick, R.M., Kerns, K.M., LaPan, P. (1990):**
Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein Induces Bone Formation.
Proc Nat Acad Sci USA 87: 2220-2224
- 135 Wang, N., Butler, J.P., Ingber, D.E. (1993):**
Mechanotransduction across the Cell Surface and through the Cytoskeleton.
Science 260: 1124-1127

- 136 Wang, S.-J., Lewallen, D.G., Bolander, M.E., Chao, E.Y.S., Ilstrup, D.M., Greenleaf, J.F. (1994):**
Low Intensity Ultrasound Treatment Increases Strength in a Rat Femoral Fracture Model.
J Orthop Res 12: 40-47
- 137 Webster, D.F., Pond, J.B., Dyson, M., Harvey, W. (1978):**
The Role of Cavitation in the in vitro Stimulation of Protein Synthesis in Human Fibroblasts by Ultrasound.
Ultrasound Med Biol 4: 343-351
- 138 Weiss, M.J., Ray, K., Henthorn, P.S., Lamb, B., Kadesch, T., Harris, H. (1988):**
Structure of the Human Liver/Bone/Kidney Alkaline Phosphatase Gene.
J Biol Chem 263: 12002-12010
- 139 Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P.A., Hogan, B.L., (1995):**
Bone Morphogenetic Protein-4 is required for Mesoderm Formation and Patterning in the Mouse.
Genes Dev 9: 2105-2116
- 140 Wittenberg, J.M., Wittenberg, R.H. (1992):**
Prostaglandinfreisetzung nach experimentellen Frakturen am Rattenfemur.
In: Ittel, T.H., Sieberth, G.-H., Matthiaß, H.H. (Hrsg.): Aktuelle Aspekte der Osteologie
Springer, Berlin-Heidelberg: 298-302
- 141 Wozney, J. M., Rosen, V. (1993):**
Bone Morphogenetic Proteins.
In: Mundy, G.R., Martin T.J. (Hrsg.): Handbook of Experimental Pharmacology
Springer, Berlin-Heidelberg-New York: 725-748
- 142 Xavier, C.A.M., Duarte, L.R. (1983):**
Ultrasonic Stimulation of Bone Callus: Clinical Application.
Rev Bras Ortopedia 18: 73-80

- 143 Yamaguchi, A., Katagiri, T., Ikeda, T., Wozney, J.M., Rosen, V., Wang, E.A., Kahn, A.J., Suda, T., Yoshiki, S. (1991):**
Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Stimulates Osteoblastic Maturation and Inhibits Myogenic Differentiation in vitro.
J Cell Biol 113: 681-687
- 144 Yang, K.-H., Parvizi, J., Wang, S.-J., Lewallen, D.G., Kinnick, R.R., Greenleaf, J.F., Bolander, M.E. (1996):**
Exposure to Low-intensity Ultrasound Increases Aggrecan Gene Expression in a Rat Femur Fracture Model.
J Orthop Res 14: 802-809
- 145 Yang, K.H., Wang, S.-J., Lewallen, D.G., Greenleaf, J., Oles, K., Bronk, J., Bolander, M.E. (1994):**
Low Intensity Ultrasound Stimulates Fracture Healing in Rat Model: Biomechanical and Gene Expression Analysis.
40th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, New Orleans
- 146 Young, S.R., Dyson, M. (1990):**
Macrophage Responsiveness to Therapeutic Ultrasound.
Ultrasound Med Biol 16: 809-816

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Reuther möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas der Arbeit sowie für die Übernahme des Referates danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dr. K. Würzler für die Idee der Arbeit und für die unermüdliche Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und deren Auswertung.

Herrn Prof. Dr. Dr. N. Kübler danke ich für die Bereitstellung seines Labors zur Durchführung der Experimente.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dipl.-Biol. K. Berr, die mir bei der Planung und Durchführung insbesondere der molekularbiologischen Versuche mit Rat und Tat zur Seite stand. Sie und Herr Dr. Dr. K. Würzler sorgten für eine jederzeit freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, auch dafür möchte ich mich bedanken.

Besonders danken möchte ich Frau M. Schleyer für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei den Arbeiten im Labor.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. C. Hendrich, König-Ludwig-Haus, für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Der Firma Exogen gilt mein Dank für die Bereitstellung der Ultraschallgeräte.

