

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
an der Universität Hamburg im Fachbereich Chemie

**Untersuchung der Wirkung
Extrakorporaler Stoßwellentherapie
auf die Haut
Effekte der Mechanotransduktion auf
Fibroblasten in-vitro und Analyse von
Hautveränderungen in-vivo**

vorgelegt von

Kerstin Birte Neumann

aus Hamburg

Hamburg 2012

Gutachter: Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein

Prof. Dr. Michael Korth

Datum der Disputation: 04. Mai 2012

Per aspera ad astra

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	1
1 Einleitung	2
1.1 Stoßwellen	2
1.1.1 Physikalische Parameter der Stoßwelle.....	3
1.1.2 Erzeugungsverfahren von Stoßwellen	5
1.1.3 Berechnung des Energieeintrages.....	12
1.1.4 Applikation und Ausbreitung akustischer Wellen	14
1.1.5 Medizinische Anwendung von Stoßwellen	17
1.1.6 Wirkungsmechanismen von Stoßwellen	21
1.2 Normale humane dermale Fibroblasten.....	26
1.2.1 Bedeutung von Fibroblasten für die Haut.....	26
1.2.2 Bioanalytische Untersuchungen von Fibroblasten	31
1.3 Hyaluronsäure.....	37
1.3.1 Struktur und Eigenschaften der Hyaluronsäure	37
1.3.2 Bedeutung der Hyaluronsäure für die Haut.....	38
1.3.3 Analytische Methoden zur Bestimmung von Hyaluronsäure	40
1.4 PRIMOS Messsystem.....	42
2 Zielsetzung	44
3 Material und Methoden	45
3.1 Material	45
3.1.1 Laborgeräte, Apparaturen und Software	45
3.1.2 Reagenzien.....	46
3.1.3 Zelllinien, Lösungen und Medien für die Zellkultur	48
3.1.4 Puffer	49
3.1.5 Reaktionskits.....	49
3.1.6 Primer	50
3.1.7 Sonstige verwendete Produkte	50
3.2 Methoden der Zellkultur	51
3.2.1 Kultivierung normaler humaner dermaler Fibroblasten	51

3.2.2	Behandlung der Zellen mit Stoßwellen	52
3.2.3	Migrationsanalyse mit dem Wound and Heal Assay	55
3.2.4	Entwicklung und Optimierung der Zellquantifizierung	58
3.2.5	Genexpressionsanalyse	61
3.2.6	Sekretionsanalyse	66
3.3	Methoden der Hyaluronsäureanalytik	70
3.3.1	Behandlung der Hyaluronsäure mit Stoßwellen	70
3.3.2	Analytik mit der Kapillarelektrophorese	72
3.3.3	Analytik durch Rheologie	73
3.4	Methoden der Studie	75
3.4.1	Aufbau der Studie	75
3.4.2	Behandlung der Probanden mit Stoßwellen	76
3.4.3	Vermessung der Haut mit PRIMOS	76
3.4.4	Aufbereitung der Bilder für die Auswertung	78
3.5	Statistik	80
4	Ergebnisse	81
4.1	Effekte der in-vitro Behandlung mit Stoßwellen	81
4.1.1	Migration von Fibroblasten	81
4.1.2	Proliferation von Fibroblasten	92
4.1.3	Vergleich des elektrohydraulischen und piezoelektrischen Erzeugungsprinzips durch Proliferation	101
4.1.4	Auswertung der Genexpressionsanalyse	106
4.1.5	Auswertung der Sekretionsanalyse	112
4.1.6	Zusammenfassung der Ergebnisse der in-vitro Experimente	115
4.2	Analytik der Hyaluronsäure	116
4.2.1	Kapillarelektrophoretische Analytik der Hyaluronsäure	116
4.2.2	Rheologische Analytik der Hyaluronsäure	122
4.2.3	Ergebnisse der Hyaluronsäureanalytik	127
4.3	Auswertung der Studie	129
4.3.1	Faltenanalyse	129
4.3.2	Rauheitsparameter	130
4.3.3	Ergebnisse der gemessenen Regionen	131
4.3.4	Zusammenfassung der Studienergebnisse	144

5	Diskussion	147
5.1	In-vitro Methoden zur Untersuchung der Effekte auf Fibroblasten..	147
5.1.1	Reproduzierbare Behandlung der Zellen	148
5.1.2	Migration	149
5.1.3	Proliferation.....	152
5.1.4	Expression und Sekretion	155
5.1.5	Klinische Umsetzung der Ergebnisse	157
5.2	Analytische Methoden zur Untersuchung der Hyaluronsäure	159
5.2.1	Behandlung der Hyaluronsäure mit Stoßwellen für die Analytik..	160
5.2.2	Kapillarelektrophorese	161
5.2.3	Rheologie.....	163
5.2.4	Bedeutung der Ergebnisse der Hyaluronsäureanalytik für das Studiendesign	165
5.3	Hintergründe und Auswertung der Studie	167
5.3.1	Die Studienentwicklung.....	167
5.3.2	Bewertung und Interpretation der Studienergebnisse	168
5.4	Ausblick	171
6	Zusammenfassung	172
7	Literaturverzeichnis.....	175
Anhang	187	
	Abkürzungsverzeichnis und Glossar	188
	Gefahrstoffe und KMR-Substanzen.....	191
	Veröffentlichungen.....	192
	Danksagung	193
	Versicherung an Eides statt.....	195

Vorwort

Stoßwellen wurden in der Medizin erstmals in den 80er Jahren als nicht invasive Methode zur Lithotripsie eingesetzt. Seither hat sich das Spektrum der Anwendungen unter Ausnutzung dieses Wirkmechanismus auf die Behandlung von Kalkansammlungen in der Schulter, Speichel- und Gallensteinen, sowie des Fersenspornes erweitert. Durch Veränderung der therapeutischen Parameter kamen in den letzten Jahren viele weitere Indikationsgebiete hinzu. Diese erstrecken sich von der Therapie von Sportverletzungen und Pseudoarthrosen über schlecht heilende Wunden bis zur Akupunktur durch Stoßwellen und kosmetische Behandlungen der Haut bei Cellulite.

Allen neueren Indikationsgebieten ist gemein, dass der zu Grunde liegende Wirkmechanismus bislang nur teilweise entschlüsselt wurde. Die Vielfältigkeit der Anwendungsmöglichkeiten lassen einen Effekt über die Anregung der körpereigenen Heilung vermuten. Untersuchungen konnten zeigen, dass über die Mechanotransduktion eine umfassende Kaskade an Reaktionen auf die Behandlung initiiert wird. Dazu gehören unter anderem die Freisetzung von Endorphinen und reaktiven Sauerstoffspezies, sowie die Beeinflussung von Zellen über Migration und Genexpression.

Es wurde versucht in Bezug auf die, in der dermalen Anwendung beobachteten Effekte der Stoßwellentherapie, weitere Antworten zu dem unterliegenden Wirkmechanismus zu finden. Dafür wurden Untersuchungen an Fibroblasten in-vitro, zum Einfluss auf Hyaluronsäure und zur Entwicklung der gealterten Haut nach Behandlung mit Stoßwellen durchgeführt. Dies soll das Verständnis für den Wirkmechanismus erweitern und Nachweise für die positiven Effekte der Therapie finden.

1 Einleitung

1.1 Stoßwellen

Unter Stoßwellen versteht man akustische Wellen mit starken Druckschwankungen, hohen Amplituden und einer kurzen Pulsdauer. Der Anstieg zum Spitzendruck, der bis zu 150 MPa betragen kann, erfolgt in wenigen Nanosekunden. Das weitere Druck-Zeit Profil einer Welle ist durch einen sanfteren Abfall des Druckes, gefolgt von einem Zugteil mit Unterdruck, welcher etwa ein Zehntel des positiven Spitzendrucks beträgt, geprägt. In 500 Nanosekunden läuft eine komplette Welle ab. Das dabei entstehende Geräusch ist deutlich wahrnehmbar.

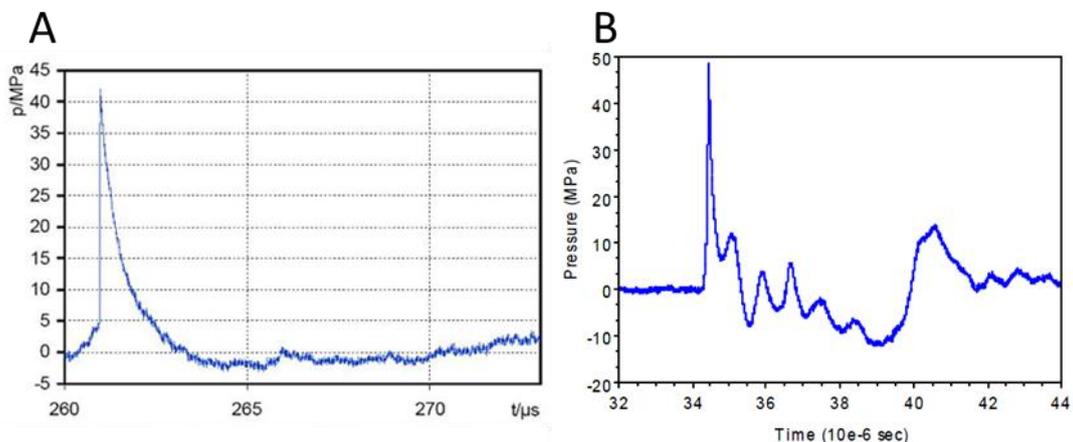


Abbildung 1.1 Aufgenommene Druck-Zeit Profile von Stoßwellen nach Erzeugung durch ein A) elektrohydraulisches und B) piezoelektrisches Prinzip. Quellen: A) MTS Europe GmbH B) Richard Wolf GmbH

Durch Stoßwellen können Energien innerhalb kurzer Zeit räumlich übertragen werden. An Grenzflächen zu Materialien abweichender akustischer Dichte, welche als Impedanz bezeichnet wird, kommt es jedoch zu einer Entladung dieser Energien, wodurch feste Materialien zum Bersten gebracht werden können. Dies kann abhängig von der Energie der Welle in großer Entfernung zu ihrem Ursprung ablaufen.

$$Z \left[\frac{Ns}{m^3} \right] = \rho \left[\frac{kg}{m^3} \right] \times c \left[\frac{m}{s} \right]$$

Formel 1.1 Definition der Impedanz Z als das Produkt aus der Dichte ρ eines Materials und der Schallgeschwindigkeit c im Material. In Abhängigkeit davon können sich die Werte für die Impedanz sehr stark unterscheiden.

Die Eigenschaft der Energieentladung an akustischen Grenzflächen führte zu der ersten medizinischen Anwendung, der Extrakorporalen Stoßwellenlithotripsie, durch das in den 70er Jahren in Deutschland von der Firma Dornier entwickelte Verfahren [1]. Dabei wird der Impedanzsprung zwischen dem Stoßwellen leitenden Gewebe und den akustisch dichteren Nierensteinen ausgenutzt, wodurch diese zertrümmert und ausgeschieden werden können.

Tabelle 1.1 Größenordnung der Impedanzen von verschiedenen Materialien bei 20°C

Material	Dichte ρ [kg/m ³]	Schallgeschwindigkeit c [m/s]	Impedanz Z [Ns/m ³]
Luft	1,204	343,4	413,5
Wasser	998,20	1480	1480000
Stahl	7850	6000	47100000

1.1.1 Physikalische Parameter der Stoßwelle

Sowohl zur Abgrenzung von Stoßwellen zu anderen, durch Druck erzeugte Wellen, als auch zur Charakterisierung der Druck und Energieverteilung zwischen den unterschiedlichen Prinzipien der Stoßwellenerzeugung, dienen die physikalischen Parameter von Stoßwellen. Anhand von Drucksonden kann die Darstellung des Verlaufes einer einzelnen Welle erfolgen [2]. Die Messungen werden dabei zu verschiedenen Zeitpunkten, aber auch in den räumlichen Dimensionen durchgeführt, um die Druckverteilung im Querschnitt einer Welle erfassen zu können.

Unterscheidung von Druck- und Stoßwellen

Der Unterschied von Stoßwellen zu Druckwellen besteht in der sprunghaften Druckänderung beim Anstieg der Welle und in den deutlich höheren resultierenden Spitzendrücken. Die Steilheit der Druckentwicklung ist dabei

Voraussetzung für die Definition als Stoßwelle. Außerdem benötigt eine Druckwelle etwa die 20-fache Zeit einer Stoßwelle für einen vollständigen Durchlauf.

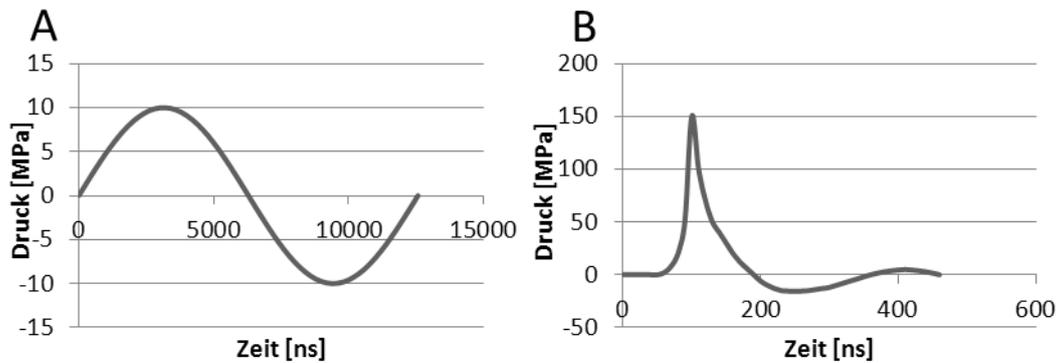


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung einer Druckwelle und Stoßwelle. A) Gezeigt ist die Druckwelle als periodische Schwingung, wie sie beispielsweise beim Ultraschall auftritt. Druck- und Zuganteil sind gleich groß, die Pulsdauer beträgt mehr als 10000 ns. B) Die Stoßwelle erreicht ihren deutlich höheren Spitzendruck in einem Bruchteil dieser Zeit. Der Zugteil beträgt nur etwa ein Zehntel der Druckintensität. Die Zeit für einen vollständigen Wellendurchlauf liegt bei 500 ns.

Druckverteilung einer Stoßwelle

Über die Querschnittsebene eines Stoßwellenfeldes werden verschiedene Bereiche definiert, um die Druckverteilung einer Welle beschreiben zu können (Abbildung 1.3). Ausgehend von dem Spitzendruck P^+ wird die Fokuszone bei halbem Spitzendruck als -6 dB Zone bezeichnet. Bei tieferem Druck und dadurch einen höheren Umfang einschließend, liegt die 5 MPa Zone. Sie umfasst den Teil des Profils bei dem diese Druckgrenze überschritten wird. Bei dem Wert handelt es sich um eine willkürlich festgelegte Grenze oberhalb derer biologische Wirkungen erwartet werden. Die 5 mm Zone beschreibt ebenfalls einen willkürlich gewählten Bereich in dem die Stoßwelle bis zu einer axialen Breite von 5 mm erfasst wird.

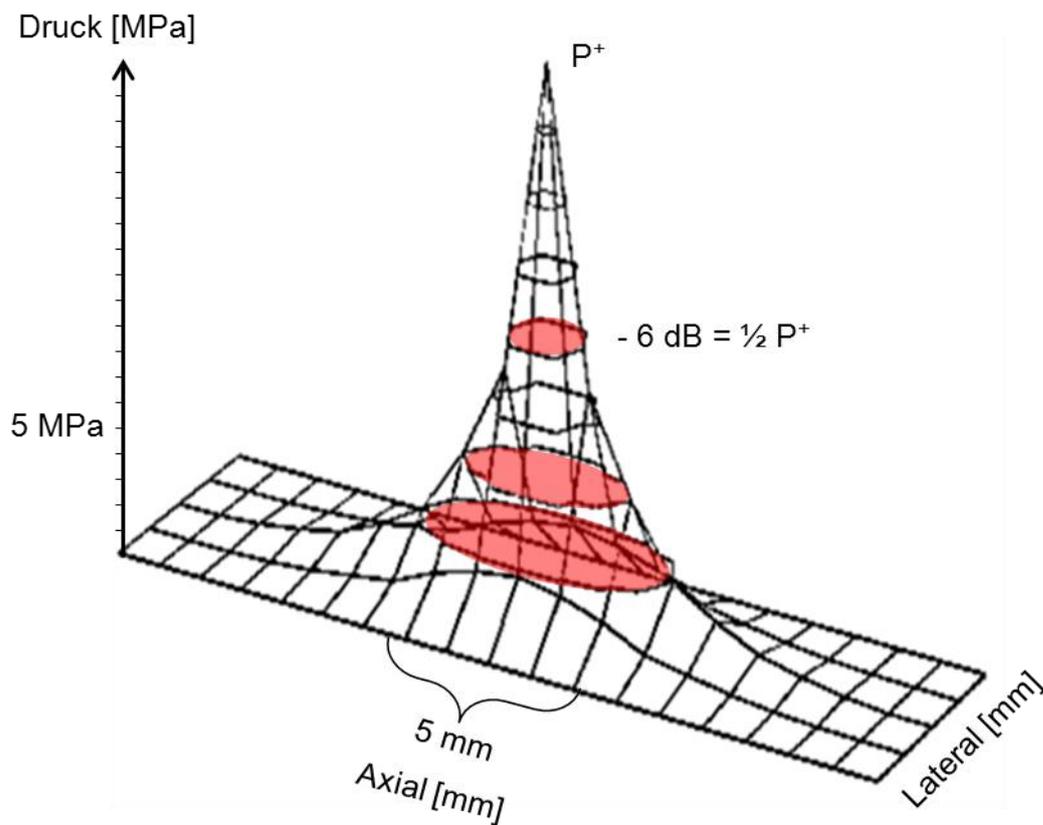


Abbildung 1.3 Verteilung des Druckes über die Ausbreitung einer Stoßwelle in axiale und laterale Richtung. Die Ebenen der definierten Zonen sind rot markiert. Absteigend werden damit die -6 dB Zone, die 5 MPa Zone und die 5 mm Zone beschrieben.

1.1.2 Erzeugungsverfahren von Stoßwellen

In der Atmosphäre können Stoßwellen durch explosionsartige Phänomene entstehen. Dazu gehören natürliche Prozesse wie Blitzschläge, aber auch Vorgänge künstlicher Ursache, wozu Detonationen und das Durchbrechen der Schallmauer von Flugzeugen gehören.

Bei dem ersten Verfahren, das zur Erzeugung medizinisch verwendeter Stoßwellen entwickelt wurde, handelt sich um ein elektrohydraulisches System. Mittlerweile sind drei Methoden, die sich in der Erzeugung der resultierenden Energieintensität und der Ausbreitung voneinander abgrenzen, auf dem Markt. Dazu zählen neben dem elektrohydraulischen das piezoelektrische und das elektromagnetische Prinzip, die im Folgenden genauer erläutert werden.

Das elektrohydraulische Verfahren

Dieses Verfahren erzeugt, vergleichbar mit dem Blitzschlag, eine elektrische Entladung zwischen einer Funkenstrecke. Zwei, im Abstand weniger Millimeter angeordnete Elektroden, fungieren als Kondensator, der mit einigen Kilovolt aufgeladen wird (Abbildung 1.4 A). Zwischen den Elektroden entsteht zunächst ein dünner Strompfad, der sich unter starker Erhitzung zu einem Stromkanal erweitert. Da sich die Elektroden im wässrigen Milieu befinden, bildet sich um die Funkenstrecke heißes Plasma. Dieses dehnt sich mit extremer Geschwindigkeit aus, wodurch die umgebende Flüssigkeit stark komprimiert wird und Drücke bis zu 150 MPa resultieren. Durch Fokussierung dieser Stoßwelle an einem Rotationsellipsoid kann der entstehende Druck auch in einiger Entfernung vom Ursprungsort zielgerichtet erreicht werden (Abbildung 1.4 B). Nach Einleitung in den menschlichen Körper wird diese Technologie damit zugänglich für lokal begrenzte Therapien.

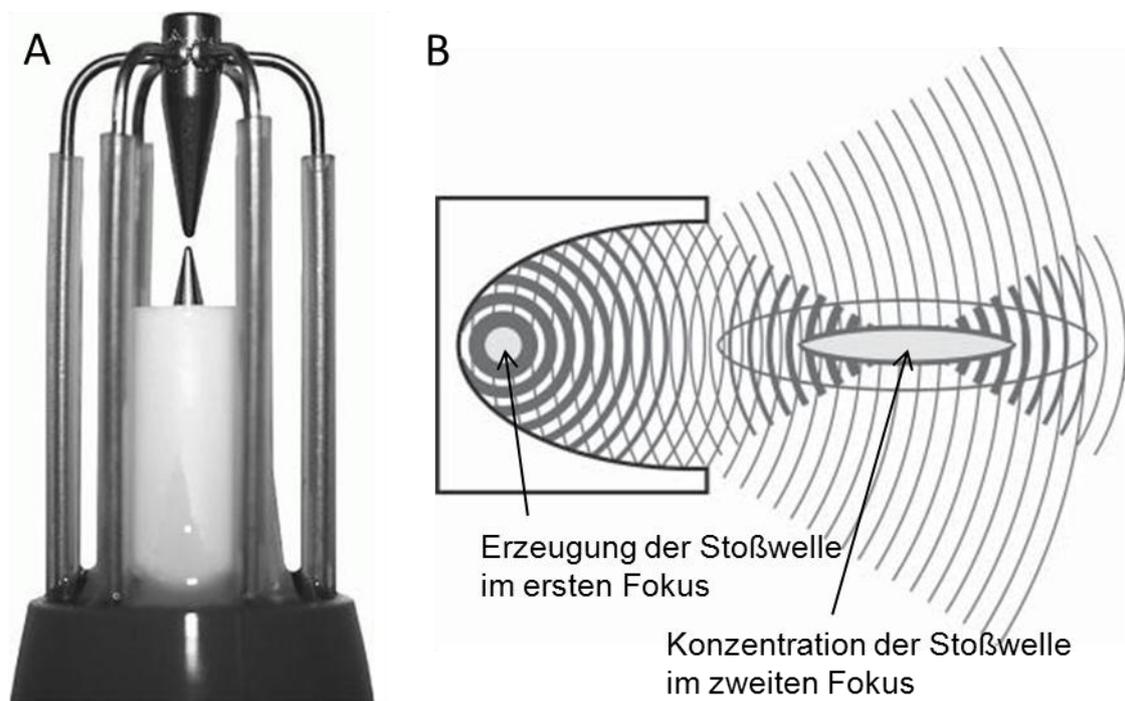


Abbildung 1.4 Erzeugung elektrohydraulischer Stoßwellen. A) Elektrodenansätze zur Generation der Unterwasserfunkenentladung. B) Fokussierung der erzeugten Welle am Rotationsellipsoid. Aus dem Reflektor läuft sowohl die primär erzeugte divergente als auch die fokussierte Welle. Quelle: [3]

Bezeichnend für dieses Erzeugungsverfahren ist die Generierung hoher Druckenergien schwankender Stärke. Da der Funke mit jeder Erzeugung anders verläuft und das Elektrodenmaterial abschmilzt, verändert sich das Druckprofil sowohl mit jedem einzelnen Stoß als auch über die Nutzungsdauer der Elektrode. Die Funkenentladung ist vom Patienten visuell als kurzer Blitz und akustisch als Knall wahrnehmbar, was für die Compliance bei der klinischen Anwendung nachteilig sein kann. Vom Vorteil hingegen ist die Ausbreitungsform der Stoßwelle. Sie verläuft leicht tailliert, wodurch in einem großen Bereich therapeutisch verwendbare Drücke erhalten werden (Abbildung 1.5 B).

Eigenschaften des verwendeten dermagolds

In dieser Arbeit kam das elektrohydraulische Verfahren mit dem Gerät dermagold der Firma MTS Europe GmbH zum Einsatz. Es handelt sich dabei um ein für die dermale Anwendung entwickeltes Therapiesystem, bei dem eine auf einen Durchmesser von 7 mm fokussierte Stoßwelle erzeugt wird, die eine breite Behandlungsfläche abdeckt (Abbildung 1.5).

Die am Gerät verfügbaren Energiestufen gehen über diesen Anwendungsbereich hinaus, sind jedoch ausschließlich für andere Indikationen zu wählen.

Tabelle 1.2 Technische Daten einiger experimentell verwendeter Energieeinstellungen des dermagolds unter Einsatz des Applikators CP-155. Empfohlen für die gewebe- und hautregenerierende Wirkung ist die Wahl der Energiestufe 5.

Energielevel am Gerät	Ladungsspannung [kV]	Energieflussdichte in der -6dB Zone [mJ/mm²]
3	3	0,03
5	5	0,10
7	7	0,19

Die Ausbreitungscharakteristik der Stoßwelle folgt einem Doppelkegel, der durch eine breite und leicht geschwungene Fokuszone gekennzeichnet ist. Dies unterscheidet das Verfahren deutlich von dem im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen ebenfalls verwendeten piezoelektrischen Prinzip.

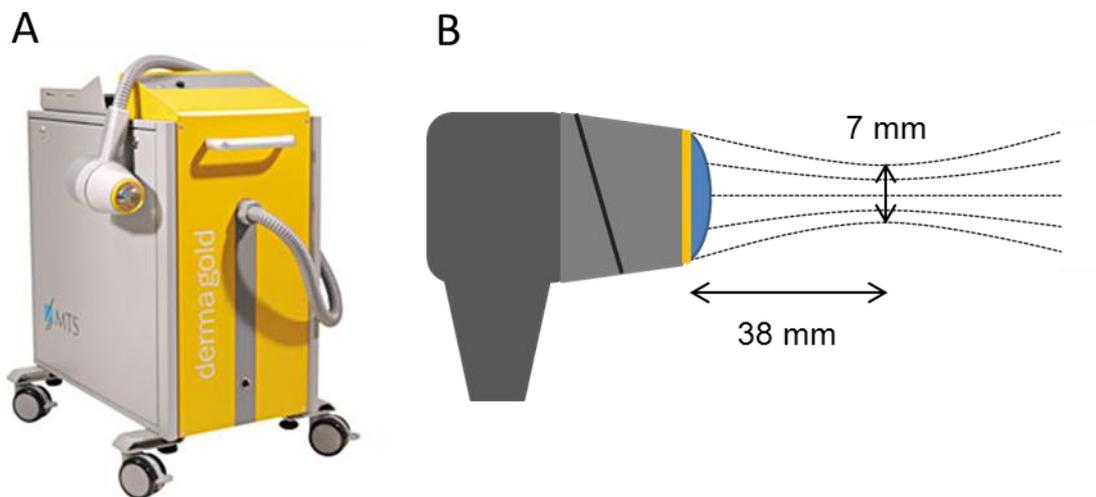


Abbildung 1.5 Abbildung des verwendeten elektrohydraulischen Prinzips. A) demagold Stoßwellengerät mit dem Applikator CP-155. Quelle: MTS Europe GmbH. B) Schematische Abbildung des Stoßwellenverlaufes. Die vergrößert dargestellte Fokuszone befindet sich am schmalsten Bereich von 7 mm in 38 mm Entfernung vom Applikator.

Die Eindringtiefe der Stoßwelle in das zu behandelnde Gewebe kann über die Wasserfüllung im Applikator reguliert werden. Durch stärkere Füllung wölbt sich die Membran nach außen, wodurch der Abstand zwischen Körperoberfläche und Fokus höher und damit die Eindringtiefe reduziert wird.

Das piezoelektrische Verfahren

Bei diesem Verfahren werden Piezoelemente, die auf einer Kugelkalotte angeordnet sind, durch einen Spannungsimpuls zur Auslenkung angeregt (Abbildung 1.6). Diese läuft synchron und durch die Anordnung der Elemente bedingt zentrumsgerichtet ab. Der Druck ist zunächst gering, erst in der Fokuszone werden die Druckwerte einer Stoßwelle erreicht.

Durch dieses Erzeugungsprinzip wird eine hohe Reproduzierbarkeit gewährleistet, mit der auch Stoßwellen geringerer Drücke gut generiert werden können. Insgesamt ist die maximal emittierte Energie aber deutlich kleiner als bei den elektrohydraulischen Verfahren. Eine Schichtung der Piezoelemente führt zu einer Verstärkung der erzeugten Drücke, welche bei einigen orthopädischen Indikationen genutzt werden.

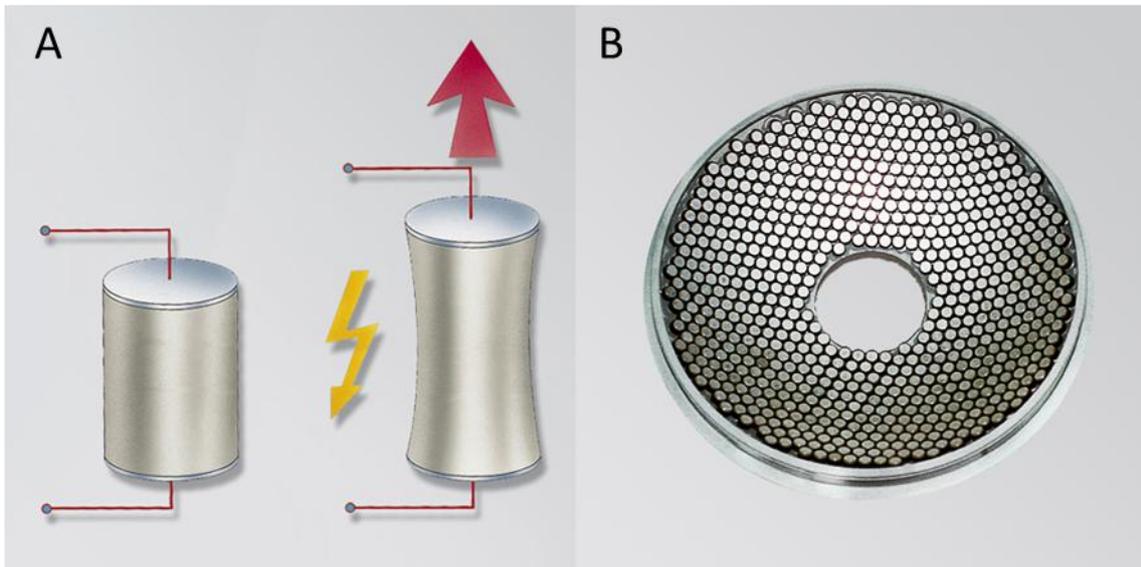


Abbildung 1.6 Erzeugung piezoelektrischer Stoßwellen. A) Auslenkung eines Piezoelements nach Spannungsimpuls. B) Anordnung der Piezoelemente in der Kugelkalotte eines Stoßwellenapplikators. Quelle: Richard Wolf GmbH

Die Entstehung der Welle wird von den behandelten Personen lediglich als knackendes Geräusch wahrgenommen. Durch die eindimensional gerichtete Fokussierung läuft die Welle spitz auf ein durch die Form der Kugelkalotte definiertes Zentrum zu. Die Wirkung bleibt damit lokal stark begrenzt.

Eigenschaften des verwendeten PiezoWaves

Ein Gerät mit piezoelektrischem Prinzip für die dermale Anwendung befand sich zur Erstellung dieser Arbeit noch in der Studienphase. Da sich die Geräte im Wesentlichen durch die Wahl des Applikators und die dadurch erzeugten Energien, nicht aber im Grundgerät unterscheiden, wurde das aus dem orthopädischen Bereich stammende PiezoWave für die Untersuchungen verwendet.

Da das Gerät ein deutlich kleineres Energiespektrum abdeckt, ist die Variation der Ladespannung im Vergleich zum dermagold geringer. Die Wahl hoher Energiestufen ist aufgrund der verhältnismäßig geringen Energieabgabe außerhalb der Fokuszone nötig, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Tabelle 1.3 Technische Daten einiger experimentell verwendeter Energieeinstellungen des PiezoWaves unter Einsatz des Applikators F7G3.

Energielevel am Gerät	Ladungsspannung [kV]	Energieflussdichte in der -6dB Zone [mJ/mm ²]
10	4,4	0,167
20	6,4	0,403

Bei verschiedenen Abständen vom Applikator resultiert aus dem sehr spitz zulaufenden Stoßwellenprofil und der geringen Größe der Fokuszone eine starke Veränderung der Energieflussdichte. Der Abstand der Fokuszone ist vergleichbar zum dermagold, der Verlauf hingegen deutlich steiler, wodurch der Behandlungsbereich außerhalb des Fokus stärker ausgeweitet wird, die Energieflussdichten jedoch sinken (Abbildung 1.7 B).

Die Eindringtiefe der Stoßwelle kann über die Dicke eines aufgesetzten Silikonpads reguliert werden. Es sind flache Pads verfügbar, die ein Eindringen von 40 mm erlauben. In Abstufungen von 5 mm lässt sich dies bis auf eine nahezu oberflächliche Wirkung reduzieren, indem die spitz zulaufenden Pads den Weg von der Körperoberfläche zum Fokus erhöhen.

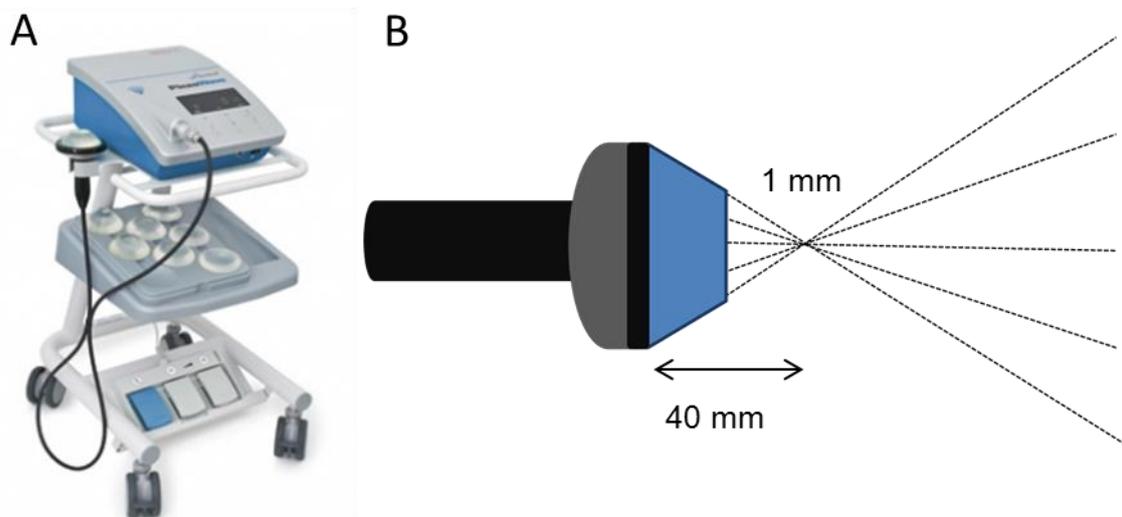


Abbildung 1.7 Abbildung des verwendeten piezoelektrischen Prinzips. A) PiezoWave Stoßwellengerät mit dem Applikator F7G3. Quelle: Richard Wolf GmbH. B) Schematische Abbildung des Stoßwellenverlaufes. Die Fokuszone befindet sich in 40 mm Entfernung vom Applikator.

Die planare Applikationseinheit

Das piezoelektrische Prinzip verfügt über die Besonderheit, dass eine planare Applikationseinheit für die oberflächliche Behandlung zur Verfügung steht. Die Piezoelemente sind dabei in einer Ebene angeordnet, wobei der Druckimpuls unfokussiert abgegeben wird (Abbildung 1.8 B). Durch diese Eigenschaft handelt es sich bei dem erzeugten Impuls definitionsgemäß eher um eine Druck- als eine Stoßwelle, da die nötigen Spitzendrücke nicht erreicht werden können.

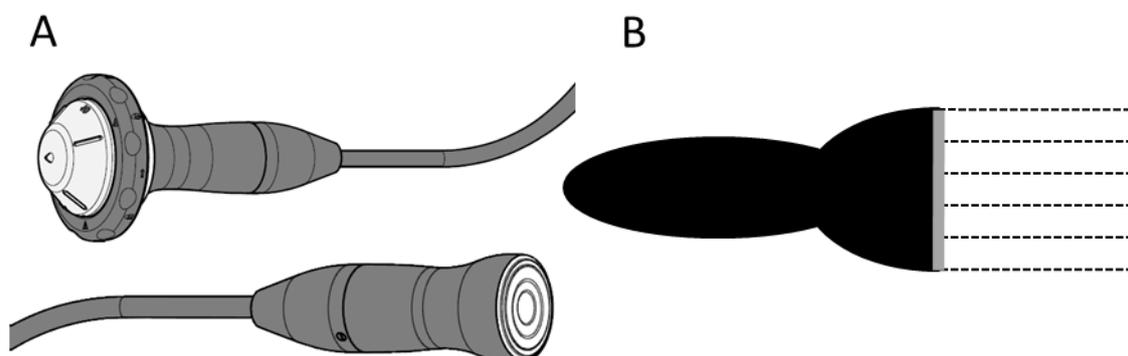


Abbildung 1.8 Applikatoren des PiezoWaves. A) Vergleich der Applikatoren F7G3 (oben) und FP4 (unten). Quelle: Richard Wolf GmbH. B) Schematische Abbildung des Wellenverlaufes der planaren Quelle FP4.

Detaillierte Messungen der erzeugten Energieflussdichten durch die Herstellerfirma liegen nicht vor. Lediglich für die höchste Energiestufe ist der Wert von $0,06 \text{ mJ/mm}^2$ bekannt. Die Eindringtiefe ist wegen der niedrigen Energie sehr gering und beträgt nur 5 mm. Dennoch wird der Applikator in der medizinischen Praxis für dermale Behandlungen unter dem Oberbegriff der Stoßwellentherapie eingesetzt. In dieser Arbeit wurde die planare Quelle für die Untersuchung der Migration von Fibroblasten und in der Faltenbehandlung verwendet.

Das elektromagnetische Verfahren

Zuletzt ist das elektromagnetische Verfahren zu nennen, bei dem zwischen Spulen und Membranen durch Induktion starke Impulse kurzer Dauer entstehen. Man unterscheidet bei diesem Verfahren die Erzeugung durch Flachspulen und Zylinderspulen. Aufgrund der besseren Einstellungsmöglichkeiten in Bezug auf Fokuszone und Öffnungswinkel der Welle, ist die Technik

der Zylinderspule heute weiter verbreitet. Die Spule wird von einem Strom durchflossen, wodurch sich um sie herum magnetische Felder ausbilden. Diese sind den an der Membran erzeugten Magnetfeldern entgegen gerichtet. Es kommt zu einer abrupten Abstoßung, wobei hohe Drücke in ein angrenzendes Wasserbad übertragen werden. Die Fokussierung der Welle ist mit Hilfe eines Rotationsparaboloids möglich (Abbildung 1.9 B).

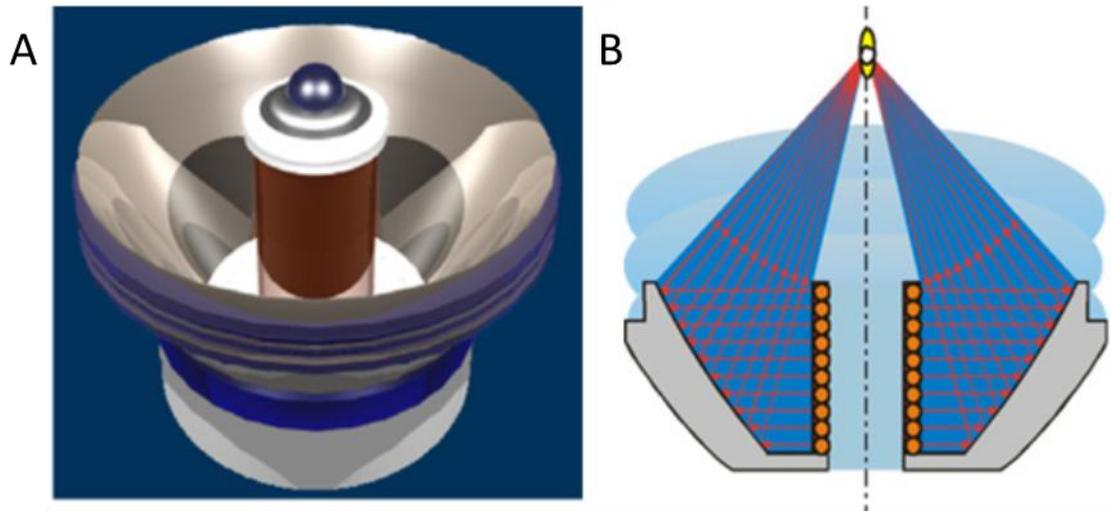


Abbildung 1.9 Erzeugung elektromagnetischer Stoßwellen. A) Zylinderförmige Anordnung der Spule im Applikator. B) Fokussierung der erzeugten Wellen durch einen parabolischen Reflektor. Quelle: Deutschsprachige Internationale Gesellschaft für Extrakorporale Stoßwellentherapie (DIGEST)

Vergleichbar mit der piezoelektrisch erzeugten Stoßwelle können auf diese Weise hohe Reproduzierbarkeiten und kleine Drücke für bestimmte Therapieformen erreicht werden. Das Verfahren wurde in dieser Arbeit unter anderem wegen der großen Ähnlichkeit der Stoßwellencharakteristik zum PiezoWave nicht verwendet.

1.1.3 Berechnung des Energieeintrages

Energiemessungen erfolgen innerhalb der, durch die Druckzonen definierten, Bereiche (Abbildung 1.3). Je größer der in der Messung erfasste Druckbereich oder die Energiestufe am Gerät gewählt wird, desto höher ist auch der resultierende Eintrag der Energie.

Kondensatorwirkung der Applikatoren

Bei allen Erzeugungsprinzipien fungiert der Applikator als Kondensator konstanter Kapazität. Die wählbaren Energiestufen stehen für die Ladespannung, die im Gerät erzeugt wird. Abhängig von der gewählten Stufe wird eine Stoßwelle definierter Energie erzeugt. Deswegen kann die allgemeine Kondensatorgleichung für die Berechnung der Abhängigkeit der emittierten Energie von der Ladespannung verwendet werden. Die Kapazität wird dabei mit den Faktoren der Einheiten zu einer Konstante, die die Steigung beschreibt, zusammengefasst. Es ergibt sich eine quadratische Gleichung ohne linearen Term und Achsenabschnitt.

$$W [J] = \frac{1}{2} C [F] \times U [V]^2$$

$$W[mJ] = \text{Steigung} \times U [kV]^2$$

$$\text{Energieabgabe [mJ]} = \text{Steigung} \times \text{Ladungsspannung [kV]}^2$$

Formel 1.2 Herleitung der Formel für die Regression der Energieabgabe im Verhältnis zur Ladespannung eines Stoßwellengerätes aus der allgemeinen Gleichung für einen Kondensator, wobei W die geleistete Arbeit, C die Kapazität des Kondensators und U die Spannung beschreibt.

Aus den Energiemessungen der einzelnen Druckbereiche und Ladespannungen der jeweiligen Firmen lässt sich somit für jedes Gerät eine quadratische Regression erstellen, die den Energieeintrag für den bezeichneten Druckbereich wiedergibt. Um zur akkumulierten Energie zu gelangen, muss zusätzlich die Anzahl der applizierten Impulse beachtet werden.

Akkumulierte Energieflussdichte

Die medizinischen Angaben zur Vergleichbarkeit von Therapieparametern beziehen sich zumeist auf die Energieflussdichte. Die akkumulierte Energieflussdichte beschreibt dabei die bei einer Behandlung eingebrachte Energie auf eine definierte Fläche. Die gebräuchliche Einheit hierfür ist die Angabe in mJ/mm^2 . Um die akkumulierte Energieflussdichte berechnen zu können, muss die durch eine Behandlung erfasste Fläche berücksichtigt werden. Dies ist unter Kenntnis der Ausbreitungscharakteristiken, welche in Abbildung 1.4 und

Abbildung 1.7 gezeigt sind und Anwendung des Strahlensatzes berechenbar. Dabei wird vereinfacht von einer geometrisch gleichmäßig kreisförmigen Wellenform ausgegangen. Der Zusammenhang zwischen der durch das elektrohydraulische oder piezoelektrische Verfahren eingebrachten akkumulierten Energieflussdichte und der Proliferation von Fibroblasten wurde in Kapitel 4.1.3 dieser Arbeit verglichen.

1.1.4 Applikation und Ausbreitung akustischer Wellen

Da es sich bei Stoßwellen um akustische Wellen handelt, können Grenzflächenphänomene auftreten, sobald die Welle auf einen Bereich abweichender Impedanz trifft. Dies bedeutet für medizinisch genutzte Stoßwellen, dass ein Medium zur Übertragung der Welle zur Verfügung stehen muss, um die Luftbarriere zwischen Applikator und Körperoberfläche zu überwinden.

Grenzflächenphänomene

Treffen Stoßwellen auf akustische Grenzflächen, bei denen sich die Dichte ρ oder die Schallgeschwindigkeit c ändert, kommt es zu den aus der Optik bekannten Grenzflächenphänomenen Brechung, Streuung oder Beugung (Abbildung 1.10). Bei einem senkrechten Auftreffen auf eine Grenzfläche kann es außerdem zur Totalreflektion kommen, wodurch zwei in entgegengesetzter Richtung verlaufende Stoßwellen aufeinander treffen. Die Interferenz kann im Extremfall konstruktiv unter Addition oder destruktiv unter Aufhebung der Amplituden verlaufen (Abbildung 1.11). Die lineare Ausbreitung der Wellen ändert sich durch die beschriebenen Phänomene und es erfolgt eine nicht reproduzierbare Einwirkung der Energie.

Nach Erzeugung der Stoßwelle wird diese daher über den mit Wasser gefüllten Applikator oder das Silikonpad auf das Gewebe übertragen. Dabei muss ein Impedanzsprung an den entstehenden Grenzflächen verhindert werden, wozu in der Regel eine Ankopplung mit Hilfe von Ultraschallgel erfolgt. Dieses muss luftblasenfrei zwischen Applikator und dem zu behandelnden Areal aufgebracht werden, da sonst die Ausbreitungsrichtung am Übergang zur Luft geändert wird.

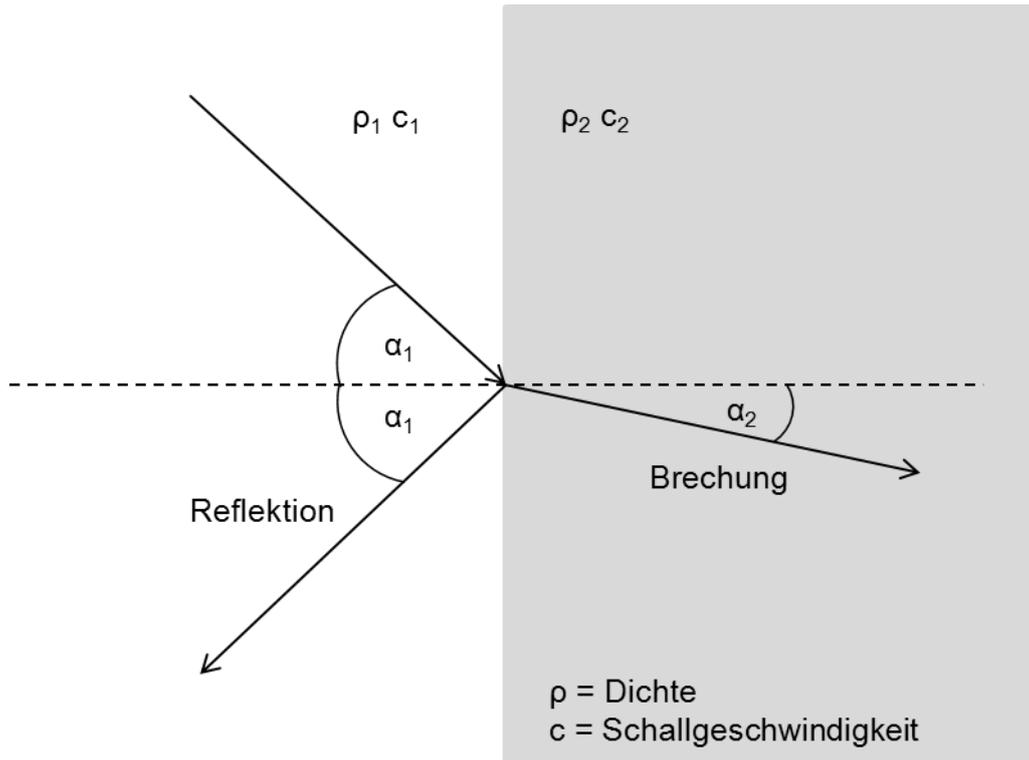


Abbildung 1.10 Die Grenzflächenphänomene Reflektion und Brechung von Stoßwellen beim Auftreffen auf ein Medium abweichender Dichte ρ oder Schallgeschwindigkeit c .

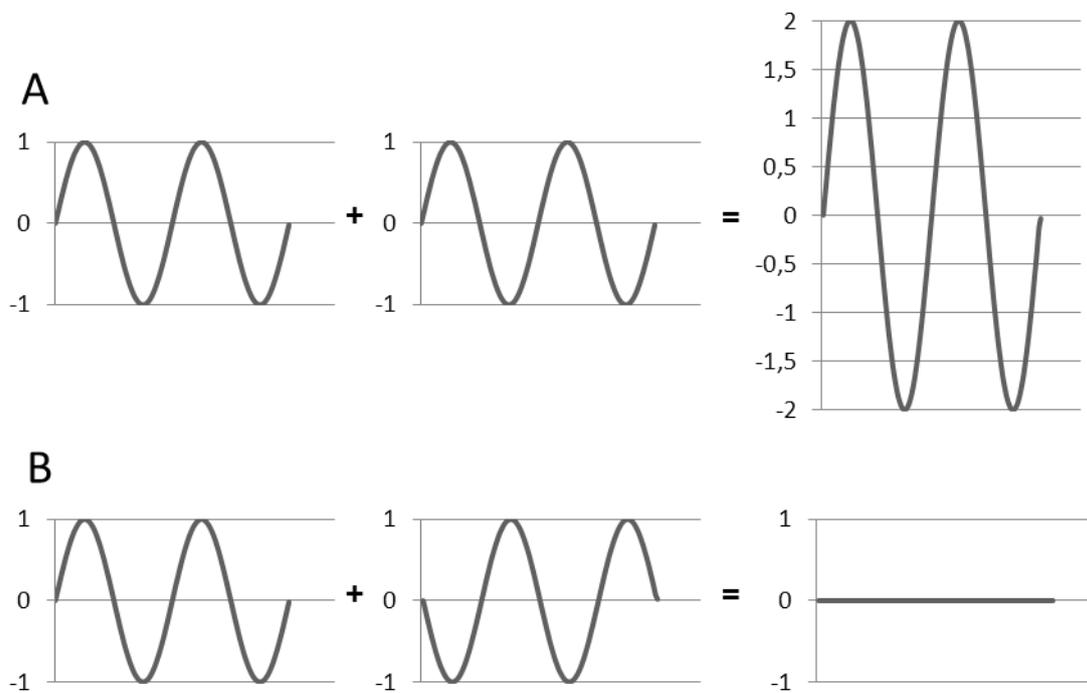


Abbildung 1.11 Interferenz aufeinander treffender Wellen gleicher Amplitude. A) Konstruktive Interferenz. B) Destruktive Interferenz.

Folgen der Grenzflächeneigenschaften für die Applikation

Die genannten Ereignisse treten in der medizinischen Anwendung von Stoßwellen beim Auftreffen auf Luft in gashaltigen Organen, zu denen Lunge und Darm gehören, aber auch an harten, massiven Strukturen wie am Knochen auf. Dadurch müssen diese Bereiche in der Behandlung sorgfältig ausgespart werden. Zwischen den Weichgeweben, zu denen Muskeln, Fett und Haut zählen, tritt der Effekt nur in geringem Maße auf, was zu vernachlässigbaren Abweichungen führt. Die Grenzflächenphänomene können umgekehrt aber auch zur gezielten Energieentladung und damit der gewollten Zerstörung von Nieren-, Gallen- oder Speichelstein und Kalkablagerungen genutzt werden, was ihnen den Einzug in die therapeutische Applikation erlaubte.

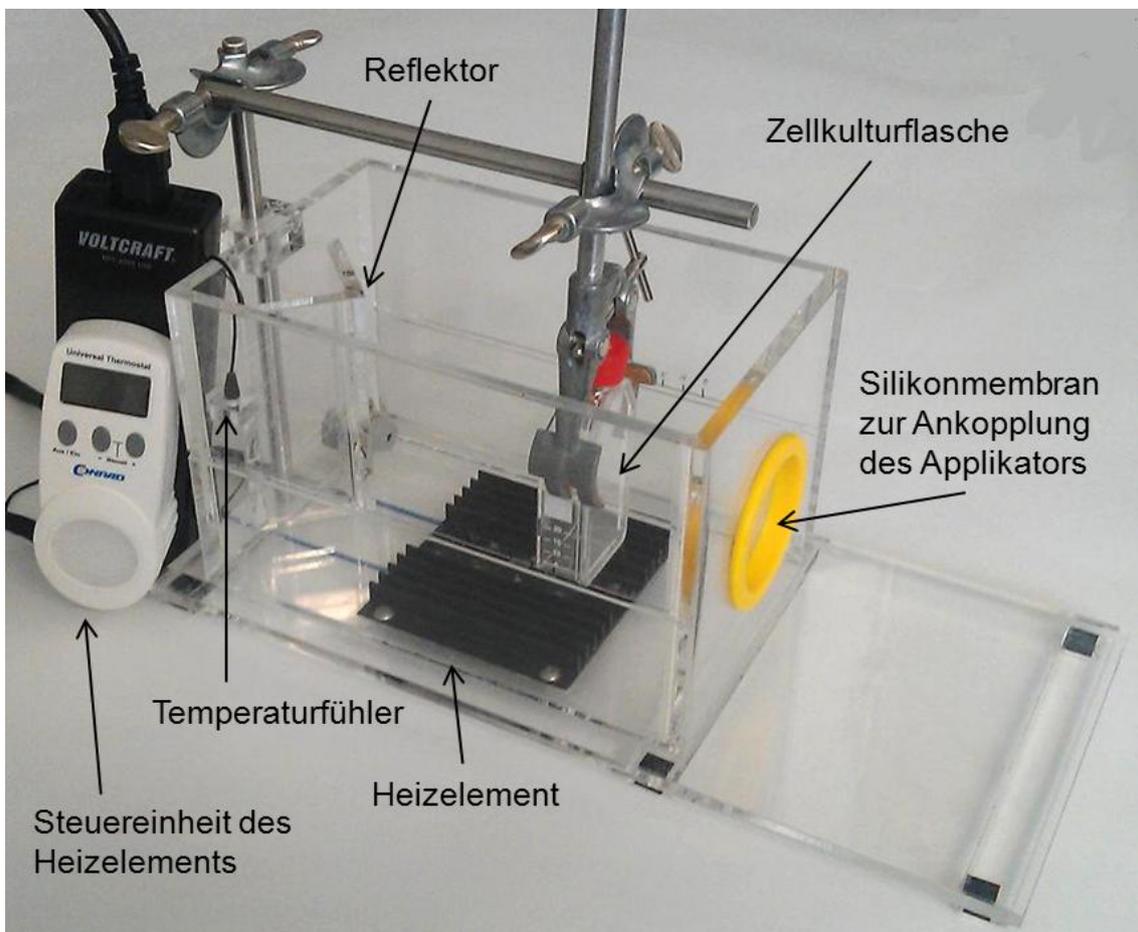


Abbildung 1.12 IVSWT Water Bath zur reproduzierbaren Behandlung von Zellen in Kultur unter Vermeidung physikalischer Grenzflächenphänomene.

Auch bei der Applikation von Stoßwellen in-vitro muss auf die Reflektion der Wellen beim Auftreffen auf Luft geachtet werden. Daher wurde speziell für die Behandlung von Zellkulturen ein Wasserbad entwickelt, welches sowohl den physikalischen Eigenschaften des Wellenverlaufes als auch den Kultivierungsbedingungen der Zellen gerecht wird [4]. Das in-vitro shock wave therapy water bath (IVSWT Water Bath) ist ein temperierbares Wasserbad aus Plexiglas, welches über eine Ankopplungsmembran für den Stoßwellenapplikator und eine Reflektoreinheit zur Vermeidung von Interferenzen verfügt (Abbildung 1.12). Über eine Halterung können die vollständig mit Flüssigkeit gefüllten Zellkulturflaschen in das Wasserbad eingebracht werden. Dies wird dafür zuvor mit entgastem Wasser befüllt, welches über ein Heizelement auf eine physiologische Temperatur gebracht wird. Bei Verwendung von Zellkulturflaschen aus Polyethylen sind aufgrund der akustischen Impedanz des Stoffes von 1760000 Ns/m^3 keine Grenzflächenphänomene zu erwarten. An der Reflektoreinheit des Wasserbades findet hingegen eine Brechung der Wellen zu den Seiten statt, da die Impedanz von Plexiglas bei 3260000 Ns/m^3 liegt.

1.1.5 Medizinische Anwendung von Stoßwellen

Die medizinische Anwendung von Stoßwellen hat in den vergangenen Jahren eine starke Ausweitung der Indikationen erfahren. Durch Beobachtungen und Forschungsarbeiten ist mit einer weiteren Ausdehnung der Anwendungsbereiche und Verifizierung der Ergebnisse zu rechnen.

Geschichte der Stoßwellentherapie

Die erste therapeutische Applikation der extrakorporal erzeugten und über Wasser in den Körper eingeleiteten Stoßwellentherapie zur Zertrümmerung von Nierensteinen erfolgte 1980 von Chaussy in München [1, 5]. Der Patient musste dabei, in einer Badewanne liegend, über das Wasser an den Applikator angekoppelt werden (Abbildung 1.13). Es folgte eine Reihe von Studien, die unter Optimierung der Behandlungsparameter die Wirksamkeit der Methode für einen großen Teil der Patienten zeigen konnten, wodurch sie heute als Mittel der Wahl bei einer Steingröße unterhalb von 30 mm gilt [6-10].

Ausgehend von dieser Anwendung fand eine Ausweitung der Indikation auf Blasen-, Gallen und Speichelsteine statt [11-15]. Die Steine können dabei durch Ultraschall exakt lokalisiert und die Stoßwelle über eine einfache Ankopplung mit einem Gel appliziert werden. Durch die zahlreichen Behandlungen wurden weitere Effekte der Therapie beobachtet, die mit den Stoßwellen in direkten Zusammenhang gebracht werden konnten. So zeigten sich positive Wirkungen auf Knochenheilungsstörungen, die in weiteren Anwendungsstudien untersucht wurden und in den 90er Jahren den Einstieg zur heilungsstimulierenden Stoßwellentherapie ebneten [16, 17].



Abbildung 1.13 Lithotripter HM3 der Firma Dornier. Erstes kommerziell erhältliches Gerät für die klinische Anwendung. Quelle: Dornier MedTech GmbH

Anwendungsbereiche der Stoßwellentherapie

Die Unterstützung von Heilungsstörungen ist eine der am besten untersuchten Indikationen der Stoßwellentherapie. Für Pseudoarthrosen wurde in verschiedenen Studien eine Heilungsrate zwischen 52% und 91% nachgewiesen [18]. Damit steht für diese Anwendung, wie auch für die Lithotripsie, mit der extrakorporalen Stoßwellentherapie ein nicht invasives Verfahren als Behandlungsalternative gegenüber chirurgischen Eingriffen zur Verfügung. Für die Unterstützung der Wundheilung wurde die Stoßwelle ebenfalls entdeckt [19].

Auch hier zeigten sich zum Teil sehr gute Ergebnisse, die Heilungsraten zwischen 36% und 100% bezifferten [20]. Hautläsionen bei Tieren wurden ebenso erfolgreich behandelt, wie Nekrosen, Ulzerationen und Verbrennungen [21-24]. Im kosmetischen Bereich hat die Anwendung zur Verbesserung der Hautstraffheit und -beschaffenheit bei der Behandlung der Cellulite Einzug gefunden [25-27].

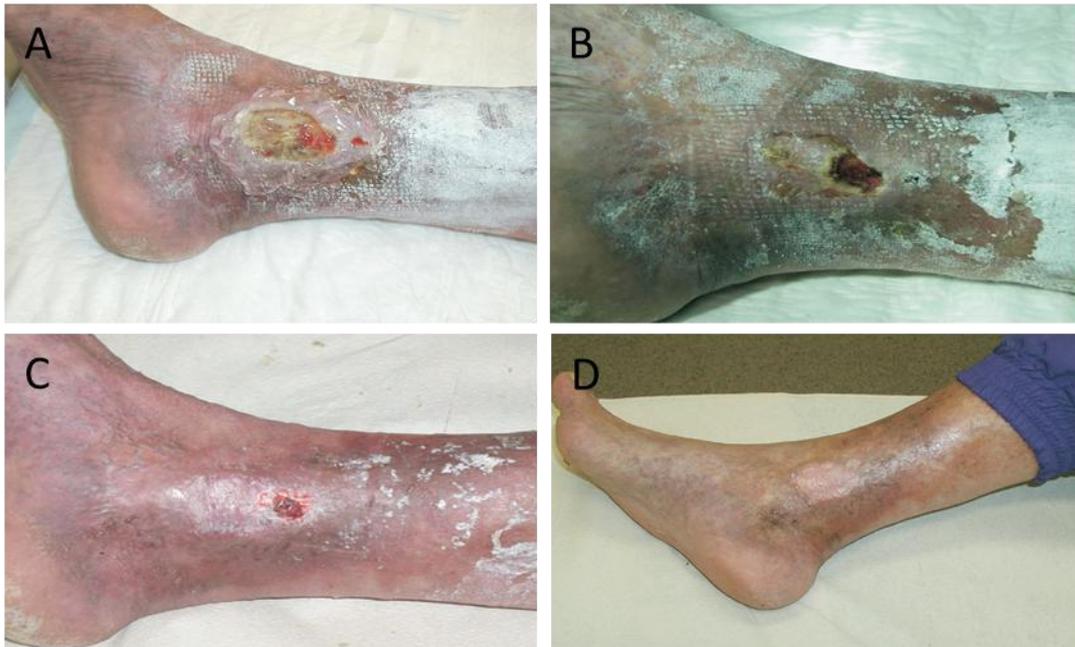


Abbildung 1.14 Stoßwellenbehandlung in der Wundheilung. A) Chronische Ulzeration eines 57-jährigen Patienten am unteren Bein die durch topische Therapie über ein Jahr keine Heilung zeigte. Stoßwellenbehandlung: 800 Impulse der Energieflussdichte $0,1 \text{ mJ/mm}^2$. B) Zwei Wochen nach erster Behandlung. Zweite Behandlung mit 400 Impulsen der Energieflussdichte $0,1 \text{ mJ/mm}^2$. C) Zwei Wochen nach zweiter Behandlung. D) Vier Wochen nach zweiter Behandlung. Quelle: [28]

In der Orthopädie und in der Sportmedizin sind eine Reihe von Indikationen untersucht worden, die auf dem destruktiven Effekt der Stoßwelle, aber auch auf der Unterstützung der Heilung beruhen. Dazu gehören die Behandlung der kalzifizierenden Tendinitis, bei der sowohl die Kalzifizierungen, als auch die Schmerzen reduziert werden konnten [29, 30]. Das therapeutische Potential bei der Therapie der Epicondylitis ist aufgrund der kontroversen Studienlage noch nicht endgültig geklärt. Buchbinder et al. konnten keine Überlegenheit gegenüber Placebo nachweisen [31]. Eine Reihe weiterer Studien hingegen

belegte die Wirkung [32]. Ein ähnliches Bild zeigt sich in der Effektivität gegenüber der Plantarfasciitis bei der positive Ergebnisse in multizentrischen, kontrollierten Studien vorliegen [33]. Demgegenüber stehen Ergebnisse der Unwirksamkeit in Studien vergleichbaren Evidenzniveaus [34]. Genauere Untersuchungen, die den Erfolg der Therapie indikationsgebunden angeben, könnten hierbei der Schlüssel zu den unterschiedlichen Ergebnissen sein. So konnte der Wirkungsnachweis insbesondere bei Ausübung sportlicher Aktivitäten gegeben werden [35]. Des Weiteren muss die Form der Applikation beachtet werden. Signifikante Unterschiede zwischen radialer und fokussierter Stoßwelle spielen eine große Rolle für den Therapieerfolg [36]. Tendinopathien der Achillessehne sprachen weitgehend gut auf Stoßwellenapplikation an [37]. Ein weiterer Ansatz begann 2004 durch die Behandlung von Myokardinfarkten bei Bypass Operationen. Hier wurde eine Induktion der Heilung, sowie eine Verbesserung der Klappenfunktion und Angiogenese gezeigt [38, 39]. Darüber hinaus sind einzelne Studien in verschiedensten Therapiebereichen durchgeführt worden. Dazu gehören die bislang unveröffentlichte Triggerpunkttherapie und Stoßwellenakupunktur bei der die Schmerzlinderung im Vordergrund steht. Beim Kaninchen wurden erste Studien zum Effekt auf Osteomyelitiden gemacht [40].

Nebenwirkungen von Stoßwellenapplikation

Das breite Spektrum, in dem die Stoßwellentherapie bisher zum Einsatz kam, lässt sich unter anderem mit der einfachen Handhabung und den geringen Nebenwirkungen, die aus der Applikation resultieren, erklären. Bei der Lithotripsie werden deutlich höhere Energien eingesetzt, als bei anderen Indikationen. Ob es dadurch zu einer Schädigung der Niere kommt, konnte bisher nicht nachgewiesen werden [41]. Es sind jedoch Gewebeschädigungen beobachtet worden, die sich in lokalen Hämatomen, Hautreizungen und Ödemen äußerten [42]. Langfristige Nebenwirkungen wurden nicht gezeigt. Insbesondere bei Kindern und jüngeren Patienten ist die Behandlung daher als unbedenklich eingestuft worden [43]. Lediglich im Tierversuch wurde eine dosisabhängige Nierenschädigung nachgewiesen, die jedoch Dosen weit oberhalb der therapeutischen Behandlung betraf [44].

Vorteile der Stoßwellentherapie

Als großer Vorteil dieser Therapiemethode ist die nicht invasive Behandlungsmöglichkeit zu nennen, wodurch auf stationäre Aufnahmen in der Regel verzichtet werden kann. Für den Patienten bedeutet das eine geringere Belastung, ein vermindertes Infektionsrisiko und eine kürzere Genesungszeit. Daraus ergibt sich insgesamt eine positive ökonomische Bilanz der Stoßwellentherapie. Trotz der Studienlage ist die Lithotripsie als einzige Indikation von Krankenkassen in Deutschland anerkannt.

1.1.6 Wirkungsmechanismen von Stoßwellen

Vom Wirkungsmechanismus nach Stoßwellenapplikation ist nur wenig bekannt. Grundsätzlich werden die Wirkungen von Stoßwellen in direkte und indirekte Effekte unterteilt, wobei eine scharfe Abgrenzung durch mangelnde Kenntnisse des Mechanismus und Überschneidung der Auswirkungen kaum möglich ist. Bislang konnten einige Beobachtungen aus der klinischen Praxis anhand von in-vitro Untersuchungen aufgeklärt werden, die damit einen Hinweis auf mögliche Hintergründe geben.

Direkte Wirkung von Stoßwellen

Die Druckübertragung an Grenzflächen macht die direkte Wirkung der Stoßwelle aus. Damit wird die mechanische Krafteinwirkung auf Steinchen, aber auch auf Gewebe, Membranen und Zellen erfasst. Diese können durch die in der Behandlung verursachten reversiblen Deformationen gereizt oder sogar zerstört werden, was jedoch ein Impuls für die Stimulation von Heilungsprozessen zu sein scheint. Eine Steigerung der Durchblutung und ein intensivierter Stoffwechsel, der nach Stoßwellenapplikation beobachtet wurde, tragen zu den Regenerationsprozessen bei [45].

Indirekte Wirkung von Stoßwellen

Die Wirkung von Kavitationsblasen wird als Hauptursache der indirekten Wirkung von Stoßwellen angegeben. Sie entstehen durch die extreme Druck-Zug Wechselbelastung mit der eine Stoßwelle ein Medium passiert. Kleinste Gasbläschen wachsen nach dem Durchlaufen der Welle stark an, um

anschließend zu kollabieren. Dabei werden sekundäre Stoßwellen ausgesendet. Erfolgt dieser Prozess in der Nähe von Grenzflächen, kann nicht von allen Seiten ausreichend Flüssigkeit nachströmen, um die kollabierende Blase zu füllen. Es kommt zu der Ausprägung eines Mikrojets. Darunter wird ein Flüssigkeitsstrahl verstanden, der mit Geschwindigkeiten von einigen hundert Metern pro Sekunde auf weitere Grenzflächen stößt [46].

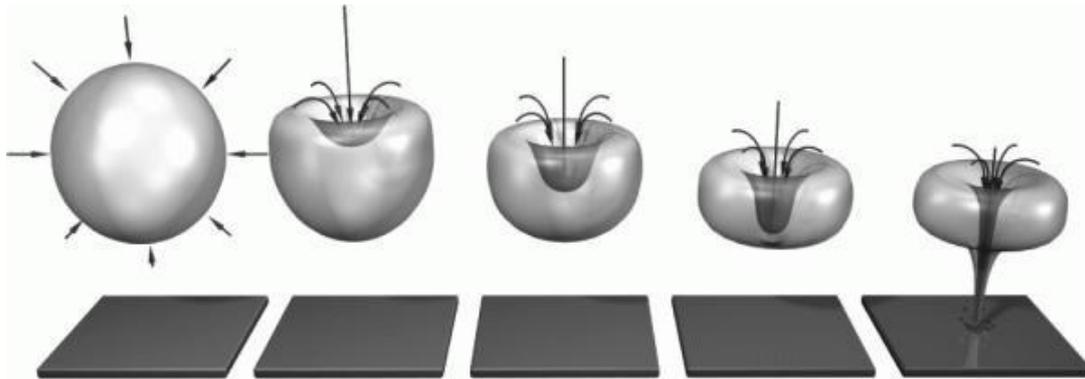


Abbildung 1.15 Kavitationsblase die asymmetrisch unter Ausbildung eines Mikrojets kollabiert. Die angrenzende Membran wird dabei durch die hohe Energie perforiert. Quelle: [3]

Die dabei freigesetzte Energie kann zu Erosionen an harten Grenzen oder dem Durchstoßen von Flächen an Gewebestrukturen führen, wodurch dieser Mechanismus entscheidend zur lithotriptischen Wirkung beiträgt [47, 48]. Es werden aber auch Mikroverletzungen und Membranperfusionen verursacht, die für die Nebenwirkungen verantwortlich sind und zu Schmerzen führen, welche eine Anästhesie erfordern [49, 50].

Grundlagen der Mechanotransduktion

Sowohl die direkten, als auch die indirekten Effekte der Stoßwellenapplikation wirken maßgeblich über die Mechanotransduktion. Sie beschreibt die Übertragung eines mechanischen Reizes auf ein Gewebe und dessen Umwandlung in eine biologische Antwort (Abbildung 1.16). Gewebe können sich somit über diesen Weg den physikalischen Gegebenheiten der Umgebung anpassen. Die Wirkung der Mechanotransduktion zeigt sich in sofortigen Reaktionen, wie der Öffnung von Ionenkanälen oder Freisetzung von Substanzen, aber auch in später sichtbaren Eigenschaften, zu der die Veränderung von Proliferation,

Apoptosis, und genetischer Expression gehören [51]. Sie spielt eine große Rolle in der Differenzierung und Organisation der verschiedenen Gewebe, sowie von Knochen und Blutgefäßen. So reagieren Muskeln aufgrund von mechanischen Reizen, die beim Training ausgeübt werden, durch Vergrößerung der Zellen [52]. In der Ausdifferenzierung von Endothelzellen und in der Gefäßreifung geben Scherkräfte den Impuls für die über Mechanotransduktion initiierten Veränderungen [53].

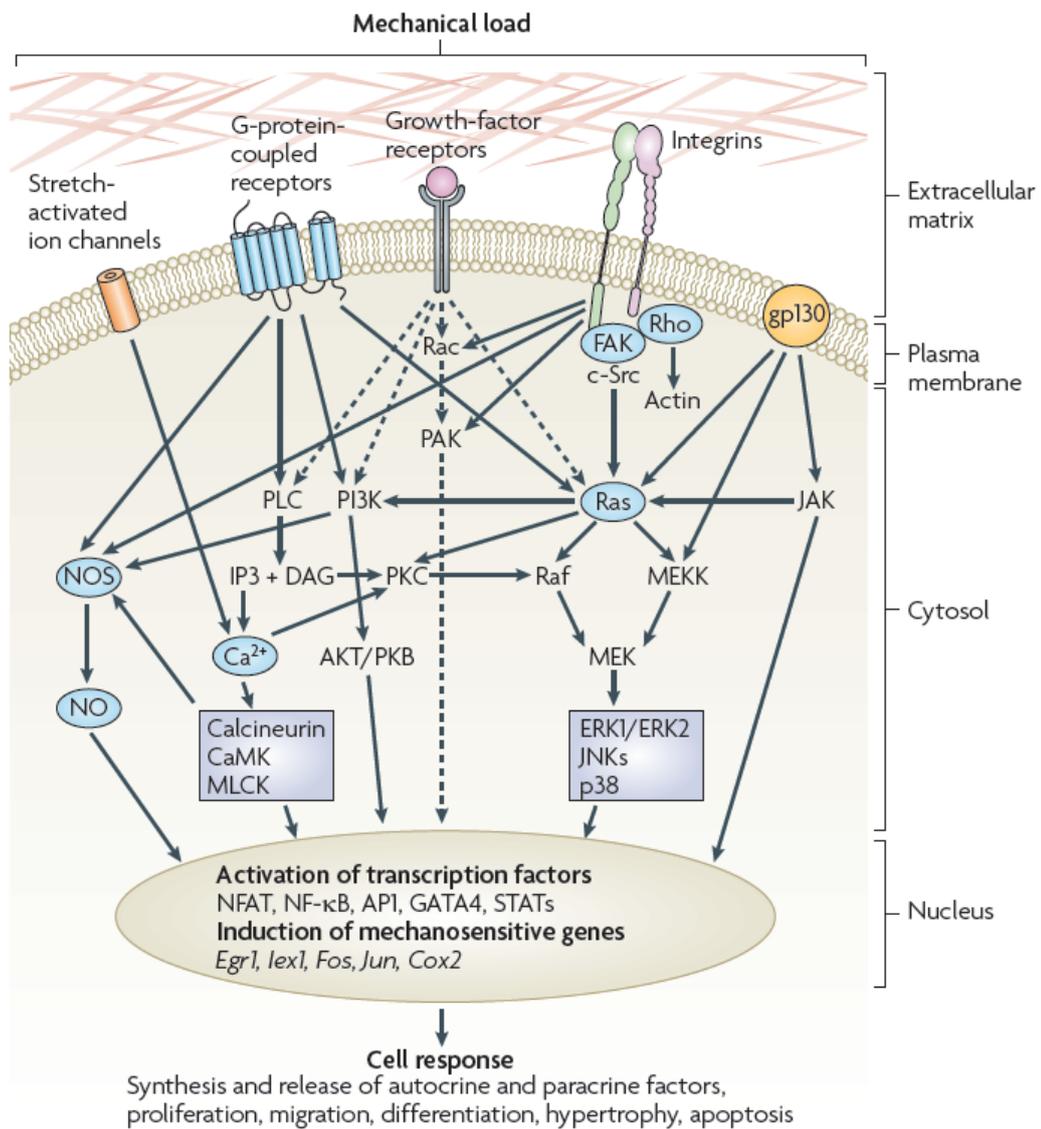


Abbildung 1.16 Die Mechanotransduktion bei Kardiomyozyten. Gezeigt ist die Entwicklung vom mechanischen Reiz über die ablaufende Signalkaskade bis zur zellbiologischen Antwort. Quelle: [51]

Sehr gut untersucht ist die Signaltransduktion am Herzen. Sie liefert einen Eindruck von den umfassenden Reaktionen, die über die Mechanotransduktion vermittelt werden können. Kardiomyozyten reagieren auf die hämodynamischen Gegebenheiten mit der Induktion intrazellulärer Signalwege. Dabei wird der mechanische Reiz über dehnungssensitive Ionenkanäle, G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Integrine und Rezeptoren für Wachstumsfaktoren aufgenommen. Über eine Reihe von intensiv erforschten Signalkaskaden kommt es im Cytosol zur Freisetzung von Ca^{2+} und NO, im Zellkern werden Transkriptionsfaktoren aktiviert und mechanosensitive Gene induziert. Am Ende steht mit der Synthese und Freisetzung von Signalstoffen sowie dem Einfluss auf die Proliferation und Migration eine modifizierte Zellantwort.

Defekte in den ablaufenden Signalkaskaden können eine Vielzahl von Krankheiten oder pathologischen Entwicklungen von Organfunktionen verursachen. Taubheit geht beispielsweise mit einer Veränderung der Haarzellen am inneren Ohr einher, wodurch der Schall nicht in einen Nervenreiz umgewandelt werden kann [54].

Effekte von Stoßwellen in-vitro

Die zellbiologischen Antworten der Mechanotransduktion auf eine Stoßwellenbehandlung sind bisher in vielfältiger Weise in-vitro nachgewiesen worden, wodurch Ansätze für die Erklärung des Wirkmechanismus gefunden werden konnten.

Für eine Vielzahl von humanen Zellkulturlinien, darunter mesenchymale Stammzellen (hMSCs), Chondrozyten und Tenozyten wurde eine Steigerung der Proliferation nachgewiesen [55-57]. Dies wurde durch die Veränderung der Aktivität von Kalzium- und Kaliumionenkanälen auch für Osteoblasten gezeigt, womit sich eine mögliche Erklärung der Induktion der Knochenheilung ergibt [58]. Die Untersuchung der Genexpression in Tenozyten ergab eine Verstärkung der Kollagenproduktion [57]. In Sehnen konnte außerdem eine Erhöhung an Lubricin, einem Glykoprotein welches die Gleitfähigkeit in Gelenken fördert, gefunden werden [59]. Die vermehrte Bildung von Kollagen und Lubricin kann sich günstig auf die Heilung von muskuloskeletalen Beschwerden auswirken.

Eine wichtige Wirkung für die Vasodilatation hat die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies nach der Applikation von Stoßwellen [60]. Eine gesteigerte Aktivität der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und Reduktion von inflammatorisch wirksamen Substanzen wie Nekrosefaktoren (NF- κ B, TNF- α) und Interleukinen wurde außerdem bewiesen [61-63]. Es erhöhte sich zudem der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), der für die Gefäßbildung und Versorgung von Geweben eine entscheidende Rolle spielt [64]. Endotheliale Vorläuferzellen, welche die Vaskulogenese unterstützen, wurden vermehrt in den behandelten Regionen gefunden [65]. Über diese Mechanismen kann die klinisch gezeigte Durchblutungssteigerung und verbesserte Myokardfunktion, sowie die fördernde Wirkung der Gewebeheilung durch Stoßwellenapplikation elementar unterstützt werden.

Der analgetischen Effekts der Stoßwelle wurde über ein niedrigeres Ansprechen von Neuronen auf das Neuropeptid Substanz P während und kurz nach der Behandlung, sowie einen langfristigen und selektiven Substanzverlust von unmyelinisierten Nervenfasern erklärt [66, 67]. Bislang unveröffentlichte Arbeiten konnten zudem eine Freisetzung von Endorphinen nach Stoßwellenbehandlung messen.

Darüber hinaus wurden weitere Eigenschaften der Stoßwellentherapie untersucht. So konnte eine antibakterielle Wirkung nachgewiesen werden, die eine Vermeidung von Infektionen als neues Indikationsgebiet vorschlägt [68]. Die durch Kavitation verursachte Sonoporation von Zellen machte die Aufnahme von Makromolekülen möglich, wodurch eine gesteigerte Resorption von Dextran in behandelte Zellen gezeigt wurde [69]. Ausgehend davon wurde die Beeinflussung der Membranpermeabilität untersucht, welche sich signifikant erhöhen ließ [70]. Darüber konnte unter anderem eine Plasmidtransfektion ermöglicht werden [71]. Untersuchungen zur Verbesserung der Aufnahme von Zytostatika in Tumorzellen konnten ebenfalls erste positive Ergebnisse zeigen [72]. Für die Behandlung von Nagelpilz wurde in Deutschland bereits ein Patent angemeldet, nachdem sich diese als erfolgreich gezeigt hatte [73].

1.2 Normale humane dermale Fibroblasten

Normale humane dermale Fibroblasten gehören zu den Bindegewebszellen, deren Funktion für die Alterung der Haut, aber auch bei der Wundheilung eine wichtige Rolle spielt. Dadurch kann ihre Untersuchung wesentliche Beiträge zu den durch Stoßwellen vermittelten Hautveränderungen beitragen. Sie sind mesenchymaler Herkunft und werden für die in-vitro Kultivierung aus der Haut erwachsener Menschen isoliert.

1.2.1 Bedeutung von Fibroblasten für die Haut

Fibroblasten befinden sich in der Dermis, der Hautschicht die Epidermis und Unterhautfettgewebe verbindet. Die Dermis, welche auch als Lederhaut bezeichnet wird, wirkt versorgend und stabilisierend auf die Hautstruktur. Sie wird daher auch als dermales Bindegewebe bezeichnet. Entscheidende Prozesse der Heilung und Alterung der Haut finden in dieser Region statt.

Beteiligung von Fibroblasten am Aufbau des dermalen Bindegewebes

Das Bindegewebe zeigt im Aufbau ein maschenartiges Fasernetz aus Kollagen und Elastin. Dazwischen liegen, in die extrazelluläre Matrix eingebettet, die Gewebszellen. Dazu zählen neben den Fibroblasten und deren ausgereifter Form, den Fibrozyten, auch Mastzellen, Lymphozyten, Leukozyten und Makrophagen. Fibroblasten bilden den vorherrschenden Zelltyp und übernehmen mit der Produktion von Bindegewebsfasern, Matrixproteinen, Enzymen und Interzellularsubstanz eine wichtige Aufgabe im Aufbau des Bindegewebes. In der Dermis befinden sich außerdem Blut- und Lymphgefäße, welche die Haut versorgen und einen Beitrag zu regenerativen Prozessen leisten (Abbildung 1.17).

Zu den Bindegewebsfasern gehören die Strukturproteine Elastin und Kollagen. Elastin ist für die Elastizität der Haut verantwortlich, da es sich um ein vielfaches dehnen lässt, ohne dabei die Ausgangsstruktur zu verlieren. Die Synthese zunächst löslicher Elastineinheiten, die sofort nach Verlassen der Zelle zum unlöslichen Elastin vernetzt werden, erfolgt in verschiedenen Zellen. In der Haut findet dieser Prozess unter anderem an den Ribosomen von

Fibroblasten statt. Kollagen bedingt die mechanische Stabilität und Zugfestigkeit der Haut. Es ist weniger dehnbar als Elastin, wodurch im Zusammenspiel eine feste und doch flexible Hautstruktur geschaffen wird. Vom Kollagen sind 18 verschiedene Typen bekannt, wovon Typ I und Typ III zusammen etwa 60% des Trockengewichtes an Kollagen in der Haut ausmachen [74]. Die Synthese von Prä-Pro-Kollagen erfolgt ebenfalls an den Ribosomen der Fibroblasten. Im Anschluss findet eine Modifikation unter Ausbildung des stabilen Kollagens im endoplasmatischen Retikulum statt.

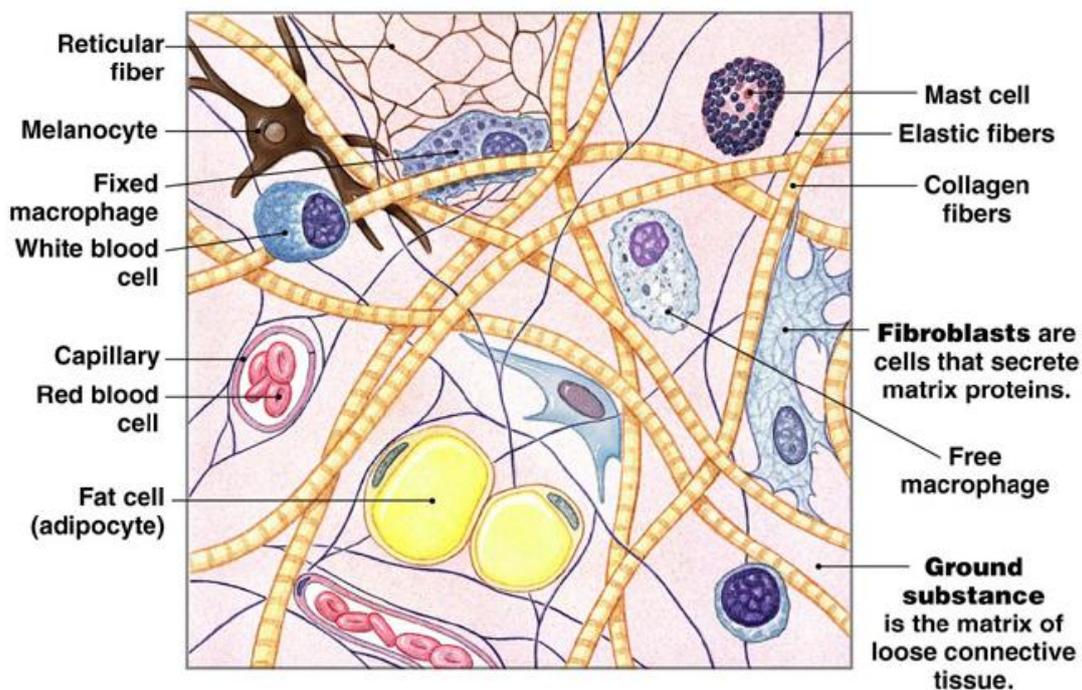


Abbildung 1.17 Aufbau des Bindegewebes. Eingebettet in die gelartige Grundsubstanz befindet sich das Maschensystem aus Kollagen und Elastin. Dazwischen liegen die Bindegewebszellen und versorgende Gefäße. Quelle: Pearson Education Inc.

Die Grundsubstanz der Dermis besteht aus einer gelartigen Füllung, welche mit den Bindegewebsfasern zur extrazellulären Matrix zusammengefasst wird. Glykosaminoglykane und Glykoproteine bilden die Grundstrukturen dieser Füllung. Sie können als große Polyanionen beträchtliche Mengen an Wasser und Kationen binden. Dadurch dienen sie der Aufrechterhaltung des Wasser- und Elektrolythaushaltes und erfüllen eine wichtige Aufgabe im Rahmen der viskoelastischen Eigenschaften der Haut.

Zur Gruppe der Glykosaminoglykane gehören Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Dermatan-sulfat, Heparansulfat und Keratansulfat. Dabei ist Hyaluronsäure das einzige nicht sulfatierte Molekül. Auch in der Herkunft unterscheidet sie sich durch die Bildung an der inneren Seite der Plasmamembran von den anderen Glykosaminoglykanen, die am endoplasmatischen Retikulum oder Golgi Apparat synthetisiert werden. Hyaluronsäuresynthesen werden wiederum von Fibroblasten exprimiert. In der Haut spielt Hyaluronsäure innerhalb dieser Gruppe die bedeutendste Rolle, da sie neben der starken Wasserbindung auch wichtig für Zellwachstum und -adhäsion sowie antioxidative Prozesse ist [75].

Die Glykoproteine sind an der Migration, Adhäsion und Orientierung von Zellen beteiligt. Zu ihnen gehören Fibronectin und Tenascin, wovon Fibronectin eine Bedeutung für die Wundheilung und Zellwanderung besitzt. Es werden zwei Arten des Fibronectins unterschieden. Das lösliche Plasma-Fibronectin wird in der Leber gebildet und bei der Wundheilung in Fibringerinnsel eingebaut, wodurch weitere Zellen für die Geweberegeneration gebunden werden können. Von Fibroblasten wird vornehmlich das unlösliche Fibronectin, welches sich in die extrazelluläre Matrix einlagert, synthetisiert [74]. Dort wirkt es als Verbindung zwischen Kollagenfibrillen und als Adhäsionsmolekül für wandernde Zellen.

Fibroblasten und Hautalterungsprozesse

Die Alterung der Haut wird durch intrinsische und extrinsische Faktoren verursacht. Die intrinsische Hautalterung beschreibt dabei den natürlichen Prozess der physiologischen Veränderungen im Verlauf des Lebens, während die extrinsische Alterung auf äußere Schäden durch umweltbedingte Belastungen wie UV-Strahlen zurück zu führen ist. Beide Formen gehen makroskopisch in erster Linie mit Elastizitätsverlust und Faltenbildung einher [76]. Da die Hautstruktur und -funktion bei extremer extrinsischer Alterung unter Ausbildung einer Elastose jedoch stark verändert wird, muss dieser Prozess gesondert betrachtet und behandelt werden. In dieser Arbeit wurde daher die intrinsische Alterung unter Beachtung der Beteiligung von Fibroblasten fokussiert.

Mit steigendem Lebensalter reduziert sich die Zahl und biosynthetische Arbeit der Zellen in der Dermis [77]. Dies gilt auch auf Fibroblasten, wodurch ihre nachlassende Funktionalität zu den Alterungsprozessen beiträgt [78]. Die Reduktion der Aktivität von Fibroblasten führt zu einer Abnahme der elastischen und kollagenen Fasern, was wiederum zu einer Minderung der Straffheit führt [76]. Durch die Verdünnung der Dermis, aber auch der Epidermis und des Unterhautfettgewebes, stellt sich insgesamt eine geringere Elastizität ein. Die Haut wird dünner, durchscheinender und verletzbarer. Der Rückgang der versorgenden Gefäße in der Dermis führt zusätzlich zu einer Verlangsamung regenerativer Prozesse.

Es ist nachgewiesen worden, dass der Hyaluronsäuregehalt der Haut mit dem Alter abnimmt, was ebenfalls mit der Funktion der Fibroblasten in Verbindung gebracht werden kann [79]. Die Folge sind ein weniger pralles Erscheinungsbild, sowie die Reduktion von Zellproliferation und -migration.

Diese Vorgänge der intrinsischen Alterung werden bei Frauen in einen nahen Zusammenhang mit der Veränderung des Hormonspiegels in der postmenopausalen Phase gebracht, wodurch die Hautbeschaffenheit in dieser Zeit einen größeren Wandel, als in den anderen Lebensabschnitten durchläuft [80].

Einfluss von Fibroblasten auf die Wundheilung

Die Wundheilung kann in drei verschiedene Formen gegliedert werden. Die einfachste Form ist die epitheliale Wundheilung, bei der nur die Epidermis verletzt wurde und innerhalb weniger Tage durch die schnelle Regeneration von Epithelzellen abheilt. Weiterhin ist die primäre Wundheilung zu nennen, welche nach glatten Schnittverletzungen oder Operationswunden eintritt und meist ebenfalls zügig und narbenfrei abläuft. Die sekundäre Wundheilung findet statt, wenn durch Substanzverlust die Wunde zunächst mit Granulationsgewebe aufgefüllt werden muss [81]. Die sich im Verlauf des länger dauernden Vorgangs ausbildende Haut weist häufig eine verminderte physiologische Funktion und Narben auf. Diese Form der Wundheilung kann durch pathologische Prozesse stark verlangsamt oder ganz unterbunden sein und bildet somit den Ansatz für eine Stoßwellentherapie [82].

Der Heilungsprozess der sekundären Wundheilung wird in vier Stufen unterteilt, die jedoch fließend ineinander übergehen (Abbildung 1.18). Die erste Phase, welche als exsudative Phase bezeichnet wird, schließt die Wunde provisorisch durch die Bildung eines Thrombus aus Thrombozyten, Leukozyten und Fibrin. In der sich anschließenden resorptiven Phase werden abgestorbene Zellen, Keime und Fibringerinnsel durch Phagozyten und Makrophagen zersetzt. Die proliferative Phase ersetzt die verloren gegangenen Zellen, Blutgefäße und Gewebe. Schließlich wird die Heilung mit der reparativen Phase abgeschlossen, in der vom Rand her neue Zellen einwachsen und die Wunde häufig unter Narbenbildung verschließen. Die Bindegewebsfasern reifen aus, wodurch die Wunde zusammengezogen und gefestigt wird. Die letzte Phase kann bis zu einem Jahr andauern [81].

Fibroblasten stellen neben Leukozyten und Endothelzellen eine der ersten Zellpopulationen dar, die in das Wundheilungsareal eindringen [83]. Sie werden zum einen durch verschiedene in der Wunde vorkommende Bedingungen wie Hypoxie oder Azidose, aber auch durch Thrombozyten- oder Makrophagenfaktoren zur Kollagenbildung angeregt [84]. Zum anderen initiiert Fibronectin diesen Prozess entscheidend. Das Einwandern von Fibroblasten in die Wunde wird durch eine chemoattraktive Wirkung des löslichen, in der Leber gebildeten Fibronectins gesteuert. Untersuchungen konnten zeigen, dass Fibronectin sehr früh im Granulationsgewebe nachweisbar ist, worauf eine Fibroblasteninvasion mit beginnender Synthese von Kollagen der Typen I und III folgt [85]. Dadurch, aber auch mit der anschließenden Synthese unlöslichen Fibronectins, leisten Fibroblasten einen wichtigen Beitrag zur Neubildung von Gewebe in der reparativen Phase. Die synthetisierten Kollagenfibrillen bilden die Grundlage für die Entwicklung neuer Blutgefäße und der damit verbundenen Versorgung im Wundareal. Die Neubildung der extrazellulären Matrix durch Fibroblasten ist in der Heilung mit dem Aufbau eines Gerüsts vergleichbar, welches der Wunde Struktur gibt und weitere Aufbauprozesse unterstützt [86]. Des Weiteren tragen Fibroblasten durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren und Proteoglykanen zur Angiogenese bei [87]. Sie sind somit für den Heilungsprozess unverzichtbar.

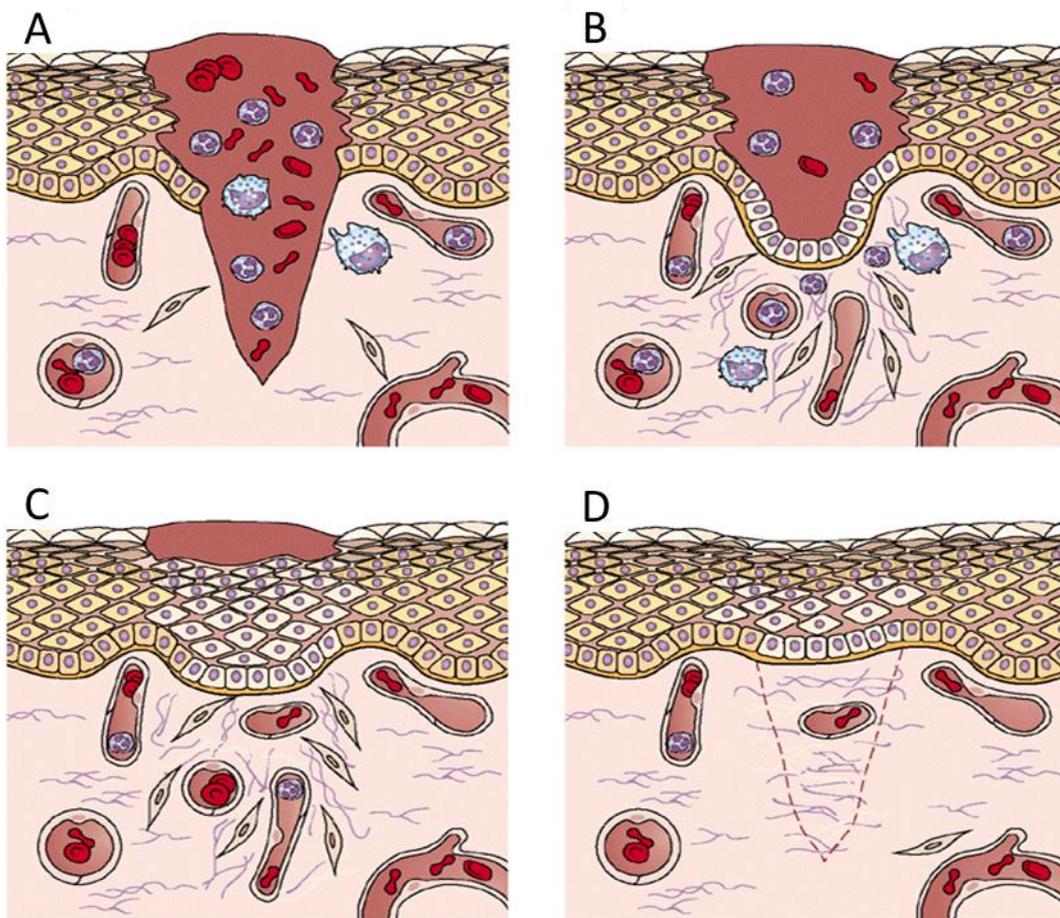


Abbildung 1.18 Phasen der Wundheilung. A) Exsudative Phase: Auffüllung des Wundspaltes mit koaguliertem Blut und Fibrinbestandteilen. B) Resorptive Phase: Resorption des Koagels im dermalen Bindegewebe und Ausbildung eines basalen Epithels. C) Proliferative und reparative Phase: Ausbildung neuer Blutgefäße im unterliegenden Bindegewebe und eines Plattenepithels an der Oberfläche der Wunde. D) Endstadium der reparativen Phase: Verschluss der Wunde unter Narbenbildung. Quelle: Roche Lexikon Medizin, 4. Aufl. 1999, Urban & Fischer

1.2.2 Bioanalytische Untersuchungen von Fibroblasten

Die bioanalytische Untersuchung der Reaktion von Fibroblasten auf physikalische oder chemische Reize kann Aufschluss über die klinisch beobachteten Veränderungen der Haut nach Applikation dieser Reize geben. In der Literatur steht eine Vielzahl differenzierter Verfahren zur Verfügung, wovon einige Methoden, die Beteiligung von Fibroblasten an Regenerations- und Heilungsprozessen sehr gut zeigen.

Migrationsuntersuchungen

Migrationsvorgänge können gerichtet oder ungerichtet ablaufen. Gerichtete Bewegungen entstehen, wenn zu einer Seite der Zelle dauerhaft chemoattraktive Substanzen wirken. Dazu gehören neben Fibronectin auch Kollagene, Elastinpeptide und Wachstumsfaktoren [88].

In der Literatur stehen eine Reihe von Assays zur Untersuchung der Migration zur Verfügung. Dazu gehören das klassische Boyden-Chamber Assay und die Analyse mit *ibidi* μ -Slides. Beide Verfahren beruhen jedoch auf der Messung gerichteter Migration in Gegenwart einer chemoattraktiven Substanz, wodurch sie nicht geeignet sind [89]. Da die Applikation von Stoßwellen als Indikator der Bewegung verstanden werden kann, aber keine dauerhaft zur Verfügung stehende chemoattraktive Wirkung ausübt, eignet sich an dieser Stelle ein Wound and Heal Assay [90]. Dabei wird die Migration über die Zeit, die zur Schließung einer künstlich erzeugten Wunde im nahezu konfluenten Zellteppich benötigt wird, ermittelt. Von *ibidi* steht dafür das μ -Dish, welches eine definierte Wundfläche erzeugt, zur Verfügung.

Messung der Proliferation

Die Messung der Proliferation gibt eine Aussage über die Geschwindigkeit der Zellteilung. Bei regenerativen Prozessen und im juvenilen Alter läuft dieser Prozess schneller ab. Fibroblasten können sich jedoch nur 50- bis 80-mal teilen, da sie einer Zellalterung unterliegen, wofür die Verkürzung der Telomere an ihren Chromosomenenden verantwortlich ist [91]. Es ist daher nötig, dass aus dem Mesenchym stetig Zellen nachgebildet werden.

Messung von Zellzahlen und damit die Bestimmung der Proliferation kann über instrumentelle Zählung der Zellen oder Viabilitätsassays erfolgen. Die Zählung mit Hilfe der CASY Technologie, welche in dieser Arbeit verwendet wurde, hat sich dabei als robustes und genaues Verfahren bewährt. Die Zellsuspension wird dafür von einer Kapillare am Gerät eingesaugt und in ein Spannungsfeld gebracht. Bei intakter Zellwand kann kein Stromfluss erfolgen, da diese als Isolator wirkt. Die Zellgröße wird bei der Messung ebenfalls erfasst, wodurch zwischen lebenden Zellen und Fragmenten unterschieden werden kann.

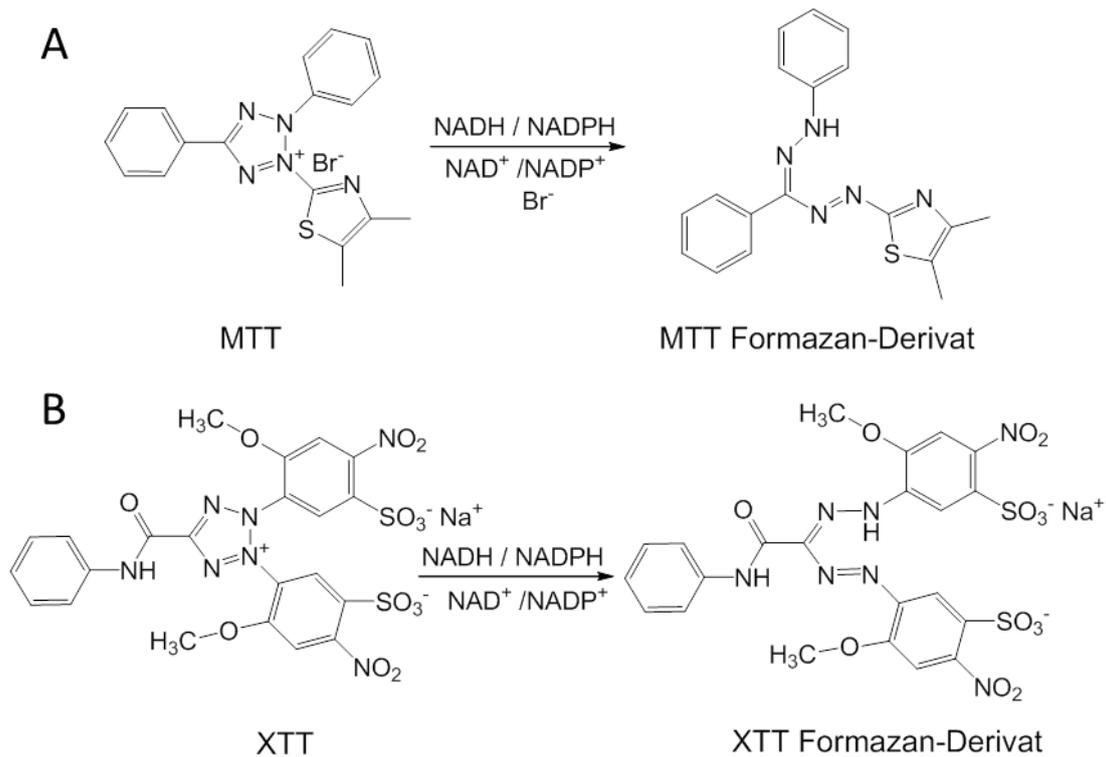


Abbildung 1.19 Reaktionsformeln der reduktiven Umsetzung im Farbassay. A) MTT wird zum violetten, unlöslichen Formazan-Derivat umgesetzt. B) XTT wird zum orangenen, wasserlöslichen Formazan-Derivat umgesetzt.

Viabilitätsassays bedienen sich Indikatoren, die ins Verhältnis zu der Zellzahl gestellt werden. Dazu gehören zahlreiche Methoden, die über die Quantifizierung der Umsetzung eines Farbstoffes eine Aussage erlauben oder den Gehalt eines Zellbestandteils, wie Proteine oder Adenosintriphosphat, messen und darüber den Rückschluss auf die Anzahl der Zellen ziehen.

In dieser Arbeit wurde das MTT und XTT Assay vergleichend verwendet. Bei MTT handelt es sich um den gelben Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, der durch Reduktion in der Zelle in ein violettes Formazan-Derivat umgesetzt wird, welches durch Zellaufschluss und Lösung quantifiziert werden kann. XTT ist das schwach gelbe Natriumsalz des 2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilids. Es wird ebenfalls durch reduktive Prozesse in der Zelle umgesetzt, bildet aber im Gegensatz zu MTT ein wasserlösliches, orangefarbenes Molekül, welches in das Medium sezerniert wird. Obwohl der genaue Mechanismus der Reduktion der Farbstoffe bislang diskutiert wird, lässt sich sagen, dass hauptsächlich von einer

Umsetzung an den Mitochondrien ausgegangen werden kann [92]. Dadurch besteht ein direkter Zusammenhang zwischen metabolischer Aktivität und Farbumsatz in der Zelle.

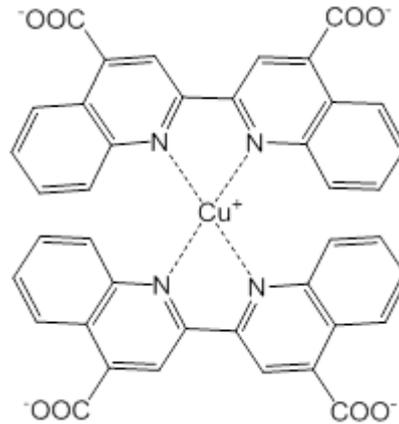


Abbildung 1.20 Komplexbildung von Bicinchoninsäure mit einwertigem Kupfer unter Ausbildung einer violetten Farbe.

Bei der Messung des Proteingehaltes als Indikator für die Zellzahl handelt es sich um ein weiteres gebräuchliches Verfahren. Das Bicinchoninic acid (BCA) Protein Assay beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine im alkalischen Medium. Die Cu^{1+} Ionen bilden durch Komplexbildung mit Bicinchoninsäure eine violette Farbe aus, welche photometrisch erfasst und in ihrer Konzentration gemessen werden kann [93].

Quantifizierung der Genexpression

Über die quantitative Polymerasekettenreaktion in Echtzeit (qRT-PCR) ist es möglich den Zusammenhang zwischen extrakorporaler Stoßwellentherapie und der Veränderung der Expression wichtiger Genabschnitte, die der Hautfunktion dienen, herzustellen. Dabei wird die Eigenschaft der DNA-Polymerase eingesetzt, welche kurzkettige DNA Abschnitte ausgehend von einer Startsequenz, dem Primer, duplizieren kann. Während der Amplifikationszyklen kann die vorliegende Menge eines zu bestimmenden Gens erfasst werden.

Die Quantifizierung der DNA während der ablaufenden Polymerasekettenreaktion (PCR) kann über die Verwendung von FRET-Sonden (Fluorescence resonance energy transfer) ermöglicht werden. Dabei werden sogenannte

TaqMan-Sonden eingesetzt, welche am 3'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff und am 5'-Ende mit einem Quencher, der diese Fluoreszenz unterdrückt, ausgestattet sind.

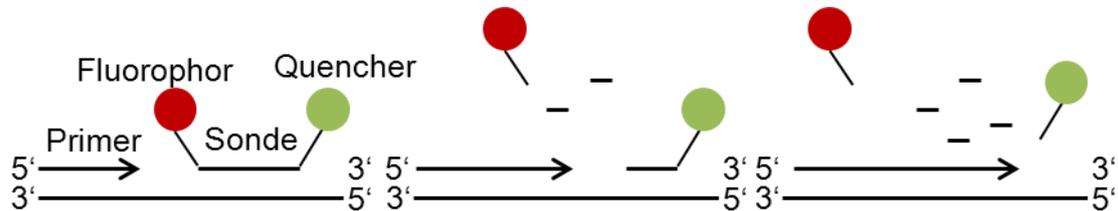


Abbildung 1.21 Prinzip von TaqMan Sonden. Durch die Elongation werden Fluorophor und Quencher voneinander getrennt, wodurch es zur Ausprägung einer messbaren Fluoreszenz kommt.

Sie binden spezifisch an das Zielgen. Während der Amplifikation wird das 5'-Ende der Sonde abgebaut, wodurch es zu einer räumlichen Entfernung von Quencher und Fluorophor kommt. Ein messbares Signal entsteht, welches ein direktes Maß für die vorliegende Anzahl von Zielgenen ist.

Der eigentliche Messwert, der zur Auswertung der quantitativen Bestimmung dient, ist der C_t -Wert, auch Threshold genannt. Er gibt an, bei welchem PCR-Zyklus ein Signal oberhalb eines bestimmten Schwellenwertes sichtbar wird. Durch Bildung von Differenzen der C_t -Werte von unbehandelten und behandelten Proben, sowie Verwendung des natürlichen Logarithmus, kann das Verhältnis der Genexpression beider Gruppen bestimmt werden.

Messung der Sekretion von Kollagen, Elastin und Hyaluronsäure

Die Messung der Sekretion vermag die Aussage von Genexpressionsanalysen zu verifizieren. Dabei werden die zu bestimmenden Stoffe aus dem Überstand des Kulturmediums isoliert und quantifiziert.

Dies kann, wie bei Elastin und Kollagen, über einfache Anfärbung der Proteine erfolgen. Zunächst werden diese durch Detergentien aus dem Medium ausgefällt und isoliert. Im Anschluss erfolgt die Anfärbung entweder mit dem Farbstoff 5,10,15,20-Tetraphenyl-21,23-porphine-tetra-sulfonat (TPPS), welcher eine hohe Affinität zu Elastin besitzt oder mit Siriusrot, einem Azofarbstoff mit hoher Affinität zu Kollagen [94, 95]. Das Farbpellet, welches durch diesen

Vorgang gebildet wird, kann in einem weiteren Schritt in Lösung gebracht und photometrisch quantifiziert werden.

Hyaluronsäure hingegen kann über ein Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt werden. Dabei wird ein für Hyaluronsäure spezifischer Fangantikörper auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Daran bindet die zu bestimmende Hyaluronsäure. Ausgehend von jeder erfolgten Bindung wird ein weiterer Antikörper mit spezifischen Bindungseigenschaften an die Hyaluronsäure gebunden, welcher mit einem farbgebenden Enzym gekoppelt ist. Ein Substrat für die enzymkatalysierte Reaktion wird hinzu gegeben und die Umsetzung über eine definierte Zeitspanne stattfinden lassen. Durch Zugabe eines Reagenzes, welches die Reaktion beendet, kann dieser Prozess zeitlich konstant gehalten werden. Der gebildete Farbstoff wird am Ende photometrisch quantifiziert, um damit auf die vorliegende Analysenkonzentration rückschließen zu können.

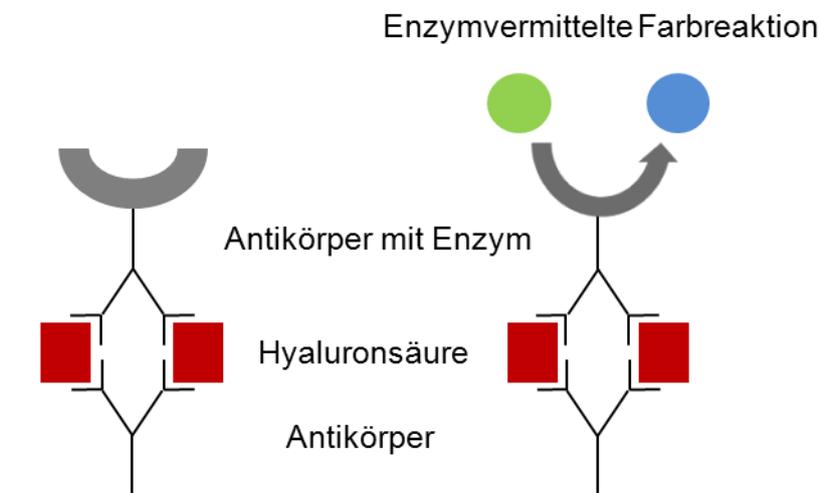


Abbildung 1.22 Bildung eines Sandwich-ELISA zur quantitativen Bestimmung der in das Medium sezernierten Hyaluronsäure.

1.3 Hyaluronsäure

Hyaluronsäure vermag die Funktion der Fibroblasten zu unterstützen. Außerdem sorgt sie durch ihre wasserspeichernde Eigenschaft für ein straffes Erscheinungsbild der Haut. Das macht sie für kosmetische Produkte, die der Hautalterung entgegen wirken, interessant.

Sie wurde erstmals 1934 aus dem Kammerwasser von Rinderaugen isoliert und charakterisiert [96]. Ihr Name ist abgeleitet von dem griechischen Wort "hyaloid" für gläsern und D-Glucuronsäure, welche Bestandteil von Hyaluronsäure ist. Ihre rheologischen Eigenschaften machen sie zu einem vielseitigen und im Organismus ubiquitär vorkommenden Polymer.

1.3.1 Struktur und Eigenschaften der Hyaluronsäure

Hyaluronsäure ist das einzige nicht sulfatierte Glykosaminoglykan. Trotz ihrer polyanionischen Eigenschaften, wodurch sie in physiologischer Lösung vor allem als Natriumhyaluronat vorliegt, ist die Bezeichnung mit dem Suffix Säure gebräuchlich.

Chemische Struktur der Hyaluronsäure

Die Grundstruktur wird durch D-Glucuronsäure, welche β -(1 \rightarrow 3) glykosidisch an N-Acetyl-D-glucosamin geknüpft ist, gebildet. Diese Disaccharide verbinden sich wiederum β -(1 \rightarrow 4) glykosidisch zu langkettigen Biopolymeren, welche eine Größe von bis zu 400 kDa erreichen können.

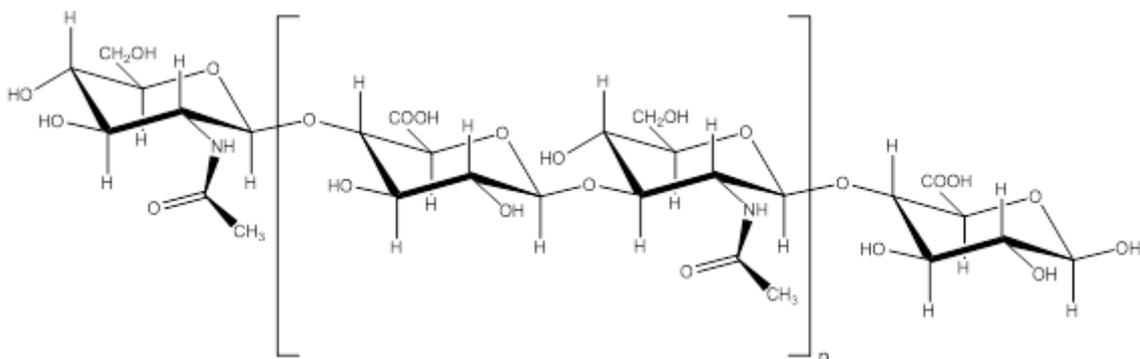


Abbildung 1.23 Strukturformel von Hyaluronsäure.

Durch die Verknüpfungen und die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Disaccharideinheiten kommt es zu einer starken Streckung des Moleküls. Bei physiologischen pH-Werten konnte daher eine ausgedehnte helicale Konformation festgestellt werden [97].

Wasserbindende Eigenschaften von Hyaluronsäure

Die Streckung des Moleküls trägt neben den zahlreichen Hydroxylgruppen und den bei physiologischen pH-Werten fast vollständig dissoziierten Carboxylatgruppen dazu bei, dass Hyaluronsäure ein beträchtliches Bindungsvermögen für Wasser aufweist. So kann die 50-fache Menge Wasser unter Ausbildung eines dickflüssigen Gels aufgenommen und die 1000-fache Menge gebunden werden. Hyaluronsäure bestimmt dadurch die rheologischen Eigenschaften der Synovialflüssigkeit, des Kammerwassers im Auge und der Lympheflüssigkeit [98]. Des Weiteren trägt sie entscheidend zur Aufrechterhaltung des Wasserhaushaltes im Körper und zur Gewebespannung bei.

1.3.2 Bedeutung der Hyaluronsäure für die Haut

Die Hälfte der im Körper vorkommenden Hyaluronsäure befindet sich mit einer Gesamtmasse von etwa 7 Gramm in der Haut [99]. Dort erfüllt sie eine Reihe von Aufgaben für die Hautfunktion, indem sie zu Wachstum, Migration, Differenzierung und Proliferation der Zellen beiträgt. Ihre Bedeutung für die Haut soll aufgrund der Verwendung innerhalb der Studie zur Hautalterung, die in dieser Arbeit durchgeführt wurde, genauer betrachtet werden.

Hyaluronsäure und Hautfunktion

Hyaluronsäure wird durch die Hyaluronsäuresynthase (HAS) an der Plasmamembran gebildet. Drei Isoformen des Enzyms, deren spezifische Aufgaben jedoch nicht vollständig geklärt sind, wurden bisher charakterisiert. Für die HAS2 konnte jedoch festgestellt werden, dass sie die Form der Hyaluronsäure synthetisiert, die für die Formierung der extrazellulären Matrix von Bedeutung ist [100]. Hyaluronsäure findet sich sowohl in der Dermis, als auch in den epidermalen zellulären Zwischenräumen. Dort ermöglicht sie Diffusion und Transport von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten, womit sie

zur Lebensdauer sowie Entwicklung von Keratinozyten beiträgt [101]. Darüber hinaus wirkt sie als Radikalfänger und ist an der Inaktivierung radikaler Sauerstoffspezies in der Epidermis beteiligt [102, 103]. Es wird vermutet, dass Hyaluronsäure bei ihrem natürlichen Abbau auch toxische Substanzen aus der Haut entfernt. Wegen ihrer kurzen Halbwertszeit von 24 Stunden wird die Haut so stetig von schädigenden Stoffen befreit [104]. Der CD44 Rezeptor an Zelloberflächen kann Hyaluronsäure binden, worüber Morphogenese und epidermale Differenzierung reguliert werden können [105, 106]. Über den Rezeptor RHAMM (Receptor for hyaluronan-mediated motility) kann außerdem die Zellbeweglichkeit und -transformation reguliert werden [107].

Im Alter kommt es zu einer Abnahme des Hyaluronsäuregehaltes in der Haut [108]. Dadurch können die genannten, in der Haut ablaufenden Prozesse, an denen Hyaluronsäure beteiligt ist, schlechter vorangetrieben werden. Das bedeutet, dass Stoffwechsel, Zelldifferenzierung und Abwehrmechanismen der Haut zurückgehen. Außerdem wird die Straffheit durch Reduktion des Wasserbindungsvermögens reduziert.

Kosmetische Verwendung von Hyaluronsäure

Die genannten Eigenschaften der Hyaluronsäure machen sie für die Kosmetikindustrie zu einer interessanten Substanz. Eine Reihe von Anti-Aging Produkten enthalten unveränderte Hyaluronsäure, wie sie auch in der Haut produziert wird. Dabei ist trotz des erbrachten Nachweises umstritten, ob Hyaluronsäure, als Makromolekül topisch appliziert, gut in die Haut eindringen kann [109]. Ein Effekt für diese Art der Anwendung über die Reduktion der Faltentiefe konnte für ein 0,5%iges Hyaluronsäuregel gezeigt werden [110].

Die Verwendung vernetzter Hyaluronsäure ist dagegen intensiver untersucht worden. Sie wird in der minimalinvasiven Behandlung zur Unterspritzung von Falten oder ganzen Hautarealen eingesetzt [111]. Durch die chemische Modifikation ist sie weniger anfällig für den Abbau durch Hyaluronidasen und erhält eine längere Halbwertszeit [112]. Diese Zubereitungen der Hyaluronsäure müssen jedoch injiziert werden. Eine Penetration in die Haut ist durch die strukturelle Veränderung ausgeschlossen.

1.3.3 Analytische Methoden zur Bestimmung von Hyaluronsäure

Hyaluronsäure kann durch den Einfluss von UV-Strahlen oder Ultraschall zerstört werden [113, 114]. Die Eignung der kombinatorischen Anwendung mit Stoßwellen muss daher genau geprüft werden.

Insgesamt ist Hyaluronsäure analytischen Bestimmungen schlecht zugänglich. Sie beinhaltet weder Chromophore, die für eine photometrische Analyse geeignet wären, noch weitere funktionelle Gruppen, welche ihre chemischen Eigenschaften herausstellen. Bedingt durch ihre Molekülgröße ist sie zudem mit vielen chromatografischen Verfahren nur degradiert analysierbar. Mit der Kapillarelektrophorese ist eine Reinheits-, Gehalts- und in Grenzen auch Molekülgrößenbestimmung der Hyaluronsäure möglich. Eine genauere Analyse der Molekülgröße erlauben rheologische Verfahren.

Grundlagen der Kapillarelektrophorese

Das Trennprinzip der Kapillarelektrophorese beruht auf den unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten von geladenen Teilchen in einem elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit einer Substanz hängt dabei von ihrer Molekülgröße und Ladung ab. Die Viskosität und Ionenzusammensetzung des Lösungsmittels spielen eine weitere Rolle, können jedoch den jeweiligen Anforderungen angepasst werden. Die auf die Substanz wirkende Feldstärke ist über die elektrophoretischen Parameter ebenfalls regulierbar.

$$v = \frac{E \times z \times e}{6\pi \times r \times \eta}$$

Formel 1.3 Abhängigkeiten der Wanderungsgeschwindigkeit v eines Teilchens im elektrischen Feld. Die auf die Teilchen wirkende Kraft wird durch die elektrische Feldstärke E , die Ladungszahl z und die Elementarladung e beschrieben. Entgegengerichtet wirken Reibungskräfte, die bei kugelförmigen Teilchen nach dem Stokes'schen Gesetz vom Radius des Teilchens r und der Viskosität η abhängen.

Die Auftrennung des Analysegemisches findet in einer Quarzkapillare, an die eine Spannung angelegt wird, statt. Kathodenständig befindet sich ein UV-Vis Detektor, welcher durch Absorptionsmessung die ankommenden Analyten

quantifiziert. Diese werden zunächst durch das Anlegen von Druck in die Kapillare eingebracht. Die endständige Kathode zieht die Kationen der Probe an, welche daher zuerst den Detektor passieren. Durch den elektroosmotischen Fluss (EOF) können aber auch neutral und negativ geladene Teilchen in Richtung der Kathode bewegt werden. Er entsteht bei pH-Werten oberhalb von 2, da die Innenseite der Kapillare unter diesen Bedingungen negativ geladen ist. An ihr lagern sich Kationen der Elektrolytlösung an, wodurch eine Doppelschicht entsteht. Die angelegte Spannung zieht die Kationen, ihre Solvathülle und damit die gesamte Elektrolytlösung in Richtung der Kathode. Neutralteilchen werden dadurch ebenfalls zum Detektor transportiert. Ist der EOF ausreichend hoch, können auf diesem Wege auch negativ geladene Teilchen für die Bestimmung zugänglich gemacht werden. Die Reihenfolge, mit der die Analyten den Detektor passieren, erstreckt sich daher von kleinen Kationen, welche weniger Rückhalt durch Reibung, aber eine hohe Anziehung durch die Kathode erfahren, über große Kationen, Neutralteilchen und große Anionen, die aufgrund ihres Radius eine schlechte anodische Beweglichkeit aufweisen, zu kleinen Anionen [115].

Grundlagen der Rheologie

Eine Lösung von Hyaluronsäure kann als kolloiddisperses System betrachtet werden. Die Molmasse der Hyaluronsäure beeinflusst die Viskosität dieses Systems entscheidend. Über die Mark-Houwink-Gleichung wird für kolloidale Lösungen ein Zusammenhang zwischen Viskosität und Molmasse beschrieben, welcher die gegenseitige analytische Bestimmung ermöglicht [116].

$$[\eta] = K \times M^\alpha$$

Formel 1.4 Die Mark-Houwink Gleichung beschreibt den Zusammenhang zwischen der Grenzviskosität $[\eta]$ und der Molmasse M der kolloidalen Teilchen.

Die Grenzviskosität $[\eta]$ ist als Viskosität bei unendlicher Verdünnung definiert und dient nach Mark-Houwink als Indikator für die Molmasse. Die Konstanten K und α sind vom kolloiddispersen System abhängig und können über Viskositätsmessungen verschiedener Molmassen des Polymers und umstellen der Formel ermittelt werden.

1.4 PRIMOS Messsystem

PRIMOS steht für Phaseshift rapid in-vivo measuring of human skin. Es handelt sich dabei um ein Messverfahren, mit dem Oberflächen abgetastet und genauestens charakterisiert werden können. Ursprünglich entstammt das System der industriellen Anwendung, in der es beispielsweise für die Vermessung von Lackoberflächen eingesetzt wurde. Auch im Bereich des Sports findet es etwa bei der Analyse der Lauffläche von Skiern Anwendung. In Zusammenarbeit mit der Beiersdorf AG wurde das Verfahren für die kosmetische Anwendung etabliert.

Messverfahren

Das Prinzip der Oberflächenmessung beruht auf der Streifenlichtprojektion. Eine Vielzahl 20 Mikrometer schmaler Streifen werden über Spiegel auf die Haut projiziert. Aus dem Schattenwurf und der Verzerrung dieser Lichtstreifen, welche von einer Software erfasst werden, kann die Form der Oberfläche auf den Mikrometer genau bestimmt werden [117]. Durch das Übereinanderlegen von mehreren derartig erzeugten Bildern ist es möglich, die Veränderung der Hautstruktur zwischen den Messungen zu analysieren.

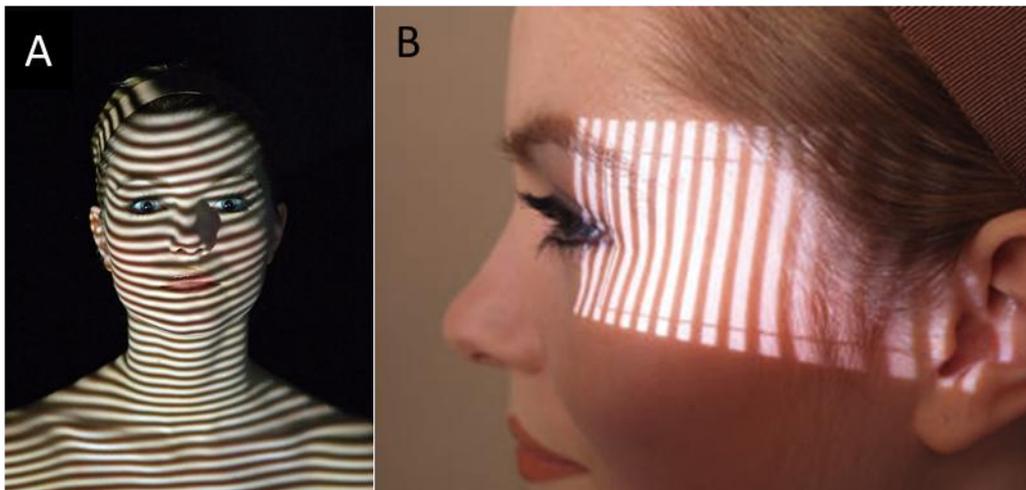


Abbildung 1.24 Streifenlichtprojektion zur Messung von Oberflächen. A) Vermessung des gesamten Kopfbereiches zur dreidimensionalen Wiedergabe. B) Vermessung von Periorbitalfalten für Wirksamkeitsnachweise von kosmetischen Produkten. Quelle: GFMesstechnik GmbH

Definition der Messparameter

Das System verfügt über zwei grundlegend verschiedene Auswertemechanismen. Eine Möglichkeit bietet die Auswertung dreidimensional definierter Bereiche. Dazu wird Volumen, Größe, Länge oder eine weitere Messgröße einer einzelnen Falte durch Analyse des Programms bestimmt.

Eine zweite Funktion geht über die Messung von Rauigkeiten. Diese können nur zweidimensional ermittelt werden. Dabei wird das Bild durch eine oder mehrere, parallel laufende Linien geschnitten, wobei ein zweidimensionales Höhenprofil erzeugt wird. Der Verlauf dieses Profils kann anhand von Rauheitskenngrößen, die aus der Charakterisierung technischer Oberflächen stammen, analysiert werden. Nach DIN EN ISO 4287:1998 sind diese genau definiert. Der Mittenrauhwert R_a beschreibt den arithmetischen Mittelwert der absoluten Beträge der senkrechten Abstände des Rauheitsprofils von der mittleren Linie innerhalb der Messstrecke. Damit gibt er einen Überblick über den Gesamtverlauf eines Profils.

$$Ra = \sqrt{\frac{1}{lr} \times \int_0^{lr} R^2(x) dx}$$

Formel 1.5 Darstellung der Formel zur Berechnung des Mittenrauhwertes R_a , wobei l die Länge einer Einzelmessstrecke $R(x)$ den Wert des Rauheitsprofils an der Position x beschreibt.

Ein weiterer Parameter dieser Reihe ist die maximale Rauhtiefe R_{max} . Über die definierte Messstrecke werden fünf Abschnitte gleicher Länge gebildet. Innerhalb jeder dieser Strecken wird der maximale Höhenunterschied in senkrechter Richtung ermittelt. Der höchste Unterschied dieser fünf Werte wird als maximale Rauhtiefe bezeichnet.

2 Zielsetzung

Die extrakorporale Stoßwellentherapie vermag die Wundheilung und Geweberegeneration bedeutend voranzutreiben. Nach Behandlung der gealterten Haut konnten Einzelbeobachtungen außerdem einen straffenden Effekt durch Stoßwellen zeigen. Sie scheint Stoffwechsel- und Regenerationsprozesse in der Haut auszulösen, deren Verläufe bislang ungeklärt sind.

Daher war es ein Ziel dieser Arbeit die zugrunde liegenden Wirkmechanismen zu untersuchen. Dies sollte über die Analyse der Einflüsse von Stoßwellen auf Fibroblasten in-vitro erfolgen. Der Fokus wurde dabei auf die über die Mechanotransduktion vermittelten Prozesse Migration, Proliferation und Genexpression gelegt. Außerdem sollten die Ergebnisse, die in der Behandlung der gealterten Haut gesehen wurden, mit Hilfe eines objektiven und präzisen Messverfahrens überprüft werden. Dabei spielte Hyaluronsäure eine weitere, wichtige Rolle. Sie unterstützt die Hautfunktion auf vielfältige Weise, wodurch ihr Einsatz in der Kombination mit der Stoßwellentherapie untersucht werden sollte. Dafür musste zunächst der Abbau der Hyaluronsäure durch die Applikation von Stoßwellen ausgeschlossen und die Qualität des Produktes überprüft werden. Darüber hinaus zielte die Arbeit darauf das elektrohydraulische mit dem piezoelektrischen Erzeugungsprinzip von Stoßwellen anhand der Proliferation zu vergleichen.

Somit sollte eine Aussage über die Einflüsse von Stoßwellen auf die Haut in-vivo und in-vitro gemacht werden, wobei in-vitro zusätzlich der Vergleich zweier Geräte angestrebt wurde. Der Einfluss von Hyaluronsäure in der Kombination mit der Stoßwelle sollte bei den Studien in-vivo hingegen eine besondere Rolle spielen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Laborgeräte, Apparaturen und Software

Gerät	Hersteller
Analysenwaage CP 225 D	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Bandelin Sonorex	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Brutschrank Heracell 150i CO ₂ Incubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Casy Counter Casy 1	Schärfe System, Reutlingen, Deutschland
Elektrophoresesystem Power Pac 300	BioRad Laboratories, München, Deutschland
ELISA Wäscher Tecan SLT Columbus	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
HPCORE Chem Station Version 4.2	Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland
Inversmikroskop Olympus CK2	Olympus, Hamburg, Deutschland
Kamera CCD Retiga 1300	QImaging, Surrey, Kanada
Kapillarelektrophorese Agilent 3D CE	Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland
Lichtmikroskop invers	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Microplate Reader MRX TC Revelation	Dynex Technologies, Berlin, Deutschland
MRX TC Revelation Software (Version 4.22)	Dynex Technologies, Berlin, Deutschland
PASW Statistics 18 (SPSS 18)	IBM, New York, USA
PRIMOS ^{lite} Optisches Messsystem	GFM, Teltow, Deutschland
PRIMOS ^{lite} Software (Version 5.7)	GFM, Teltow, Deutschland
qRT-PCR System Step One Plus	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
QtiPlot Software (Version 0.9.7.8)	ProIndepent Software, Craiova, Rumänien
RheoStress1 Rheometer	ThermoElectron, Karlsruhe, Deutschland
RheoWin HAAKE (Version 3.1)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Step One Software (Version 2.2.2)	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

Sterilbank LaminAir HVR 2448	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Stoßwellengerät dermagold	MTS Europe GmbH, Konstanz, Deutschland
Stoßwellengerät PiezoWave	Richard Wolf GmbH, Knittlingen, Deutschland
Stream Pix 5 Software	Imaging Solutions, Eningen, Deutschland
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Mini Spin	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
T-Scratch Version 1.0 Software	ETH Zürich, Schweiz
UV-Fotokammer Bio Doc II	Biometra, Göttingen, Deutschland
Vortex Genie	Scientific Industries, New York, USA
Zentrifuge Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Labofuge 400R	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

3.1.2 Reagenzien

Substanz	Warnhinweis (H- und P-Sätze)	Hersteller
Agarose	-	Sigma-Aldrich
Borsäure	H: 360FD P: 201-202-281-308+313-405-501	Sigma-Aldrich
Dikaliumhydrogenphosphat	-	Merck
Dimethylsulfoxid	-	Sigma-Aldrich
Ethanol ≥ 99,5%	H: 225 P: 210-233-240-241-242-280-303+361+353-305+351+338-337+313-370+378-403+235-501	Merck
Ethidiumbromid	H: 341-330-302 P: 281-302+352-305+351+338-304+340-309-310-320-330-403+233-405	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure	H: 319 P: 264-280-305+351+338-337+313	Merck

Isopropanol ≥99%	H: 225-319-336 P: 210-233-240-241-242-243-264-280-303+361+353-305+351+338-337+313-370+378-403+235	Sigma-Aldrich
Kalilauge 1 N	H: 302-314 P: 280-301+330+331-305+351+338-309-310	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	-	Merck
Mercaptoethanol	H: 302-311-314-332-411 P: 260-264-273-280-301+312-302+352-303+361+353-304+340-305+351+338-309-310-321	Merck
MTT	H: 315-319-335 P: 261-305+351+338	Sigma-Aldrich
Natriumazid	H: 300-400-410 EUH: 032 P: 264-273-301+310-321-330-391-405-501	Merck
Natriumchlorid	-	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	H: 228-311-302-335-315-319 P: 210-280-304+340-305+351+338-309+310	Carl Roth
Natronlauge 1 N	H: 290-H314 P: 280-301+P330+P331-P305+P351+P338	Merck
PDGF-BB human	-	Peprotech
Phenazinmethosulfat	-	Sigma-Aldrich
Phosphorsäure 85%	H: 314 P: 260-264-280-301+330+331-305+351+338-309+310	Carl Roth
Salzsäure 37%	H: 314-335 P: 260-301+330+331-303+361+353-304+340-305+351+338-310-321-405-501	Carl Roth
Schwefelsäure 2 N	H: 314 P: 280-301+330+331-309-310-305+351+338	Carl Roth
Tetramethylbenzidin	H: 228-400 P: 210-273	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	H: 315-319-335 P: 261-305+351+338	Sigma-Aldrich

Triton X-100	H: 302-318 P: 280-305+351+338	Sigma-Aldrich
Tween 20	-	Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid 30%	H: 271-332-302-314 P: 220-261-280-305+351+338-310	Merck
XTT	H: 315-319-335 P: 261-305+351+338	Sigma-Aldrich

3.1.3 Zelllinien, Lösungen und Medien für die Zellkultur

Bezeichnung	Zusammensetzung (soweit bekannt)	Hersteller
Cryo-SFM	Methylcellulose DMSO Kryoprotektive Faktoren	Promocell
Fibroblast Growth Medium 2	0,02 mL/mL Fetales Kälberserum 1 ng/mL Fibroblasten Wachstumsfaktor 5 µg/mL Insulin Aminosäuren, Glucose, Salze, Vitamine in Phosphatpuffer	Promocell
Normale humane dermale Fibroblasten (NHDF)	500.000 kryokonservierte Zellen	Promocell
Penicillin-Streptomycin- Lösung	10000 Units/mL Penicillin 10000 µg/mL Streptomycin	Carl Roth
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	8,0 g Natriumchlorid 0,2 g Kaliumchlorid 1,42 g Dinatriumhydrogenphosphat 0,27 g Kaliumdihydrogenphosphat	Invitrogen
RPMI 1640	0,1 mL/mL Fetales Kälberserum Wachstumsfaktoren, Insulin Aminosäuren, Glucose, Salze, Vitamine in Phosphatpuffer	Invitrogen
Trypsin-EDTA	0,04% Trypsin 0,03% EDTA	Promocell
Trypsin Neutralization Solution (TNS)	0,05% Trypsin Inhibitor aus Soja 0,1% Rinderserum Albumin	Promocell

3.1.4 Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Phosphat-Puffer pH 7,0 für Hyaluronsäureanalytik nach Ph. Eur 6.0	9,00 g Natriumchlorid 0,78 g Natriumdihydrogenphosphat 1,79 g Natriummonohydrogenphosphat ad 1 Liter Aqua dem. pH-Einstellung mit NaOH 1 N oder H ₃ PO ₄ 85%
40 mM Phosphat-Puffer pH 7,4 für Kapillarelektrophorese	1,384 g Kaliumdihydrogenphosphat 5,260 g Dikaliumhydrogenphosphat ad 1 Liter Aqua dem. pH-Einstellung mit KOH 1 N oder H ₃ PO ₄ 85%
TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE) pH 8,0 für Agarose-Gelelektrophorese	10,8 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 5,5 g Borsäure 0,7 g Ethylendiamintetraessigsäure ad 1 Liter Aqua dem. pH-Einstellung mit NaOH 1N

3.1.5 Reaktionskits

Bezeichnung	Hersteller
Fastin Elastin Assay	Biocolor, Carrickfergus, UK
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
HotStarTaq Master Mix Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Hyaluronan Duo Set	R&D Systems Europe, Abingdon, UK
MTT Cell Proliferation Assay	ATCC Bioproducts, Manassas, USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	Pierce, Thermo Scientific, Rockford, USA
QIAshredder	QIAGEN, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Sircol Soluble Collagen Assay	Biocolor, Carrickfergus, UK
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

3.1.6 Primer

Bezeichnung (human)	TaqMan-Primer (Applied Biosystems)
COL1A2	Hs01028970_m1
COL3A1	Hs00943809_m1
ELN	Hs00355783_m1
FN1	Hs01549976_m1
GAPDH	Hs02758991_g1
HAS2	Hs00193435_m1

3.1.7 Sonstige verwendete Produkte

Bezeichnung	Zusammensetzung (soweit bekannt)	Hersteller
CASYton	Elektrolytlösung	Schärfe System, Reutlingen, Deutschland
Natrium-Hyaluronat	Natrium-Hyaluronat 300 kDa	Orthomol, Langenfeld, Deutschland
Natrium-Hyaluronat	Natrium-Hyaluronat 1200 kDa	Sanofi Aventis, Frankfurt, Deutschland
RNase-Zap	-	Invitrogen, New York, USA
Sonogel	Wasser, Acrylamid, Natronlauge	Sonogel GmbH, Bad Camberg, Deutschland
Viscontour Serum®	Natrium-Hyaluronat 1200 kDa Phosphatpuffer, isotone Natriumchloridlösung	Sanofi Aventis, Frankfurt, Deutschland

3.2 Methoden der Zellkultur

3.2.1 Kultivierung normaler humaner dermaler Fibroblasten

Für die Kultivierung der Fibroblasten wurde, sofern nicht anders beschrieben, durchgehend Fibroblast Growth Medium 2 verwendet, welches vor Gebrauch mit 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung ergänzt wurde.

Die Fibroblasten wurden kryokonserviert bezogen und bis zum Aussähen in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Ansetzen der Zellkultur wurde eine t-75 Zellkulturflasche mit 14 mL vorgewärmtem Medium gefüllt und zunächst im Brutschrank gelagert. Dieser wurde auf die Temperatur von 37°C und einen CO₂ Gehalt von 5% eingestellt. Während der Vorbereitung der Zellen wurde dadurch das Medium warm gehalten und mit CO₂ gesättigt.

Die Zellampulle wurde zügig unter Schwenken im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und der Inhalt in 1 mL Medium suspendiert. Die erhaltene Zellsuspension konnte anschließend in die vorbereitete Kulturflasche überführt und für 24 Stunden im Brutschrank kultiviert werden. Dann erfolgte der erste Mediumswechsel. Nach Ansetzen der Zellkultur oder Passagieren wurde das Medium bereits nach 24 Stunden gewechselt, sonst nach 48-72 Stunden.

Die Zellen wachsen adhärent im Monolayer. Nach fünf bis sieben Tagen, wenn eine 90%ige Konfluenz erreicht war, konnte passagiert werden. Dazu wurden die Zellen zunächst mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, anschließend mit 60 µL Trypsin-EDTA pro cm² Oberfläche überschichtet und das Ablösen der Zellen unter dem Mikroskop beobachtet. Sobald die Zellen begannen sich leicht zu runden, konnte der Ablösungsvorgang durch Anklopfen der Kulturflasche beschleunigt werden. Das Trypsinieren wurde mit der Äquivalentmenge Trypsin Neutralization Solution (TNS) gestoppt und ein weiteres Äquivalent Medium hinzu gegeben. Die Suspension wurde in ein 50 mL Falcon-Röhrchen überführt und bei 220 x g zentrifugiert, wodurch sich ein Zellpellet bildete. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in einer fünf-fachen Verdünnung zur ursprünglichen Konzentration wieder aufgenommen und in Kulturflaschen oder -schälchen zur weiteren Kultivierung gegeben.

Zur Vermehrung und anschließend langfristigen Lagerung wurden die nach der ersten Passage konfluent gewachsenen Zellen trypsinisiert und das Zellpellet gewonnen, welches in 1 mL Cryo-SFM suspendiert wurde. Die Zellsuspension wurde über Nacht in Cryoröhrchen, welche in Isopropanol getaucht wurden, bei -80°C gelagert. Dadurch konnte ein langsames, gleichmäßiges Absinken der Temperatur gewährleistet werden. Anschließend fand die Lagerung in flüssigem Stickstoff statt.

Nach dem Auftauen der subkultivierten Zellen erhielten diese die Passagenummer 4. Für die Experimente wurden Zellen der Passagen 4 bis 9 verwendet.

3.2.2 Behandlung der Zellen mit Stoßwellen

Zunächst wurden die Zellen entsprechend des geplanten Experiments in kleinere Zellkulturflaschen oder Petrischalen subkultiviert und für 24 Stunden im Brutschrank belassen um eine Adhäsion der Zellen zu gewährleisten. Vor der Behandlung mit Stoßwellen wurde PBS im Wasserbad auf eine Temperatur von 37°C gebracht und die Kulturflasche oder -schale damit vollständig und luftblasenfrei gefüllt. Nach erfolgter Behandlung wurde die Flüssigkeit aus den Kulturgefäßen gegossen, wobei abgelöste Zellen entfernt wurden. Im Anschluss wurde einmal mit PBS gewaschen und die Zellen zur Kultivierung mit Medium überschichtet.

Es fand eine ausführliche Optimierung der Parameter Energiestufe und Anzahl der Impulse statt. Bei der durchgeführten Migrationsanalyse wurde neben der üblicherweise verwendeten Frequenz von 4 Hertz auch die Frequenz 6 Hertz getestet. Bei der Behandlung im Wasserbad fand eine Optimierung des Abstandes und des Beobachtungszeitraumes statt.

Direkte Stoßwellenapplikation

Eine direkte Applikation der Stoßwelle fand nur bei der Migrationsanalyse Anwendung. Diese erfolgte in *ibidi μ -Dishes* oder Petrischalen, welche zur Behandlung mit Hilfe von Ultraschallgel unmittelbar an den Applikator des

Stoßwellengerätes angekoppelt wurden. Dabei konnte die Kulturschale durch den Applikator vollständig abgedeckt werden, da dieser einen Durchmesser von 40 mm aufweist. In Tabelle 3.1 sind die für die Behandlung gewählten Einstellungen, sowie das verwendete Stoßwellengerät angegeben.

Tabelle 3.1 Behandlungsparameter Migrationsanalyse

Gerät	PiezoWave
Firma	Richard Wolf GmbH
Applikator	FP4
Parameter	Einstellung
Energiestufe	Low 5 - 20
Maximale Energieflussdichte	0,06 mJ/mm ²
Anzahl der Impulse	500 - 2500
Frequenz	4 Hz oder 6 Hz
Entfernung	direkte Ankopplung

Stoßwellenapplikation im Wasserbad

Die weiteren Analysen wie Proliferation, genetische Expression und Sekretion fanden aus t-12,5 oder t-25 Zellkulturflaschen heraus statt. Für in-vitro Versuche von Stoßwellen wurde ein standardisiertes Wasserbad, das in Kapitel 1.1.4 beschriebene IVSWT Water Bath, verwendet.

Das Wasserbad wurde vor Versuchsbeginn mit entgastem, vortemperierten Leitungswasser gefüllt. Der Thermostat wurde so programmiert, dass die Wassertemperatur zwischen 36,5°C und 37°C konstant gehalten wurde. Dazu wurde diese über einen Fühler ständig kontrolliert. Die zu behandelnden Flaschen wurden nach dem Befüllen mit PBS über eine Klemme am Schraubverschluss befestigt und in das Wasserbad getaucht. Die Oberfläche der Zellen zeigte dabei in Richtung der Stoßwellenquelle. Über die Silikonmembran wurde der Applikator des Stoßwellengerätes angekoppelt. Dazu wurde zwischen Membran und Applikator luftblasenfrei Ultraschallgel aufgetragen. Im Anschluss konnten die Behandlungen durchgeführt werden.

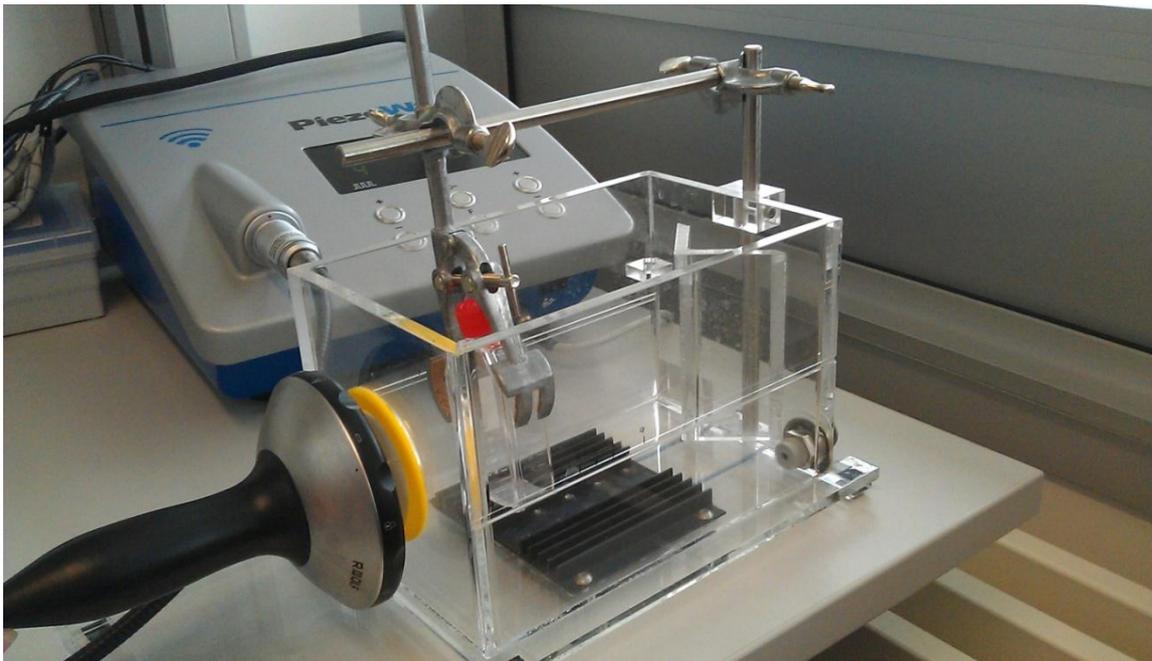


Abbildung 3.1 Das IVSWT Water Bath mit angekoppeltem Applikator F7G3 des Gerätes PiezoWave.

Optimierung des Abstandes

In den Versuchsreihen wurde mit zwei verschiedenen Stoßwellengeräten behandelt. Zum einen fand wiederum das piezoelektrische Erzeugungsprinzip mit dem Gerät PiezoWave Anwendung, zum anderen wurde mit dem elektrohydraulisch funktionierenden dermagold gearbeitet.

Um optimale Bedingungen zu erhalten, wurden für beide Geräte vorab Versuche durchgeführt, in denen verschiedene Entfernungen der Zellkulturflasche zum Applikator getestet wurden. Mit dem dermagold wurden drei Entfernungen getestet, mit dem PiezoWave zwei. Gemessen wurde dabei von der Applikationsmembran zum Flaschenboden, wobei die Zellen von oben behandelt wurden, da eine rückseitige Anwendung stärkere Zellablösung gezeigt hatte.

Um bei der Behandlung mit dem PiezoWave die gesamte Flasche im postfokalen, sich ausweitenden Bereich erfassen zu können, wurde im Abstand von 8 cm, was 4 cm Abstand vom Fokus entspricht, behandelt. Die Messung erfolgte dabei zwischen dem äußeren Ende der Kugelkalotte und dem Flaschenboden. Außerdem wurde die Flasche 1,5 cm hinter den Fokus

eingbracht, wobei aufgrund des geringen Radius der Behandlungsfläche die Behandlung mehrfach für die einzelnen Bereiche erfolgen musste.

Tabelle 3.2 Apparatur und Einstellungen der Stoßwellenbehandlung im Wasserbad für die Verwendung des PiezoWaves

Gerät	PiezoWave
Firma	Richard Wolf GmbH
Applikator	F7G3
Parameter	Einstellung
Energiestufe	10 - 20
Ladespannung	3,4 - 6,4 kV
Anzahl der Impulse	500 - 2500
Frequenz	4 Hz
Entfernung	5,5 und 8 cm

Tabelle 3.3 Apparatur und Einstellungen der Stoßwellenbehandlung im Wasserbad für die Verwendung des dermagolds

Gerät	dermagold
Firma	MTS Europe GmbH
Applikator	CP-155
Parameter	Einstellung
Energiestufe	3 - 7
Ladespannung	3 - 7 kV
Anzahl der Impulse	300 - 500
Frequenz	5 Hz
Entfernung	5, 7 und 9 cm

3.2.3 Migrationsanalyse mit dem Wound and Heal Assay

Zur Messung der Migrationsneigung der Fibroblasten nach erfolgter Stoßwellenbehandlung wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Zunächst wurde das *ibidi μ -Dish*, welches eine definierte, konstante Wundfläche liefert, verwendet. Im späteren Verlauf kam jedoch eine Petrischale, mit manuell erzeugter Wundfläche zum Einsatz.

In jeder Behandlungsrunde wurden zwei unbehandelte Schälchen zur Kontrolle mitgeführt. Sie wurden ebenso mit PBS gefüllt und für die Länge einer Stoßwellenbehandlung in das Wasserbad eingebracht. Die Fotodokumentation wurde auch hier durchgeführt und diente als Referenz für die behandelten Schälchen des Durchganges.

Migration im *ibidi* μ -Dish

Das *ibidi* μ -Dish ist eine kleine Petrischale, die zwei Kammern enthält, in die ein definiertes Volumen Zellsuspension gefüllt werden kann. Die Kammern sind durch biokompatibles Silikon begrenzt, welches zu Beginn der Migrationsanalyse entfernt wird und einen definierten Spalt zwischen den Zellteppichen hinterlässt, in den die Zellen migrieren können.

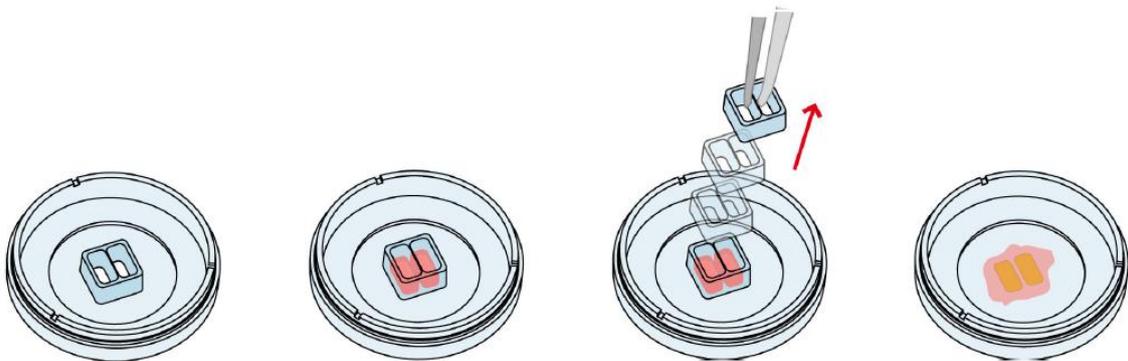


Abbildung 3.2 Verwendung des *ibidi* μ -Dishes. Im zeitlichen Ablauf erfolgt die Stoßwellenbehandlung zwischen Bild 2 und 3. Quelle: *ibidi* GmbH

Beim Passagieren konfluent gewachsener Zellen wurde das Zellpellet unverdünnt in Medium aufgenommen und 70 μ L der Suspension luftblasenfrei in jede Kammer pipettiert. Dadurch konnte ein gleichmäßiger Zellteppich erzeugt werden. Eine Verdünnung oder Konzentration der Zellsuspension war nicht angebracht, da dadurch ein undefinierter Spalt bzw. übermäßige Bewegung der Zellen durch den resultierenden Migrationsdruck entstehen könnten.

Anschließend wurden die Kulturschälchen wie beschrieben über Nacht im Brutschrank gelagert und vor der Stoßwellenapplikation mit vorgewärmtem PBS gefüllt. Nach der Behandlung aller Schälchen wurde mit einer sterilen Pipette die Silikonbegrenzung entfernt und die Zellen mit 800 μ L Medium überschichtet.

Tabelle 3.4 Abmessungen des *ibidi* μ -Dishes

Geometrische Abmessungen	
Wachstumsfläche gesamt	0,44 cm ²
Füllvolumen gesamt	140 μ L
Zellfreier Spalt	500 μ m \pm 50 μ m
Äußere Abmessung des Zellteppichs	9 mm x 9 mm

Migration in der Petrischale

Die verwendeten Petrischalen wiesen einen Durchmesser von 3,5 cm auf. Es wurde pro Schale beim Passagieren 2500 μ L unverdünnte Zellsuspension eingefüllt, die Schälchen zur gleichmäßigen Verteilung der Zellen anschließend vorsichtig umgeschwenkt und wiederum vor der Behandlung über Nacht im Brutschrank gelagert.

Nach erfolgter Stoßwellenapplikation konnte manuell ein Zellspalt erzeugt werden. Dazu wurden unter dem Laminar Air Flow mit einer sterilen 200 μ L Eppendorf Pipettenspitze Zellen kreuzförmig weggeschabt. Der resultierende Spalt konnte durch die Haltung der Pipettenspitze und die Geschwindigkeit beim Schaben stärker variieren, als der definierte Spalt der *ibidi* μ -Dishes. Um die bei der Erzeugung der künstlichen Wunde abgelösten Zellen zu entfernen, wurden diese im Anschluss einmal mit PBS gewaschen. Dann konnte mit 2500 μ L Medium überschichtet und die Schalen im Brutschrank gelagert werden.

Tabelle 3.5 Abmessungen der Petrischale

Geometrische Abmessungen	
Wachstumsfläche	9,62 cm ²
Füllvolumen	2500 μ L
Zellfreier Spalt	ca. 1000 μ m \pm 200 μ m
Äußere Abmessung des Zellteppichs	3,5 cm x 3,5 cm

Positiv-Kontrolle mit Platelet-derived growth factor (PDGF)

Es wurde eine Positiv-Kontrolle mit migrationsförderndem PDGF durchgeführt. Dazu wurde rekombinantes humanes PDGF der Untereinheit BB bezogen, welches in bidestilliertem Wasser gelöst, verdünnt und in Aliquots der Konzentration 200 ng/mL bei -20°C gelagert wurden. Vor der Anwendung wurde mit Medium auf eine finale Konzentration von 2 ng/mL verdünnt. Das PDGF-haltige Medium wurde nach dem Spülen mit PBS zu den Zellen gegeben.

Bilddokumentation

Direkt nach der Präparation der Kulturschalen, sowie nach 6, 12, und 24 Stunden wurden Fotoaufnahmen der Wundflächen gemacht. Dabei wurden die Zellen über eine Heizplatte, auf der sie während des Fotografierens standen, warm gehalten. Zur Fotodokumentation wurde ein Inversmikroskop mit aufgesetzter CCD Kamera verwendet. Bei einer vierfachen Vergrößerung konnte die künstliche Wunde vollständig erfasst und gut ausgewertet werden. Auf konstante Ausrichtung und Position der Schalen bei den einzelnen Zeiten wurde geachtet. Zwischen den Aufnahmen der Fotos befanden sich die Zellen im Brutschrank.

3.2.4 Entwicklung und Optimierung der Zellquantifizierung

Für die Zellquantifizierung wurden drei Methoden verwendet, die die gesamte Zellzahl einer Kulturflasche erfassen konnten. Dies war die Zellzählung mit dem Casy Counter sowie die Quantifizierung der Farbe nach MTT/XTT-Assay und BCA Protein Assay. Bei der Beobachtung der Zellen über einen Zeitraum von 7 Tagen musste einmal passagiert werden. In der Auswertung sind die Werte unter Rücksicht auf die Verdünnung auf alle behandelten Zellen bezogen.

Casy Counter

Um die Zellen mit dem Casy Counter zählen zu können, muss eine Zellsuspension vorliegen. Dazu wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, trypsiniert, jedoch nach Zugabe des Trypsins für 10 Minuten im Brutschrank gelagert. Eine vollständige Ablösung wurde unter dem Mikroskop beobachtet und die Reaktion mit TNS gestoppt. Aus der Zellsuspension konnte nach

mehrmaligem Vermischen durch auf- und abpipettieren 200 µL entnommen werden. Dieses wurde mit CASYton Lösung zu 10,0 mL aufgefüllt und zur Vermessung unter die Saugkapillare des Casy Counters gegeben. Von jeder Probe erfolgte jeweils eine Doppelbestimmung, wobei das Ergebnis einer Messung von dem Gerät aus drei Einzelmessungen gemittelt angegeben wurde. Vor jeder Messreihe wurde eine Hintergrundmessung durchgeführt. Außerdem musste zwischen den einzelnen Messungen das System durch dreifaches Spülen gereinigt werden.

Tabelle 3.6 Einstellungen am Casy Counter

Parameter	Einstellung
Kapillare	150 µm
Verdünnungsfaktor	50
Messbereich	9,9 µm – 39,9 µm
Messvolumen	400 µl
Wiederholungen	3

Als Ergebnis wurde die Anzahl der Zellen in den unverdünnten, eingesetzten 200 µL angegeben. Über das Gesamtvolumen der eingesetzten Trypsin- und TNS-Menge konnte ein Rückschluss auf die Zellzahl der gesamten Flasche gezogen werden.

Entwicklung der MTT und XTT-Färbung

Da mit einem MTT Cell-Proliferation Assay Kit keine ausreichende Lyse der Zellwand möglich war, wurden verschiedene Reagenzien getestet um das Assay eigenständig zu entwickeln. Dabei musste beachtet werden, dass Phenolrot, welches zur pH-Wert Kontrolle im Medium ist, einen störenden Einfluss auf die Farbmessung ausübt. Es musste daher vor dem Aufschluss der Zellen entfernt und mit PBS gespült werden.

MTT wurde in einer Konzentration von 10 mg/mL in PBS gelöst. Ein Anteil von 10% des auf den Zellen befindlichen Mediums wurde gegen die MTT Lösung ausgetauscht und die Zellen inkubiert. Der Prozess der Formazanbildung wurde in regelmäßigen Zeitabständen unter dem Mikroskop beobachtet. Nach einer

Stunde waren bereits ausreichend Farbnadeln in den Zellen sichtbar, so dass die Farblösung entfernt werden konnte. Es wurde einmal mit PBS gespült bevor die Solubilisation erfolgte.

Verschiedene Detergentien wurden erprobt. Da eine vollständige Lösung lediglich mit DMSO erfolgte, wurde dies im weiteren Verlauf der Experimente eingesetzt. Dabei wurde eine Flüssigkeitsmenge von 50 μL pro cm^2 Kulturfläche verwendet. Jeweils 200 μL der Proben wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert und bei einer Wellenlänge von 530 nm vermessen. Dies konnte durch die Aufnahme eines Spektrums als Absorptionsmaximum ermittelt werden.

Gleichzeitig wurde eine weitere Alternative mit dem Farbstoff 2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid Natriumsalz (XTT) getestet. XTT verhält sich wie MTT, bildet jedoch einen löslichen, rötlichen Farbstoff der in das Medium sezerniert wird, wodurch der Lyse-Schritt entfällt.

Da ein Phenolrotfreies Medium zum Einsatz kommen musste, welches als Fibroblast Growth Medium nicht erhältlich war, wurde das Medium RPMI 1640 gewählt. Die Zellen wurden nur während der Inkubation mit XTT mit RPMI 1640 versetzt. XTT wurde täglich frisch in einer Konzentration von 1 mg/mL direkt im Medium, unter erwärmen auf 60°C, gelöst. Um die Farbgebung zu verstärken war ein Elektronen-Kopplungsreagenz, das Phenazinmethosulfat (PMS) nötig. Kurz vor der Anwendung wurden 1 mL einer 100 mM Lösung von PMS zu 99 mL XTT-Lösung gegeben. Diese Mischung ersetzte ein Viertel des Mediums. Die Inkubationsdauer betrug 3 Stunden. Anschließend wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm die Absorption von 200 μL Medium aus einer 96-Well-Platte vermessen. Für beide Methoden wurde eine Linearitätsbestimmung durchgeführt.

BCA Protein Assay

Da auch hier eine Störung durch das Phenolrot, aber auch durch die Trypsinlösung des Assays gegeben war, wurde das experimentelle Protokoll des Herstellers verändert und das Assay wie folgt durchgeführt:

Die Zellen wurden aus den verwendeten t-12,5 Zellkulturflaschen wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben abgelöst. Eine Abtrennung des Mediums erfolgte durch Zentrifugation. Die Zellsuspension wurde dazu in ein 2 mL Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und 3 Minuten bei 220 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, 1,0 mL PBS hinzugegeben und kurz auf dem Vortexer vermischt. Dies diente zum Waschen der Zellen. Dann wurde erneut 3 Minuten bei 220 x g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das erhaltene Zellpellet wurde in 100 µL PBS aufgenommen und suspendiert. 25 µL der Suspension wurden in eine 96-Well-Platte überführt. Dazu wurden 200 µL Worksolution, welche durch Mischen von 50 Teilen Lösungen A und 1 Teil Lösung B des Kits hergestellt wurde, pipettiert. Lösung A, welche mit Natronlauge auf einen pH-Wert von 11,25 eingestellt ist, enthält Bicinchoninsäure, Natriumtartrat, Natriumbicarbonat, sowie Natriumcarbonat. In Lösung B ist Kupfersulfat enthalten. Auf dem Rüttler wurde für 1 Minute gemischt und anschließend für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Absorption konnte dann bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt werden.

Zur quantitativen Messung des Proteins wurde eine Standardkurve des im Kit enthaltenen bovinen Serumalbumins im Konzentrationsbereich 0-2000 µg/mL durchgeführt.

3.2.5 Genexpressionsanalyse

Vor Beginn der Arbeiten mit RNA wurden alle Oberflächen mit RNase-Zap gereinigt um anhaftende RNasen zu entfernen. Für sämtliche Pipettierschritte wurden Filterspitzen verwendet und die Proben auf Eis gehalten. Bei einer Pause zwischen den einzelnen aufgeführten Abschnitten wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Zellgewinnung

Die Zellen für die Genexpressionsanalyse wurden zunächst mit Stoßwellen behandelt und über einen definierten Zeitraum kultiviert. Bei einer Kultivierung die über 6 Tage hinausging, musste einmal passagiert werden. Anderweitig könnte das Ergebnis durch übermäßige Konfluenz der Zellen beeinflusst

werden. Für die Zellgewinnung wurden diese wie bei einem Passage-Schritt durch Trypsinieren abgelöst, die Reaktion mit TNS gestoppt und das Zellpellet durch Zentrifugation bei 220 x g gewonnen. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet in 1,0 mL PBS suspendiert und in ein 1,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Suspension wurde erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand sehr vorsichtig mit der Pipette entfernt. Das Zellpellet wurde kurz in flüssigem Stickstoff eingefroren, um anschließend längerfristig bei -80°C gelagert zu werden. Für jeden Analysezeitpunkt wurde eine unbehandelte Kontrolle zum Vergleich mitgeführt.

RNA Isolation

Der Zellaufschluss erfolgte mit Hilfe der QIAshredder Zentrifugenröhrchen, die folgende Isolation der mRNA mit RNeasy Zentrifugenröhrchen. Neben den Röhrchen sind in dem verwendeten RNeasy Mini Kit die in Tabelle 3.7 aufgeführten Lösungen verwendet worden.

Tabelle 3.7 Verwendete Lösungen aus dem RNeasy Mini Kit

Lösungen	Wirksamer Inhalt	Verwendung
RLT	Guanidin Thiocyanat	Zelllyse
RW1	Ethanol	Waschpuffer
RPE	Wässriger Puffer	Waschpuffer

RLT wurde mit RNase hemmenden β -Mercaptoethanol versetzt, so dass eine Endkonzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ β -Mercaptoethanol erhalten wurde. Die Zellen wurden mit 350 μL dieser Mischung versetzt und die Suspension in ein QIAshredder Röhrchen überführt. Es wurde 2 Minuten bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Zellsuspension durchfloss das Röhrchen und wurde in einem Sammelgefäß aufgefangen. Die erhaltene Lösung der aufgespaltenen und homogenisierten Zellen wurde mit 350 μL 70%igem Ethanol versetzt und auf die RNeasy Röhrchen gegeben. Es folgten mehrere Waschschriffe mit den Puffern RW1 und RPE, welche durch Zentrifugation das Röhrchen passierten, in einem Sammelgefäß aufgefangen und im Anschluss jeden Schrittes verworfen wurden.

Zentrifugenschritte:	Zelllösung und Ethanol:	15 sec bei 10000 rpm
	+ 700 μ L RW1:	15 sec bei 10000 rpm
	+ 500 μ L RPE:	15 sec bei 10000 rpm
	+ 500 μ L RPE:	2 min bei 10000 rpm

Die RNeasy Röhrcchen wurden in ein neues Sammelgefäß gesteckt und 1 Minute bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Erneut wurde das Sammelgefäß getauscht, 50 μ L RNase freies Wasser in das Röhrcchen gegeben, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 1 Minute bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Die RNA befand sich im erhaltenen Eluat.

Reinheit und Gehalt der RNA

Für die weiteren Schritte musste die RNA der einzelnen Proben auf eine identische Konzentration eingestellt werden. Daher wurde eine photometrische Quantifizierung durchgeführt. 6 μ L RNA Lösung wurden mit 54 μ L RNase freiem Wasser verdünnt, in eine Küvette überführt und die Absorption bei 260 nm bestimmt. Unter Kenntnis, dass ein RNA-Gehalt von 40 μ g/mL einer Absorption von 1 entspricht, wurde der Gehalt der einzelnen Proben berechnet. Des Weiteren wurde die Reinheit der Lösungen durch Messungen bei 230 nm, 270 nm und 320 nm bestimmt.

Alle RNA Proben wurden, orientiert an der Probe der geringsten Konzentration, mit RNase freiem Wasser auf denselben Gehalt verdünnt. Dieser musste für die cDNA Synthese innerhalb der Spanne von 0,1-1,0 μ g RNA in 13,2 μ L liegen.

Reverse Transkription in cDNA

Die mRNA wurde mit Hilfe des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits in cDNA umgeschrieben. Pro Probe wurden die im Kit enthaltenen Komponenten, wie in Tabelle 3.8 angegeben, in einem 0,2 mL PCR Eppendorf Reaktionsgefäß vereint.

Die Reaktionsgefäße wurden im Thermocycler zunächst für 10 Minuten auf 25°C, dann für 120 Minuten bei 37°C gehalten und abschließend für 5 Sekunden auf 85°C erhitzt. Währenddessen erfolgten die Aktivierung der reversen Transkriptase, die cDNA Synthese, sowie ein inaktivierender Schritt am Ende der Transkription.

Tabelle 3.8 Pipettierschema der cDNA Synthese

Menge	Komponente
2 µL	10x RT Buffer
0,8 µL	25x Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP's)
2 µL	Random Primer
2 µL	MultiScribe Reverse Transcriptase
13,2 µL	RNA mit eingestelltem Gehalt (0,1-1,0 µg)

Test der cDNA mit GAPDH-PCR und Gelelektrophorese

Der Erfolg der reversen Transkription wurde überprüft, indem mittels PCR Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) nachgewiesen wurde. Dazu wurde der HotStarTaq Master Mix verwendet, in dem bereits die benötigten Inhaltsstoffe DNA Polymerase, dNTP's und PCR Puffer, enthalten waren.

Tabelle 3.9 Pipettierschema der GAPDH-PCR

Menge	Komponente
1 µL	Primer: GAPDH-sense (10 µM)
1 µL	Primer: GAPDH-antisense (10 µM)
15 µL	HotStarTaq Master Mix
12 µL	RNAse freies Wasser
1 µL	cDNA

In 0,2 mL PCR Reaktionsgefäßen wurden die Komponenten für die PCR vermischt und pro Gefäß die cDNA einer Probe hinzugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden in den Thermocycler überführt, wo die PCR-Zyklen, den in Tabelle 3.10 angegebenen Bedingungen folgend, abliefen.

Tabelle 3.10 Bedingungen der GAPDH-PCR

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min:sec]	Zyklen
Aktivierung	95	2:00	
Denaturierung	95	0:30	} 32
Anlagerung	55	0:30	
Elongation	72	0:30	
Finale Elongation	72	2:00	

Zur Überprüfung, ob in allen Proben GAPDH und damit cDNA vorhanden war, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Für das Gel wurde 2 g Agarose in 200 mL TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBA) unter Erhitzen gelöst, 20 µl Ethidiumbromid der Konzentration 10 mg/mL hinzugegeben und ein Gel daraus gegossen. Nach dem Aushärten wurde jede Tasche mit 20 µL der PCR Probe, sowie zwei Taschen mit 6 µL einer Mischung aus 4 µL Wasser, 1 µL Blue Loading Dye und 1 µL 100 bp DNA-Leiter befüllt. Zuvor wurde jede PCR Probe von 30 µL mit 6 µL Blue Loading Dye versetzt. Bei einer Spannung von 60 V erfolgte über den Zeitraum von einer Stunde die Trennung. Unter UV-Licht wurde das Gel im Anschluss betrachtet und fotografiert. Bei jeder Probe sollte eine Bande für GAPDH mit vergleichbarer Intensität vorhanden sein. Dadurch kann eine ähnliche Ausgangskonzentration an cDNA in jeder Probe angenommen werden.

Quantitative RT-PCR

Die mRNA Expression wurde mit einem für das Zielgen spezifischen TaqMan-Primer quantitativ erfasst. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Zunächst wurde die verbleibende cDNA mit Wasser 1:10 verdünnt. In einem TaqMan Array Plate wurden TaqMan Universal PCR MasterMix, cDNA und einer der TaqMan Primer, wie aus Tabelle 3.11 ersichtlich, zusammen gegeben.

Tabelle 3.11 Pipettierschema qRT-PCR

Menge	Komponente
1 µL	TaqMan Primer sense und antisense
10 µL	TaqMan Universal PCR MasterMix
9 µL	Verdünnte cDNA

Dabei wurden verschiedene TaqMan Primer gegen die in Tabelle 3.12 genannten Genabschnitte eingesetzt.

Tabelle 3.12 Liste der verwendeten TaqMan Primer

Gen Symbol	Gen Name und Abschnitt
COL1A2	Kollagen, Typ I, Untereinheit alpha 2
COL3A1	Kollagen, Typ III, Untereinheit alpha 1
ELN	Elastin
FN1	Fibronektin 1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
HAS2	Hyaluronsäuresynthase 2

Für jede Probe wurden somit 12 PCR-Läufe durchgeführt, was sich aus der Anzahl von sechs Primern und der jeweiligen Durchführung von Doppelbestimmungen ergab. GAPDH wurde dabei als Housekeeping-Gen eingesetzt. Die Proben konnten auf dieses Gen normiert werden, da die Expression von GAPDH einen konstanten, von Stoßwellen unabhängigen, Level hat. Für die Auswertung wurde die $\Delta\Delta C_T$ -Methode verwendet, bei der nach Bezug auf tatsächlich vorhandene Menge RNA und Normierung auf GAPDH die n-fache Expression des zu bestimmenden Gens im Verhältnis zu den bei der Kontrolle ermittelten Werten berechnet wurde. Die PCR lief unter den in Tabelle 3.13 aufgeführten Bedingungen.

Tabelle 3.13 Bedingungen der qRT-PCR

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min:sec]	Zyklen
Denaturierung	95	0:20	} 40
Denaturierung	95	0:01	
Elongation	60	0:20	

3.2.6 Sekretionsanalyse

Das Medium für die Analysen der Sekretion wurde, von den für die Genexpressionsanalyse kultivierten Zellen beim Mediumswechsel, zurückbehalten und bis zur Durchführung der Assays bei -80°C gelagert.

Kollagen Assay

Für die Analyse des in das Medium abgegebenen Kollagens wurde das Sircol Collagen Assay Kit verwendet. Mit dessen Hilfe konnte es isoliert, angefärbt und quantifiziert werden. Zunächst wurde das Kollagen aus dem Medium isoliert, da Phenolrot das Assay stören kann. Dazu wurden 1 mL Medium und 200 µL kaltes Isolation & Concentration Reagent in ein *Protein LoBind Tube*, ein Eppendorfgefäß mit reduzierter Proteinbindung, gegeben. Nach guter Vermischung wurden die Reaktionsgefäße über Nacht in einem Ständer, der in einem Eis/Wasser-Gemisch stand, bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Am Folgetag wurden die Gefäße nur vorsichtig bewegt. Sie wurden bei 12000 rpm ohne Bremsverzögerung zentrifugiert. Anschließend wurden vorsichtig 1000 µL Flüssigkeit mit einer Pipette abgenommen. Die verbleibende Flüssigkeit wurde mit einem Wattestäbchen entfernt. Das Kollagen befand sich nun als labiles Präzipitat im Reaktionsgefäß.

Als Referenz wurden Standards der Konzentrationen 0-50 µg/mL aus Rinderhaut Kollagen hergestellt. Zu den Standards und den vorbereiteten Proben wurde 1000 µL Dye Reagent gegeben. Die Gefäße wurden für 30 Minuten in einen Thermomixer gegeben, anschließend bei 12000 rpm 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Nach Zugabe 750 µL kalten Acid-Salt Wash Reagents wurde erneut 10 Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgegossen und mit Wattestäbchen die gesamte Flüssigkeit entfernt. Das Kollagen wurde in 250 µL Alkali Reagent durch kräftiges Schütteln gelöst. 200 µL jeder Probe wurden in eine 96-Well-Platte gegeben und bei 530 nm die Absorption bestimmt.

Tabelle 3.14 Im Sircol Kollagen Assay enthaltene Lösungen

Lösung	Wirksamer Inhalt	Verwendung
Isolation & Concentration Reagent	Polyethylenglykol, TRIS-HCl Puffer	Fällung des Kollagens aus dem Medium
Dye Reagent	Siriusrot in Pikrinsäure	Anfärbung des Kollagenpellets
Acid-Salt Wash Reagent	Essigsäure	Reinigung des Kollagenpellets
Alkali Reagent	NaOH	Lösung des Kollagenpellets

Elastin Assay

Für die Analyse des Elastins wurde das Fastin Elastin Assay Kit verwendet, welches ähnlich zu der beim Kollagen beschriebenen Methode, funktioniert. Ein Isolationsschritt ist hier nicht nötig. Standards im Konzentrationsbereich 0-50 µg/mL wurden aus α-Elastin, welches aus Rindernackten Ligament gewonnen wurde, hergestellt und analog zu den Proben behandelt. 100 µL Medium oder Standard wurden mit 100 µL kaltem Precipitating Reagent in einem Eppendorf Reaktionsgefäß vermischt und 10 Minuten ruhen lassen. Die Reaktionsgefäße wurden bei 10000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die Restflüssigkeit mit Wattestäbchen entfernt. In jedes Gefäß wurde 1000 µL Dye Reagent gegeben und bis zur Lösung des Elastinpellets bei hoher Geschwindigkeit auf dem Vortexer gemischt. Im Anschluss wurden die Proben weitere 90 Minuten geschüttelt. Es wurde erneut 10 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert und sowohl Überstand als auch Restflüssigkeit entfernt. 250 µL Dye Dissociation Reagent wurde hinzugegeben, mit dem Vortexer das gefärbte Elastin gelöst und 200 µL in eine 96-Well-Platte überführt. Bei 513 nm wurde die Absorption gemessen.

Tabelle 3.15 Im Fastin Elastin enthaltene Lösungen

Lösung	Wirksamer Inhalt	Verwendung
Precipitating Reagent	Trichloressigsäure, HCl	Fällung des Elastins
Fastin Dye Reagent	5,10,15,20-Tetraphenyl-21H,23H-porphin-tetra-sulfonat (TPPS)	Anfärbung des Elastinpellets
Dye Dissociation Reagent	Guanidin-HCl, Propanol	Lösung des Elastinpellets

Hyaluronan Assay

Die sezernierte Hyaluronsäure wurde mit einem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt. Dazu wurde das DuoSet ELISA Hyaluronan verwendet, in dem ein Teil der verwendeten Reagenzien enthalten war (Tabelle 3.16).

Zur Vorbereitung der eingesetzten 96-Well-Platte wurde diese mit 100 µL Capture Reagent pro Well befüllt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Alle Inkubationsschritte des Assays fanden bei Raumtemperatur statt. Am nächsten Tag wurde ein Waschschrift durchgeführt, der bei diesem ELISA immer mit dreimaligem Waschen jeden Wells mit 400 µL Wash Buffer durchgeführt wurde. Die Flüssigkeit wurde dabei nach jedem Waschschrift durch Absaugen komplett entfernt. In jedes Well wurde 300 µL Block Buffer gegeben und eine Stunde inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift war die Platte für den Assay präpariert.

Aus einem mitgelieferten Hyaluronsäure-Standard wurden Verdünnungen im Bereich von 0-90 ng/mL hergestellt. 100 µL Standard oder Probe wurde in jedes Well eingefüllt, wobei jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde. Die Platte wurde mit Klebefolie versiegelt, 2 Stunden inkubiert, gewaschen und 100 µL Detection Reagent in jede Vertiefung gegeben. Wiederum musste 2 Stunden inkubiert und gewaschen werden. Anschließend wurde 100 µL Streptavidin-horseradish-peroxidase (Streptavidin-HRP) hinzu pipettiert, 20 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert und gewaschen. Im letzten Schritt wurde 100 µL Substrate Solution in jedes Well gegeben, nochmals 20 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert und schließlich 50 µL Stop Solution hinzu gegeben. Diese wurde durch leichtes Bewegen der Platte gut mit dem Inhalt vermischt. Unmittelbar im Anschluss wurde die Absorption bei 450 nm gemessen.

Tabelle 3.16 Im Hyaluronan ELISA verwendete Lösungen. Die Im DuoSet ELISA Hyaluronan mitgelieferten Lösungen sind mit einem * markiert.

Lösung	Wirksamer Inhalt	Verwendung
Capture Reagent*	Aggrecan	Bindung der Hyaluronsäure an die Platte
Wash Buffer	Tween 20	Detergenz
Block Buffer	NaN ₃ , Tween 20	Abtötung von Keimen
Detection Reagent*	Biotingekoppeltes Aggrecan	Bindung an die Hyaluronsäure
Streptavidin-HRP*	Streptavidin-HRP	Bindung an gebildeten Komplex, Peroxidase Aktivität
Substrate Solution	Tetramethylbenzidin, H ₂ O ₂	Substrat für die Streptavidin-HRP
Stop Solution	H ₂ SO ₄	Stoppen der Enzymreaktion, Bildung eines stabilen Komplexes

3.3 Methoden der Hyaluronsäureanalytik

In der in Kapitel 3.4 beschriebenen Studie wurde eine Hyaluronsäurelösung neben der Stoßwellenbehandlung verwendet. Um sicher zu stellen, dass durch die Stoßwellen kein zerstörender, abbauender Einfluss auf die Hyaluronsäure wirkt und eine reine Hyaluronsäurelösung vorliegt, wurde diese behandelt und analysiert. In den folgenden Abschnitten wurde für die Herstellung von Hyaluronsäurelösungen ausschließlich Natriumhyaluronat verwendet.

3.3.1 Behandlung der Hyaluronsäure mit Stoßwellen

Es wurden Hyaluronsäurelösungen hergestellt, die dem Puffer des in der Studie verwendeten Viscontour Serums[®] von Sanofi Aventis möglichst nahe kommen sollten. Dies wurde durch einen isotonen Phosphat-Puffer pH 7,0 gewährleistet (Kapitel 3.1.4). Entsprechend der in den Analysen benötigten Konzentrationen wurde darin Natriumhyaluronat der Molekülgröße 1200 kDa, welches von Sanofi Aventis zur Verfügung gestellt wurde, gelöst.

Um die Hyaluronsäure zu behandeln wurden zwei Methoden verwendet, die zum einen eine angenommene Reflektion der Stoßwelle am Knochen und zum anderen einen Verlauf ohne Interferenzen simulieren sollten, um die nicht einschätzbaren Einflüsse der Behandlung zu berücksichtigen. Die Reflektion wurde durch eine Metallplatte, auf die die Hyaluronsäurelösung aufgetragen wurde, simuliert. Durch die Verwendung von Parafilm über einem Wasserreservoir konnte hingegen das Auslaufen der Wellen gewährleistet werden (Abbildung 3.3).

5 mL Hyaluronsäurelösung wurde auf den Parafilm oder die Metallplatte aufgetragen, die Stoßwellenquelle direkt auf die Lösung gesetzt und die Behandlung gestartet. Verschiedene Behandlungsparameter und Applikatoren wurden getestet. Dabei wurden die in der Studie gewählten Einstellungen, sowie ein Belastungstest mit hoher Energieflussdichte, bestimmt durch die Intensität und Stoßzahl, gewählt.

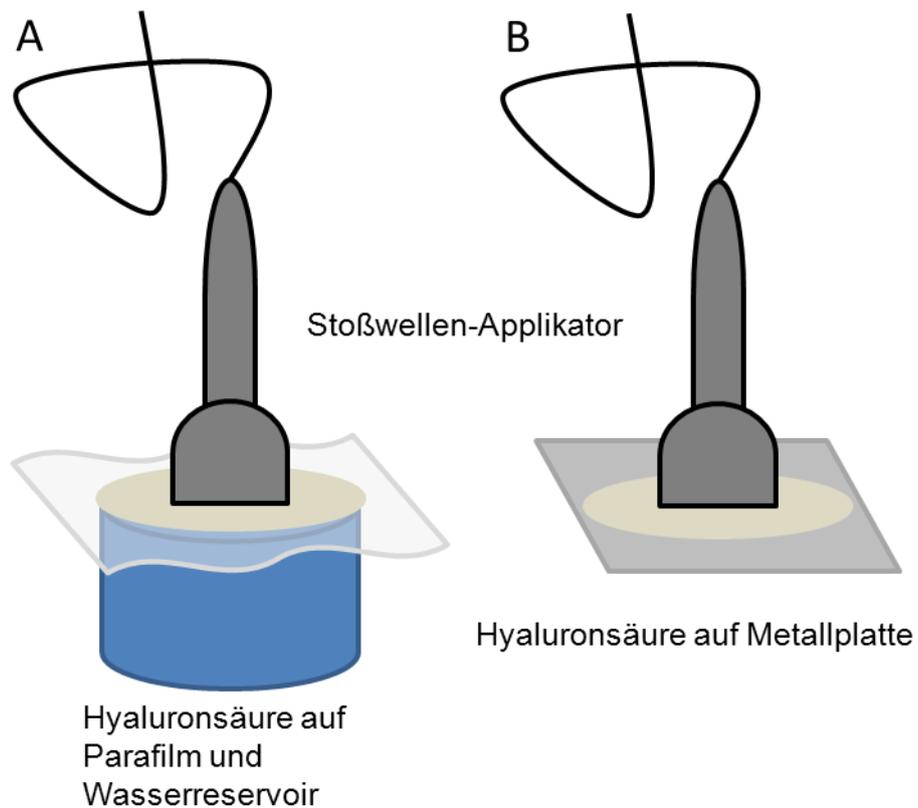


Abbildung 3.3 Versuchsanordnung für die Behandlung der Hyaluronsäure. A) Das Auslaufen der Stoßwelle in einem Wasserreservoir wird ermöglicht. B) An der Metallplatte erfolgt Totalreflektion.

In Tabelle 3.17 sind die gewählten Einstellungen aufgelistet. Nach der Behandlung wurden die Proben bis zu weiteren Analysen im Kühlschrank gelagert, um mikrobielles Wachstum zu verhindern.

Tabelle 3.17 Parameter für die Stoßwellenbehandlung der Hyaluronsäure

Applikator	Anzahl der Impulse	Energiestufe
FP4	1000	10
FP4	1000	20
FP4	2500	10
FP4	2500	20
F7G3	1000	10
F7G3	1000	20
F7G3	2500	10
F7G3	2500	20

3.3.2 Analytik mit der Kapillarelektrophorese

Für die Quantifizierung der Hyaluronsäure wurde eine Methode verwendet, die aus den Kenngrößen der von Kinoshita et al. [118], sowie Alkrad et al. [119] publizierten Verfahren entwickelt wurde. Durch ständige Validierung während der Entwicklung konnte die Methode optimiert und der Nachweis ihrer Eignung erbracht werden.

Validierung der Kapillarelektrophorese

Es wurde eine Validierung vorgenommen, bei der die Parameter Linearität, Präzision und Richtigkeit ermittelt wurden.

Für die Bestimmung der Präzision wurde zwischen Vergleichspräzision und Messpräzision unterschieden. Zunächst wurden sechs Proben des Konzentrationsniveaus 200 µg/mL durch Lösen des Natriumhyaluronats im Phosphat-Puffer pH 7,0 unabhängig voneinander hergestellt. Diese Proben wurden einzeln vermessen, wobei die Vergleichspräzision ermittelt werden konnte. Eine der hergestellten Proben wurde im Anschluss sechsmal vermessen, wodurch die Messpräzision bestimmt wurde.

Für die Linearitätsbestimmung wurden Proben in einem Konzentrationsbereich von 100 µg/mL bis 500 µg/mL hergestellt, diese jeweils dreifach analysiert und aus den Mittelwerten eine lineare Regression erstellt.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Dintest, womit die gemessenen Flächeneinheiten verglichen und die Regressionsgleichungen ermittelt wurden. Auf Veränderung der Migrationszeiten wurde bereits während der Methodenentwicklung geprüft, da eine ungeeignete Methode zu Ablagerung der Hyaluronsäure an der Kapillarwand und Verschiebung der Retentionszeiten führen kann. Die Migrationszeiten wurden mit dem Schnelltest nach David auf Normalverteilung geprüft und die Methode erst nach Bestehen der Prüfung weiter validiert.

Durchführung der Analysen

Zunächst wurde ein 40 mM Phosphat-Puffer pH 7,4 für die Elektrophorese hergestellt (Kapitel 3.1.4). Dieser wurde mit Hilfe von Ultraschall entgast, steril

gefiltert und in das Replenishment System eingefüllt. Die zu analysierenden Proben wurden mit Phosphat-Puffer pH 7,0 (Kapitel 3.1.4), der ebenfalls entgast und steril gefiltert wurde, von der Konzentration 5 mg/mL auf 400 µg/mL verdünnt. Eine Entgasung der Probelösungen war wegen des Abbaus der Hyaluronsäure durch Ultraschall nicht möglich [113]. Alle Proben wurden in Vials gefüllt. Außerdem wurde ein Vial mit 1 N NaOH vorbereitet.

Es wurde eine Quarzglas Kapillare mit einem inneren Durchmesser von 50 µm und einer Bubble Cell von 150 µm am Detektorfenster verwendet. Der Abstand zwischen Detektorfenster und Kapillarende betrug 8,5 cm. Die in der verwendeten Methode eingestellten elektrophoretischen Bedingungen sind in Tabelle 3.18 zusammengestellt. Von jeder Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Tabelle 3.18 Elektrophoretische Parameter zur Analyse von Hyaluronsäure.

Kapillare	48,5 cm
Kassettentemperatur	20,0°C
Puffer	40 mM Phosphat-Puffer pH 7,4
Replenishment	Nach jedem Lauf
Präkonditionierung	1. 1 N NaOH für 1 min 2. 40 mM Phosphat-Puffer pH 7,4 für 3 min
Polarität	Positiv
Injektion	Hydrodynamisch: 50 mbar für 10 sec
Spannung	30 kV
Detektor	Photometer
Detektionswellenlänge	Analyse: 200 nm; Referenz: 220 nm und 260 nm
Laufzeit	15,0 min

3.3.3 Analytik durch Rheologie

Zunächst wurde von den zur Verfügung stehenden Hyaluronsäurequalitäten der Molmasse 1200 kDa und 300 kDa Lösungen im Konzentrationsbereich von 500 µg/mL bis 5000 µg/mL in Phosphat-Puffer pH 7,0 (Kapitel 3.1.4) hergestellt.

Für die Analytik wurde ein Kegel-Platte-Rheometer verwendet. Es wurde bei einem zentralen Abstand von 105 μm zwischen Kegel und Platte, einem resultierenden Winkel von 2° und einer Temperierung bei 21°C gearbeitet. Der Kegel besaß einen Durchmesser von 35 mm.

Für jede Messung wurde 500 μL Lösung der Probe auf die Mitte der Platte des Rheometers aufgebracht und der Kegel abgesenkt. Der Spalt zwischen Platte und Kegel musste komplett mit Lösung ausgefüllt sein. Übertretende Lösung wurde vorsichtig entfernt. Es wurde mit einer Scherrate von 5 sec^{-1} für 3 Minuten vorgeschert, um eine gleichmäßige Scherung nach Absenken des Kegels in der Probe zu erzeugen. Anschließend wurde 10 Minuten gewartet, damit sich die Temperatur einstellen konnte. Außerdem wurde dadurch der viskositätsmindernde Einfluss des Pipettierens und Vorscherens reduziert. Anschließend konnte die Messung gestartet werden.

Zunächst wurden Vormessungen gemacht, bei denen der Bereich der Scherraten von $0,01 \text{ sec}^{-1}$ bis 1000 sec^{-1} durch 25 Messpunkte abgetastet wurde. Da erst ein scherbedingt starker Abfall und später eine Annäherung der Viskosität auf stabile Werte bei höheren Scherraten beobachtet werden konnte, mussten weitere Messungen bei einer konstanten Scherrate erfolgen. Für die analytischen Bestimmungen wurden vier Messpunkte ausgewählt bei denen alle Proben untersucht wurden. Es wurde aufsteigend bei den Schergeschwindigkeiten 1 sec^{-1} , 10 sec^{-1} , 100 sec^{-1} und 1000 sec^{-1} jeweils 50 Sekunden lang die Viskosität gemessen. Während dieser Zeit wurden auf jeder Stufe 20 Messwerte erzeugt, deren Mittelwert für die Auswertung verwendet wurde. Es wurden außerdem Blindwerte mit unbehandelter Lösung, sowie eine Vermessung des reinen Puffers durchgeführt.

3.4 Methoden der Studie

Um die in-vitro gemessenen Effekte der Stoßwelle auf die gesunde, gealterte Haut messen zu können, wurde eine Studie, in der die Probanden mit Stoßwellen behandelt wurden, unter ärztlicher Aufsicht durchgeführt.

3.4.1 Aufbau der Studie

Die Studie wurde vierarmig aufgebaut, wobei jeder Arm aus drei Probanden gebildet wurde. Der erste Arm, welcher eine Kontrollgruppe bildete, wurde nicht behandelt, jedoch zur Erfassung der natürlichen biologischen Schwankungen und des jahreszeitlichen Einflusses vermessen. Eine weitere Gruppe erhielt das Produkt Viscontour Serum[®] der Firma Sanofi Aventis. Es handelt sich dabei um eine 0,5%ige Lösung von Natrium-Hyaluronat in Phosphat-Puffer. Diese musste über einen Zeitraum von 4 Wochen täglich morgens und abends nach der Hautreinigung auf dem gesamten Gesicht verteilt und einmassiert werden. Die dritte Gruppe erhielt über 4 Wochen gleichmäßig verteilt 10 Stoßwellenbehandlungen. Bei einer letzten Gruppe wurde die Behandlung mit der Anwendung von Hyaluronsäure kombiniert.

Die Studiendauer wurde auf 3 Monate festgesetzt. Zu Beginn der Studie erfolgte eine Nullmessung aller Probanden. Die Veränderung des Hautprofils der Teilnehmer wurde 4, 8 und 12 Wochen nach Studienstart vermessen. Während der gesamten Studie durften die Pflegeprodukte nicht gewechselt und keine kosmetischen Veränderungen oder Eingriffe durchgeführt werden. Außerdem wurden Probanden mit früheren Eingriffen, empfindlicher Haut, sowie Grunderkrankungen, die zur Einnahme von Zytostatika oder blutungsneigungsfördernden Arzneimitteln verpflichten, ausgeschlossen. Das Mindestalter für die Aufnahme in die Studie betrug 45 Jahre. Eine Verblindung war aufgrund der Geräuschbildung und des resultierenden Gefühls bei der Applikation der Stoßwelle nicht möglich.

3.4.2 Behandlung der Probanden mit Stoßwellen

Es wurden 6 Probanden mit Stoßwellen behandelt, wobei das Gerät PiezoWave verwendet wurde. Dabei wurden im Abstand von 2 bis 3 Tagen 10 Applikationen innerhalb von 4 Wochen durchgeführt. Die Behandlung erfolgte beidseitig periorbital und im mittleren Stirnbereich. Dadurch konnten die Fältchen um das Auge (Periorbitalregion), sowie die Zornesfalte (Glabellaregion) erfasst werden. Bei der Behandlung wurden zwei verschiedene Applikatoren eingesetzt, um diese vergleichen zu können. Zwischen Applikator und Haut wurde Ultraschallgel aufgetragen, womit die Ankopplung gewährleistet wurde. In Tabelle 3.19 sind die Behandlungsparameter jeder Sitzung aufgeführt.

Tabelle 3.19 Behandlungsparameter in der Studie

Region	Applikator	Energiestufe	Impulse
Glabellaregion	FP4	20	1000
Linke Periorbitalregion	FP4	20	1000
Rechte Periorbitalregion	F7G3	5	750

Die gewählten Parameter konnten durchgehend beibehalten werden, da alle Probanden diese gut vertrugen.

3.4.3 Vermessung der Haut mit PRIMOS

Für die Vermessung der Haut mit dem PRIMOS-System musste auf einige Faktoren geachtet werden, die zu starken Schwankungen der Messwerte führen können. Da die Temperatur und Luftfeuchtigkeit die Faltentiefe beeinflussen, wurden die Probanden in einem Raum möglichst stabiler Bedingungen vermessen. Ein klimatisierter Raum stand jedoch nicht zur Verfügung. Vor jeder Messung durfte keine Hautpflege und dekorative Kosmetik verwendet werden, da dies zu Reflektionen führen kann. Außerdem durfte in den 24 Stunden vor der Messung keine Maske aufgelegt, Sport gemacht oder die Sauna besucht werden. Dadurch könnte die Haut aufquellen, was die ermittelten Werte reduziert.

Für die Messungen wurde das Gesicht der Probanden durch ein Stativ stabil gehalten. Dazu wurde das Kinn auf die vorgesehene Stütze gelegt und die Stirn gegen eine Halterung gedrückt, welche im seitlichen Winkel verändert werden konnte, so dass die jeweils zu vermessende Region senkrecht in den Fokus des Messgerätes eingebracht wurde.



Abbildung 3.4 Kopfstativ mit einstellbaren Winkeln für die Messung mit dem PRIMOSlite. Quelle: GFMesstechnik 2011

Bei der Glabellaregion wurde mit einem Winkel von 0° gemessen. Für die Periorbitalregion lag der Messwinkel probandenabhängig zwischen 45° und 90° . Der verwendete Wert wurde notiert und bei allen Messungen konstant gehalten. Das PRIMOS Objektiv wurde in Position der zu vermessenden Region gebracht, die Schärfe kontrolliert und bei absoluter Raumdunkelheit in jedem Messvorgang eine Fünffachbestimmung mit einer Verzögerung von 300 msec durchgeführt. Mit Hilfe der Overlay Funktion der verwendeten Software wurde bei den Wiederholungsterminen der gleiche Messausschnitt angesteuert. Dabei wurde das zum Zeitpunkt t_0 erzeugte Bild im Hintergrund geöffnet, so dass anhand kleiner Hautmerkmale eine optimale Deckung mit dem aktuellen Bild erreicht werden konnte. Dieses war wichtig, um später die Veränderung der einzelnen Falte genau beobachten zu können.

Das Gelingen jeder Messung wurde nach der Aufnahme durch Ansicht des erstellten Höhenprofils kontrolliert. Stark verwackelte Bilder erscheinen streifig und können nicht ausgewertet werden. Sofern kein geeignetes Bild erzeugt wurde, musste die Messung wiederholt werden. Um gute Bilder zu erzeugen, wurden die Probanden gebeten während der Messung kurzzeitig nicht zu atmen.

3.4.4 Aufbereitung der Bilder für die Auswertung

Zunächst wurden alle Bilder einer Region eines Probanden gesichtet und der beste Winkel der Periorbitalmessungen anhand der Schärfe der Bilder und Lage der Falten bestimmt. Eine geringere Abweichung in der Makrostruktur lässt eine feinere Auswertung der Mikrostruktur zu. Aus dem ausgewählten Datensatz wurden wiederum leicht unscharfe Bilder eliminiert.

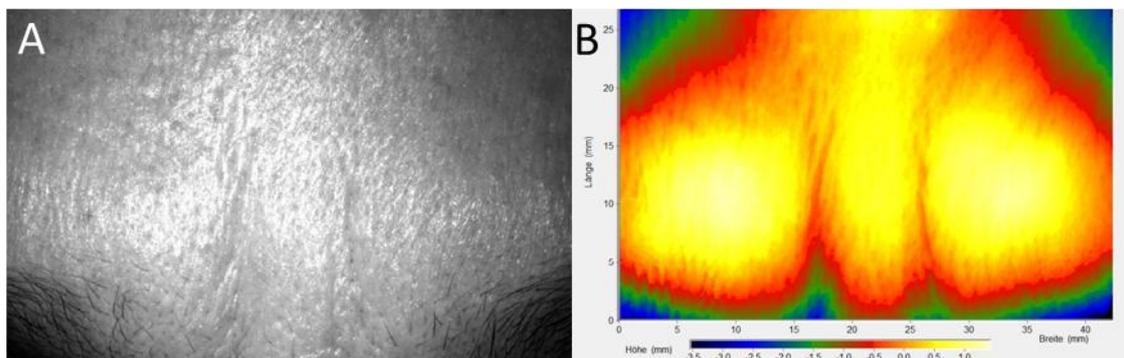


Abbildung 3.5 Messung der Stirnfalte. A) Einfaches erzeugtes Kamerabild. B) Durch das Streifenprojektionsverfahren erstelltes Höhenprofil.

Für die Auswertung der Falten mussten die gemessenen Hautausschnitte anschließend exakt übereinander gelegt werden. Dabei wurde die Position und die Neigung der Bilder der Zeitpunkte t_1 , t_2 , t_3 , dem zum Zeitpunkt t_0 erzeugten Bild angepasst. Dies konnte durch die Funktion "elastisches Matchen" der Software erreicht werden, wobei das zuerst erzeugte Bild als Referenz für alle weiteren Bilder gewählt wurde. Es wurde aus den Bildern ein größtmögliches Rechteck der Übereinstimmung ausgeschnitten, wodurch die errechneten Positions- und Neigungsabweichungen entfernt wurden. Die so erhaltenen Bilder mussten zu mindestens 60% dem ersterzeugten Bild entsprechen, um für

weitere Berechnungen verwendbar zu sein. Nach anschließender Anwendung des "robusten Hochpass-Filters" wurde die Mikrostruktur der Haut in einer Ebene dargestellt. Die durch die natürlichen Formen des Gesichts verursachte Makrostruktur wurde dabei herausgefiltert. Aus diesen Bilddaten konnten alle weiteren Auswertungen gemacht werden.

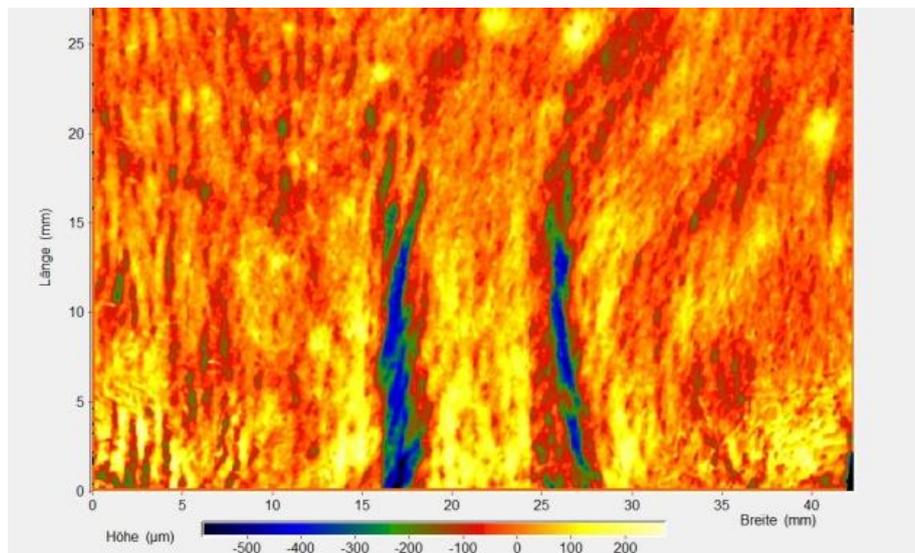


Abbildung 3.6 Darstellung der Mikrostruktur, die aus dem Höhenprofil durch Anwendung des robusten Hochpass-Filters errechnet wurde.

3.5 Statistik

Die Validierungsparameter für die Kapillarelektrophorese wurden mit dem Programm Dintest berechnet. Durchgeführte Tests sind in den Ergebnissen der Validierung aufgeführt. Die Erstellung der quadratischen Regressionen erfolgte mit dem Programm QtiPlot. Für alle weiteren Auswertungen wurde mit PASW/SPSS gearbeitet und die Daten folgendermaßen analysiert:

Die Daten wurden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung geprüft. Im Anschluss erfolgte ein Vergleich der Daten durch einen T-Test bei ungepaarten Stichproben, wobei durch einen Levene-Test auf Homogenität der Varianz geprüft wurde. Bei Vergleich von mehr als zwei Datensätzen wurde eine einfaktorielle Anova-Analyse durchgeführt. Signifikanz wurde bei Varianzgleichheit durch einen LSD post-hoc Test oder bei sich unterscheidenden Varianzen durch einen Tamhane-T2 post-hoc Test nachgewiesen. Alle Berechnungen wurden für ein Konfidenzintervall von 95% durchgeführt. Signifikanz wurde ab einem p -Wert $< 0,05$ angenommen. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung präsentiert.

4 Ergebnisse

4.1 Effekte der in-vitro Behandlung mit Stoßwellen

Die Wirkung einer Stoßwellenbehandlung auf kultivierte normale humane dermale Fibroblasten wurde in verschiedenen Experimenten erforscht. Um einen Eindruck der Wirkweise bei dermalen Behandlungen zu erhalten, wurde erstmals an Fibroblasten die Migrationsneigung, die Proliferation, sowie die Expression und Sekretion von einigen für die Integrität der Haut wichtigen Strukturproteinen und dem Glykosaminoglykan Hyaluronsäure bzw. der Hyaluronsäuresynthase untersucht.

4.1.1 Migration von Fibroblasten

Durch die Verwendung von verschiedenen Kulturschalen konnte eine größere Spanne der Behandlungsparameter getestet werden. Bei der Verwendung der *ibidi* μ -Dishes wurde zu Beginn der Versuchsreihe festgestellt, dass nur sehr niedrige Energiestufen gewählt werden konnten, da es sonst zu einer Ablösung der Zellen kam, wodurch eine Auswertung unmöglich wurde. Aufgrund des möglichen Vergleiches der Behandlungsbedingungen bei verschiedenen Zellkulturflächen wurden dennoch die Versuche der *ibidi* μ -Dishes und der Petrischalen durchgeführt und ausgewertet. Dabei wurde der Einfluss der Energiestufe, der Anzahl der Impulse und der Frequenz untersucht.

Der verwendete Applikator FP4 ist für die dermale Anwendung zugelassen. Es liegen jedoch keine physikalischen Daten zur Energieflussdichte bei den einzelnen Stufen vor. Maximal kann eine Energieflussdichte von $0,06 \text{ mJ/mm}^2$ bei Stufe 20 erreicht werden. Für die Auswertung werden an dieser Stelle daher die am Gerät einstellbaren Stufen angegeben. Diese liegen zwischen 1 und 20. Des Weiteren sind Unterstufen zwischen 1 und 9 einstellbar, welche zusätzlich mit Low bezeichnet werden.

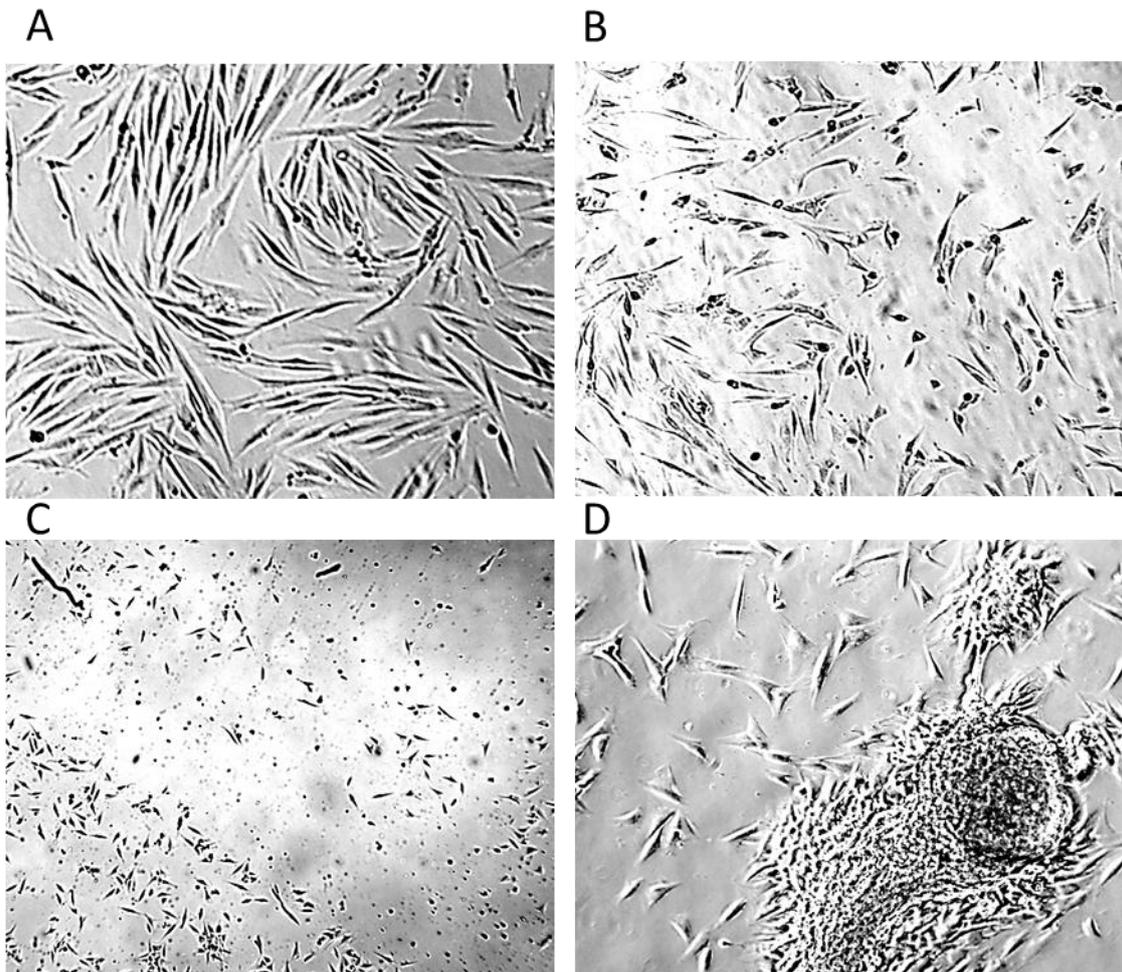


Abbildung 4.1 Negative Einflüsse auf die Zellen durch Stoßwellenbehandlung bei verschiedenen Energiestufen und Applikatoren. Betrachtung unter Inversmikroskop, Fotografie mit CCD Kamera, Vergrößerung 10x oder 4x. A) Gesunde Zellen der Kontrollgruppe. B) Rundung der Zellen und beginnender Zellverlust nach einer Behandlung mit dem Applikator FP4 im *ibidi µ-Dish* mit 250 Impulsen, Energiestufe 10. C) Starker Zellverlust nach einer Behandlung mit dem Applikator FP4 im *ibidi µ-Dish* mit 250 Impulsen, Energiestufe 20. D) Bildung von Zellklumpen bei Verwendung des Applikators F7G3 in der Kulturschale mit 250 Impulsen, Energiestufe 1.

Der Einsatz von anderen Stoßwellenquellen war wegen des hohen Energieeintrages auf die geringe Behandlungsfläche nicht möglich. In den Versuchen konnte bereits bei der Energiestufe 1 des Applikators F7G3 eine Bildung von Zellklumpen beobachtet werden, die eine Auswertung des Wundbereiches unmöglich machten (Abbildung 4.1 D). Eine Behandlung im Wasserbad, wobei die Zellen bei niedrigerer Energieflussdichte hinter den Fokus gebracht werden

könnten, erwies sich durch die unvollständige Abdichtung der Schälchen gegenüber Wasser ebenso als ungeeignet.

Einfluss der Energiestufe auf die Migration

Zunächst wurden die Energiestufen variiert und eine Anzahl von 1000 Impulsen appliziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Energiestufe bei den *ibidi* μ -Dishes begrenzt werden musste. Bei Stufen oberhalb von 3 kam es zu einer Ablösung von Zellen. Die Zellen rundeten sich, verloren ihre Haftung und lösten sich von der Schale ab, so dass keine konfluente Zellschicht mehr sichtbar war (Abbildung 4.1 B und C). Daneben konnten auch partielle Ablösungen in der Zellschicht oder am Rand der Wunde, sowie eine Verklumpung der Zellen innerhalb der Kompartimente des *ibidi* μ -Dishes gesehen werden (Abbildung 4.3 B). Dadurch war die erzeugte Wundfläche nicht mehr definiert begrenzt, so dass die Auswertung und der Vergleich zu der Kontrolle unmöglich wurde. Bereits bei geringem Zellverlust, der eine Auswertung erlaubte, konnten keine der Kontrolle überlegenen Werte erzielt werden. Die Wahl der Energiestufen für die weiteren Versuche wurde daher unterhalb der Ablösungsgrenze gewählt.

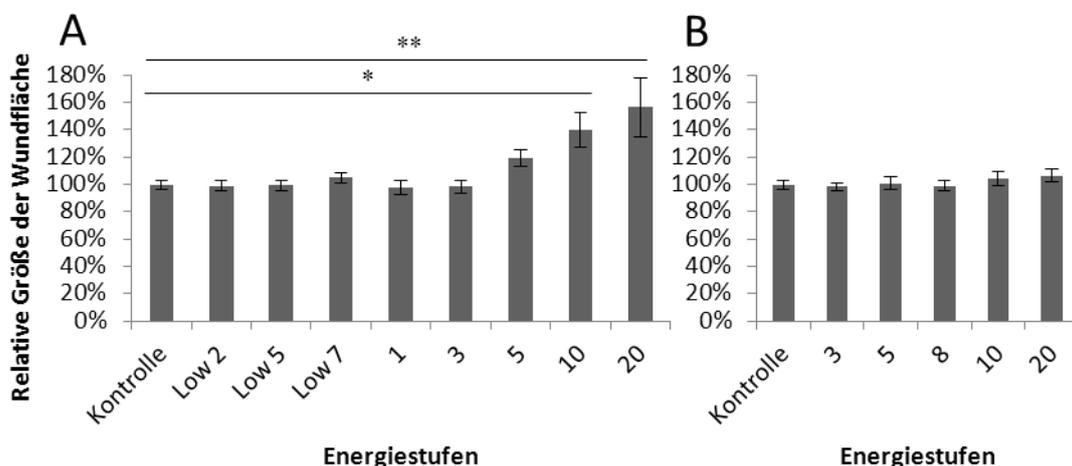


Abbildung 4.2 Relative Veränderung der Wundfläche durch die Applikation von 1000 Impulsen der jeweils angegebenen Energiestufe. A) Zellwachstum im *ibidi* μ -Dish. Sichtbare Verluste ab Stufe 5, bei Stufe 10 nachweisbare Signifikanz des Zellverlustes. B) Zellwachstum in der Petrischale. Bis zur höchsten Stufe sind keine Zellverluste erkennbar. (Kontrolle A n=12; Kontrolle B n=16; Behandlung n=5; Mittelwerte \pm SD; *p<0,05; **p<0,01)

Aus Abbildung 4.2 wird deutlich, dass bei der Verwendung der Petrischalen die maximale Energiestufe 20 angewendet werden konnte, bevor ein Zellverlust sichtbar wurde. Die weitere Beobachtung der Zellen über 24 Stunden zeigte, dass für eine signifikante Verbesserung der Migration nicht nur eine Obergrenze, sondern auch eine Untergrenze besteht unterhalb der keine Veränderung gegenüber der Kontrolle gesehen werden konnte. Dies war die Stufe Low 5 für die *ibidi* μ -Dishes und die Stufe 5 für die Petrischalen. Innerhalb der ermittelten Grenzen wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt.

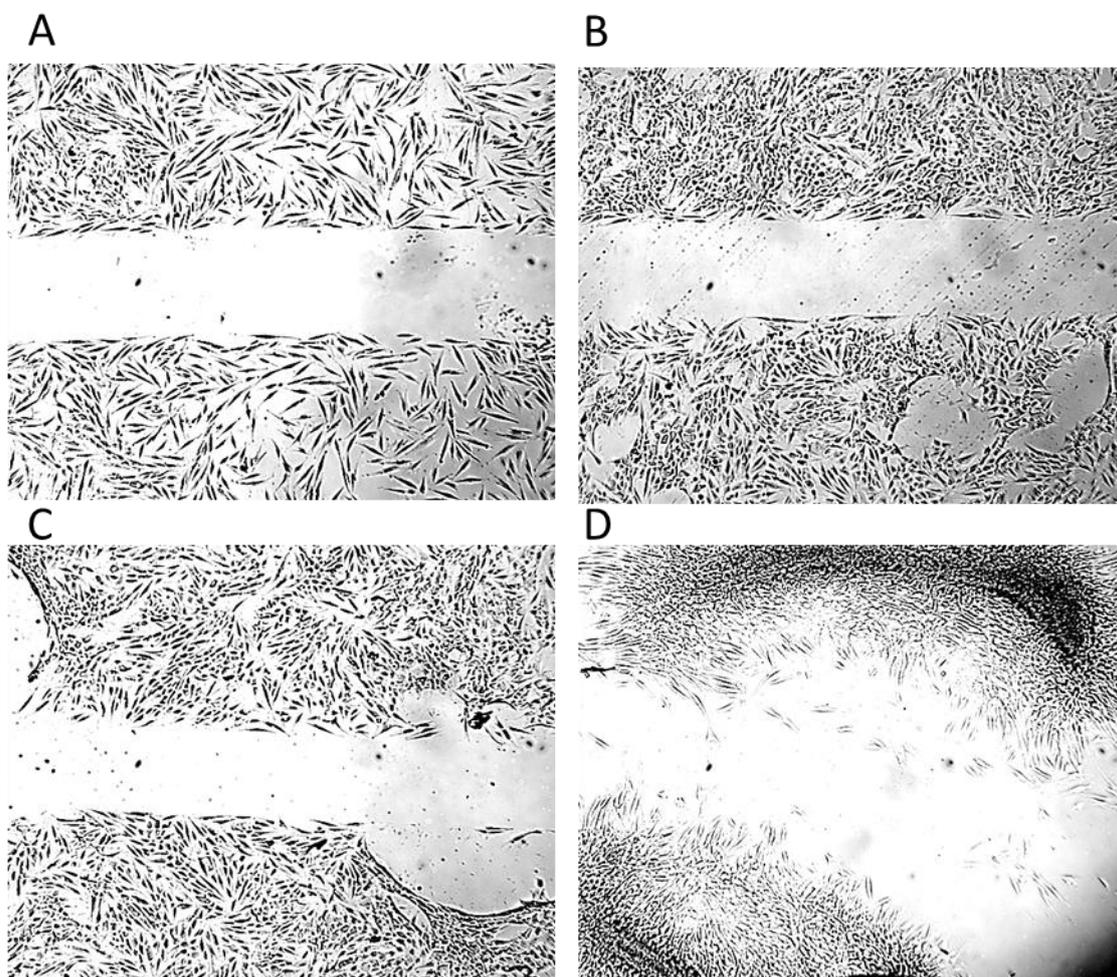


Abbildung 4.3 Negative Einflüsse auf die Zellen durch Stoßwellenbehandlung bei Verwendung der *ibidi* μ -Dishes. Betrachtung unter Inversmikroskop, Fotografie mit CCD Kamera, Vergrößerung 10x oder 4x. A) Gesunde Zellen und definierte, glatte Wundfläche der Kontrollgruppe. B) Lochbildung nach Behandlung mit 1000 Impulsen, Energiestufe 5. C) Ablösung am Wundrand und Verlust der definierten Fläche nach Behandlung mit 1000 Impulsen, Energiestufe 10. D) Komplette Verklumpung der Zellkompartimente nach Behandlung mit 1000 Impulsen, Energiestufe 20.

Durch die breitere Verteilung der möglichen Energiestufen bei der Behandlung der Zellen in der Petrischalen konnte nachgewiesen werden, dass die besten Ergebnisse für 1000 Impulse im Energiestufenbereich 8 bis 10 erreicht werden konnten, wobei die Energiestufen 5, 15 und 20 ebenfalls die Migration beschleunigten. Im statistischen Vergleich sind die Stufen 8 und 10 nach 24 Stunden aber signifikant besser, als die Stufen 5, 15 und 20 ($p < 0,05$). Ob diese Ergebnisse durch Variation der Impulszahlen verändert werden können, wurde in einem weiteren Schritt untersucht.

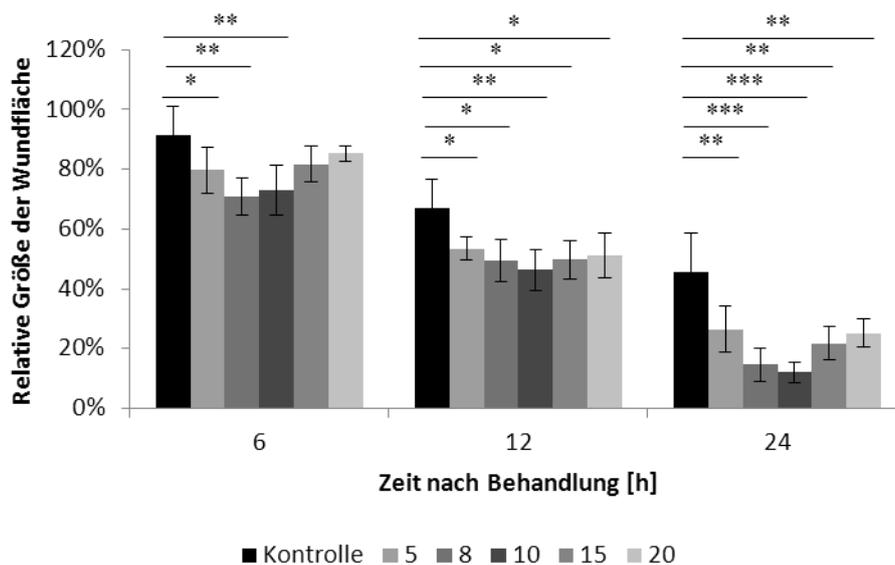


Abbildung 4.4 Zeitabhängige relative Veränderung der Wundfläche in der Petrischalen nach Behandlung mit 1000 Impulsen der jeweils angegebenen Energiestufe. (Kontrolle n=16; Behandlung n=5; Mittelwerte \pm SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Einfluss der Anzahl der Impulse auf die Migration

Es wurden bei beiden verwendeten Kulturschälchen unterschiedliche Impulszahlen getestet. Im Folgenden sind die Ergebnisse gezeigt, die zu einer Verbesserung gegenüber der Kontrolle geführt haben.

Aus der zusätzlichen Variablen, ergaben sich für die Behandlung neue Grenzen innerhalb derer eine Migrationsförderung bestätigt werden konnte. Bei den in den Petrischalen durchgeführten Versuchen zeigte sich, dass unter Erhöhung der Stoßzahlen die Energiestufe 5 ebenso effizient eingesetzt werden kann wie höhere Stufen. Durch die Steigerung der Impulse von 1000 auf 2500 konnten

die Werte mit den Wirkungen von 1000 oder 1500 Impulsen der Stufe 8 und 1000 Impulsen der Stufe 10 verglichen werden. Zwischen diesen Ergebnissen bestand kein signifikanter Unterschied. 24 Stunden nach Stoßwellenapplikation wurde in Abhängigkeit von den Behandlungsparametern eine Größe der Wundfläche zwischen 11% und 15% gemessen. Die Kontrolle erzielte einen Wert von 46%. Niedrigere Impulszahlen vermochten die Werte für die Energiestufen 15 und 20 nicht auf das gleiche Niveau verbessern, wodurch der signifikante Vorteil der Stufen 5, 8 und 10 erhalten blieb. Die Höchstzahl der applizierten Impulse wurde aufgrund von Anwendungsempfehlungen auf 2500 begrenzt, womit bei niedrigeren Energien entsprechend geringere Effekte erzielt wurden.

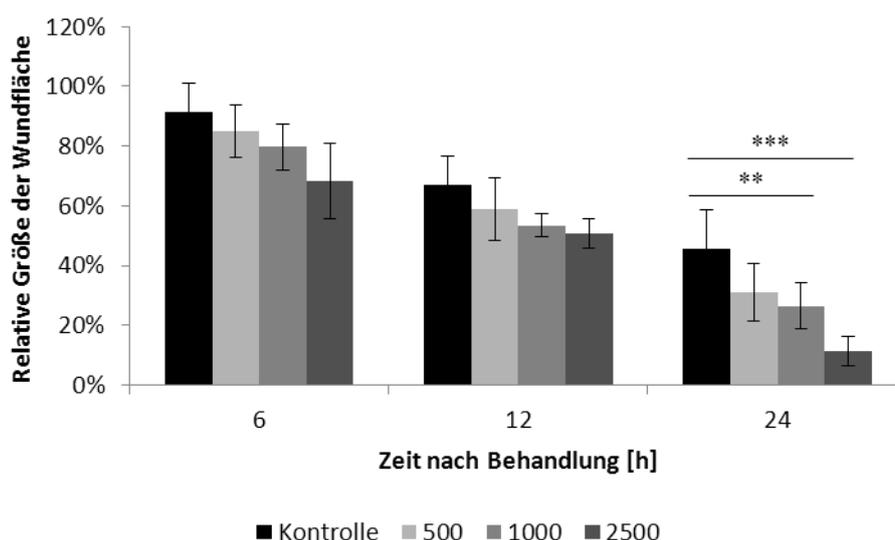


Abbildung 4.5 Zeitabhängige relative Veränderung der Wundfläche in der Petrischale nach Behandlung mit der Energiestufe 5 und den jeweils angegebenen Impulszahlen. (Kontrolle n=16; Behandlung n=5; Mittelwerte \pm SD; **p<0,01; ***p<0,001)

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich für die Migration in den *ibidi* μ -Dishes. Hier konnte innerhalb des Energiestufenbereiches von Low 5 bis 3 ein Vorteil gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden. Ein statistischer Unterschied zwischen den erzielten Ergebnissen der Behandlung bei Low 5 mit 1500 Stößen, Low 7 mit 1500 Stößen, 1 mit 1500 Stößen und 3 mit 1000 Stößen war nicht erkennbar. Die relativen Wundflächen lagen in allen genannten Fällen nach 24 Stunden zwischen 45% und 50%, wohinter die Kontrolle mit 76% zurück blieb.

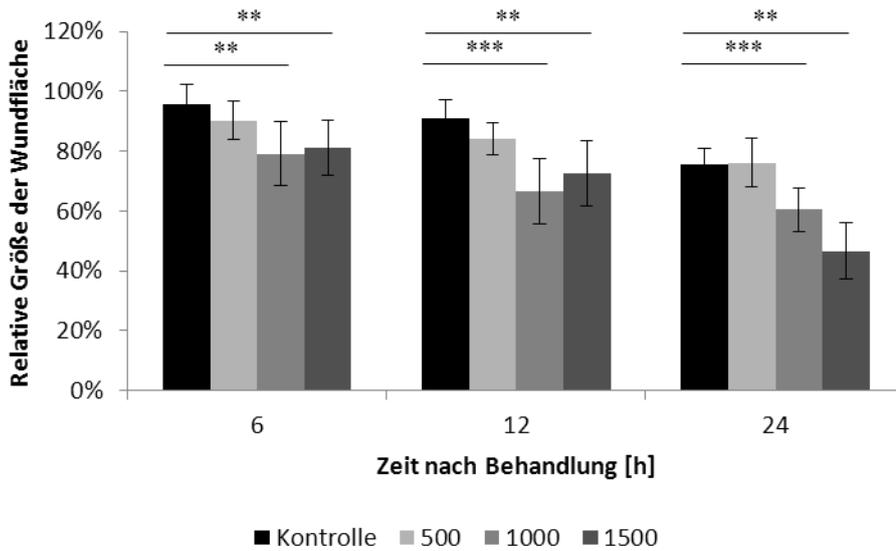


Abbildung 4.6 Zeitabhängige relative Veränderung der Wundfläche im *ibidi* μ -Dish nach Behandlung mit der Energiestufe Low 5 und den jeweils angegebenen Impulszahlen. (Kontrolle n=12; Behandlung n=5; Mittelwerte \pm SD; **p<0,01; ***p<0,001)

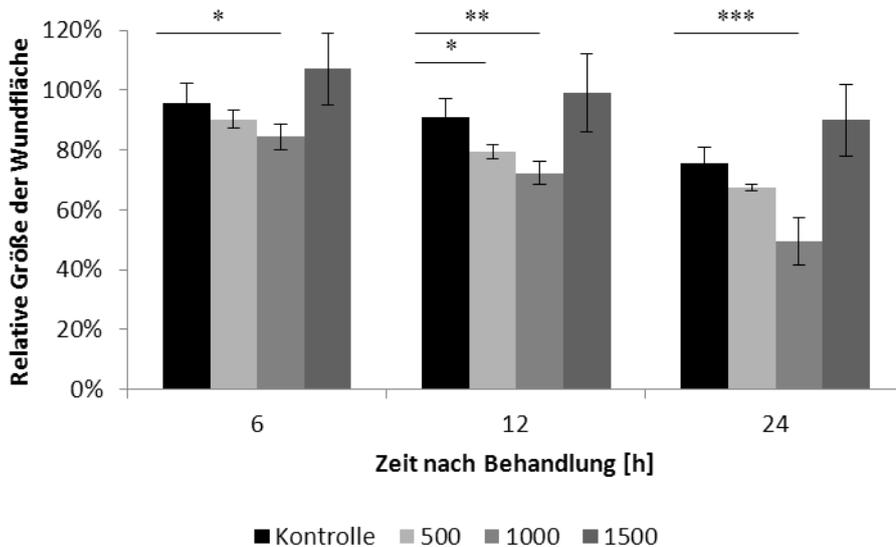


Abbildung 4.7 Zeitabhängige relative Veränderung der Wundfläche im *ibidi* μ -Dish nach Behandlung mit der Energiestufe 3 und den jeweils angegebenen Impulszahlen. (Kontrolle n=12; Behandlung n=5; Mittelwerte \pm SD; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

Die Grenze des Energieeintrages unterhalb derer kein Einfluss auf die Migrationsneigung gezeigt werden konnte liegt für die Zellen im *ibidi* μ -Dish bei 500 Impulsen der Stufe Low 5.

Einfluss der Frequenz

Standardmäßig wird bei piezoelektrischen Geräten eine Frequenz von 4 Hertz gewählt. Dies ist ein willkürlich festgelegter Wert, der in der Praxis gute Ergebnisse und Verträglichkeit zeigte. Um die Zeit der Behandlung, welche bei 2500 Impulsen mit 4 Hertz 10 Minuten und 25 Sekunden beträgt, zu kürzen, wurden mit Hilfe der, in Bezug auf Energiestufe und Anzahl der Pulse, optimierten Parameter die Frequenzen 4 Hertz oder 6 Hertz verglichen.

Für den Vergleich der Migration in den Petrischalen wurde die Energiestufe 8 mit 1500 Impulsen und die Stufe 10 mit 1000 Impulsen gewählt. Die Zellen in den *ibidi* μ -Dishes wurden mit 1500 Impulsen der Stufe Low 5 und 1000 Impulsen der Stufe 3 behandelt. Dabei wurde jeweils die gleiche Anzahl Schälchen mit der Frequenz 4 Hertz und 6 Hertz behandelt.

Die Ergebnisse wiesen bei beiden Kulturschalen zu keinem Zeitpunkt statistische Unterschiede zwischen den Frequenzen auf, so dass davon ausgegangen werden kann, dass beide Frequenzen zu äquivalenten Ergebnissen führen.

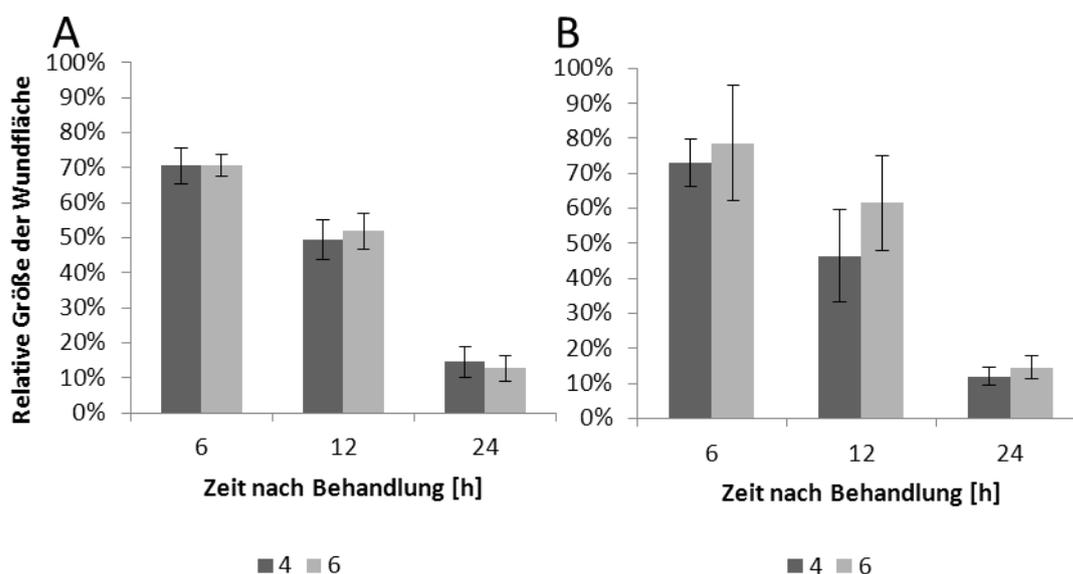


Abbildung 4.8 Zeitabhängige relative Veränderung der Wundfläche in der Petrischale mit der jeweils angegebenen Frequenz. A) 1500 Impulse, Stufe 8. B) 1000 Impulse, Stufe 10. (n=5; Mittelwerte \pm SD)

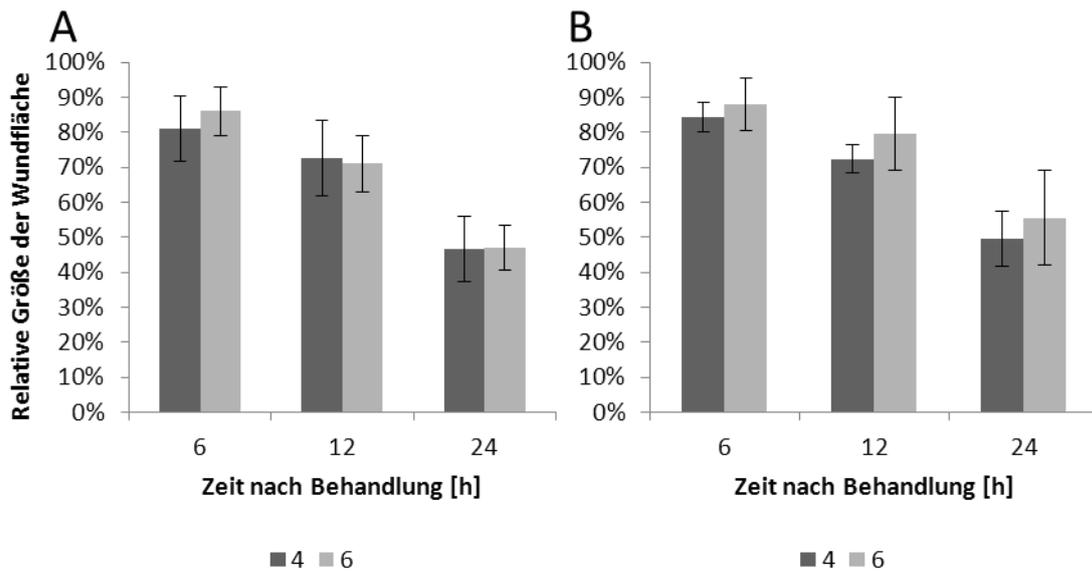


Abbildung 4.9 Zeitabhängige relative Veränderung der Wundfläche im *ibidi* μ -Dish mit der jeweils angegebenen Frequenz. A) 1500 Impulse, Stufe Low 5. B) 1000 Impulse, Stufe 3. (n=5; Mittelwerte \pm SD)

Vergleich der optimierten Behandlungsparameter mit PDGF

Um den Effekt durch die Stoßwellenbehandlung mit Substanzen, die nachgewiesen migrationsfördernd wirken, vergleichen zu können, wurde eine Positiv-Kontrolle der Behandlung mit PDGF durchgeführt. Diese wurde in Gegenüberstellung zu der Behandlung in der Petrischale und der Kontrolle ausgewertet.

Der Vergleich der Stoßwellenbehandlung und der Zugabe von PDGF zeigte, dass die Reduktion der Wundfläche durch PDGF schneller erfolgt. Dieses ist auch in der größeren Signifikanz der Mittelwerte gegenüber der Kontrolle sichtbar. Nach 12 Stunden bestand ein signifikanter Vorteil des PDGFs sowohl gegenüber der Kontrolle als auch der Stoßwelle ($p < 0,01$). Es kann vermutet werden, dass dieser Vorteil bis zum vollständigen Wundschluss in der Positiv-Kontrolle erhalten blieb. Da dieser zum letzten Messzeitpunkt bereits eingetreten war und eine Annäherung der mit Stoßwellen behandelten Schalen erfolgte, konnte dort nur ein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle gemessen werden.

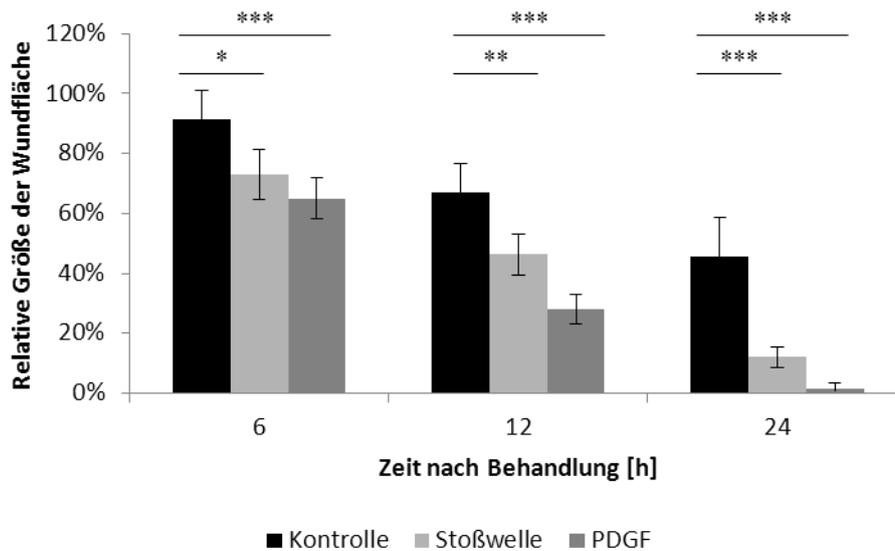


Abbildung 4.10 Zeitabhängige relative Veränderung der Wundfläche in der Petrischale. Vergleich der Behandlung mit 1000 Impulsen, Energiestufe 10 mit der Kontrolle und PDGF. (Kontrolle n=16; Stoßwelle n=5; PDGF n=3; Mittelwerte \pm SD; * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001)

Im mikroskopischen Vergleich der Bilddokumentation war bereits nach 6 Stunden die erhöhte Migrationsneigung durch PDGF sichtbar. Nach 12 Stunden war der Effekt mit dem Ergebnis der Kontrolle nach 24 Stunden nahezu vergleichbar. Dort war die erzeugte Wundfläche in ihrer Form noch erkennbar, während die Positiv-Kontrolle bereits einen kompletten Wundschluss aufwies. Dieser Eindruck bestätigte sich im Vergleich mit den Messwerte in Abbildung 4.11.

PDGF zeigte gegenüber der Stoßwellenapplikation einen Vorteil. Der Wundschluss erfolgte zügiger, was sich in der schnelleren Senkung der Größe der Wundfläche äußerte. Im Verlauf über die Zeit können die Ergebnisse der Stoßwellenbehandlung zwischen dem Effekt der Kontrolle und PDGF eingeordnet werden, wobei eine signifikante Verbesserung durch die Stoßwelle gegenüber der Kontrolle besteht.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Migration

Die Versuche der Zellmigration in beiden Kulturschälchen konnten nachweisen, dass für die Erzielung einer Wirkung eine Mindestenergie erforderlich ist. Die Wahl der optimal wirkenden Energiestufe wurde durch den zerstörenden Effekt der Stoßwelle bei höheren Energien nach oben ebenfalls begrenzt.

In Abhängigkeit von der Größe der zu behandelnden Fläche, welche sich in den *ibidi* μ -Dishes und Petrischalen deutlich unterschied, wurden abweichende Energien toleriert. Bei sehr kleinen Flächen muss die Energiestufe daher gering gehalten werden. Durch Erhöhung der Anzahl der Impulse konnte bei tieferen Stufen das Ergebnis verbessert und eine Vergleichbarkeit zu höheren Stufen erzielt werden. Dies wurde bis zu Pulszahlen von 2500 untersucht. Die Veränderung der Frequenz zwischen 4 und 6 Hertz wies keinen Einfluss auf die Ergebnisse auf.

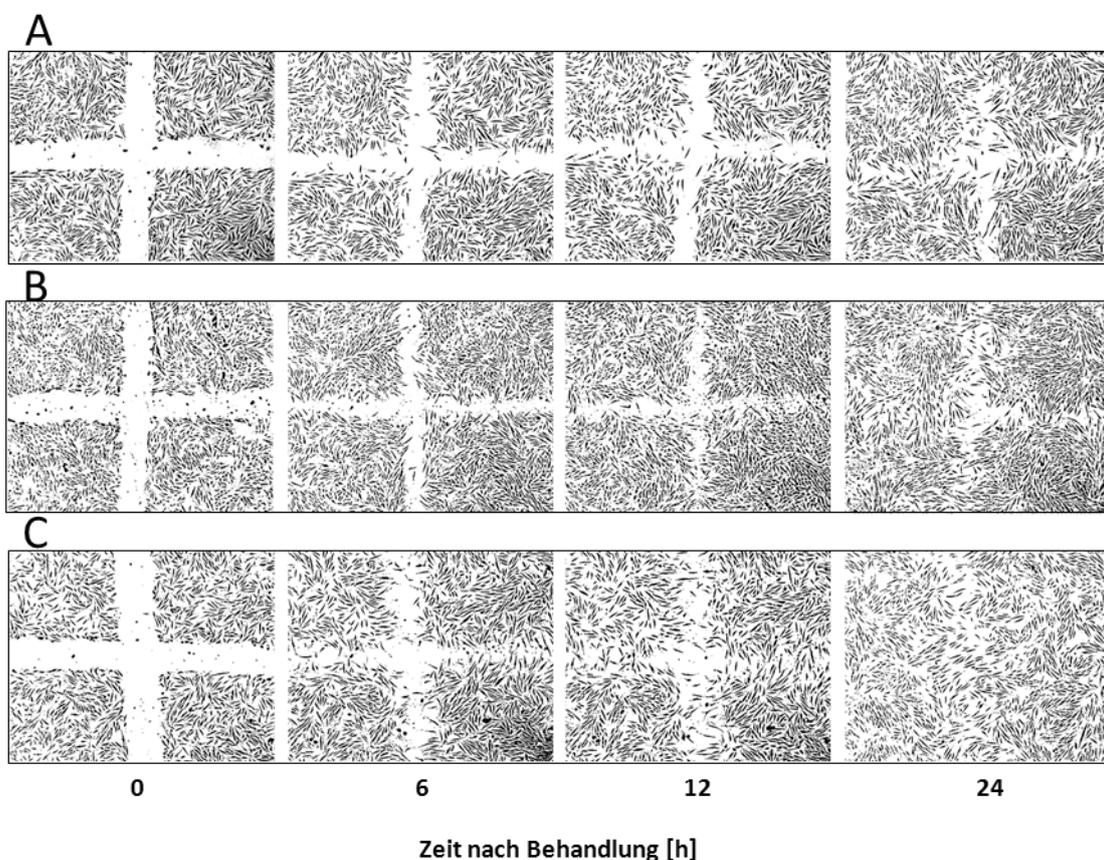


Abbildung 4.11 Mikroskopischer Vergleich des Wundschlusses in Abhängigkeit von der Behandlung und der Zeit. Betrachtung unter Inversmikroskop, Fotografie mit CCD Kamera, Vergrößerung 4x. A) Kontrolle. Die Migrationstendenz ist sichtbar, die Wundform nach 24 Stunden aber noch deutlich erkennbar. B) Behandlung mit 1000 Impulsen, Energiestufe 10. Nach 24 Stunden ist nur ein kleiner offener Wundbereich feststellbar. C) Positiv-Kontrolle mit PDGF. Es kann eine starke Migrationstendenz, die in einem kompletten Wundschluss nach 24 Stunden endet gesehen werden.

4.1.2 Proliferation von Fibroblasten

Die optimierten Behandlungsparameter aus der Analyse der Migration konnten nur zum Teil für die Stoßwellenbehandlung zur Proliferationsanalyse verwendet werden. Durch die Arbeit im Wasserbad und den längeren Beobachtungszeitraum wurden zum einen Applikatoren höheren Energieeintrages, zum anderen größere Kulturschalen eingesetzt.

Optimierung der Behandlungsparameter

Zunächst wurde für beide Geräte der Abstand des Applikators zur Zellkultur, die Anzahl der Impulse sowie die Energieflussdichte optimiert. Die Quantifizierung erfolgte dabei über Zählung im Casy Counter. Ausgehend von den später gewählten Parametern sind in Abbildung 4.12 und Abbildung 4.13 einige Ergebnisse dieser Versuche dargestellt, wobei jeweils einer der Parameter variiert. Dabei wird deutlich, dass sich diese geräteabhängig stark unterscheiden.

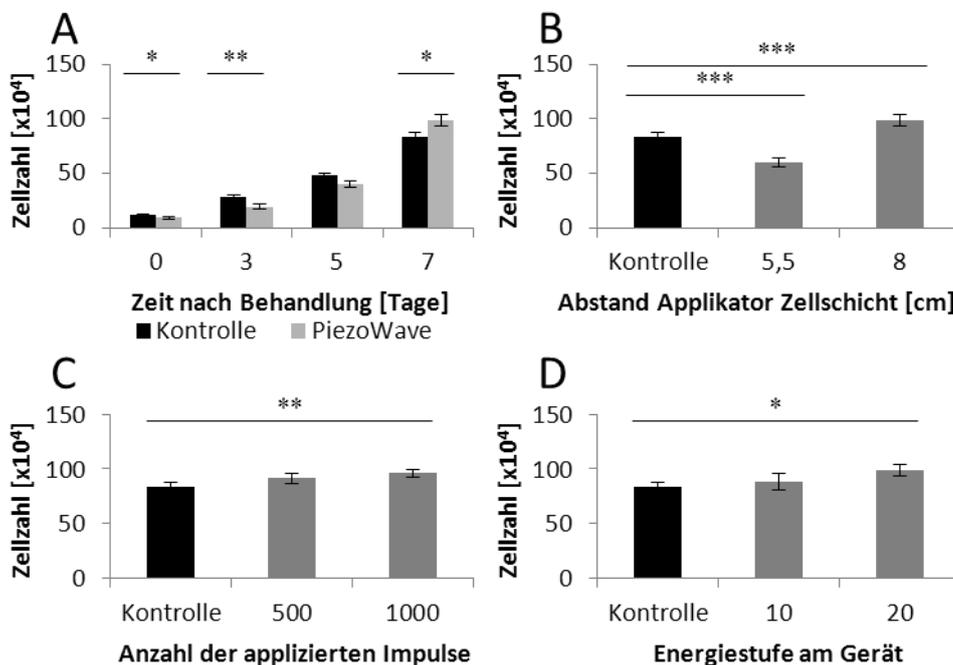


Abbildung 4.12 Zellzahlen nach Variation der Behandlungsparameter beim PiezoWave. A) Behandlung mit 1000 Impulsen, Energiestufe 20, Abstand 8 cm. B) 7 Tage nach Behandlung mit 1000 Impulsen, Energiestufe 20 C) 7 Tage nach Behandlung mit der Energiestufe 20, Abstand 8 cm. D) 7 Tage nach Behandlung mit 1000 Impulsen, Abstand 8 cm. (Kontrolle n=9; Behandlung n≥3; Mittelwerte ± SD; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

Es konnte gezeigt werden, dass die Zellzahlen innerhalb der ersten fünf Tage hinter der Kontrolle teilweise signifikant zurückblieben. Sieben Tage nach Behandlung zeigte sich durch die erhöhte Proliferation jedoch positive Signifikanz. Abgeleitet aus diesen Zellzahlen wurden die mittleren Zellteilungszeiten zwischen den Messzeitpunkten berechnet. Gegenüber der Kontrolle waren diese zunächst verlangsamt, erhöhten sich dann aber stark.

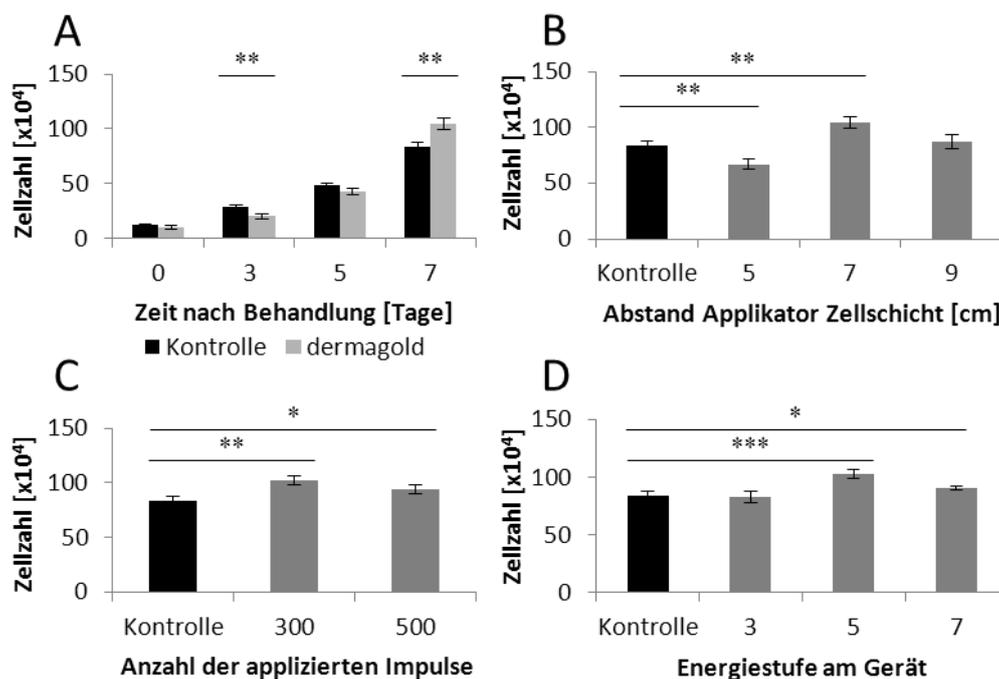


Abbildung 4.13 Zellzahlen nach Variation der Behandlungsparameter beim dermagold. A) Behandlung mit 300 Impulsen, Energiestufe 5, Abstand 7 cm. B) 7 Tage nach Behandlung mit 300 Impulsen, Energiestufe 5. C) 7 Tage nach Behandlung mit der Energiestufe 5, Abstand 7 cm. D) 7 Tage nach Behandlung mit 300 Impulsen, Abstand 7 cm. (Kontrolle n=9; Behandlung n≥3; Mittelwerte ± SD; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

Durch eine Verringerung des Abstandes der Zellen zum Applikator erhöhte sich die Energieflussdichte, da eine Näherung zum Fokus erfolgte. Dies äußerte sich durch vermehrte Ablösung von Zellen. Die verstärkte Proliferation der überlebenden Zellen konnte nach sieben Tagen diesen Verlust nicht einholen. Eine Erhöhung des Abstandes führte im Gegenzug zu einer Reduktion des Effektes, wobei dieser auf eine unzureichende Einwirkung durch Verringerung der Energieflussdichte zurückgeführt werden kann.

Ähnliche Ursachen können für die Ergebnisse bei der Messung der Anzahl der Impulse und der Energiestufen verantwortlich sein. Beim PiezoWave wird jedoch sichtbar, dass eine größere Anzahl an Impulsen und die höchste Energiestufe am Gerät zur Entwicklung eines Effektes nötig sind. Dagegen ist beim dermagold eine stärkere Variabilität gegeben, da mit einem einzelnen Impuls eine größere Energie eingebracht wird, weil die Energiestufen sich in der Ladespannung und damit auch Energieabgabe deutlicher unterscheiden. Eine Limitierung auf 300 Impulse bei der Stufe 5 brachte hier das beste Ergebnis.

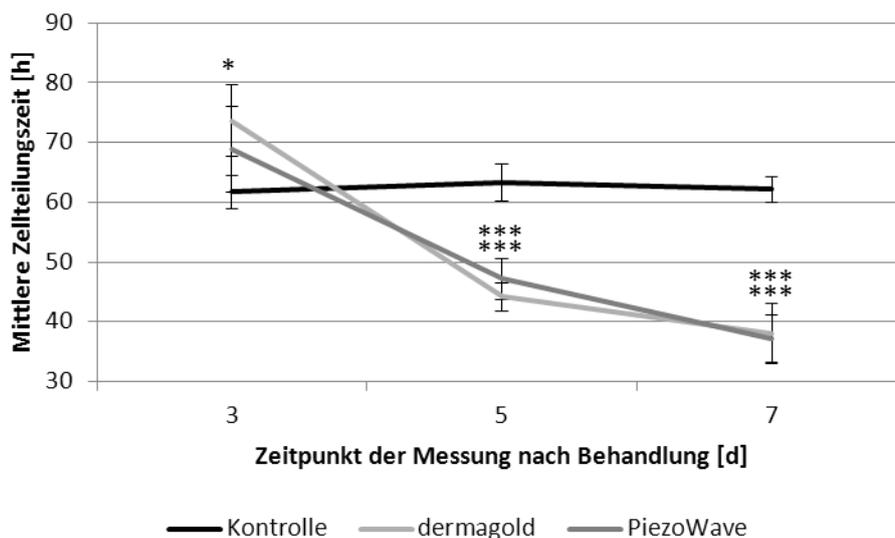


Abbildung 4.14 Mittlere Zellteilungszeit nach Behandlung mit dem dermagold: 300 Impulse, Energiestufe 5, Abstand 7 cm und dem PiezoWave: 1000 Impulse, Energiestufe 20, Abstand 8 cm. (Kontrolle n=9; Behandlung n=5; Mittelwerte \pm SD; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$)

Entwicklung des MTT und XTT Assays

Bei der Entwicklung des MTT Assays stellte die vollständige Solubilisation der Zellwand und damit quantitative Freisetzung der gebildeten Farbnadeln eine besondere Herausforderung dar. Es wurde eine Reihe von gebräuchlichen Detergentien und Lösungsmitteln für die Zellyse getestet. Lediglich unter der Einwirkung von DMSO, nach Entfernung des Mediums, konnte ein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden. Für diese Methode wurde eine Linearitätsbestimmung durchgeführt, nach der sie für alle weiteren Analysen verwendet wurde.

Tabelle 4.1 Liste der getesteten Reagenzien und Lösungen für die Zelllyse

Reagenzien und Lösungen zur Lyse der Zellen

10% SDS in H₂O

10% Triton X-100 in einer Äquivalentmischung aus Isopropanol und DMSO

10% Triton X-100 und 0,04 M HCl in Isopropanol

Ethanol 96%

DMSO

Die exakte Färbung der erzeugten Lösung hing von der Wahl des Detergenz ab. Während im zunächst verwendeten Kit eine optimale Detektionswellenlänge von 570 nm vorgeschrieben war, konnte durch die Verwendung von DMSO der Effekt der Solvatochromie durch eine hypsochrome Verschiebung beobachtet werden. Das Absorptionsmaximum der Lösung wurde durch einen photometrischen Scan bestimmt und der nächstliegende, zur Verfügung stehende, Filter bei 530 nm für die weitere Auswertung des Assays verwendet.

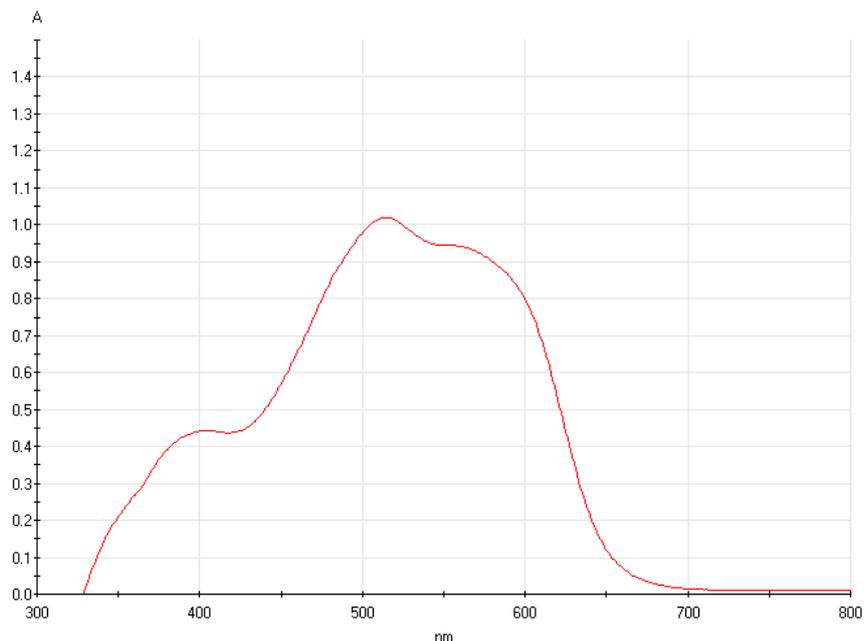


Abbildung 4.15 Absorptionskurve der im MTT Assay durch Lyse mit DMSO erzeugten Lösung und Bestimmung des Absorptionsmaximums bei 515 nm.

Alternativ wurde zeitgleich eine weitere Variante der Zellquantifizierung über metabolische Formazanbildung mit der Verwendung von XTT geprüft und diese mit der MTT Methode verglichen. Die Linearitäten beider Methoden zeigten eine

sehr gute Korrelation, so dass andere Eigenschaften zur Wahl der im weiteren Verlauf zu verwendenden Methode führten.

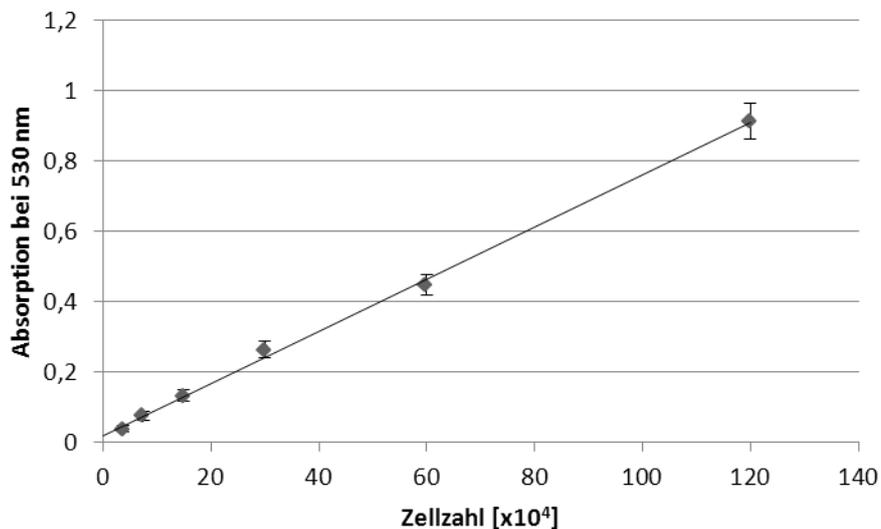


Abbildung 4.16 Linearitätsbestimmung MTT Assay. Die lineare Regression folgt der Gleichung $f(x)=7 \cdot 10^{-7}x+0,0196$; $R^2=0,9985$. ($n=5$; Mittelwerte \pm SD)

Die Sekretion des Farbstoffes erfolgt bei der XTT Methode in das Medium, wodurch hier erst nach deutlich längerer Farbproduktion eine Selbstlimitierung zu beobachten war als bei der Bildung von Farbnadeln innerhalb der Zelle. Die mit Farbnadeln gefüllten Zellen lösten sich bei Inkubationszeiten über zwei Stunden vom Flaschenboden ab und waren damit für die Quantifizierung nicht mehr zugänglich, wodurch eine rechtzeitige Auswertung durchgeführt werden musste. Aufgrund der länger anhaltenden Farbproduktion beim XTT Assay wurde das Medium für die Messung in den linearen Bereich von photometrischen Bestimmungen verdünnt. Geringe Schwankungen in der Inkubationszeit zeigten daher eine große Variabilität in der Farbquantifizierung, wodurch die höhere Sensitivität der Methode nicht positiv herausgestellt werden konnte. Ein weiterer Nachteil der Methode war die Notwendigkeit der täglich frischen Herstellung und des vielfach höheren Preises der XTT Lösung, wodurch für weitere Analysen die MTT Methode gewählt wurde.

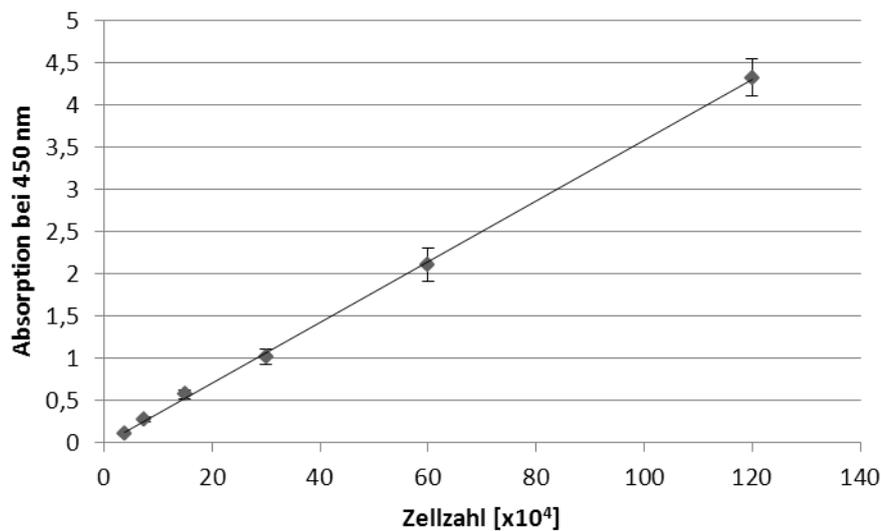


Abbildung 4.17 Linearitätsbestimmung XTT Assay. Absorptionswerte oberhalb von 1 wurden verdünnt. In der Abbildung sind die auf das unverdünnte Medium berechneten Werte gezeigt. Die lineare Regression folgt der Gleichung $f(x)=4 \cdot 10^{-6}x+0,0182$; $R^2=0,9995$. ($n=5$; Mittelwerte \pm SD)

Vergleich MTT Assay mit Zellzählung

Die Ergebnisse der Zellzählung mit dem Casy Counter wurden mit den beim MTT Assay gemessenen und über die Regression der Linearitätsbestimmung berechneten Zellzahlen verglichen. Dabei konnte gesehen werden, dass direkt nach der Behandlung mit Stoßwellen eine im Verhältnis höhere Zellzahl durch das MTT Assay bestimmt wurde. Da der metabolische Umsatz des Farbstoffes Indikator für die Zellzahl ist, diese aber bei beiden Bestimmungen innerhalb statistischer Schwankungen stabil blieb, kann eine erhöhte metabolische Aktivität angenommen werden. Verdeutlicht wird dieser Effekt durch das Verhältnis der gemessenen Absorptionen der behandelten Probe zur Kontrolle. Diese relative Erhöhung gegenüber der tatsächlich vorliegenden Zellzahl wurde unmittelbar und drei Tage nach der Behandlung gemessen, wobei eine Signifikanz nur zum früheren Messzeitpunkt nachgewiesen werden konnte. Im weiteren Verlauf der Beobachtung glichen sich die Werte an das Niveau der Kontrolle an.

Die Entwicklung der Zellzahlen ist nach erfolgter Behandlung bei beiden Stoßwellengeräten, wie bereits in der Optimierung der Proliferation gezeigt wurde, sehr ähnlich. Vergleichbar verhielt es sich mit den gemessenen Absorptionen.

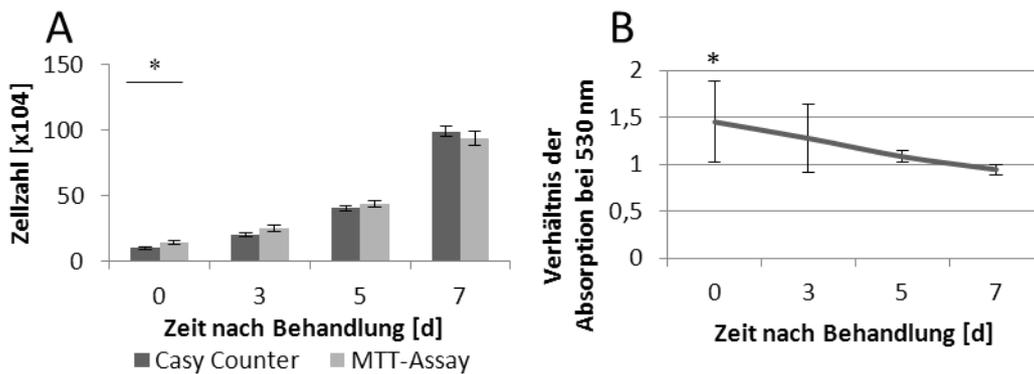


Abbildung 4.18 Vergleich der Zellzahlenbestimmung von Casy Counter und MTT Assay nach Behandlung mit dem PiezoWave: 1000 Impulse, Energiestufe 20, Abstand 8 cm. A) Gemessene absolute Zellzahlen. B) Verhältnis der Messwerte beider Methoden. (n=5; Mittelwerte \pm SD; *p<0,05)

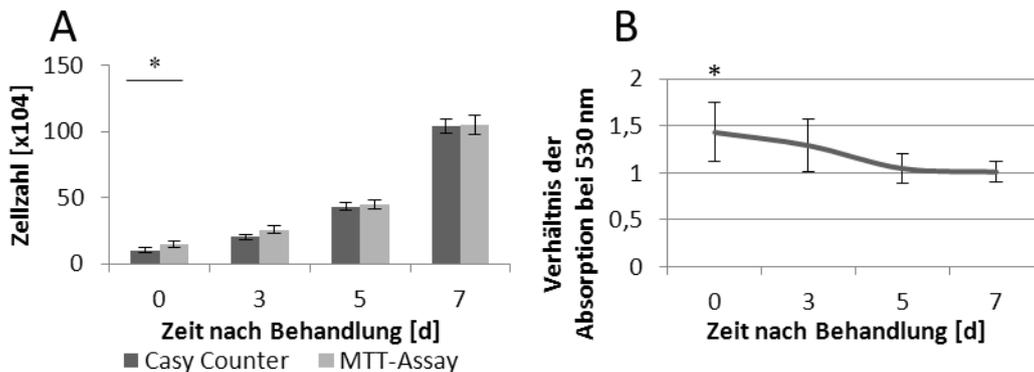


Abbildung 4.19 Vergleich der Zellzahlenbestimmung von Casy Counter und MTT Assay nach Behandlung mit dem dermagold: 300 Impulse, Energiestufe 5, Abstand 7 cm. A) Gemessene absolute Zellzahlen. B) Verhältnis der Messwerte beider Methoden. (n=5; Mittelwerte \pm SD; *p<0,05)

Der Vergleich, der durch den Casy Counter und das MTT Assay bestimmten Zellzahlen, ist anhand der optimierten Parameter der Proliferation gezeigt. Im Test mit weiteren Parametern der Stoßwellenbehandlung konnte keine deutlichere oder stärkere Beeinflussung des Metabolismus detektiert werden.

Die Auswertung des MTT Assays kann zu frühen Zeitpunkten somit nicht zur Quantifizierung genutzt werden, zeigt aber den Effekt der Erhöhung des Stoffumsatzes durch den Einfluss von Stoßwellen

BCA Protein Assay

Da eine Veränderung der Probenaufbereitung gegenüber den Angaben im Kit stattfand, wurde auch hier das Absorptionsmaximum und damit die Detektionswellenlänge für alle weiteren Versuche überprüft. Es war jedoch keine Veränderung feststellbar.

Der Zusammenhang zwischen Proteingehalt und Absorption wurde durch einen Proteinstandard bestimmt. Außerdem wurde die Absorption bei verschiedenen Zellzahlen ermittelt. Dadurch konnte in der Auswertung der Zusammenhang zwischen Zellzahl und Proteingehalt hergestellt werden. Dies war sinnvoll, da eine Beeinflussung des Proteingehaltes durch die Behandlung mit Stoßwellen gemessen werden konnte.

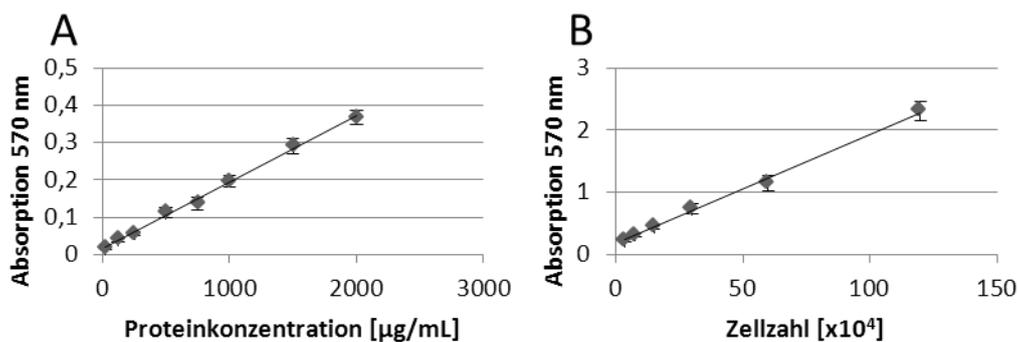


Abbildung 4.20 Korrelation von A) Proteinkonzentration und Absorption. Die lineare Regression folgt der Gleichung $f(x)=2 \cdot 10^{-4}x+0,014$; $R^2=0,9968$. B) Zellzahl und Absorption. Absorptionswerte oberhalb von 1 wurden verdünnt. In der Abbildung sind die, auf die unverdünnte Lösung berechneten Werte, gezeigt. Die lineare Regression folgt der Gleichung $f(x)=2 \cdot 10^{-6}x+0,1726$; $R^2=0,9969$. ($n=5$; Mittelwerte \pm SD)

Um eine Vergleichbarkeit zu den Ergebnissen des MTT Assays herzustellen, wurden die über den Proteingehalt bestimmten Zellzahlen, sowie der Faktor des Proteingehaltes zwischen Kontrolle und behandelten Zellen berechnet. Bei gleicher Zellzahl zeigte sich nach 5 und 7 Tagen eine Erhöhung des Proteingehaltes der behandelten gegenüber den unbehandelten Zellen. Dieser Effekt ist statistisch zu keinem Zeitpunkt und bei keinem der beiden Geräte signifikant. Der Trend, welcher sich zu späteren Messzeitpunkten steigert, kann aber dennoch beobachtet werden.

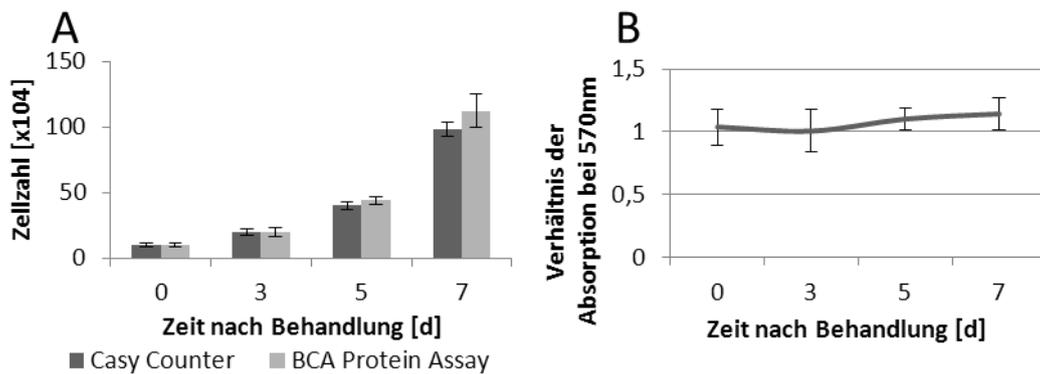


Abbildung 4.21 Vergleich der Zellzahlenbestimmung von Casy Counter und BCA Protein Assay nach Behandlung mit dem PiezoWave: 1000 Impulse, Energiestufe 20, Abstand 8 cm. A) Gemessene absolute Zellzahlen. B) Verhältnis der Messwerte beider Methoden. (n=5; Mittelwerte \pm SD)

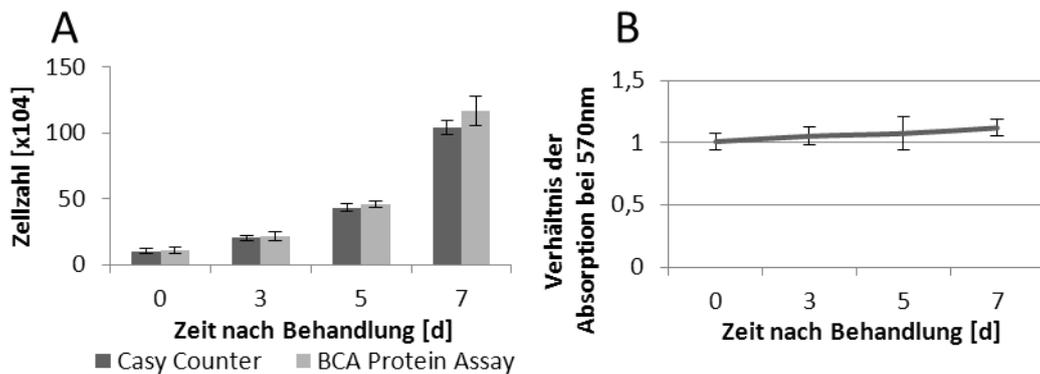


Abbildung 4.22 Vergleich der Zellzahlenbestimmung von Casy Counter und BCA Protein Assay nach Behandlung mit dem dermagold: 300 Impulse, Energiestufe 5, Abstand 7 cm. A) Gemessene absolute Zellzahlen. B) Verhältnis der Messwerte beider Methoden. (n=5; Mittelwerte \pm SD)

Das Protein Assay eignet sich somit für die Zellzahlbestimmung zu Messzeitpunkten bis zu 3 Tagen nach der Stoßwellenbehandlung. Bei Beobachtungen, die über den angegebenen Zeitraum hinausgingen, glichen sich die Werte auf das Niveau der Kontrolle an, so dass von einem vorübergehenden Effekt ausgegangen werden kann. Statistisch signifikante Beeinflussung konnte auch durch Variation der Behandlungsparameter nicht erreicht werden.

4.1.3 Vergleich des elektrohydraulischen und piezoelektrischen Erzeugungsprinzips durch Proliferation

Um einen Vergleich zwischen den unterschiedlichen Erzeugungsprinzipien der Stoßwelle herstellen zu können, wurde die akkumulierte Energieflussdichte der Behandlung berechnet und ins Verhältnis mit den, bei der Analyse der Proliferation durch Zellzählung, erhaltenen Ergebnisse gestellt.

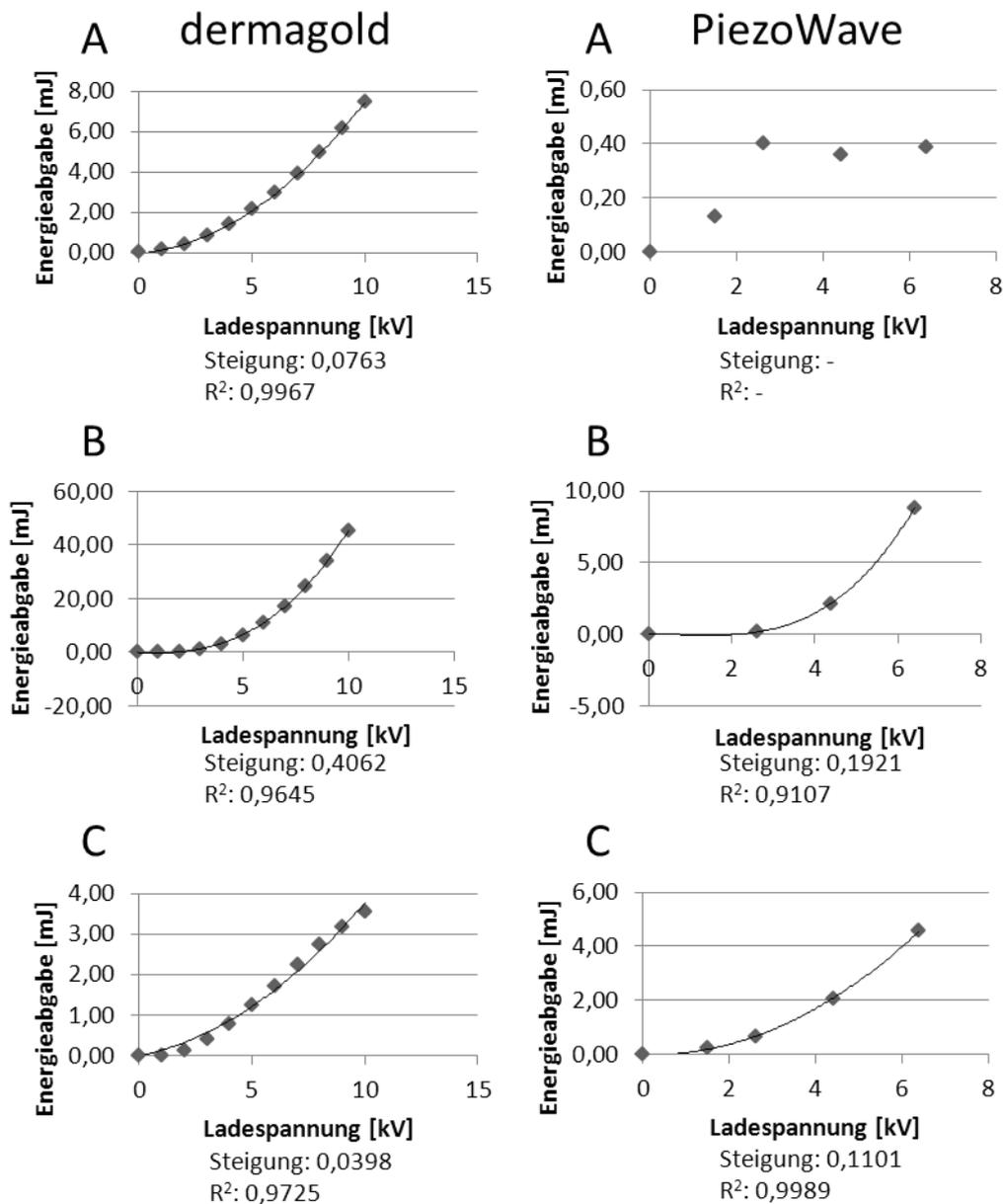


Abbildung 4.23 Quadratische Regressionen des Verhältnisses von Ladespannung zu Energieabgabe im elektrohydraulischen und piezoelektrischen Erzeugungsprinzip. A) -6 dB Bereich. B) 5 MPa Bereich. C) 5 mm Bereich.

Regression der Energieabgabe gegen die Ladungsspannung

Für die definierten Energiezonen des -6 dB, 5 MPa und 5 mm Bereiches einer Stoßwelle (Abbildung 1.3) wurde aus den, durch die Herstellerfirmen experimentell bestimmten, Energieabgaben einiger Energiestufen Regressionen berechnet. Dabei wurde aufgrund des als Kondensator wirkenden Erzeugungsprinzips die in Kapitel 1.1.3 hergeleitete Formel verwendet.

Beim piezoelektrischen Gerät PiezoWave lässt sich für die -6 dB Zone keine quadratische Regression bilden, da bei höheren Ladespannungen nahezu konstante Energieabgaben beobachtet werden (Abbildung 4.23 A). Für einen Vergleich der Geräte ist diese Zone somit ungeeignet. Auffällig ist außerdem die geringe Energiemessung im 5 mm Bereich des elektrohydraulisch arbeitenden dermagolds (Abbildung 4.23 C). Wegen des Stoßwellenverlaufes (Kapitel 1.1.2) wird in dieser Zone nicht der Bereich des Fokus, welcher einen Durchmesser von 7 mm besitzt, eingeschlossen. Für die vergleichende Auswertung blieb somit ausschließlich der 5 MPa Bereich.

Berechnung der akkumulierten Energieflussdichte

Unter Beachtung des geometrischen Verlaufes der Stoßwelle und der Lage des Fokus beider Geräte konnte, mit Anwendung des Strahlensatzes, die jeweils in der Behandlung erfasste Kreisfläche errechnet werden.

Tabelle 4.2 Durch Variation des Abstandes zwischen Zellschicht und Applikator erfasste und behandelte Kreisfläche

Verwendetes Gerät	Entfernung vom Applikator [cm]	Erfasste Kreisfläche [mm²]
dermagold	5	333
dermagold	7	1392
dermagold	9	3455
PiezoWave	5,5	490
PiezoWave	8	3849

Mit der im vorigen Schritt erstellte Regression konnte die Energieabgabe für jede am Gerät gewählte Energiestufe auf diese Fläche und damit die resultierende Energieflussdichte bestimmt werden.

$$\text{Akkumulierte EFD} \left[\frac{\text{mJ}}{\text{mm}^2} \right] = \text{Anzahl der Impulse} \times \frac{\text{Energieabgabe [mJ]}}{\text{erfasste Fläche [mm}^2\text{]}}$$

Formel 4.1 Berechnungsgrundlage für die Bestimmung der in einer Behandlung akkumulierten Energieflussdichte.

Nach Einberechnung der Anzahl der applizierten Impulse ergab sich die akkumulierte Energieflussdichte der Behandlung. Diese wurde mit den Zellzahlen 7 Tage nach Behandlung und den Zellzahlen der Kontrolle ins Verhältnis gesetzt.

Tabelle 4.3 Aus den Parametern einer Stoßwellenbehandlung berechnete akkumulierte Energieflussdichte

Verwendetes Gerät	Entfernung vom Applikator [cm]	Energiestufe am Gerät	Anzahl applizierter Impulse	Akkumulierte Energieflussdichte [mJ/mm ²]
dermagold	5	3	300	3,29
dermagold	5	3	500	5,49
dermagold	5	5	300	9,15
dermagold	7	3	300	0,79
dermagold	7	3	500	1,31
dermagold	7	5	300	2,19
dermagold	7	5	500	3,65
dermagold	7	7	300	4,29
dermagold	7	7	500	7,15
dermagold	9	5	500	1,47
dermagold	9	7	300	1,73
dermagold	9	7	500	2,88
PiezoWave	5,5	10	500	3,80
PiezoWave	5,5	10	1000	7,59
PiezoWave	5,5	20	500	8,03
PiezoWave	5,5	20	1000	16,06
PiezoWave	8	10	500	0,48
PiezoWave	8	10	1000	0,97
PiezoWave	8	20	500	1,02
PiezoWave	8	20	1000	2,04

Vergleich der Effekte der Stoßwellengeräte

Aus den Auswertungen ergab sich für beide Geräte ein Zusammenhang zwischen akkumulierter Energieflussdichte und Proliferation (Abbildung 4.24 und Abbildung 4.25). Die kombinierte Auftragung der Ergebnisse der Proliferation für beide Geräte zeigt einen linkssteilen Verlauf um einen optimalen Energiebereich (Abbildung 4.26). Zu höheren Energien erfolgt ein Abfall in negative Bereiche. Aus der gemeinsamen Auftragung wird deutlich, dass der Effekt im Bereich von 1 mJ/mm^2 bis 4 mJ/mm^2 für beide Erzeugungsprinzipien eine signifikante Verbesserung gegenüber der Kontrolle zeigt. Ober- und unterhalb dieser Grenze ist keine Veränderung sichtbar. Das veranschaulicht, dass eine Untergrenze für das Erreichen eines Effektes vorliegt. Nach oben wird dieser Effekt durch die Ablösung der Zellen aufgrund des Eintrages höherer akkumulierter Energieflussdichten begrenzt. Die erhöhte Proliferation glich den entstehenden Zellverlust aus, wodurch nach 7 Tagen mit der Kontrolle vergleichbare Werte erreicht wurden. Oberhalb von 9 mJ/mm^2 akkumulierter Energieflussdichte wurde der Zellverlust jedoch so stark, dass die Zellzahlen signifikant geringer als die Kontrollwerte waren.

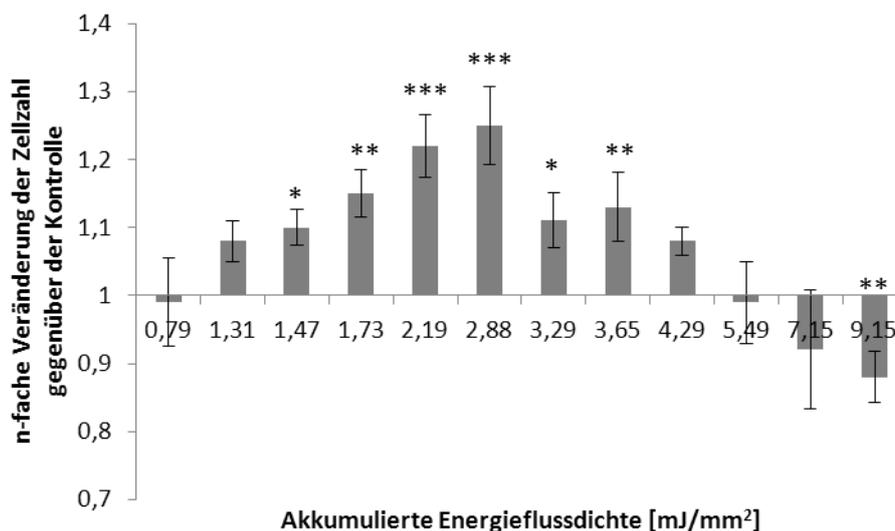


Abbildung 4.24 Zusammenhang der akkumulierten Energieflussdichte und Proliferation durch Behandlung mit dem elektrohydraulischen Prinzip des dermagolds. Werte 7 Tage nach Stoßwellenapplikation bestimmt. ($n=3-6$; Mittelwerte \pm SD; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$)

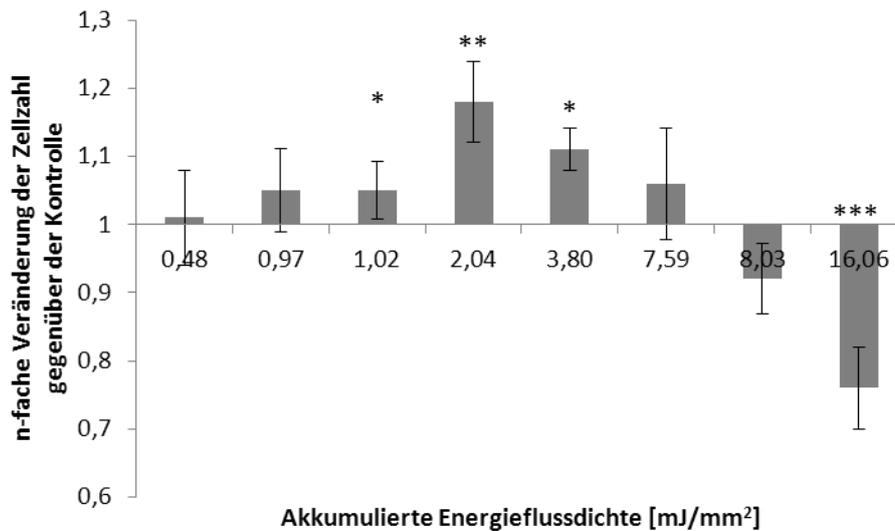


Abbildung 4.25 Zusammenhang der akkumulierten Energieflussdichte und Proliferation durch Behandlung mit dem piezoelektrischen Prinzip des PiezoWaves. Werte 7 Tage nach Stoßwellenapplikation bestimmt. (n=3-6; Mittelwerte ± SD; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

In Abbildung 4.27 ist gezeigt, dass der optimale Bereich zwischen 1 mJ/mm² und 4 mJ/mm² jedoch nicht durch wenige Pulse hoher Energieflussdichte erreicht werden kann. Bei einer Erhöhung über 0,015 mJ/mm² pro Impuls wurde der zerstörende Effekt der Stoßwelle zu hoch, was sich in einer Ablösung der Zellen von der Kulturflasche, sowie in der Reduktion der Zellzahl zeigte.

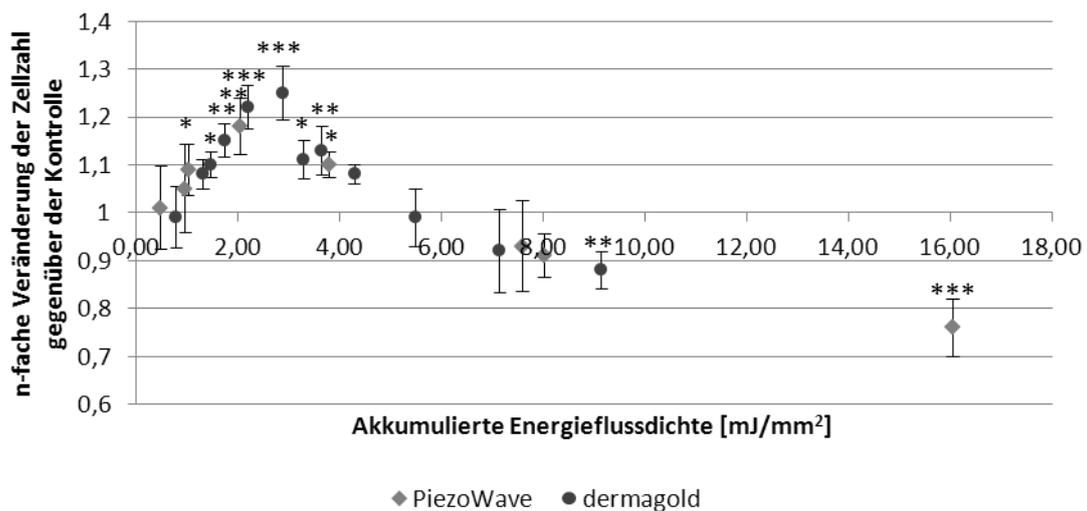


Abbildung 4.26 Zusammenhang der akkumulierten Energieflussdichte und Proliferation beider Erzeugungsprinzipien im Vergleich. (n=3-6; Mittelwerte ± SD; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

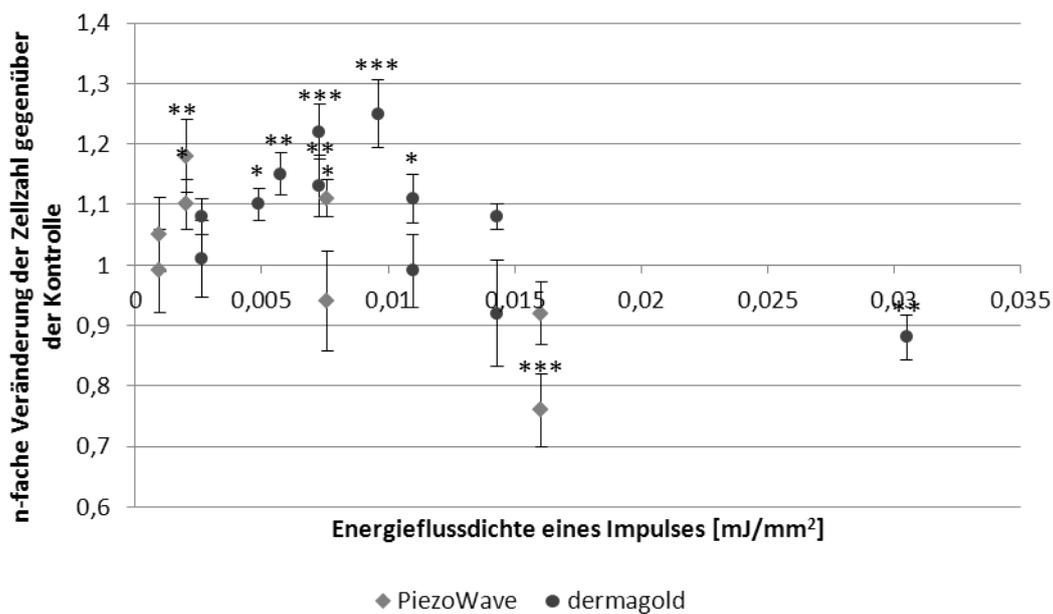


Abbildung 4.27 Zusammenhang der Energieflussdichte eines Impulses und Proliferation beider Erzeugungsprinzipien im Vergleich. (n=3-6; Mittelwerte \pm SD; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

4.1.4 Auswertung der Genexpressionsanalyse

In der Genexpressionsanalyse wurde der Einfluss der Stoßwelle auf die mRNA Synthese für Kollagen, Elastin, Fibronectin und Hyaluronsäuresynthese durch verschiedene Behandlungen mit der Stoßwelle sowie zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Damit sollte ein Hinweis auf die Grundlagen der Veränderungen, wie Straffung und Heilung der Haut, durch Stoßwellen gefunden werden.

Behandlung und Gewinnung der Zellen

Um den Einfluss der Energieflussdichte auf die Expression zu sehen, wurden für beide Geräte vergleichbare akkumulierte Energieflussdichten innerhalb der für die Proliferation optimalen Werte und auch darüber liegende Werte gewählt. Dies wurde durch Verringerung des Abstandes zwischen Applikator und Zellen realisiert. Da die höchste Energiestufe beim piezoelektrisch funktionierenden Gerät PiezoWave bereits eingestellt war, konnte nur beim dermagold zusätzlich auch die Energiestufe verändert werden.

Die Messung der Genexpression sollte über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Daher wurden mehrere Proben gleichzeitig behandelt oder Kontrollen angelegt, die Zellen aber zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen. Um frühe und spätere Effekte erfassen zu können, wurden die Proben 6, 12, und 24 Stunden, sowie 3, 5 und 7 Tage nach der Behandlung für die weitere Analyse isoliert.

Aufbereitung und Auswertung der Proben

Nach der reversen Transkription und GAPDH-PCR wurde halbquantitativ der cDNA Gehalt anhand der Bandenstärke für GAPDH in einer Gelelektrophorese überprüft. Sofern die Proben Banden vergleichbarer Intensität aufwiesen, wurden sie in der folgenden quantitativen RT-PCR eingesetzt.

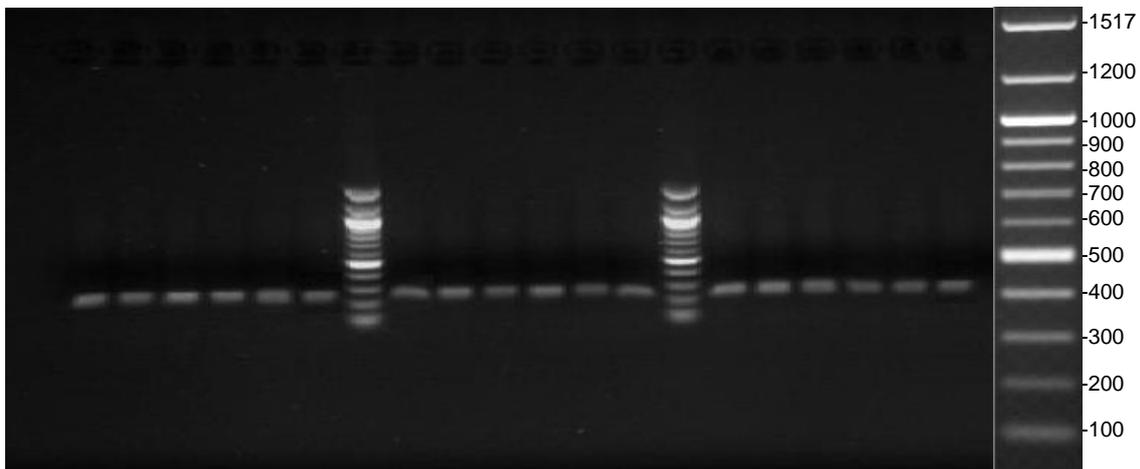


Abbildung 4.28 Auswertung der Gelelektrophorese der GAPDH-PCR unter UV-Licht. Bei jeder Probe ist eine Bande für GAPDH in vergleichbarer Intensität sichtbar. Die Zuordnung der Molekülgröße kann durch Abgleich mit der DNA-Leiter erfolgen (rechts vergrößert und mit Anzahl der Basenpaare versehen dargestellt). GAPDH liegt mit der amplifizierten Sequenz von 266 bp zwischen den Banden von 200 und 300 bp.

Die Auswertung der quantitativen RT-PCR erfolgte über die Messung des C_t -Wertes, der eine Aussage über die eingangs vorliegenden Templates macht. Die Werte wurden über die $\Delta\Delta C_t$ -Methode zueinander ins Verhältnis gesetzt, wobei die Proben der Kontrolle mit den behandelten Proben, die zum gleichen Zeitpunkt angesetzt und geerntet wurden, verglichen werden konnten. In den folgenden Ergebnissen ist das Verhältnis von Proben zu Kontrollen als n-fache Expression angegeben.

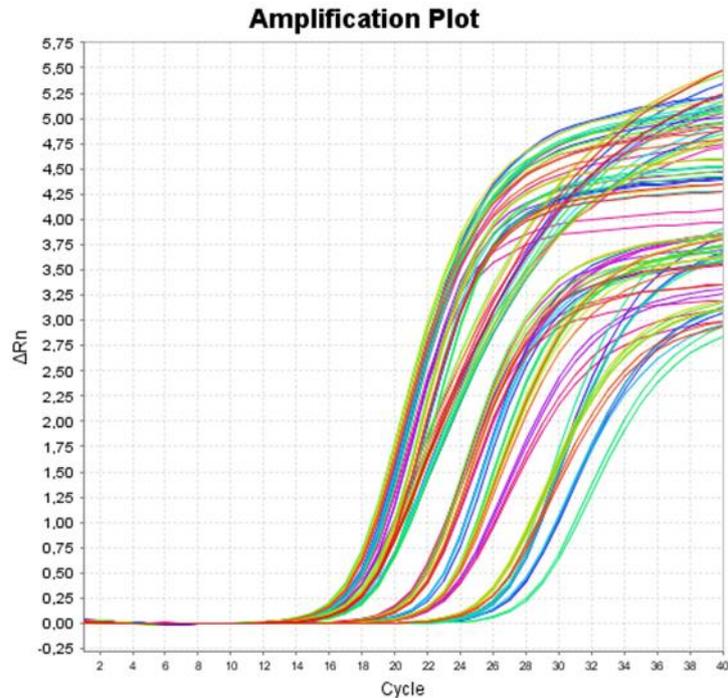


Abbildung 4.29 Amplifikationsplot mit Fluoreszenzmessung in Abhängigkeit von der Anzahl der Zyklen. Die unterschiedlichen Farben stehen dabei für verschiedene Genabschnitte und repräsentieren in jeder Kurve die Messung einer Probe.

Ergebnisse der Genexpressionsanalyse

Bei der Verwendung des dermagold Gerätes konnte nach der Behandlung mit den Parametern, die sich auch in der Messung der Proliferation als optimal heraus gestellt hatten, die besten Ergebnisse erzielt werden. Dabei wurde der positive Einfluss auf die Expression der getesteten Proteine als gut bewertet.

Aus Abbildung 4.30 wird deutlich, dass zunächst ein geringer Abfall aller Werte, welcher jedoch nicht signifikant war, beobachtet werden konnte. Auf die mRNA Synthese für Kollagen wurde insgesamt nur ein geringer Einfluss genommen, der bei wenigen Messdaten des Kollagens 3A1 zu statistischer Signifikanz führte. Die Expression von Elastin verbesserte sich bis zum Messzeitpunkt 3 Tage nach der Behandlung und erreichte nach 24 Stunden und 72 Stunden hohe Signifikanz, um anschließend auf den Ausgangswert zurück zu fallen. Die Auswertung der Expression von Fibronectin und der Hyaluronsäuresynthese hingegen zeigte erst nach 5 bis 7 Tagen Effekte, die sich bei der Hyaluronsäuresynthese zum späteren Messzeitpunkt noch deutlich verstärkten.

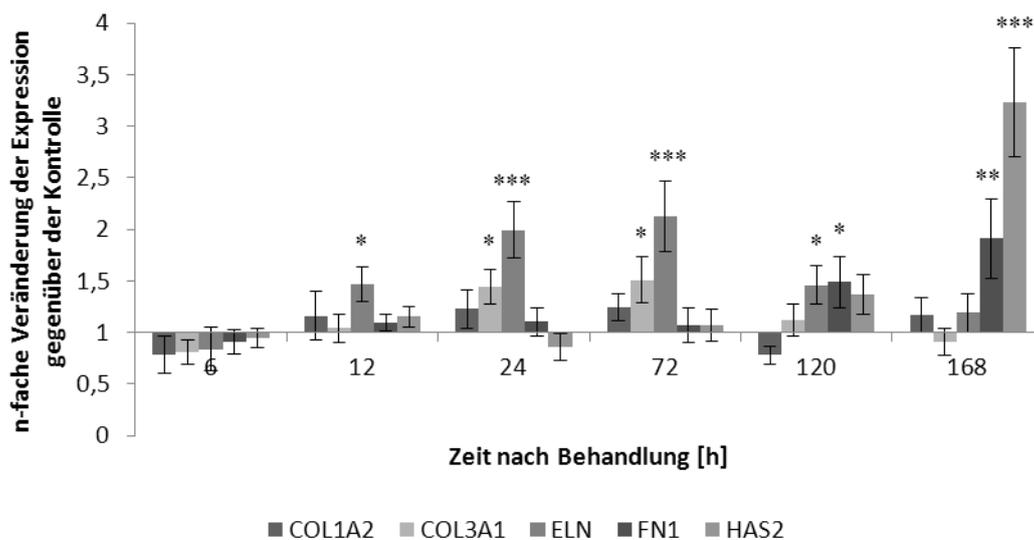


Abbildung 4.30 Genexpressionsanalyse und Darstellung der n-fachen Expression gegenüber der Kontrolle nach Behandlung mit dem dermagold: 300 Impulse, Energiestufe 5, Abstand 7 cm. Akkumulierte Energieflussdichte: 2,19 mJ/mm². (n=3; Mittelwerte ± SD; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

Die dargestellten Werte konnten weder durch eine andere Behandlung, noch durch Verwendung des piezoelektrischen Prinzips erhalten werden. Variationen der gewählten Behandlungsparameter in Abstand und Energiestufe, die zur Veränderung der akkumulierten Energieflussdichte führten, zeigten den dargestellten Ergebnissen gegenüber eine Reduktion der Expression.

Im Gegensatz dazu konnte bei der Verwendung des PiezoWaves ein deutlicher Unterschied zwischen den eingetragenen akkumulierten Energieflussdichten gesehen werden, wobei die Expression nach Behandlung mit hohen Werten ausgeprägter sichtbar war. Bei der zum dermagold vergleichbaren Energieflussdichte, wurden innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 24 Stunden ähnliche Resultate erzielt. Dieser Effekt hielt jedoch nicht bis zur Messung nach 72 Stunden an. Zu den späteren Messzeitpunkten blieb auch der starke Anstieg der Expression von Fibronectin und Hyaluronsäuresynthase hinter den Ergebnissen des dermagolds zurück. Statistische Signifikanz konnte seltener oder weniger ausgeprägt erreicht werden. Dies verdeutlicht, dass der Einfluss des Erzeugungsprinzips der Stoßwelle, anders als bei der Proliferation gezeigt, bei ähnlichen akkumulierten Energieflussdichten dennoch beachtet werden muss.

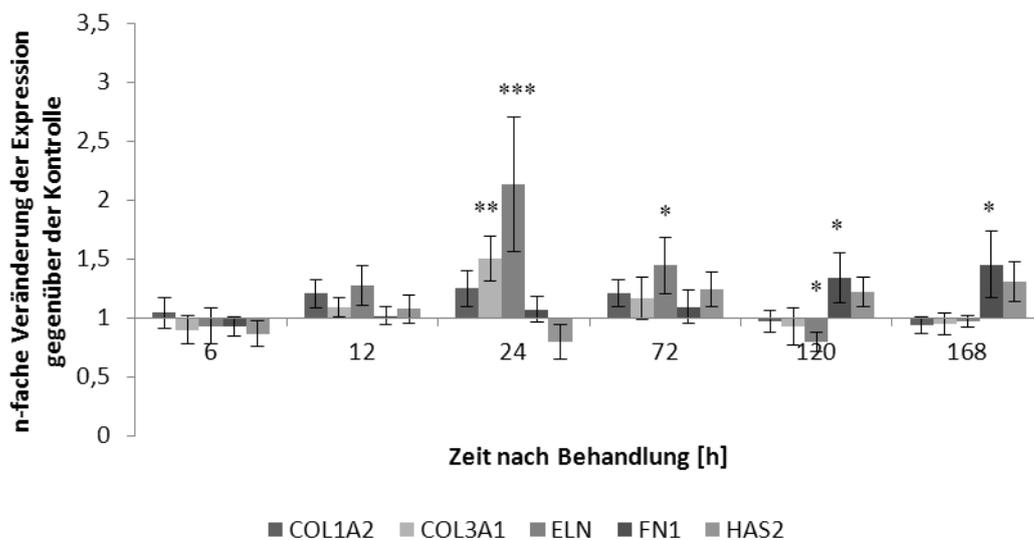


Abbildung 4.31 Genexpressionsanalyse und Darstellung der n-fachen Expression gegenüber der Kontrolle nach Behandlung mit dem PiezoWave: 1000 Impulse, Energiestufe 20, Abstand 8 cm. Akkumulierte Energieflussdichte: 2,04 mJ/mm². (n=3; Mittelwerte ± SD; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

Nach Behandlung mit dem PiezoWave bei hoher akkumulierter Energieflussdichte wurden bei der Analyse der Proliferation wegen des großen Zellverlusts keine Verbesserungen gegenüber der Kontrolle nachgewiesen. Ganz anders stellte sich die Auswertung der Expressionsmessung dar. Entgegen der Resultate bei der niedrigeren Energieflussdichte konnte ein Effekt erst 3 Tage nach der Behandlung gemessen werden. Veränderungen der Expressionswerte waren zu diesem Zeitpunkt deutlich intensiver, als bei allen weiteren Analysen. Die bei der niedrigen, akkumulierten Energieflussdichte beobachtete Gegenregulation des Elastins, konnte bei der hohen Energieflussdichte ebenfalls klarer gesehen werden. Die Expression von Fibronektin und Hyaluronsäuresynthase erreichten nach 5 und 7 Tagen nicht die Werte, die mit dem dermagold erzielt wurden. Die weiteren getesteten Behandlungsparameter zeigten keine bedeutende Veränderung oder Verbesserung gegenüber den dargestellten Auswertungen.

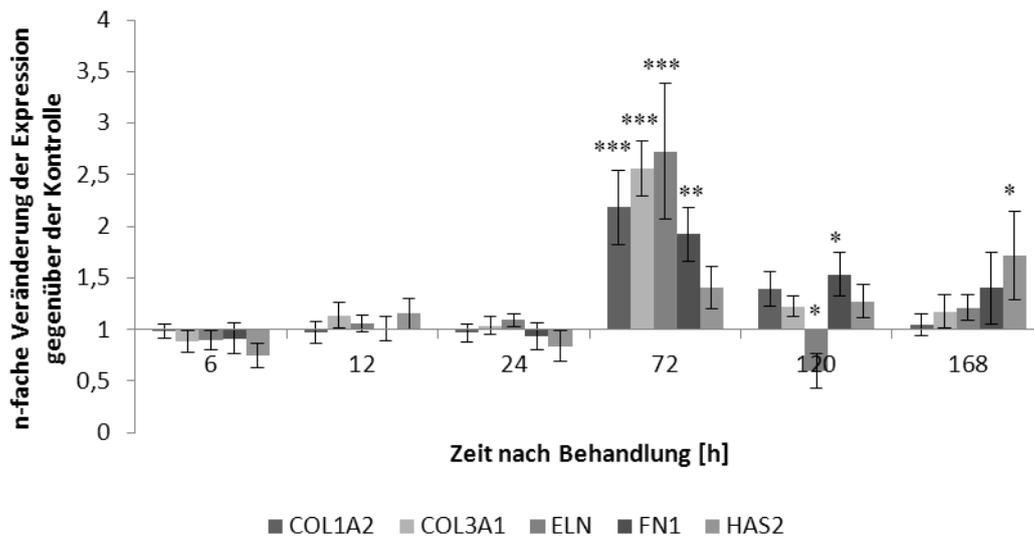


Abbildung 4.32 Genexpressionsanalyse und Darstellung der n-fachen Expression gegenüber der Kontrolle nach Behandlung mit dem PiezoWave: 1000 Impulse, Energiestufe 10, Abstand 5,5 cm. Akkumulierte Energieflussdichte: 7,59 mJ/mm². (n=3; Mittelwerte ± SD; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass innerhalb der ersten 12 Stunden nach Behandlung nur wenig Veränderung in der Expression der untersuchten Proteine zu sehen ist. Beide Kollagentypen ließen sich durch die Behandlungen zu allen Zeitpunkten nur gering beeinflussen. Bei der Expression von Elastin kam es zu einem langsamen Anstieg in der Expression, der signifikant nachweisbar war, fiel zu späteren Zeitpunkten jedoch wieder ab. Demgegenüber stand eine Erhöhung der Expressionswerte von Fibronectin und der Hyaluronsäuresynthese, insbesondere zu den Messpunkten 5 und 7 Tage nach Applikation von Stoßwellen.

Der Einfluss von Veränderungen in der Energieflussdichte wurde besonders bei Auswertung der Daten nach Behandlung mit dem PiezoWave sichtbar. Die, den Einfluss von hohen akkumulierten Energieflussdichten überlebenden Zellen wiesen eine stärkere Reaktion, welche außerdem zu späteren Messzeitpunkten verschoben war, auf. Eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse des elektrohydraulischen und piezoelektrischen Erzeugungsprinzips besteht nur für Kollagen und Elastin.

4.1.5 Auswertung der Sekretionsanalyse

Um die Ergebnisse, die in der Analyse der Expression herausgestellt wurden, verifizieren zu können, wurden im Medium Kollagen, Elastin und Hyaluronsäure quantifiziert. Kollagen wurde dabei als Gesamtkollagen, welches Typ I und Typ III erfasst, gemessen.

Gewinnung und Auswertung der Analysen

Der Rhythmus des Mediumwechsels wurde beibehalten und für behandelte und unbehandelte Zellen zeitgleich durchgeführt. Dadurch ist trotz der variierenden Kulturzeiten ein direkter Vergleich der Werte möglich. Die Ergebnisse sind ab 24 Stunden nach Behandlung für die gleichen Zeitpunkte wie bei der Expression dargestellt, was einen direkten Abgleich erlaubt. Dabei wurden die ermittelten Gehälter der Proben ins Verhältnis zu den Werten der Kontrolle gestellt. Zuvor konnte für alle Auswertungen eine gute Korrelation zwischen Gehalt an Analyt und Absorptionsmessung ermittelt werden (Kollagen $R^2=0,9949$; Elastin $R^2=0,9889$; Hyaluronsäure $R^2=0,9963$). Da die Assays gegenüber den Vorgaben des Herstellers nicht verändert wurden, wurde keine ausführliche Linearitätsbestimmung oder Validierung vorgenommen.

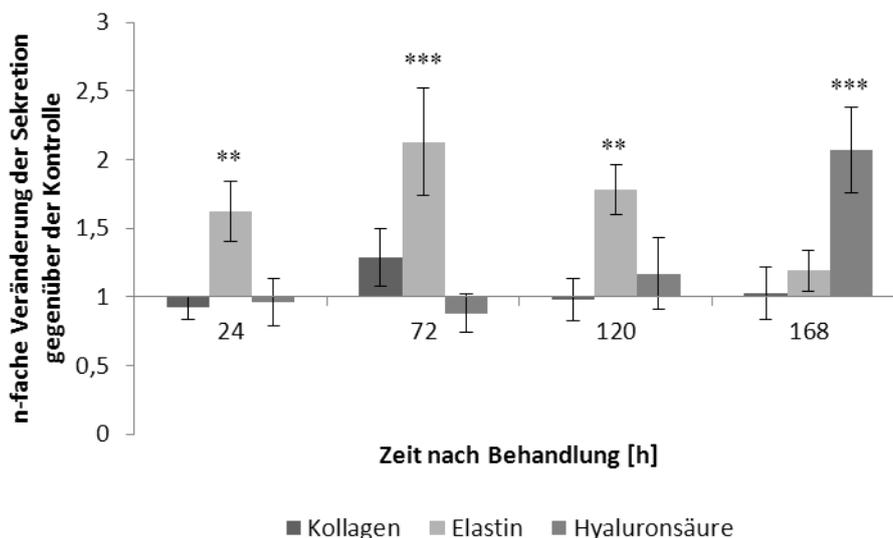


Abbildung 4.33 Sekretionsanalyse und Darstellung der n-fachen Expression gegenüber der Kontrolle nach Behandlung mit dem dermagold: 300 Impulse, Energiestufe 5, Abstand 7 cm. Akkumulierte Energieflussdichte: 2,19 mJ/mm². (n=3; Mittelwerte \pm SD; **p<0,01; ***p<0,001)

Bei der Auswertung der Ergebnisse für die Behandlung mit dem dermagold, konnte für Kollagen im Mittel kein signifikantes Ergebnis erreicht werden. Für Elastin hingegen wurde auch hier gezeigt, dass eine Erhöhung der Sekretion vorlag, welche deutlich mit den Werten der Expression korreliert. Dies beweist, dass die dort gemessenen Werte zwischen den Messpunkten stabil blieben. Die Veränderung der Hyaluronsäuresekretion nach 7 Tagen war gegenüber der Kontrolle signifikant, aber nicht so ausgeprägt gesteigert wie die Ergebnisse für die Expression der Hyaluronsäuresynthase. Damit kann ausgeschlossen werden, dass die Expression von HAS2 zuvor über einen längeren Zeitraum deutlich höher als der Messwert war.

Bei vergleichbaren Energieflussdichten wurde mit dem PiezoWave nach 24 Stunden eine signifikante Erhöhung des Kollagens gemessen. Die weiteren Werte blieben, wie auch in der Genexpression gezeigt, hinter den Ergebnissen des dermagolds zurück. Der Effekt auf Elastin zeigte eine kürzere Dauer und der Anstieg der Hyaluronsäure war kleiner als mit dem elektrohydraulischen Gerät.

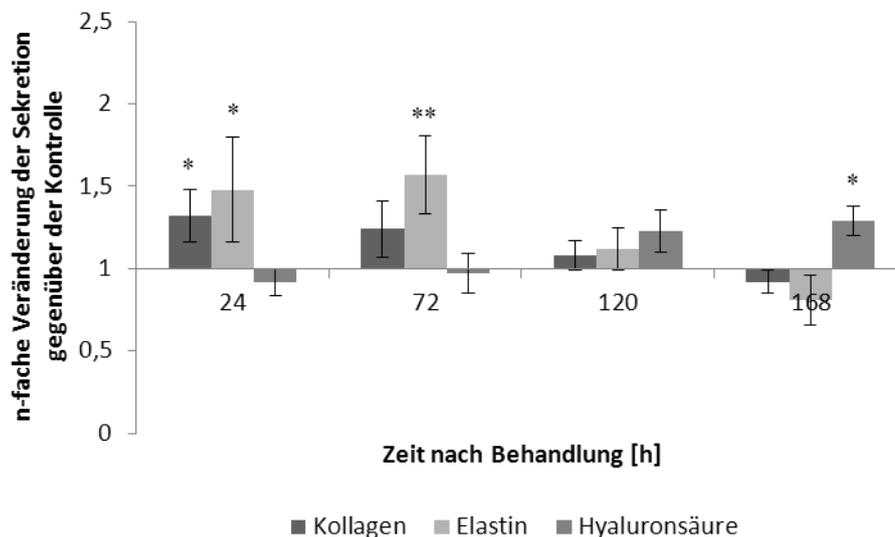


Abbildung 4.34 Sekretionsanalyse und Darstellung der n-fachen Expression gegenüber der Kontrolle nach Behandlung mit dem PiezoWave: 1000 Impulse, Energiestufe 20, Abstand 8 cm. Akkumulierte Energieflussdichte: 2,04 mJ/mm². (n=3; Mittelwerte ± SD; *p<0,05; **p<0,01)

Nach Behandlung mit hoher Energieflussdichte konnte beim PiezoWave innerhalb der ersten 24 Stunden erwartungsgemäß kaum eine Veränderung gegenüber der Kontrolle herausgestellt werden. Nach 72 und 120 Stunden wurde eine Vergleichbarkeit die Ergebnisse für Elastin mit dem dermagold erreicht. Kollagen hingegen zeigte zu den genannten Zeitpunkten nur durch diese intensive Behandlung einen signifikanten Wert. Der zum letzten Messzeitpunkt dargestellte Einfluss auf die Hyaluronsäure liegt zwischen den dermagold und PiezoWave Werten der niedrigen Energieflussdichte.

Insgesamt kann damit der geringe Einfluss auf Kollagen, der nur mit hohen Energieflussdichten gesteigert wurde, bestätigt werden. Elastin weist durchweg das beste Ansprechen auf die Stoßwellenbehandlung auf. Eine Steigerung der Hyaluronsäuresekretion zu früheren Zeitpunkten und durch andere Hyaluronsäuresynthasen, außer der in der Expression getesteten HAS2, scheint nicht vorzuliegen, da die Erhöhung der Hyaluronsäure ausschließlich zum Ende des Beobachtungszeitraumes sichtbar war.

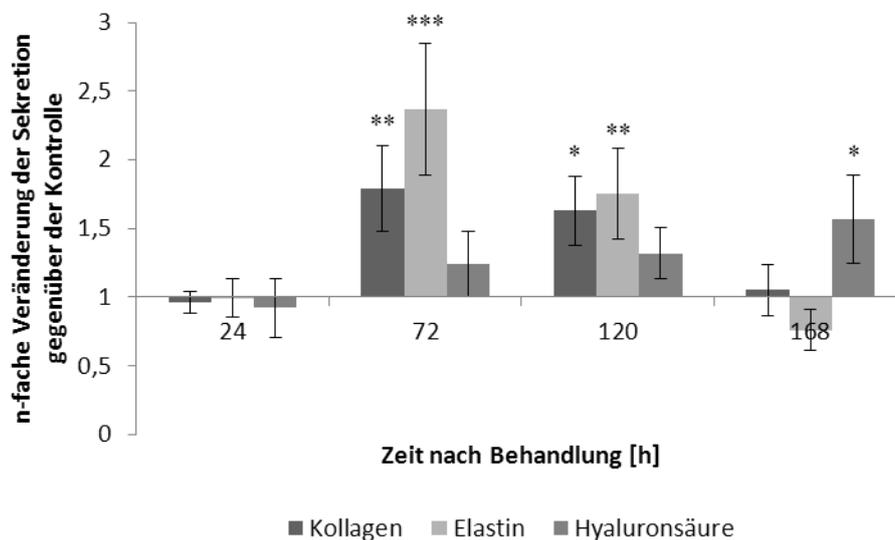


Abbildung 4.35 Sekretionsanalyse und Darstellung der n-fachen Expression gegenüber der Kontrolle nach Behandlung mit dem PiezoWave: 1000 Impulse, Energiestufe 10, Abstand 5,5 cm. Akkumulierte Energieflussdichte: 7,59 mJ/mm². (n=3; Mittelwerte ± SD; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

4.1.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der in-vitro Experimente

Insgesamt lässt sich die Wirkung von Stoßwellen auf Fibroblasten in-vitro in frühe und späte Effekte unterteilen. Zu den sofortigen Reaktionen der Zellen auf die Behandlung kann die, durch Verwendung des PiezoWaves, nachgewiesene Migration genannt werden. Der Effekt war weniger stark, als durch den Einfluss von PDGF, aber dennoch deutlich sichtbar. Aufgrund der Einwirkung der Energie wurde als sofortige Reaktion häufig eine Ablösung der Zellen von den Kulturschalen beobachtet, welche die Ergebnisse beeinflussen konnte. In der Analyse der Proliferation wurde mit Hilfe des MTT Assays eine Erhöhung der metabolischen Aktivität gesehen. Die Expression von Elastin zeigte bei der akkumulierten Energieflussdichte um 2 mJ/mm^2 ein zügiges Ansprechen.

Bei den verzögert sichtbaren Reaktionen ist eine leichte, aber nicht signifikante Erhöhung der Proteinbiosynthese zu nennen. Die Proliferation konnte durch eine ausgeprägte Reduktion der Verdopplungszeit gesteigert werden. In der Expression wurde der Einfluss auf die Hyaluronsäuresynthese und Fibronectin ebenfalls erst nach einigen Tagen gesehen. Die Sekretion von Kollagen, Elastin und Hyaluronsäure folgte weitgehend dem Expressionsmuster.

Mit jeweils optimierten Parametern ließ sich der Unterschied zwischen den Geräten nur in der genetischen Expression explizit herausstellen. Für die Proliferation wurde eine Vergleichbarkeit der Effekte über die Energieflussdichte ermittelt. Der positive Effekt auf die Proliferation, der bei Verwendung des PiezoWave außerhalb des Fokus erreicht wurde, da bei niedriger Energieflussdichte weniger Zellverlust zu sehen war, konnte in der Analyse der Genexpression nicht erhalten werden. Der Vorteil ergab sich dort eher für die Behandlung in der Nähe des Fokus. Eine derart starke Differenzierung aufgrund der Abstände der Probe zur Stoßwellenquelle war für das dermagold Gerät nicht messbar. Die Werte der Proliferations- und Expressionsbestimmung wiesen bei denselben Einstellungen die besten Werte auf. Darüber hinaus konnte keine signifikante Verbesserung durch Erhöhung der Energieflussdichte erreicht werden.

4.2 Analytik der Hyaluronsäure

Die in der durchgeführten Studie (Kapitel 4.3) verwendete Hyaluronsäure wurde anhand der Kapillarelektrophorese und Rheologie untersucht. Dadurch war über eine Analyse der Molekülgröße, welche sich aufgrund von Spaltungen nach Stoßwellenapplikation verändern kann, auch die Quantifizierung und Reinheitsprüfung möglich.

In der Kapillarelektrophorese wurde die Hyaluronsäure über die unterschiedlichen Beweglichkeiten in der Kapillare von möglichen Verunreinigungen befreit, welche durch den biotechnologischen Herstellungsprozess enthalten sein könnten. Die Ergebnisse wurden durch rheologische Untersuchungen unterstützt, die eine sensiblere Bestimmung der Spaltung von Hyaluronsäure zu abweichenden molaren Gewichten zulassen.

4.2.1 Kapillarelektrophoretische Analytik der Hyaluronsäure

Methodenentwicklung

Bei der Entwicklung der Methode zeigte sich zunächst eine anhaltende Verschiebung der Retentionszeiten mit jedem Lauf. Aufgrund dieser Problematik wurde während der Methodenentwicklung ständig auf die Stabilität der Zeiten geachtet. Durch Konditionierung der Kapillarwand, die über einen Spülschritt mit Natronlauge vor jedem Lauf durchgeführt wurde, konnte das Problem behoben werden. Ablagerungen an den Silanolgruppen, die zu einer Reduktion des EOF führten, wurden dadurch minimiert. Des Weiteren wurde aus dem Replenishment-System für jeden Lauf frischer Puffer zur Verfügung gestellt. Dadurch konnte eine Methode entwickelt werden, die sehr beständige Werte für die Migrationszeit lieferte. Die Validierung für die Quantifizierung der Hyaluronsäure über die Integration der Peaks wurde nach der genannten Optimierung durchgeführt.

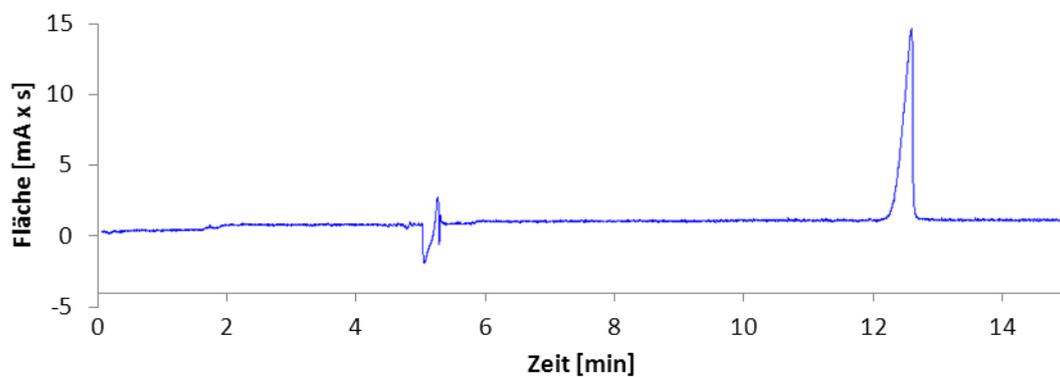
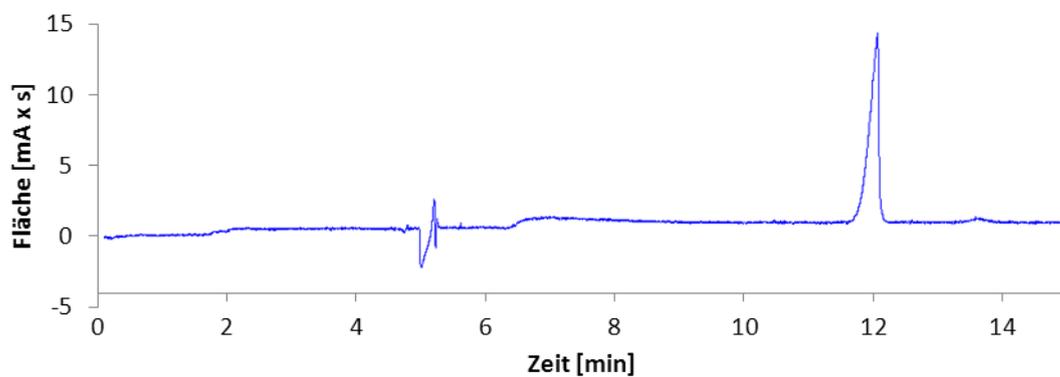
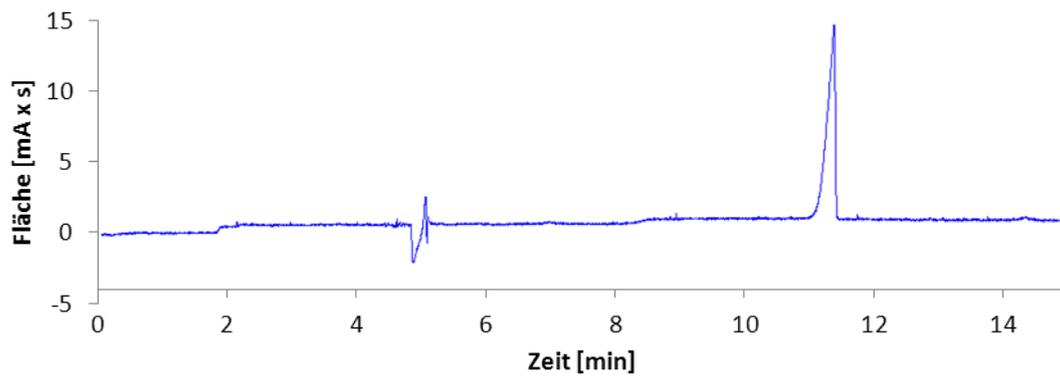


Abbildung 4.36 Verschiebung der Retentionszeiten von drei direkt aufeinander folgenden Injektionen aus dem gleichen Vial als Hauptproblematik während der Methodenentwicklung. Die schlechte Wechselwirkung mit den Silanolgruppen der Kapillarwand ist außerdem anhand des Frontings des Peaks zu sehen.

Validierung

Es wurde die Vergleichs- und Messpräzision sowie die Linearität der entwickelten Methode validiert. Die dabei ermittelten Werte und die statistische Auswertung sind aus den folgenden Tabellen ersichtlich. Mit Werten unterhalb

von 2% zeigten die Variationskoeffizienten eine hohe Stabilität des Systems. Dies konnte durch geringe Standardabweichungen in der Linearitätsanalyse bestätigt werden.

Tabelle 4.4 Bestimmung der Vergleichspräzision durch einfache Injektion sechs unabhängig voneinander hergestellter Proben der Konzentration 200 µg/mL

Probe	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Fläche [mAU x s]	119,42	122,26	118,75	117,83	121,87	124,03
Auswertung						
	Mittelwert:			120,69		
	Standardabweichung:			2,39		
	Variationskoeffizient:			1,98%		
	Vertrauensbereich (95%):			120,69 ± 2,51		
	Normalverteilung nach David*:			ja (2,59)		
	Ausreißer nach Dixon*:			nein (0,184; 0,354)		
	Ausreißer nach Grubbs*:			nein (1,197; 1,397)		

Tabelle 4.5 Bestimmung der Messpräzision durch sechsfache Injektion einer Probe der Konzentration 200 µg/mL

Messung	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Fläche [mAU x s]	119,42	117,82	115,29	115,43	118,67	119,86
Auswertung						
	Mittelwert:			117,75		
	Standardabweichung:			1,98		
	Variationskoeffizient:			1,68%		
	Vertrauensbereich (95%):			117,75 ± 2,08		
	Normalverteilung nach David*:			ja (2,31)		
	Ausreißer nach Dixon*:			nein (0,028; 0,048)		
	Ausreißer nach Grubbs*:			nein (1,171; 1,066)		

*Für den Schnelltest auf Normalverteilung nach David sind bei einer Wahrscheinlichkeit von 99% die Grenzen 2,15 nach unten und 3,16 nach oben vorgegeben.

Beim Ausreißertest nach Dixon ist für die Wahrscheinlichkeit von 99% ein oberer Grenzwert von 0,698 tabelliert. Für den Test von Grubbs gilt bei einer Wahrscheinlichkeit von 95% ein Grenzwert von 1,822.

Bei allen Tests war der Stichprobenumfang n=6.

Tabelle 4.6 Bestimmung der Linearität durch jeweils dreifache Injektion von fünf Proben mit unterschiedlichen Konzentrationsniveaus

Konzentration [µg/mL]	Fläche [mAU x s]			Statistik	
	1.Messung	2.Messung	3.Messung	Mittelwert	Standard- abweichung
100	65,53	64,38	67,92	65,94	1,81
200	119,42	117,82	115,29	117,51	2,08
300	176,13	174,94	178,45	176,51	1,79
400	219,73	214,77	217,02	217,17	2,48
500	275,06	272,92	272,19	273,39	1,49

Aus den Messungen zur Linearitätsbestimmung, welche in Tabelle 4.6 gezeigt sind, konnte die in Abbildung 4.37 dargestellte lineare Regression gebildet werden.

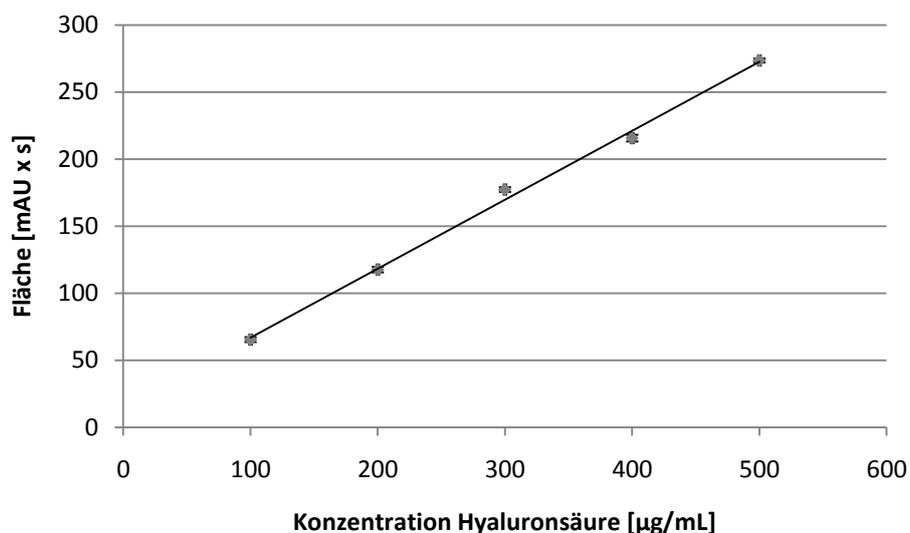


Abbildung 4.37 Lineare Regression der Gleichung $f(x)=0,515x+15,738$ für die Quantifizierung der Hyaluronsäure. (n=3; Mittelwerte \pm SD)

Die Anwendbarkeit der linearen Regression wurde mit Hilfe des Mandel-Tests geprüft, wobei ein Vergleich mit der quadratischen Regression stattfand. Da kein signifikanter Unterschied zwischen den Modellen nachzuweisen war, wurde in den weiteren Schritten für die Gehaltsbestimmung das lineare Modell verwendet. In Tabelle 4.7 sind die durch Dintest berechneten Parameter für die lineare Regression aufgelistet.

Tabelle 4.7 Parameter und statistische Eigenschaften der linearen Regression

Steigung a:	0,515
Achsenabschnitt b:	15,738
Korrelationskoeffizient r:	0,9986
Bestimmtheitsmaß R ² :	0,9972
Reststandardabweichung S _y :	4,188
Verfahrensstandardabweichung S _x :	8,140
Prüfwert nach Mandel*:	0,99

Die validierte Methode zeigte Migrationszeiten bei 9 Minuten, wodurch gute Laufzeiten von 15 Minuten pro Analyse erreicht werden konnten. Durch die eingeführte Konditionierung konnte auch die Peaksymmetrie verbessert und das Fronting verhindert werden.

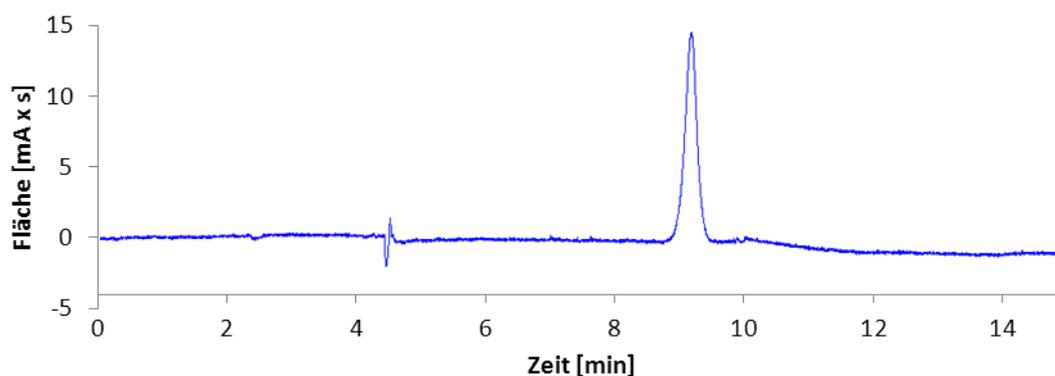


Abbildung 4.38 Beispiellauf der validierten Methode der Hyaluronsäurequantifizierung.

Analytik der mit Stoßwellen behandelten Hyaluronsäure

Die elektrophoretische Auftrennung der Hyaluronsäure von Sanofi Aventis wies in allen Analysen nur einen Peak auf, was auf eine hohe Reinheit schließen lässt. Für die zweite in dieser Arbeit verwendete Hyaluronsäure von Orthomol konnten Verunreinigungen nachgewiesen werden, welche aufgrund der Absorptionsmessung bei 260 nm Nucleinsäuren sein könnten.

*Prüfwert mit dem aus den Einzelwerten der Regression bestimmtem F-Wert zu vergleichen: F(P=99%, f₁=1, f₂=12): 9,33

Sie wurde allerdings nur für analytische Zwecke in der Rheologie verwendet, wodurch die Verunreinigung keinen weiteren Einfluss auf die hier gezeigten Ergebnisse und die Studie hat.

Die Hyaluronsäure wurde nach Behandlung der Proben mit Hilfe der erstellten Regression nach Messung der Peakflächen quantifiziert. Eine Negativkontrolle wurde ebenfalls untersucht.

Tabelle 4.8 Aus dem Mittelwert der Peakflächen errechneter Gehalt der Hyaluronsäure nach Stoßwellenbehandlung auf der Folie

Probenbehandlung				Errechneter
Applikator	Impulse	Intensität	Fläche [mA x s]	Gehalt [$\mu\text{g/mL}$]
FP4	1000	10	223,98 \pm 2,11	404
FP4	1000	20	220,98 \pm 1,89	399
FP4	2500	10	222,74 \pm 2,24	402
FP4	2500	20	217,96 \pm 2,05	393
F7G3	1000	10	217,34 \pm 1,73	391
F7G3	1000	20	220,35 \pm 1,54	397
F7G3	2500	10	221,36 \pm 1,96	399
F7G3	2500	20	219,58 \pm 1,82	396
Unbehandelte Kontrolle			218,44 \pm 1,91	394

Tabelle 4.9 Aus dem Mittelwert der Peakflächen errechneter Gehalt der Hyaluronsäure nach Stoßwellenbehandlung auf der Platte

Probenbehandlung				Errechneter
Applikator	Impulse	Intensität	Fläche [mA x s]	Gehalt [$\mu\text{g/mL}$]
FP4	1000	10	217,04 \pm 1,68	391
FP4	1000	20	220,53 \pm 2,36	398
FP4	2500	10	219,77 \pm 2,09	396
FP4	2500	20	222,06 \pm 2,17	401
F7G3	1000	10	218,96 \pm 1,77	395
F7G3	1000	20	221,60 \pm 1,98	400
F7G3	2500	10	221,63 \pm 1,80	400
F7G3	2500	20	217,86 \pm 2,26	392
Unbehandelte Kontrolle			218,44 \pm 1,91	394

Aus dem jeweils berechneten Gehalt ist erkennbar, dass keine signifikanten Abweichungen durch die Behandlung mit der Stoßwelle entstehen. Es wurde auf Normalverteilung getestet, was bestanden wurde. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Streuung der Analyseergebnisse durch die Methode begründet ist. Eine Zerstörung, die auch zu einem Abbau der Chromophore der Hyaluronsäure führt, kann damit ausgeschlossen werden. Die Migrationszeiten zeigten außerdem Stabilität für alle durchgeführten Analysen, wodurch eine starke Reduktion der Molmasse von Hyaluronsäure durch die Behandlung mit Stoßwellen ebenfalls ausgeschlossen werden kann.

4.2.2 Rheologische Analytik der Hyaluronsäure

Publizierte Methoden zur Bestimmung der Molmasse von Hyaluronsäure unterscheiden sich sowohl in der Wahl des Viskosimeters und der Durchführung [120-124], als auch in den ermittelten Werten K und α der Mark-Houwink-Gleichung. Daher wurden die Werte für das Hyaluronsäure-Puffer-System eigenständig mit Hilfe eines Platte-Kegel-Rheometers bestimmt. Damit sind Messungen bei verschiedenen Schergeschwindigkeiten möglich.

Tabelle 4.10 Variation der K und α Werte der Mark-Houwink-Gleichung in verschiedenen Literaturquellen. Die Spannen einzelner Quellen ergeben sich durch Messungen mit unterschiedlichen Molekularmassen der Hyaluronsäure.

K-Wert [$\times 10^{-4}$ dL/g]	α-Wert	Literaturquelle
0,35-3,97	0,601-0,779	[120]
1,99	0,829	[121]
12,9-395	0,604-1,056	[122]
7,3	0,720	[123]
5,5	0,721	[124]

Einfluss der Schergeschwindigkeit auf die Viskosität

Durch die Aufnahme von 25 Messpunkten konnte gezeigt werden, dass die hergestellten Hyaluronsäurelösungen kein Newtonsches Fließverhalten aufwiesen. Mit Zunahme der Scherrate wurde eine Abnahme der Viskosität η beobachtet, welche sich asymptotisch der Abszissenachse annäherte.

Gegenläufig verhielt sich die Schubspannung τ . Das in Abbildung 4.39 gezeigte pseudoplastische Fließverhalten ist charakteristisch für eine Lösung von Makromolekülen, wie sie hier vorlag.

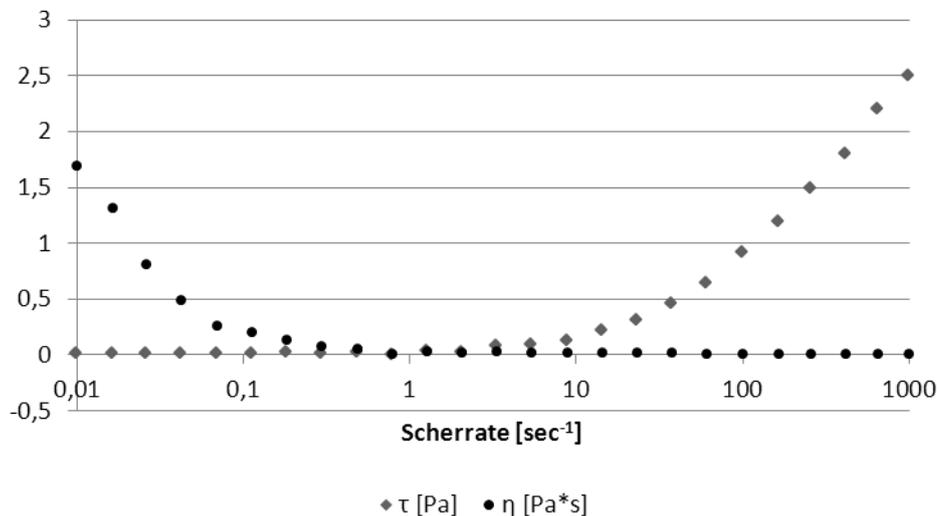


Abbildung 4.39 Veränderung der Viskosität η und Schubspannung τ bei der Aufnahme von 25 Messpunkten einer 0,05%igen Hyaluronsäurelösung (1200 kDa).

Folglich musste für die weitere Bestimmung der Grenzviskosität $[\eta]$ bei konstanter Schergeschwindigkeit gearbeitet werden. Durch die Vermessung bei verschiedenen Scherraten zeigte sich, dass nur höhere Schergeschwindigkeiten für die Ermittlung der Grenzviskosität $[\eta]$ verwendbar waren. Betrachtet man zunächst für die Hyaluronsäure der Molekülgröße 1200 kDa die Ergebnisse der Scherraten 1 sec^{-1} und 10 sec^{-1} (Abbildung 4.40), erkennt man, dass keine lineare Regression dem Verlauf der Messpunkte folgen würde. Des Weiteren würde dadurch eine negative Grenzviskosität resultieren. Bei den Schergeschwindigkeiten 100 sec^{-1} und 1000 sec^{-1} (Abbildung 4.41) konnte dagegen ein linearer Zusammenhang hergestellt werden. Die zweite verwendete Hyaluronsäurequalität der Größe 300 kDa wurde ebenfalls mit den genannten Schergeschwindigkeiten vermessen, wobei sich ein vergleichbares Verhalten zeigte. Daher wurden für die weitere Auswertung auch hier die Werte, die sich aus den Scherraten 100 sec^{-1} und 1000 sec^{-1} ergaben eingesetzt (Abbildung 4.42).

Bestimmung der Grenzviskosität, sowie der Faktoren K und α

Die Grenzviskosität $[\eta]$ wurde nach dem Verfahren von Huggins [125] ermittelt. Dafür wurden die gemessenen Viskositätswerte der Analysen auf die Viskosität des reinen Puffers bezogen. Die dadurch erhaltene spezifische Viskosität η_{sp} wurde anschließend durch die Konzentration der Hyaluronsäurelösung $[\text{g}/100\text{cm}^3]$ geteilt und gegen die Konzentration der Hyaluronsäurelösung $[\text{g}/\text{dL}]$ aufgetragen. Die Extrapolation der Werte auf die Ordinate lieferte die Grenzviskosität $[\eta]$.

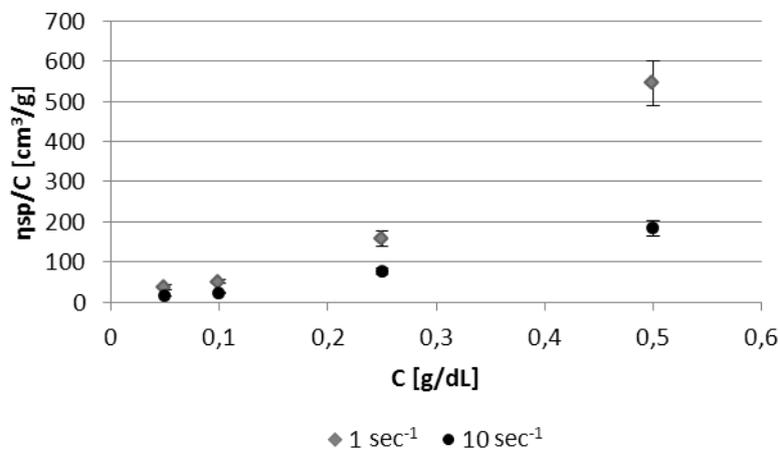


Abbildung 4.40 Ermittlung der Grenzviskosität für Hyaluronsäure 1200 kDa bei den Schergeschwindigkeiten 1 sec^{-1} und 10 sec^{-1} . Lineare Regression nicht möglich. (n=3; Mittelwerte \pm SD)

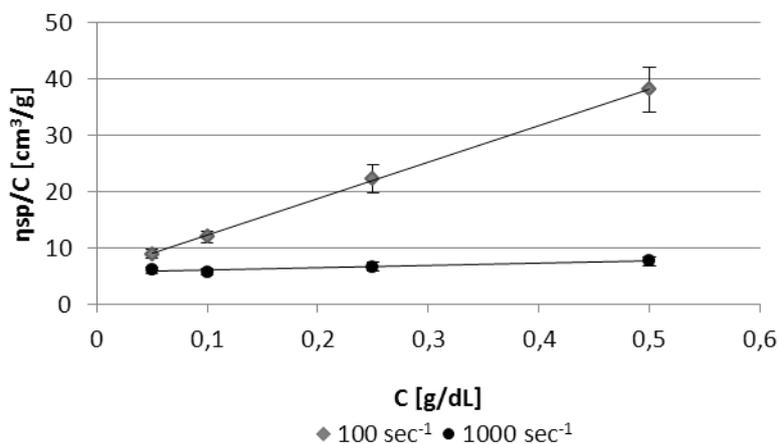


Abbildung 4.41 Ermittlung der Grenzviskosität für Hyaluronsäure 1200 kDa bei den Schergeschwindigkeiten 100 sec^{-1} und 1000 sec^{-1} . Lineare Regression möglich. (n=3; Mittelwerte \pm SD)

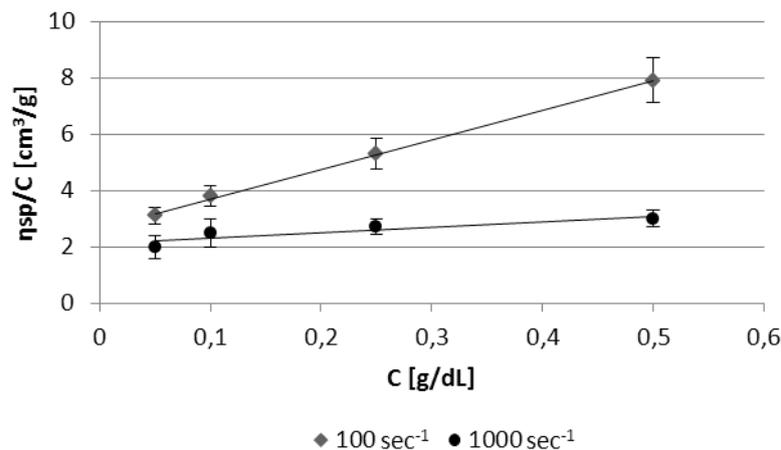


Abbildung 4.42 Ermittlung der Grenzviskosität für Hyaluronsäure 300 kDa bei den Schergeschwindigkeiten 100 sec⁻¹ und 1000 sec⁻¹. Lineare Regression möglich. (n=3; Mittelwerte ± SD)

Die gemittelten Grenzviskositäten $[\eta]$ aus Tabelle 4.11 Grenzviskositäten beider Hyaluronsäurequalitäten wurden für die Berechnung des α Wertes verwendet. Dafür wurde die Gleichung von Mark-Houwink umgestellt, so dass aus beiden Molmassen und Grenzviskositäten $[\eta]$ zunächst α bestimmt werden konnte. Mit Kenntnis dieses Wertes wurde im Anschluss die zweite Konstante K berechnet. Für α ergab sich ein Wert von 0,644. Für K wurde ein Faktor von $6,79 \times 10^{-4}$ dL/g berechnet.

Tabelle 4.11 Grenzviskositäten beider Hyaluronsäurequalitäten

Scherrate [sec ⁻¹]	Grenzviskosität $[\eta]$	
	1200 kDa	300 kDa
100	5,68	2,66
1000	5,56	2,13
Mittelwert	5,62	2,30

Veränderung der molekularen Masse

Durch die Messung der Grenzviskositäten $[\eta]$ der mit Stoßwellen behandelten Proben und Einsetzen der Faktoren K und α in die Mark-Houwink-Gleichung, konnte ein Rückschluss auf die molekulare Masse der Hyaluronsäure gezogen werden. In Tabelle 4.12 und Tabelle 4.13 sind die durch den Mittelwert aus drei

Grenzviskositätsbestimmungen berechneten Molmassen der Proben nach Behandlungen auf der Folie und auf der Platte dargestellt.

Tabelle 4.12 Grenzviskosität und daraus errechnete mittlere Molmasse der Hyaluronsäure nach Stoßwellenbehandlung auf der Folie. (n=3; Mittelwerte \pm SD; *p<0,05; ***p<0,001)

Probenbehandlung				Errechnete mittlere Molmasse [kDa]
Applikator	Impulse	Intensität	Grenzviskosität [η]	
FP4	1000	10	5,71 \pm 0,18	1230
FP4	1000	20	5,54 \pm 0,19	1174
FP4	2500	10	5,60 \pm 0,16	1193
FP4	2500	20	5,64 \pm 0,11	1207
F7G3	1000	10	5,57 \pm 0,19	1184
F7G3	1000	20	5,42 \pm 0,16	1135
F7G3	2500	10	5,14 \pm 0,14*	1045
F7G3	2500	20	4,21 \pm 0,24***	767
Unbehandelte Kontrolle			5,62 \pm 0,15	1200

Tabelle 4.13 Grenzviskosität und daraus errechnete mittlere Molmasse der Hyaluronsäure nach Stoßwellenbehandlung auf der Platte. (n=3; Mittelwerte \pm SD; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,01)

Probenbehandlung				Errechnete mittlere Molmasse [kDa]
Applikator	Impulse	Intensität	Grenzviskosität [η]	
FP4	1000	10	5,55 \pm 0,17	1177
FP4	1000	20	5,69 \pm 0,12	1223
FP4	2500	10	5,58 \pm 0,18	1187
FP4	2500	20	5,70 \pm 0,17	1227
F7G3	1000	10	5,67 \pm 0,15	1217
F7G3	1000	20	5,28 \pm 0,12*	1089
F7G3	2500	10	4,98 \pm 0,14**	995
F7G3	2500	20	4,03 \pm 0,18***	716
Unbehandelte Kontrolle			5,62 \pm 0,15	1200

Bei einer Auftragung der mittleren Molmasse gegen die, durch die fokussierte Stoßwellenquelle F7F3 applizierte, akkumulierte Energieflussdichte der -6dB Zone, wird deutlich, dass die Spaltung der Hyaluronsäure bei Werten um

400 mJ/mm² beginnt. Dabei ist der Effekt trotz nahezu ähnlicher akkumulierter Energieflussdichten bei 2500 Impulsen der Stufe 10 ausgeprägter als bei 1000 Impulsen der Stufe 20. Mit den Energieeinträgen der planaren Quelle FP4 ist aufgrund der deutlich geringeren Energieflussdichte, welche bei der Energiestufe 20 und 2500 applizierten Stößen 150 mJ/mm² beträgt, keine Spaltung der Hyaluronsäure zu beobachten.

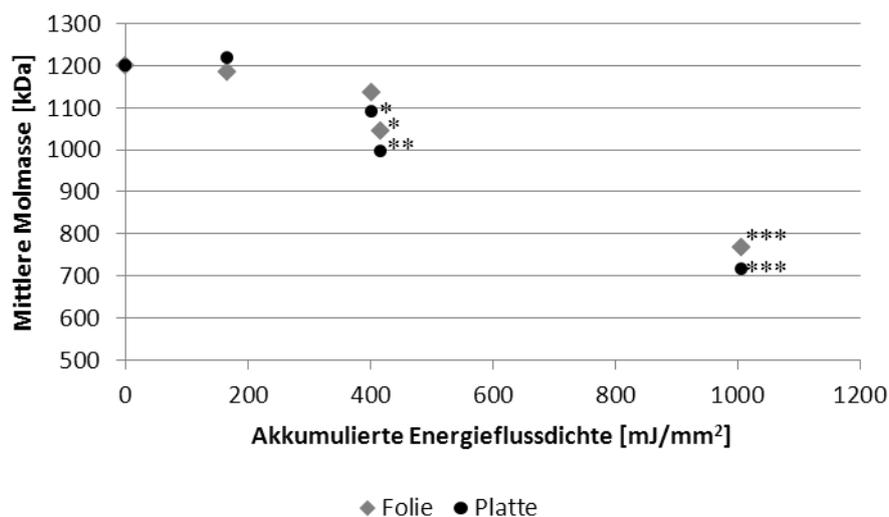


Abbildung 4.43 Berechnete mittlere Molmasse in Abhängigkeit von der akkumulierten Energieflussdichte. Daten für die Energieflussdichte pro Impuls: F7G3 (Intensität 10): 0,167 mJ/mm², F7G3 (Intensität 20): 0,403 mJ/mm². Quelle: [126]. (n=3; Mittelwerte ± SD; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,01)

4.2.3 Ergebnisse der Hyaluronsäureanalytik

Die Kapillarelektrophorese kann einen starken Abbau oder eine Zerstörung der Hyaluronsäure erfassen. Die Integrationswerte der Peaks und die Migrationszeiten blieben über alle Analysen hinweg konstant, so dass hier davon ausgegangen werden kann, dass die Struktur durch die Behandlung weitgehend erhalten blieb und kein Abbau zu sehr kleinen Hyaluronsäurefragmenten stattgefunden haben kann. Weitere Peaks oder Absorptionen bei den Referenzwellenlängen wurden nicht beobachtet, was für eine hohe Reinheit der Substanz spricht.

Die weiterführende rheologische Analytik konnte jedoch einen Nachweis für die Spaltung des Polymers erbringen. Bei hohen Intensitäten und Stoßzahlen,

welche mit dem fokussierten Applikator eingebracht wurden, ist eine Reduktion der Viskosität signifikant sichtbar. Dieser Effekt war bei dem Versuchsaufbau der Beschallung auf der Platte eher erkennbar als bei der Folie. Die dabei applizierte Gesamtenergie lag jedoch weit über den Anwendungsempfehlungen und den in der Studie verwendeten Einstellungen. Dort beträgt die maximale akkumulierte Energieflussdichte für den Applikator F7G3 $72,75 \text{ mJ/mm}^2$ und 60 mJ/mm^2 für den Applikator FP4. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die während der Studie applizierte Hyaluronsäure, bei den dort verwendeten Behandlungsparametern, keinem negativen Einfluss durch die Stoßwellenbehandlung unterliegt.

4.3 Auswertung der Studie

Die mit Hilfe der PRIMOS lite Software vorbereiteten Bilder wurden für alle weiteren Auswertungsschritte verwendet. Dabei wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewendet, auf deren Grundlage sowohl die einzelnen Falten als auch die gesamte Oberflächenveränderung analysiert wurden, womit eine breite Aussage über den Effekt von Stoßwellen auf die Haut möglich ist.

4.3.1 Faltenanalyse

Die Faltenanalyse grenzt anhand der Mikrostruktur der Haut Falten ein, deren Charakteristik im Anschluss einzeln berechnet werden kann. Für jede Falte konnten somit die mittlere Faltentiefe, maximale Faltentiefe, Faltenlänge sowie das Faltenvolumen errechnet werden. Auf diese Weise wurden einzelne und tiefe Falten berücksichtigt, welche häufig stark durch die Mimik geprägt sind.

Für jede Person wurden in den Periorbitalregionen jeweils drei Falten und auf der Stirn die zwei Zornesfalten ausgewählt und auf die genannte Weise berechnet. Der Mittelwert jeder Region wurde gebildet und mit den Mittelwerten der gleichen Region anderer Gruppenmitglieder zu einem Gruppenergebnis zusammengefasst. Die Berechnung der Faltentiefen erfolgte in μm , die Länge wurde in mm berechnet und für das Volumen die Einheit mm^3 gewählt.

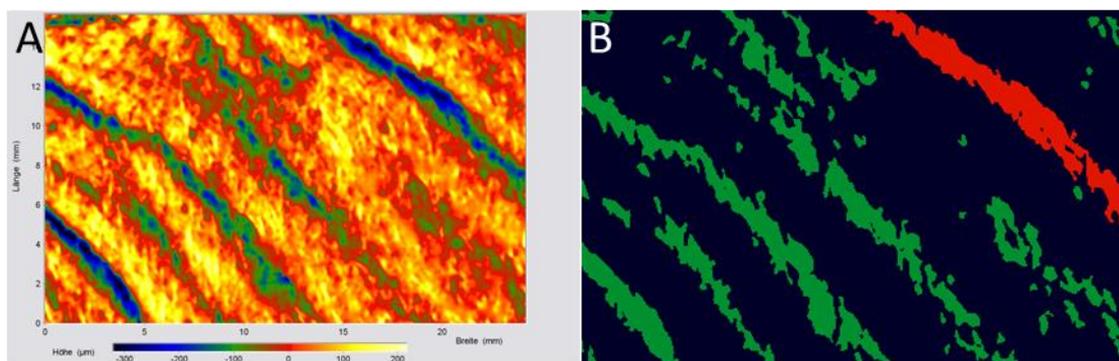


Abbildung 4.44 Faltenanalyse mit der PRIMOS lite Software. A) Höhenprofil der Mikrostruktur von Falten der Periorbitalregion. B) Daraus abgegrenzte und unterteilte Falten, welche einzeln analysiert wurden. Die für den folgenden Berechnungsschritt markierte Falte ist in Rot dargestellt.

Damit jedoch ein Vergleich der Probanden einer Gruppe sowie der Vergleich der Gruppen, trotz interindividuell stark variierenden, absoluten Messgrößen möglich war, werden in der Darstellung der Ergebnisse alle Veränderungen in relativer Abweichung vom gemessenen Ausgangswert [%] angegeben. Statistische Vergleiche erfolgten zwischen den jeweiligen Gruppenmittelwerten.

4.3.2 Rauheitsparameter

Die zweite verwendete Auswertemethode beruht auf einem Schnitt der quer zu den Falten durch das erstellte Höhenbild gelegt wurde (Abbildung 4.45). Die Schnittlinie zeigt ein Höhenprofil über mehrere Falten und bildet dadurch auch feine Abweichungen ab. Somit konnte zusätzlich zu einzelnen tiefen Falten auch die Veränderung der gesamten Oberfläche dokumentiert werden. Dabei wurde aus dem gemessenen Ausgangsprofil, unter Berücksichtigung des groben Welligkeitsprofils, ein reines Rauheitsprofil erstellt, welches auch feine Höhenunterschiede darstellt (Abbildung 4.46).

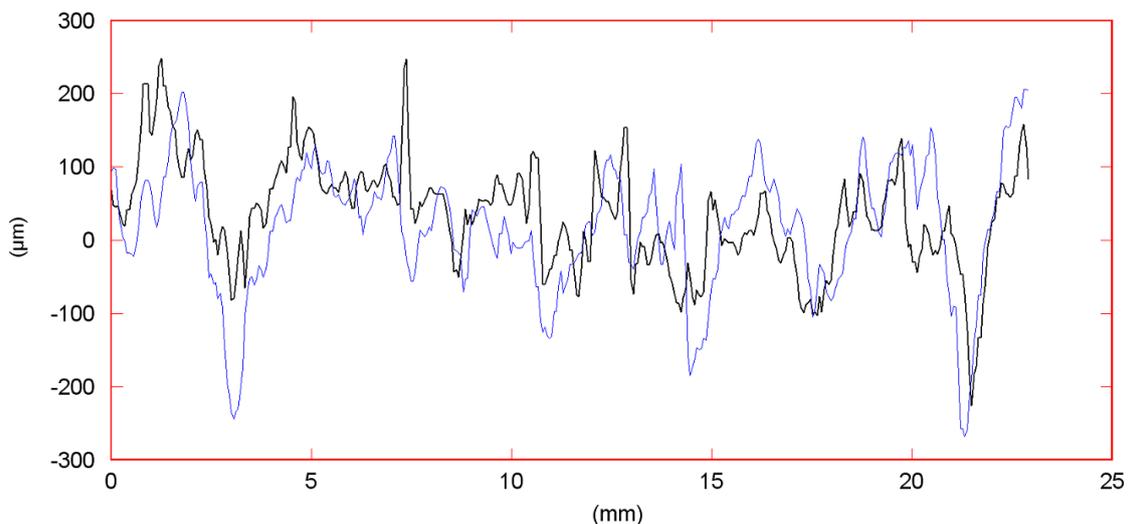


Abbildung 4.45 Höhenprofil von Falten der Periorbitalregion. Zur Erstellung wurde das in Abbildung 4.44 verwendete Höhenprofil eingesetzt. Der blaue Verlauf wurde zu Beginn der Studie gemessen. Der Schwarze 4 Wochen nach Studienstart.

Anhand des Rauigkeitsprofils konnte eine Vielzahl von Rauheitsparametern berechnet werden. Für die Auswertung der Studie werden im Folgenden der arithmetische Mittenrauhwert R_a und die maximale Rauhtiefe R_{max} angegeben.

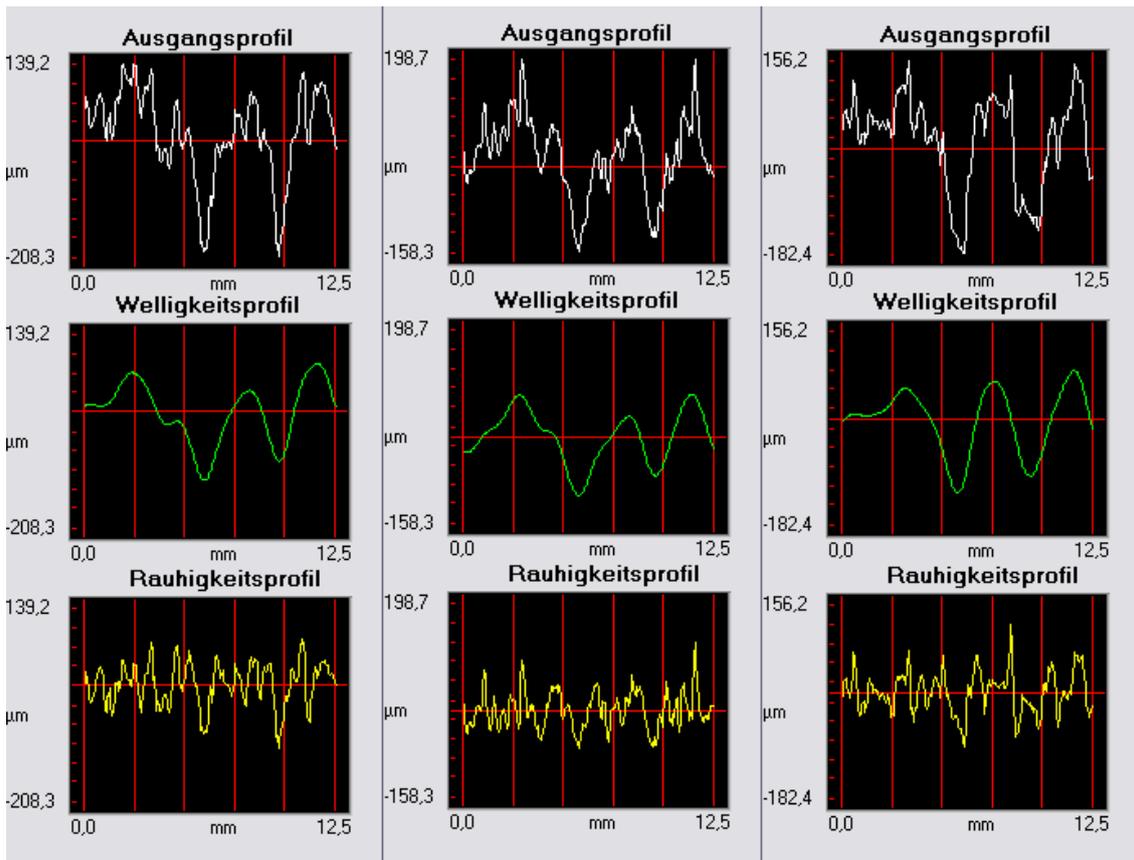


Abbildung 4.46 Schnittbilder von drei parallel laufenden Linien und Unterteilung in Ausgangs-, Welligkeits- und Rauheitsprofil. Zur Auswertung wurde das in Abbildung 4.44 verwendete Höhenprofil eingesetzt.

In jedes Höhenbild wurden drei, im Abstand von 1 mm parallel laufende, Schnittlinien gelegt. Die für jede Linie erhaltenen Rauheitswerte wurden gemittelt und mit den Mittelwerten anderer Gruppenmitglieder zu einem Mittelwert der Gruppe zusammengefasst. Die weitere Auswertung erfolgte wie in der Faltenanalyse in relativen Abweichungen vom Ausgangswert.

4.3.3 Ergebnisse der gemessenen Regionen

Da sich die behandelten Regionen Glabella- und Periorbitalbereich in der physiologischen Beschaffenheit der Haut unterscheiden, sowie verschiedene Parameter für die Behandlung der links- und rechtsseitigen Periorbitalregion verwendet wurden (Tabelle 3.19), ist die Auswertung im Folgenden für die einzelnen Regionen unterteilt angegeben. Alle Veränderungen sind als relative Abweichungen gegenüber der Nullmessung zum Zeitpunkt des Studienstarts

angegeben. Statistische Vergleiche sind aufgrund der Übersichtlichkeit in den Grafiken nur im Verhältnis zur Kontrolle dargestellt. Unterschiede der Wirksamkeit zwischen den Gruppen kann den Beschreibungen der Auswertung entnommen werden.

Auswertung der Glabellaregion

Die Ergebnisse der Faltentiefenauswertungen zeigen durchgehend einen signifikanten Vorteil für die Behandlungsgruppe der kombinierten Hyaluronsäure- und Stoßwellenanwendung gegenüber der Kontrolle (Abbildung 4.47 und Abbildung 4.48). Für die anderen Gruppen ist die Tendenz der Verbesserung erkennbar, die einem statistischen Vergleich aber nicht Stand halten kann. Die Reduktion der mittleren Faltentiefe und der mittleren Tiefe der größten Falte in der Hyaluronsäure- und auch der Stoßwellengruppe unterscheidet sich durch die hohe Schwankungsbreite der Messwerte nicht signifikant von der Gruppe der kombinierten Anwendung.

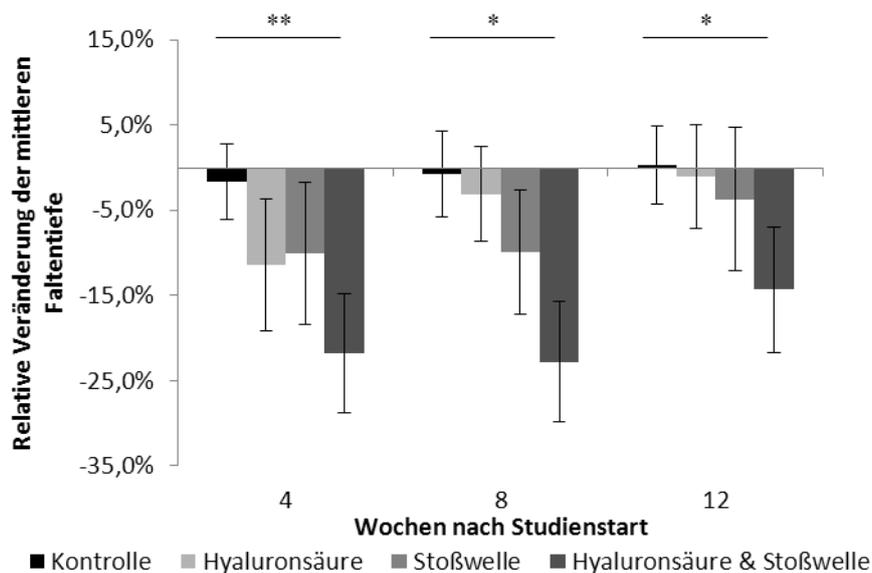


Abbildung 4.47 Veränderung der mittleren Faltentiefe der Glabellaregion angegeben als relative Werte in Abhängigkeit von der Zeit. (n=3; Mittelwerte ± SD; *p<0,05; **p<0,01)

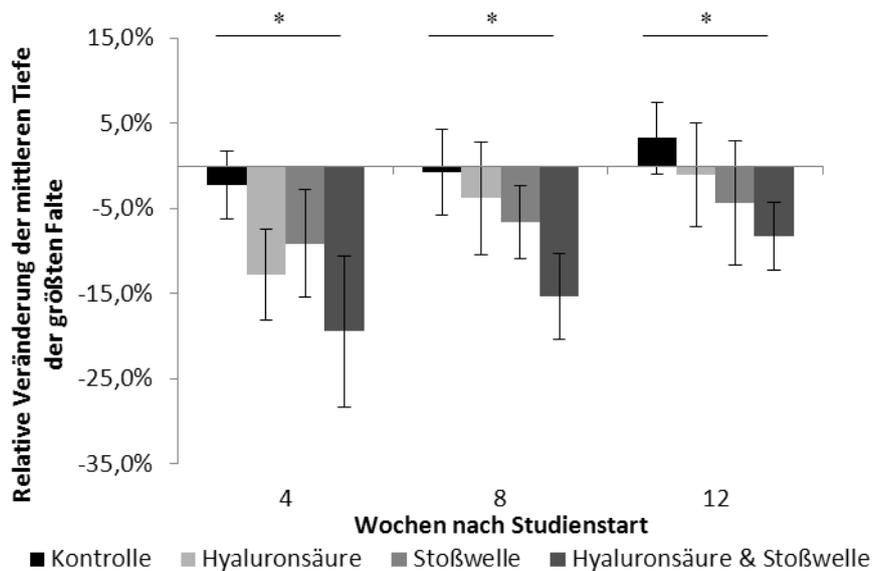


Abbildung 4.48 Veränderung der mittleren Tiefe der größten Falte der Glabellaregion angegeben als relative Werte in Abhängigkeit von der Zeit. (n=3; Mittelwerte \pm SD; *p<0,05)

Das Faltenvolumen und die Faltenlänge konnten, im Gegensatz zu den bei der Faltentiefe gezeigten Ergebnissen, über den gesamten Beobachtungszeitraum sowohl mit der kombinierten Anwendung, als auch durch die alleinige Applikation der Stoßwelle signifikant gesenkt werden (Abbildung 4.49 und Abbildung 4.50). Da die mittlere Faltentiefe in der Berechnung nicht die Faltenfläche einschließt, diese aber beim Vergleich des gesamten Faltenvolumens berücksichtigt wurde, kann somit auf eine Reduktion der Faltenfläche geschlossen werden. Die Hyaluronsäure in der alleinigen Anwendung erzielte in der Volumenmessung nach vier Wochen ebenfalls eine signifikante Verbesserung, welche jedoch bis zur nächsten Messung wieder nachließ.

Der weitere statistische Vergleich der Methoden untereinander konnte eine Überlegenheit der kombinierten Methode gegenüber der Hyaluronsäure für die Faltenlänge und für das Faltenvolumen zeigen ($p < 0,05$ und $p < 0,01$). Darüber hinaus konnte teilweise eine Verbesserung gegenüber der alleinigen Stoßwellenanwendung, insbesondere beim Faltenvolumen nach vier und auch nach zwölf Wochen, gezeigt werden ($p < 0,05$).

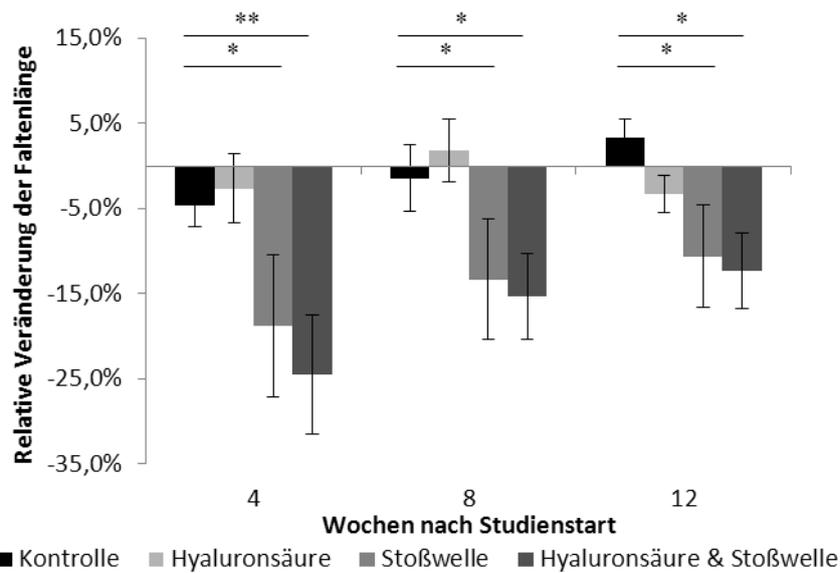


Abbildung 4.49 Veränderung der Faltenlänge der Glabellaregion angegeben als relative Werte in Abhängigkeit von der Zeit. (n=3; Mittelwerte \pm SD; *p<0,05; **p<0,01)

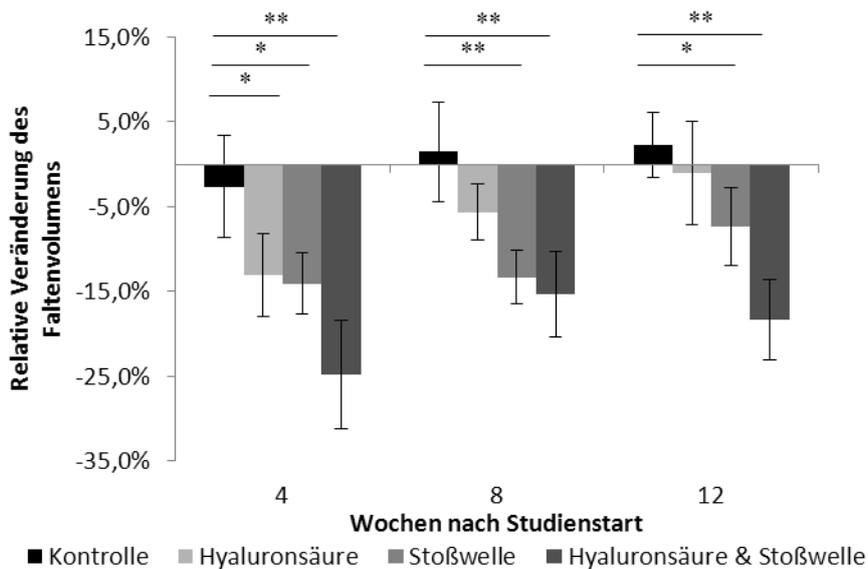


Abbildung 4.50 Veränderung des Faltenvolumens der Glabellaregion angegeben als relative Werte in Abhängigkeit von der Zeit. (n=3; Mittelwerte \pm SD; *p<0,05; **p<0,01)

Alle gemessenen Effekte waren in den Rauheitsparametern ausgeprägter sichtbar. Hier konnte auch in der Hyaluronsäuregruppe, über einen Zeitraum von vier bis acht Wochen, eine Besserung gegenüber der Kontrolle statistisch nachgewiesen werden (Abbildung 4.51 und Abbildung 4.52).

Die kombinierte Behandlungsmethode war in der Messung der maximalen Rauhtiefe über den gesamten Zeitraum nicht nur der Kontrolle, sondern auch der Hyaluronsäure überlegen ($p < 0,05$).

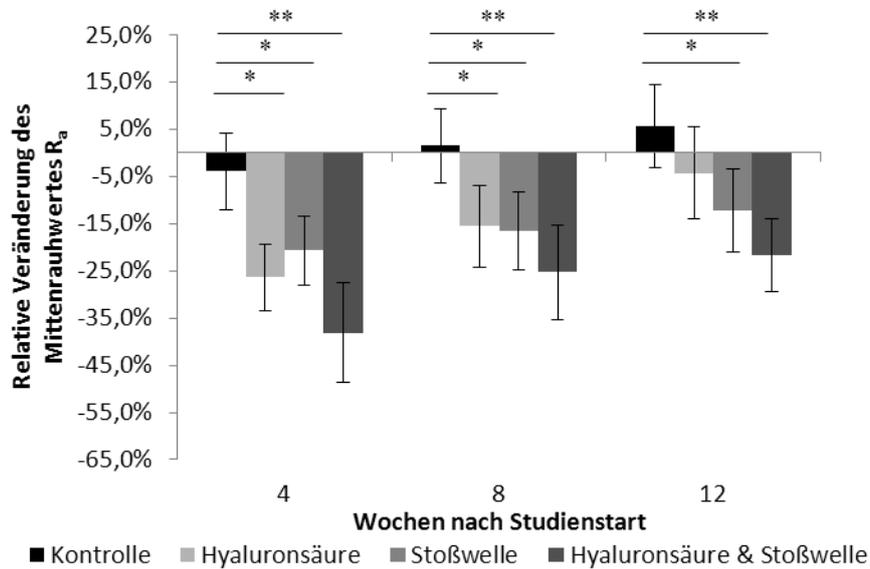


Abbildung 4.51 Veränderung des Mittenrauhwertes der Glabellaregion angegeben als relative Werte in Abhängigkeit von der Zeit. ($n=3$; Mittelwerte \pm SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

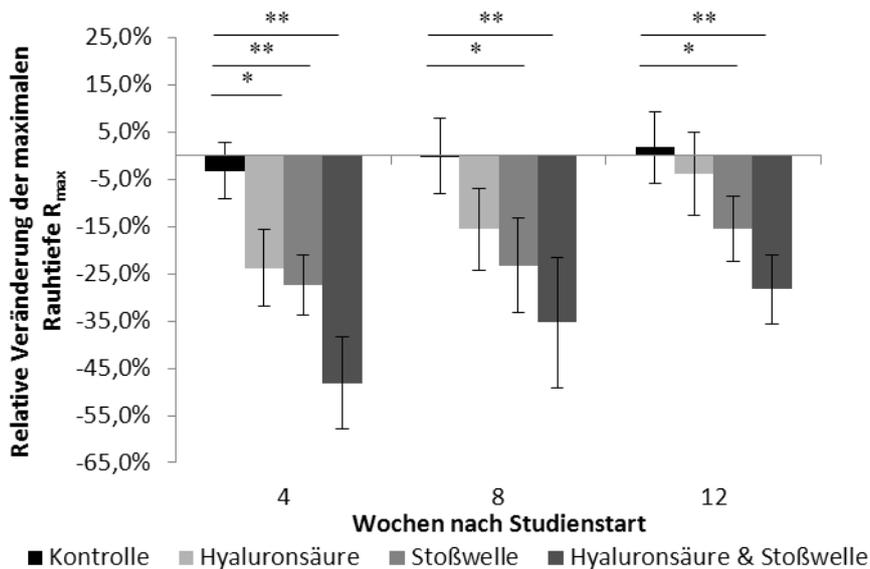


Abbildung 4.52 Veränderung der maximalen Rauhtiefe der Glabellaregion angegeben als relative Werte in Abhängigkeit von der Zeit. ($n=3$; Mittelwerte \pm SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

Auswertung der linken Periorbitalregion

Der bereits in der Auswertung der Glabellaregion gezeigte Vorteil der Gruppe der gemeinschaftlichen Anwendung von Stoßwellen und Hyaluronsäure bezüglich der Faltentiefen, wurde an der linken Periorbitalregion, unter Verwendung des identischen Applikators FP4, bestätigt (Abbildung 4.53 und Abbildung 4.54). Eine Reduktion der Faltentiefen konnte signifikant nur durch die kombinierte Anwendung nachgewiesen werden, während in den anderen Gruppen über acht Wochen eine Verbesserung im Mittel erkennbar, jedoch nicht statistisch belegbar war. Der länger anhaltende Effekt der kombinierten Anwendung gegenüber der einfachen Stoßwellenanwendung war an dieser Region gut sichtbar und wurde auch bei den weiteren, in der Faltenanalyse berechneten Parametern, deutlich.

Eine Signifikanz der kombinierten Methode gegenüber der Hyaluronsäure bestand für beide Auswertungen der Faltentiefe, sowie gegenüber der Stoßwelle in der mittleren Tiefe der größten Falte zu den Zeitpunkten acht und zwölf Wochen nach Studienbeginn ($p < 0,05$).

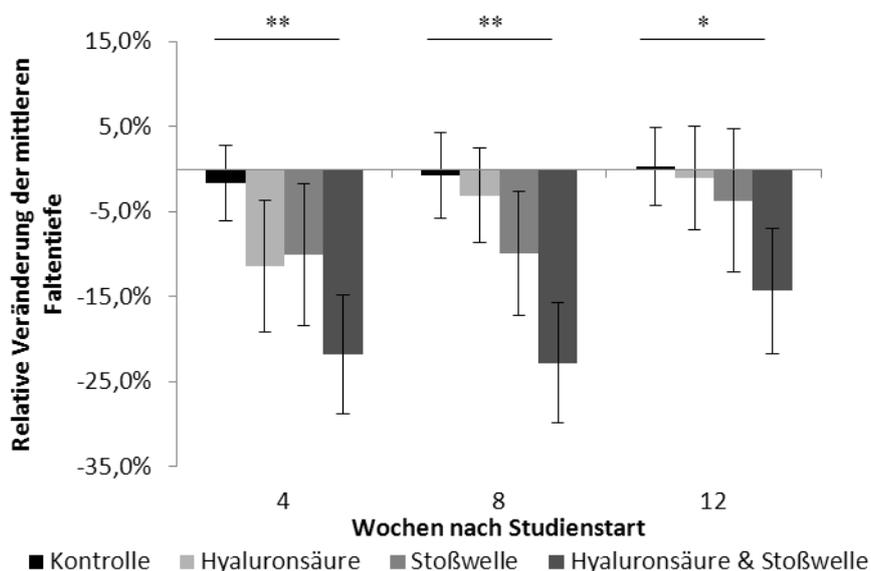


Abbildung 4.53 Veränderung der mittleren Faltentiefe der linken Periorbitalregion angegeben als relative Werte in Abhängigkeit von der Zeit. (n=3; Mittelwerte \pm SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

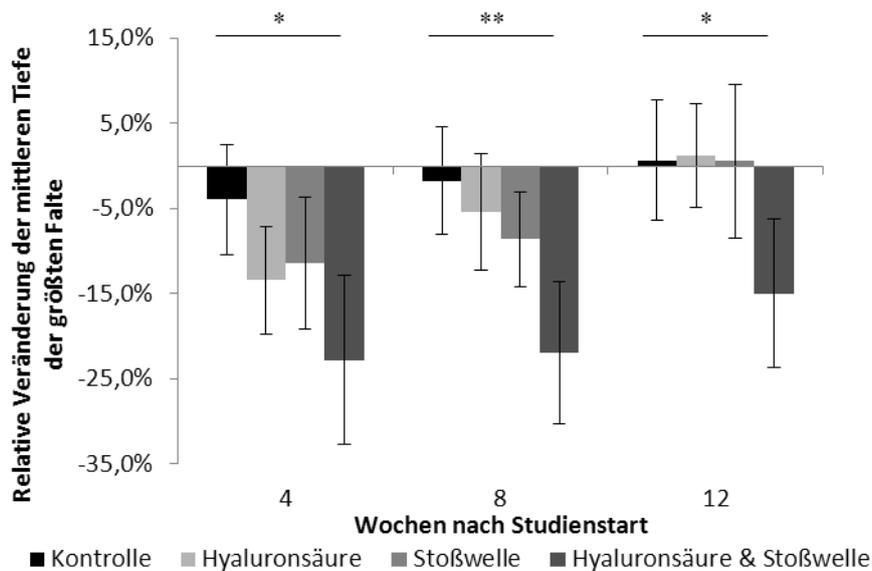


Abbildung 4.54 Veränderung der mittleren Tiefe der größten Falte der linken Periorbitalregion angegeben als relative Werte in Abhängigkeit von der Zeit. (n=3; Mittelwerte \pm SD; *p<0,05; **p<0,01)

In Bezug auf Faltenlänge und Faltenvolumen konnte der für die Glabellaregion gemessene Effekt der alleinigen Stoßwellenbehandlung trotz der Verwendung des identischen Applikators nicht erhalten werden (Abbildung 4.55 und Abbildung 4.56). Wegen der zügigen Reduktion der Effekte war ein Vorteil in der Faltenlänge gegenüber der Kontrolle nur nach vier Wochen erkennen. Die veränderte Signifikanz der Hyaluronsäure ergab sich aus der höheren Schwankungsbreite der Messwerte dieser Region.

Die kombinierte Methode hingegen zeigte wiederum signifikante Effekte, die nach acht und zwölf Wochen auch der Hyaluronsäure überlegen waren ($p<0,05$ und $p<0,01$). Eine derartige Verbesserung gegenüber der alleinigen Stoßwellenanwendung konnte nicht nachgewiesen werden. Auch bestand zwischen den Ergebnissen der Stirn und der linken Periorbitalregion kein beweisbarer Unterschied. Herausgestellt werden konnte jedoch die länger anhaltende Verbesserung des Faltenvolumens beider Regionen durch die kombinierte Anwendungsmethode.

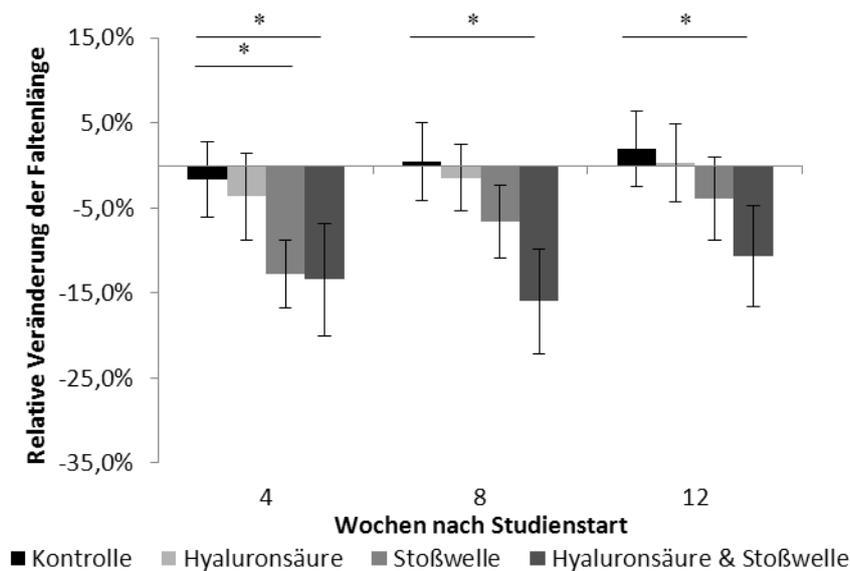


Abbildung 4.55 Veränderung der Faltenlänge der linken Periorbitalregion angegeben als relative Werte in Abhängigkeit von der Zeit. (n=3; Mittelwerte \pm SD; *p<0,05)

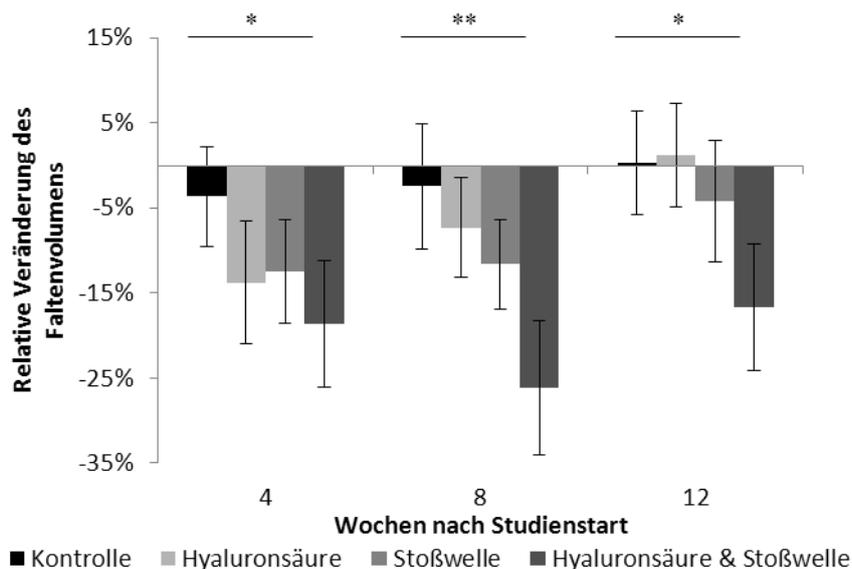


Abbildung 4.56 Veränderung des Faltenvolumens der linken Periorbitalregion angegeben als relative Werte in Abhängigkeit von der Zeit. (n=3; Mittelwerte \pm SD; *p<0,05; **p<0,01)

Die Auswertung der Rauheit war mit den Ergebnissen der Glabellaregion vergleichbar. Trotz Schwankungen der Effekte konnte bei beiden Methoden in der die Stoßwelle Anwendung fand, eine signifikante Verbesserung gemessen werden (Abbildung 4.57 und Abbildung 4.58). Diese war den Mittenrauhwert

betreffend in der kombinierten Anwendung jedoch signifikant besser ($p < 0,05$). Für die maximale Rauhtiefe wurde nach acht und zwölf Wochen für beide Stoßwellenmethoden auch eine Überlegenheit gegenüber der Hyaluronsäure nachgewiesen ($p < 0,05$ und $p < 0,01$).

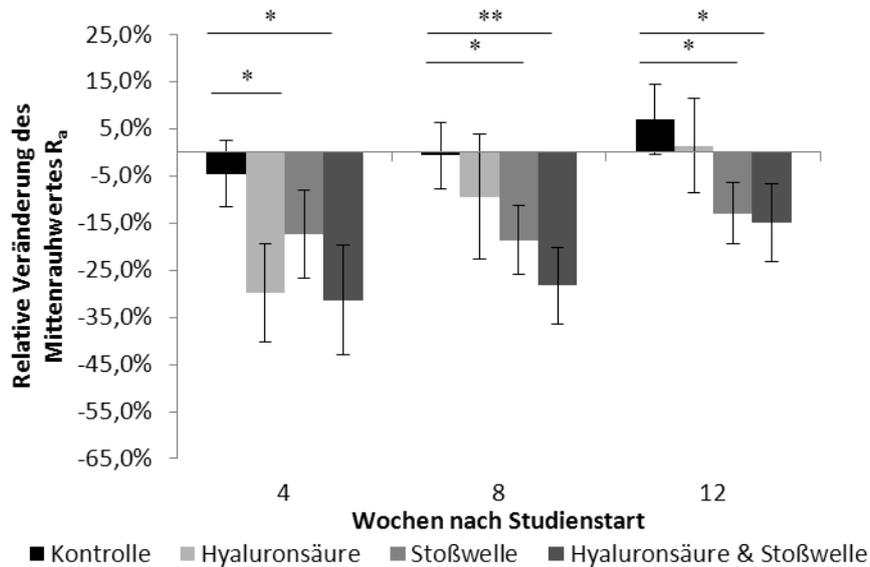


Abbildung 4.57 Veränderung des Mittenrauhwertes der linken Periorbitalregion angegeben als relative Werte in Abhängigkeit von der Zeit. (n=3; Mittelwerte \pm SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

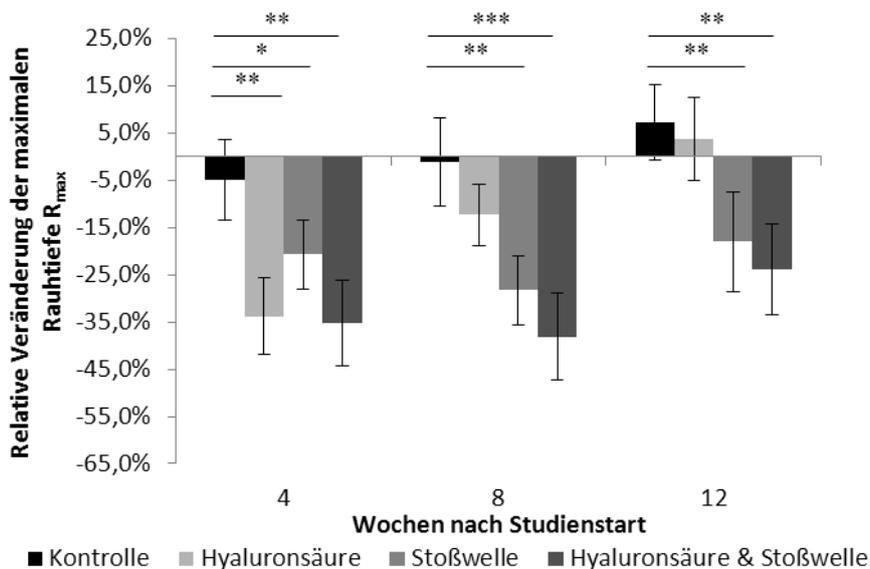


Abbildung 4.58 Veränderung der maximalen Rauhtiefe der linken Periorbitalregion angegeben als relative Werte in Abhängigkeit von der Zeit. (n=3; Mittelwerte \pm SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Auswertung der rechten Periorbitalregion

Die reduktive Entwicklung der Faltentiefen war bei der Behandlung der rechten Periorbitalregion mit dem Applikator F7G3 stärker ausgeprägt als bei der linken Seite, bei der der Applikator FP4 zu Einsatz kam. Im Vergleich konnten die Faltentiefen der mit Stoßwellen behandelten Gruppen weiter gesenkt werden, wobei sich die alleinige Anwendung der Stoßwelle den Werten der Gruppe die zusätzlich mit Hyaluronsäure behandelt wurde, annäherte. Die alleinige Stoßwellenanwendung erreichte auf dieser Seite zwölf Wochen nach Studienstart eine signifikante Verbesserung, wodurch der Effekt länger anhaltend war als auf der linken Seite. Vier Wochen nach Studienbeginn wurde der statistische Nachweis knapp verfehlt. Durch die schwankenden Werte der kombinierten Anwendergruppe bei der Messung acht Wochen nach Studienstart konnte dort keine Signifikanz bewiesen werden (Abbildung 4.59 und Abbildung 4.60).

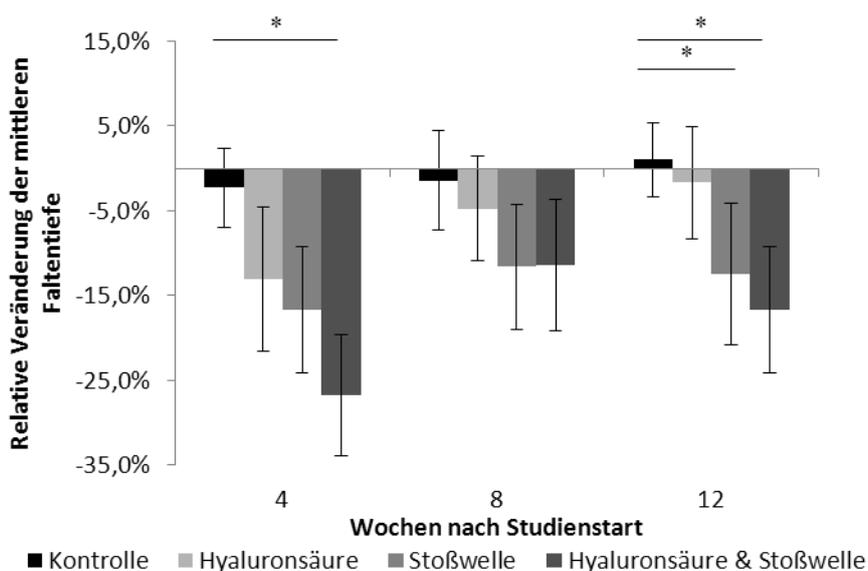


Abbildung 4.59 Veränderung der mittleren Faltentiefe der rechten Periorbitalregion angegeben als relative Werte in Abhängigkeit von der Zeit. (n=3; Mittelwerte \pm SD; *p<0,05)

Im Vergleich der Gruppen untereinander war die kombinierte Anwendung der Hyaluronsäure nach zwölf Wochen sowohl in der mittleren Faltentiefe, als auch in der mittleren Tiefe der größten Falte überlegen (p<0,05). Letzteres galt ebenfalls für die alleinige Stoßwellenanwendung (p<0,05). Ein signifikanter

Unterschied zu den an der linken Periorbitalregion erzielten Effekten konnte mit dem hier verwendeten fokussierten Applikator nicht nachgewiesen werden.

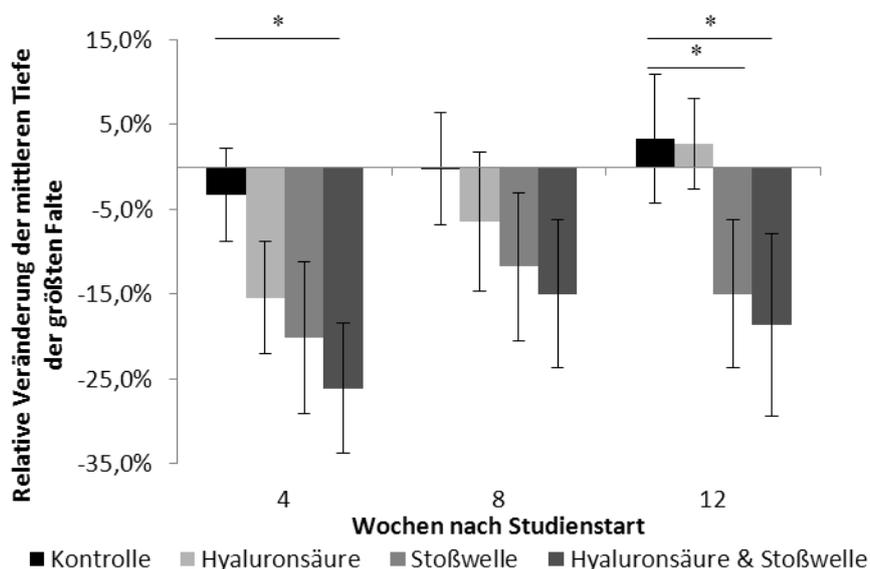


Abbildung 4.60 Veränderung der mittleren Tiefe der größten Falte der rechten Periorbitalregion angegeben als relative Werte in Abhängigkeit von der Zeit. (n=3; Mittelwerte \pm SD; *p<0,05)

Im Gegensatz zur linken Seite wurde an der rechten Periorbitalregion nach acht Wochen keine Signifikanz in Faltenvolumen und -länge für die mit Stoßwellen und Hyaluronsäure behandelte Gruppe gemessen. Durch eine Verschlechterung der Kontrollgruppe wurde der Vergleich in Bezug auf das Faltenvolumen auch für die Hyaluronsäure- und Stoßwellengruppe signifikant. Die durch die alleinige Stoßwellenbehandlung erzielte Reduktion des Faltenvolumens näherte sich nach zwölf Wochen dem Effekt der kombinierten Anwendung an, wodurch für beide gleichermaßen eine Signifikanz ersichtlich wurde (Abbildung 4.61 und Abbildung 4.62).

Die Ausprägung der Effekte der linken und rechten Periorbitalregion über den Beobachtungszeitraum war dennoch vergleichbar. Statistisch konnte kein Unterschied nachgewiesen werden. Ein Vorteil in der Faltenlänge gegenüber der Hyaluronsäuregruppe konnte nach vier Wochen nur durch die kombinierte Anwendung gezeigt werden (p<0,05). Eine weitere Unterscheidung der einzelnen Gruppen war auch hier aufgrund der breiten Schwankungen nicht möglich, so dass nur Tendenzen aufgezeigt werden konnten.

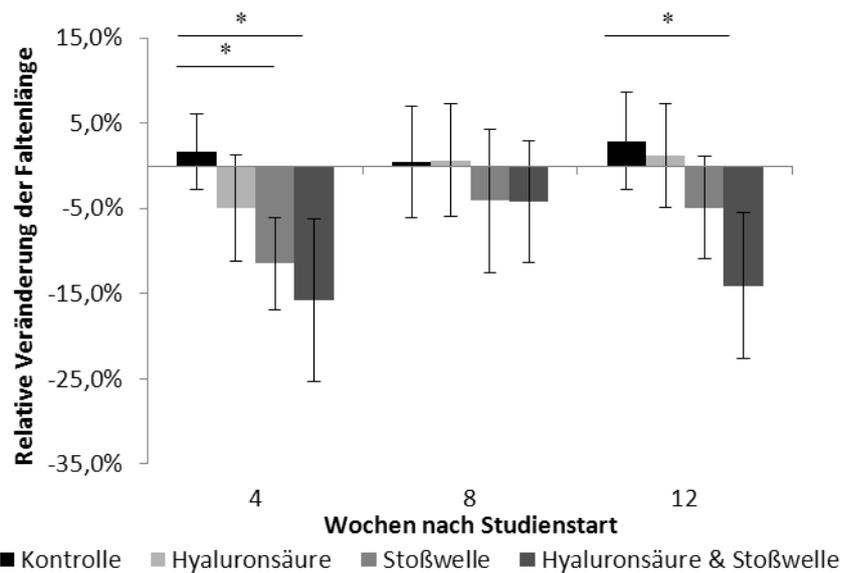


Abbildung 4.61 Veränderung der Faltenlänge der rechten Periorbitalregion angegeben als relative Werte in Abhängigkeit von der Zeit. (n=3; Mittelwerte ± SD; *p<0,05)

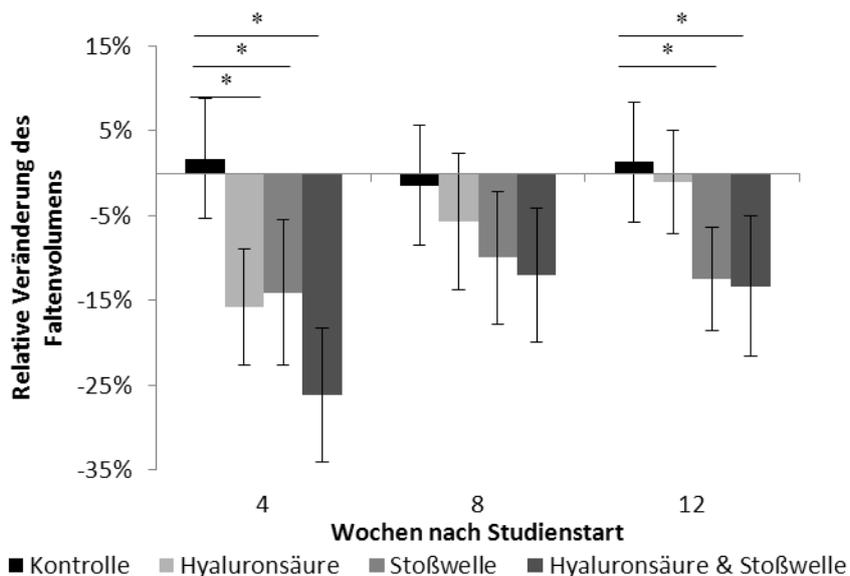


Abbildung 4.62 Veränderung des Faltenvolumens der rechten Periorbitalregion angegeben als relative Werte in Abhängigkeit von der Zeit. (n=3; Mittelwerte ± SD; *p<0,05)

Die Veränderung der Rauheitswerte war, wenn auch deutlich sichtbar, nicht so stark ausgeprägt wie an der linken Periorbitalregion. Ausgenommen des Messwertes nach acht Wochen, kann die kombinierte Methode auch hier als Effektivste bewertet werden, da über den Studienverlauf eine statistische Verbesserung gezeigt werden konnte (Abbildung 4.63 und Abbildung 4.64). Die

alleinige Anwendung der Stoßwelle verfehlte diesen Nachweis, insbesondere in der maximalen Rauhtiefe, nach acht und zwölf Wochen nur knapp. Die kombinierte Methode war der Hyaluronsäure auch in dieser Region nach zwölf Wochen überlegen ($p < 0,05$).

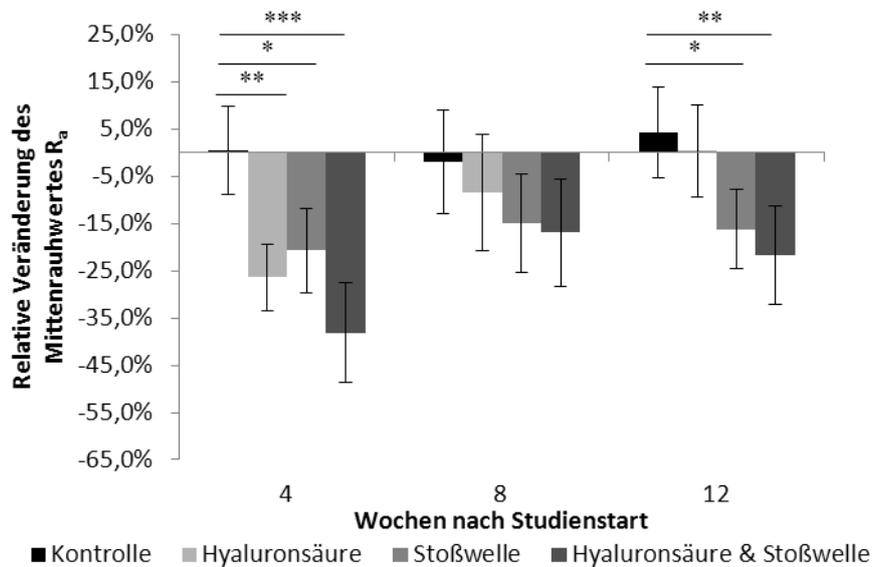


Abbildung 4.63 Veränderung des Mittenrauhwertes der rechten Periorbitalregion angegeben als relative Werte in Abhängigkeit von der Zeit. (n=3; Mittelwerte \pm SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

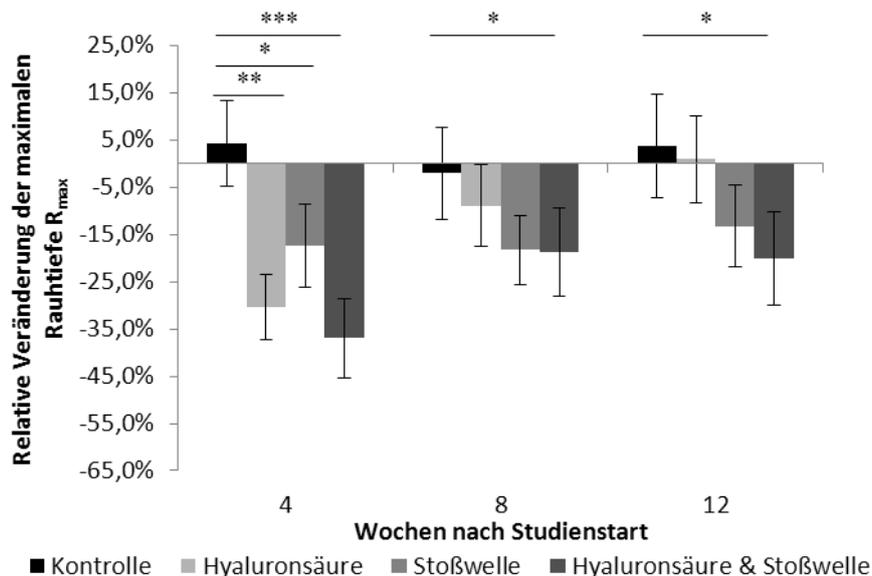


Abbildung 4.64 Veränderung der maximalen Rauhtiefe der rechten Periorbitalregion angegeben als relative Werte in Abhängigkeit von der Zeit. (n=3; Mittelwerte \pm SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

4.3.4 Zusammenfassung der Studienergebnisse

Die Studie konnte in nahezu allen Regionen und zu fast allen Zeiten eine statistisch signifikante Reduktion der Falten- und der Rauheitskenngrößen durch die kombinierte Anwendung von Stoßwelle und Hyaluronsäure zeigen. Die alleinige Anwendung der Stoßwelle ließ Verbesserungen erkennen, die jedoch zumeist nur die Rauheit, sowie teilweise das Faltenvolumen und die Faltenlänge signifikant änderten. Die verwendete Hyaluronsäure führte erwartungsgemäß ebenfalls zu einer Verbesserung der gemessenen Werte. Dies war jedoch nach Absetzen der Anwendung nur noch wenig messbar und die Ergebnisse näherten sich der Kontrolle an. Im Folgenden sind alle ausgewerteten Effekte in der Übersicht beschrieben. Die Angabe der Messergebnisse erfolgt in der anschließenden Beschreibung auf ganze Zahlen gerundet und über den jeweils angegebenen Zeitraum gemittelt.

Die Ergebnisse für die Hyaluronsäuregruppe ähneln sich bei allen Regionen. Der beste Effekt war an den Rauheitskenngrößen ermittelbar, bei denen nach vierwöchiger Anwendung eine signifikante Besserung deutlich wurde. Die Reduktion des Mittenrauhwertes R_a lag im Mittel aller Regionen bei 28%, die maximale Rauhtiefe R_{max} erreichte einen Wert von -29%. Die Reduktion des Faltenvolumens um 14% war als weitere, signifikante Veränderung sichtbar. Für die sonstigen Parameter konnte ein Einfluss der Hyaluronsäure gesehen werden, der statistisch jedoch nicht auffiel.

Für die Stoßwellenanwendung wurden an den Periorbitalregionen verschiedene Quellen eingesetzt. An der linken Periorbitalregion wurde die planare Quelle FP4 verwendet, wohingegen an der rechten Periorbitalregion die fokussierte Quelle F7G3 zum Einsatz kam. Dies wurde sowohl für die Gruppe der Stoßwellenbehandlung als auch für die kombinierte Gruppe beibehalten. Vergleicht man die Ergebnisse der einfachen Stoßwellenbehandlung an der linken und rechten Periorbitalregion statistisch, lässt sich für keinen ausgewerteten Parameter ein Unterschied ermitteln. Die Tendenz zeigt eine etwas stärkere Wirkung und auch eine veränderte Wirkdauer an der rechten Seite. Die Faltentiefen und das Faltenvolumen betreffend unterscheidet sich der Mittelwert

des zwölf Wochen Messwertes deutlicher vom Kontrollwert als auf der linken Seite. Die Rauheitsparameter zeigen ähnliche Effekte auf. Im Mittel konnte für die linke Periorbitalregion eine Reduktion der Faltentiefen um 10%, für Faltenvolumen und -länge um 11% ermittelt werden. Der Mittenrauhwert R_a und die maximale Rauhtiefe R_{max} wurden 20% reduziert. Diese Werte hielten lediglich bei den Rauheitskenngrößen zwölf, sonst acht Wochen an und sind hier über diese Zeiträume gemittelt angegeben. Der Nachweis der Signifikanz gegenüber der Kontrolle betrifft ebenfalls alleinig die Rauheitskenngrößen. Auf der rechten Seite zeigten sich die beschriebenen Effekte deutlicher. Die Faltentiefen wurden um 15% reduziert, beim Faltenvolumen war eine Veränderung von -12% sichtbar, wovon die Faltenlänge aufgrund schnellen Verlusts der Reduktion zurückblieb. Faltenvolumen und -tiefen konnten die genannten Werte über den Beobachtungszeitraum von zwölf Wochen halten. Kein Unterschied zur linken Seite war bei der Rauigkeit sichtbar.

Für die kombinierte Anwendung von Stoßwelle und Hyaluronsäure wurden die besten Ergebnisse erzielt. Teilweise konnte ein überadditiver Erfolg gezeigt werden. Wenn auch nicht signifikant, so sind doch Unterschiede zwischen beiden verwendeten Applikatoren erkennbar. Auf der rechten Seite konnten die Faltentiefen nach vier Wochen im Mittel stärker reduziert werden. Der Effekt ließ jedoch schneller wieder nach. So war auf der linken Seite nach vier und acht Wochen eine Reduktion um 22% messbar, während die rechte Seite von 26% auf 13% sank. Dieser Wert konnte im weiteren Verlauf auf beiden Seiten erhalten werden. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Betrachtung der Faltenvolumina und -längen. Auf der linken Seite kam es nach acht Wochen noch zu einer Verstärkung der Ergebnisse von 19% auf 26% beim Faltenvolumen, sowie von 13% auf 16% bei der Faltentiefe. Die Nachhaltigkeit auf der rechten Seite war jedoch nicht in gleichem Maße gegeben. Die Reduktion des Faltenvolumens sank um 14% auf 12%. Die Faltenlänge ist aufgrund der über den Beobachtungszeitraum stark schwankenden Werte schlechter vergleichbar. Die Rauigkeitsmessungen zeigten in Ausprägung und Reduktion nur geringe Unterschiede. Im Mittel konnten hier nach 12 Wochen noch 20% Verbesserung auf beiden Seiten gemessen werden.

Die Glabellaregion wurde aufgrund der abweichenden Beschaffenheit der Faltenstruktur in den Vergleich der Applikatoren nicht einbezogen. Während an den Periorbitalregionen viele, aber sehr feine Fältchen verlaufen, sind an der Stirn die tieferen und ausgeprägten Zornesfalten zu finden. Die mittlere Faltentiefe ließ sich bei der kombinierten Methode im Mittel um 14% reduzieren. Dies hielt über acht Wochen an. Weitere vier Wochen später waren noch 10% messbar. Die mittlere Tiefe der größten Falte erreichte ein Minus von 19%, welches sich im Abstand der Messungen von vier Wochen um jeweils etwa 5% verringerte. Die Messergebnisse der alleinigen Anwendung der Stoßwelle blieben dahinter weiter zurück. Faltenvolumen und -länge konnten durch die gemeinsame Anwendung von Hyaluronsäure und Stoßwelle nach vier Wochen um 25%, vier Wochen später noch um 15% gesenkt werden. In der Auswertung der Rauheit wurden an der Glabellaregion die stärksten Veränderungen gemessen. In der Kombination konnte die maximale Rauhtiefe R_{max} um 48% gesenkt werden, wovon nach zwölf Wochen noch 28% messbar waren. Der Mittenrauhwert R_a wurde um 38% reduziert, wobei am Ende der Studie noch 22% erhalten war. Die Werte für die Reduktion durch die Stoßwelle erreichten etwa die Hälfte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die kombinierte Anwendung von Hyaluronsäure und Stoßwelle den besten Einfluss auf die Reduktion von Falten aufwies, auch wenn häufig keine Signifikanz gegenüber der alleinigen Stoßwellenanwendung vorlag. Die fokussierte Quelle F7G3 wirkte zunächst besser. Bei der Verwendung der planaren Quelle waren die Ergebnisse jedoch von längerer Dauer, so dass beide Quellen nach zwölf Wochen vergleichbare Effekte messen ließen, die keinen statistischen Unterschied aufwiesen. Somit kann zunächst keine Aussage gemacht werden, welcher Applikator für die Behandlung der gealterten Haut die bessere Eignung aufweist. Angenehmer empfanden die Probanden die planare Quelle, was auf den Eintrag einer geringeren Energieflussdichte zurückzuführen ist. Stärkere und längere Wirkungen konnten durch die Behandlung mit Stoßwellen im Vergleich zur Hyaluronsäure nahezu immer erreicht werden.

5 Diskussion

Stoßwellen verfügen über ein hohes therapeutisches Potential. Schlecht heilende Wunden können mit großem Erfolg behandelt werden und die gesunde, gealterte Haut zeigt in Einzelbeobachtungen durch Straffung ein Ansprechen auf die Applikation. Der zugrunde liegende Wirkmechanismus ist jedoch weitgehend ungeklärt. Ziel dieser Arbeit war es Hinweise für die Effekte der Extrakorporalen Stoßwellentherapie auf Fibroblasten in-vitro zu finden und diese mit dem Nachweis der Wirkung auf die gealterte Haut in-vivo zu unterstützen. Es konnte ein positiver Einfluss der Behandlung auf die Migration und Proliferation von normalen humanen dermalen Fibroblasten gezeigt werden. Für einige, am Aufbau der Haut beteiligte Substanzen, wurde zudem eine erhöhte genetische Expression und Sekretion nachgewiesen. In einem weiteren Schritt wurde eine Verbesserung der gealterten Haut durch Reduktion von Falten mit Hilfe von Hyaluronsäure und Stoßwellentherapie belegt. Dafür konnte die Zerstörung der Hyaluronsäure durch die Stoßwelle ausgeschlossen werden.

Im Folgenden sollen diese Befunde interpretiert und diskutiert werden. Außerdem findet eine Einbettung der Methoden und Ergebnisse in den aktuellen Stand der Forschung und eine Aussage über die klinische Bedeutung statt.

5.1 In-vitro Methoden zur Untersuchung der Effekte auf Fibroblasten

Die Wirkungen, die eine Stoßwellenbehandlung auf Fibroblasten ausübt, wurden anhand verschiedener Methoden untersucht. Dabei wurde das Augenmerk eher auf die Ergebnisbreite als -tiefe gelegt, um einen grundlegenden Eindruck des Wirkmechanismus zu erhalten. Die in den Experimenten verwendeten Geräteeinstellungen waren beim dermagold an Parameter, die in Studien zur Wundheilung gewählt wurden, angepasst [28]. Da vergleichbare Studien für piezoelektrische Geräte bislang fehlen, wurde bei den in-vivo Versuchen auf die in der Praxis üblichen Einstellungen zurückgegriffen. In-vitro

mussten jedoch höhere Level eingesetzt werden, was in dem Stoßwellenverlauf und den Abmessungen des Wasserbades begründet lag. Der Verlauf der Welle ist stark fokussiert, was eine flächige Behandlung von Zellkulturflaschen nur außerhalb des Fokus erlaubte. Die Energieflussdichte am Wirkort reduzierte sich dadurch jedoch stark, was die Wahl höherer Energiestufen in dieser Arbeit erforderte.

5.1.1 Reproduzierbare Behandlung der Zellen

Grundvoraussetzung für reproduzierbare Ergebnisse ist auch die Schaffung konstanter Bedingungen. Bei der Einwirkung von Stoßwellen mussten mögliche Grenzphänomene beachtet werden, aber auch vergleichbares Zellmaterial zur Verfügung gestellt werden.

Verwendung des IVSWT Water Bath

Zur Behandlung der Fibroblasten wurde, die Migration ausgenommen, das international etablierte IVSWT Water Bath eingesetzt. Durch Temperierung sollten für die Dauer der Behandlung physiologische Bedingungen für die behandelten Zellen geschaffen werden. Wichtiger war jedoch die Vermeidung von Reflektionsphänomenen, welche zu unreproduzierbaren Energieeinwirkungen führen würde. Zellverluste durch Kavitation, welche sich in der Ausbildung runder, zellfreier Flächen äußerten, konnten mit der Verwendung frisch entgastem Wasser minimiert werden [127]. Die Schwankungsbreite der Ergebnisse wurde außerdem geringer, da weniger Wechselwirkungen des Wellenverlaufes mit der Luft erfolgen konnten. Des Weiteren wurde der Abstand zwischen Applikator und Zellkulturflasche über fixierte Messmarken konstant gehalten. Dies war wichtig, um gleichbleibende Energieflussdichten wirken lassen zu können.

Vorbereitung der Proben

Faktoren der Zellen, die die Ergebnisse beeinflussen konnten, wurden ebenfalls beachtet und über die Durchführung der Experimente oder Vergleich zu Kontrollen minimiert. So wurden stets vergleichbare Zellzahlen ausgesät, um die Wechselwirkungen zwischen den Zellen, welche in Zusammenhang mit der

Konfluenz stehen, konstant zu halten. Es konnte gezeigt werden, dass die Zelldichte einen Einfluss auf zytoskeletäre Veränderungen nach mechanischen Reizen ausübt [128]. Das bedeutet, dass die Zellmigration, die von diesen Veränderungen abhängt, bereits durch die Zelldichte beeinflusst werden kann. Auch das Alter von Zellen kann sich auf diesen Prozess auswirken, indem sich die Dynamik des Zytoskeletts verringert [129]. In den Auswertungen wurden daher behandelte Zellen immer lediglich mit der gleichzeitig angesetzten Kontrolle verglichen und ein Verhältnis der Effekte zwischen beiden Gruppen hergestellt.

5.1.2 Migration

Die Migration wurde in zwei verschiedenen Kulturschalen untersucht. Damit konnte zum einen die Abhängigkeit der vertragenen Stoßwellen von der behandelten Fläche, zum anderen aber auch ein Hinweis auf den Einfluss der verwendeten Schale gefunden werden. Darüber hinaus wurden die Behandlungsparameter Energiestufe, Anzahl der Impulse und Frequenz untersucht.

Einfluss der behandelten Fläche

In der Petrischale konnte eine etwa 20-fach größere Kulturfläche behandelt werden als im *ibidi* μ -Dish. Wie sich im Verlauf der Versuche zeigte, erlaubte dies eine breitere Variation der Energieeinstellungen. Da die Energieflussdichte in beiden Fällen gleich blieb, muss gefolgert werden, dass die Reaktion und das Überleben der Zellen auch von ihrem Zusammenhalt und ihrer Umgebung abhängt. Dies zeigt jedoch, dass für jedes zu behandelnde System eine eigenständige Evaluierung der optimalen Energiestufe von Nöten ist, was auch für einen direkten Vergleich der in-vitro getesteten Parameter mit den in-vivo zu verwendenden Parametern gilt. Die Gegebenheiten in-vivo müssen, bedingt durch die Umgebung aus Gewebe, von der Behandlung eines Zellmonolayers unterschieden werden. Größere Kulturschalen, die die Untersuchung höherer Energiestufen möglich gemacht hätten, konnten in diesem Versuch nur schwer verwendet werden. Es mussten Schalen gefunden werden, welche die Setzung einer Wunde erlaubten. Mit Kulturflaschen wäre das aufgrund der kleinen

Öffnung unmöglich. Daneben konnten bedingt durch die Fläche des planaren Applikators nur etwa 700 mm² behandelt werden. Größere Petrischalen hätten in Abschnitte unterteilt und nacheinander behandelt werden müssen. Bei einer Dauer von über 10 Minuten, die für die Applikation von Stoßwellen auf ein Areal nötig gewesen wäre, wird dadurch eine Vergleichbarkeit von mehreren behandelten Schalen unmöglich.

Eine weitere Beobachtung, die mit der Verwendung verschiedener Schälchen in Verbindung gebracht werden kann, ist die Unterscheidung der Migrationsneigung. Der Wundschluss erfolgte in den *ibidi* μ -Dishes deutlich langsamer als in den Petrischalen. Da dies auch beim Vergleich der Kontrollen beobachtet werden konnte, scheint dies durch reine Materialeinflüssen begründet zu sein.

Für die Durchführung dieser Methode konnte im Gegensatz zu den weiteren in-vitro Experimenten nicht das Wasserbad verwendet werden. Dies begründet sich ebenfalls in dem Einsatz von Petrischalen, welche sich nicht ausreichend abdichten lassen, um sie in das Bad einbringen zu können. Die Eindring- und Wirtiefe der mit dem planaren Applikator erzeugten Stoßwelle ist allerdings so gering, dass Interferenzen hier nicht zu erwarten waren.

Optimierung und Bedeutung der Behandlungsparameter

Aufgrund der Wahl des planaren Applikators FP4 sind alle Aussagen zu den optimalen Parametern ausschließlich für dieses System möglich. Die Versuche mit verschiedenen Energiestufen, Impulsen und Frequenzen konnten zeigen, dass eine Vielzahl von Kombinationen zu guten Ergebnissen führen kann. Der Beobachtung von Martini et. al., die der Gesamtzahl an Impulsen nach Untersuchungen an Osteoblasten eine untergeordnete Bedeutung zuschreibt, muss daher widersprochen werden [130]. Für mesenchymale Stammzellen konnte in anderen Arbeiten hingegen eine deutliche Abhängigkeit zwischen Migration und Stoßzahl gezeigt werden, was mit den hier gefundenen Ergebnissen korreliert [55].

Die Energiestufe musste bei Durchführung der Experimente im Wesentlichen an das System angepasst werden, da sich zu hohe Energien durch Ablösungen und Zellverluste äußerten. Unter Beachtung des Zeitfaktors kann die Verwen-

dung höherer Stufen jedoch einen Vorteil zeigen. Die Applikation von 1000 Impulsen steht mit 4 Minuten einer Dauer von 10 Minuten bei 2500 Impulsen gegenüber. Da die Behandlung, in Abhängigkeit von der Indikation, als schmerzhaft empfunden werden kann, ist hier die Variationsmöglichkeit von Intensität und Zeit von Vorteil. Behandlungsverkürzend wirkt sich außerdem die Wahl der Frequenz aus. Die Erhöhung von 4 Hz auf 6 Hz kann als Alternative diskutiert werden, da keine Beeinflussung der Ergebnisse gesehen wurde.

Vergleich mit PDGF

Für eine Reihe von Stoffen, zu denen auch Kollagen, Fibronectin und Elastin gehören, wurde eine chemoattraktive Wirkung auf Fibroblasten gezeigt [88]. PDGF wurde gewählt, da ein Vergleich zu einem von der Hautstraffung unabhängigen Faktor hergestellt werden sollte. Die Wirkung von PDGF war stärker, als die der Stoßwelle. Hier muss jedoch beachtet werden, dass PDGF zusätzlich die Proliferation fördern kann, was zu einem schnelleren Wundschluss führt [131]. Dies konnte anhand der Proliferationsuntersuchungen für die Stoßwelle ausgeschlossen werden. Der positive Einfluss kam erst nach mehr als 3 Tagen zum Tragen. Der zügige Wundschluss unter PDGF führte dazu, dass zum letzten Messzeitpunkt die Wunde bereits vollkommen verschlossen war. Um einen exakten Vergleich machen zu können, wären automatisierte Kameraaufnahmen, die jedoch nicht zu Verfügung standen, von Vorteil. So diente der Abgleich mit PDGF eher einer Einordnung der Stoßwellenwirkungen zu bereits bekannten Effekten.

Einfluss von Stoßwellen auf die Migration

Die Migration von Fibroblasten erfolgt durch eine Kriechbewegung. Da sie adhärent wachsen, nutzen sie breite, flache Ausstülpungen, die als Lamellipodien bezeichnet werden, für die vorübergehende Verankerung während der Fortbewegung. Die Zelle bildet ein solches Lamellipodium in Richtung der Bewegung aus und heftet sich mit dessen Unterseite an die Unterlage. An dieser Verankerung zieht sich die Hauptmasse der Zelle voran. Unter Ablösung des Hinterendes von der Unterlage wird dieses schließlich nachgezogen. Aktinpolymerisierungen liefern die Kraft für diese Bewegung [132].



Abbildung 5.1 Migrationsbewegung eines Fibroblasten unter Ausstülpung und Anheftung eines Lamellipodiums zur rechten Seite. Nach Umverteilung der Zellmasse wird die Anheftung im zurückliegenden Zellteil gelöst. Quelle: Four steps of cell migration, Creative Commons

Es ist bekannt, dass Scherstress die Zellmigration fördern kann [133]. Diese Wirkung kann auch für das Einbringen von Druck- bzw. Stoßwellen diskutiert werden. Sie verursachen ein sehr ungleichmäßiges Strömungsprofil, welches entsprechend auf die Zellen wirken könnte. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass sich Aktinfasern in Zellen nach der Behandlung mit Stoßwellen ausrichten und Polymerisierungsvorgänge ablaufen [55]. Diese Reaktion ist Grundlage für dynamische Prozesse und könnte einen Hinweis auf den Wirkmechanismus geben, was in Fibroblasten jedoch in weiteren Untersuchungen verifiziert werden müsste [132].

5.1.3 Proliferation

Für die Zellquantifizierung wurden drei Methoden ausgewählt, die über unterschiedliche Parameter einen Rückschluss auf die Zellzahl zuließen. Wichtig war hierbei die Wahl eines Verfahrens, welches eine Quantifizierung der gesamten Zellen einer Flasche und nicht nur eines Ausschnitts ermöglichte. Durch die Ablösung von Zellen im Behandlungsfokus und Erhöhung der Proliferation in der Peripherie konnte es zu einer Ungleichverteilung kommen. Die einfache Auszählung eines Areals hätte keine Vergleichbarkeit der Ergebnisse erlaubt. Daher wurde zunächst für die Optimierung der Behandlung eine Zählung mit dem Casy Counter durchgeführt, die später jedoch durch weitere Methoden umfassenderer Aussagekraft ergänzt wurde.

Optimierung und Vergleich der Behandlungsparameter beider Erzeugungsprinzipien

Für diese Versuchsreihe mussten die Behandlungsparameter erneut optimiert werden, weil mit anderen Applikatoren als bei der Migration und im Wasserbad gearbeitet wurde. Dadurch ergab sich die zusätzliche Variabilität des Abstandes

zwischen Applikator und Zellkulturflasche. Zusammen mit der Energiestufe und der Anzahl der Impulse konnte aus diesen drei Faktoren die akkumulierte Energieflussdichte berechnet werden. Diese eignete sich als Indikator für die resultierende Proliferation, sollte jedoch nicht mit wenigen Impulsen erreicht werden. Für die verwendeten Geräte konnte eine Kombination der Parameter, die zu einer akkumulierten Energieflussdichte von 1-4 mJ/mm² in der 5 MPa Zone führte, signifikante Verbesserungen aufzeigen. Dabei wurden zum Erreichen dieses Wertes, entsprechend der klinischen Anwendung, auch unterschiedliche Einstellungen an den Geräten vorgenommen. Deutlich ist der Unterschied in der Anzahl der applizierten Impulse. Das dermagold trägt mit jedem Impuls eine höhere Energie in die Zellkultur ein als das PiezoWave. Die dadurch erzeugte Energieflussdichte konnte das PiezoWave nur in Fokusnähe erreichen, wodurch es jedoch schneller zu einer Ablösung der Zellen kam. Dies zeigt trotz der guten Vergleichbarkeit einen Unterschied beider Geräte auf, der auch in der Genexpression beobachtet werden konnte.

Die Ablösung von Zellen durch die Behandlung war insgesamt der limitierende Faktor der Behandlungen. Durch starke Verluste konnte auch nach 7 Tagen kein positives Ergebnis erreicht werden. Als Grund für die Ablösung können physikalische Kräfte und die Kavitation, welche Zellzerstörung verursachen können, infrage kommen. Die Ablösung der Zellen von ihren Fokalkontakten ist ein erstes Zeichen für das Absterben der Zelle [134]. Durch erneutes Aussähen der losen Zellen zeigte sich, dass nur ein geringer Anteil weiterhin lebensfähig war, was die Zerstörung gegenüber der einfachen Ablösung indiziert.

Die Wahl der 5 MPa Zone für den Vergleich beider Geräte ergab sich aus den jeweils generierten Wellenverläufen. Die 5 mm Zone umschloss beim dermagold nicht den Fokusbereich, so dass keine Vergleichbarkeit möglich war. In der -6 db Zone konnte hingegen keine Steigerung der emittierten Energie des PiezoWaves gemessen werden, wodurch diese für den Vergleich ebenfalls ungeeignet war. Dies lässt sich mit der besonderen Fokussierung piezoelektrischer Geräte erklären. Bei höheren Energiestufen wird der Fokus kleiner, wodurch die Energieflussdichte zwar erhöht wird, die Gesamtenergie aber konstant bleibt.

Einfluss von Stoßwellen auf die Ergebnisse der Zellquantifizierung

Zunächst sollte durch den Vergleich der gewählten Methoden die Auswahl der bestgeeigneten ermöglicht werden. Die dabei beobachtete Verschiebung der gemessenen Werte in der Farbquantifizierung gegenüber der Zählung konnte weitere Einflüsse, die Stoßwellen auf Zellen ausüben, aufdecken. Dazu gehörte die raschere reduktive Umsetzung von MTT und XTT nach Stoßwellenapplikation. Diese reduzierte sogar die allgemeinen Angaben zur Dauer nach welcher das Assay ausgewertet werden kann. Abweichend von der gängigen Inkubationszeit von 2 bis 4 Stunden, war bereits nach einer Stunde ausreichend Farbstoff in den Zellen vorhanden [135]. Bei weiterer Wartezeit kam es zu einer Ablösung der stark mit Farbnadeln gefüllten Zellen, wodurch diese nicht mehr erfasst werden konnten. Ein Zusammenhang zwischen der mitochondrialen Aktivität und dem Umsatz von Formazan-Derivaten ist bekannt, wodurch von einer Steigerung dieser Aktivität durch Stoßwellen ausgegangen werden kann [136]. Die zeitliche Übereinstimmung zu der erhöhten Migrationsneigung könnte eine Korrelation zwischen den Mechanismen anzeigen.

Die leichte Erhöhung der Werte, die bei der Messung des Proteingehaltes gesehen wurde kann auch auf Schwankungen der Methode zurückgeführt werden. Der statistische Nachweis eines signifikanten Unterschiedes konnte nicht erbracht werden. Genauere Untersuchungen könnten dennoch klären, ob ein Zusammenhang zu der ebenfalls verzögert ablaufenden Genexpression besteht. Möglicherweise werden auf diesem Wege vermehrt Proteine gebildet.

Die Erhöhung der Proliferation konnte erst einige Tage nach Stoßwellenbehandlung nachgewiesen werden, wobei zunächst sogar eine Verringerung der Zellteilungszeit sichtbar war. Da Scherstress bei Endothelzellen eine Erhöhung der Proliferation auslöst, welche in direktem zeitlichen Zusammenhang mit der Einwirkung des Stresses steht, scheinen weitere Mechanismen für die Stoßwellenwirkung verantwortlich zu sein, die jedoch bislang ungeklärt sind [133]. Untersuchungen in der ablaufenden Mechanotransduktion könnten Hinweise auf diese Verzögerung geben, die zunächst allgemein als Regenerationsprozess gedeutet werden kann.

5.1.4 Expression und Sekretion

Die Untersuchung der Expression und Sekretion sollte zeigen, ob die in der Haut beobachteten Entwicklungen mit einer produktiven Aktivität der Fibroblasten in Verbindung gebracht werden kann. Diese Aktivität reduziert sich mit Zunahme des Alters, so dass an dieser Stelle trotz des schwierigen Vergleichs von in-vitro zu in-vivo eine Korrelation angenommen werden kann. Bei der Verzögerung der Wundheilung handelt es sich dagegen um einen komplexeren Zusammenhang von Faktoren, die diesen pathologischen Zustand bestimmen. Die Ergebnisse an vitalen Fibroblasten in-vitro können daher mehr als Hinweis gedeutet werden.

Auswahl der Stoffe und Genabschnitte für die Analysen

Die untersuchten Stoffe sind Komponenten des gesunden Bindegewebes der Haut. Bei Vorliegen mehrerer Subtypen erfolgte die Wahl der Genabschnitte nach ihrer Bedeutung für die Hautfunktion. Kollagen vom Typ I und III macht einen Großteil des Kollagens in der Haut aus und ist als fibrilläres Kollagen für den Aufbau des dermalen Bindegewebes wichtig [74]. Elastin ergänzt die Eigenschaften des Kollagens unter Ausbildung einer festen aber flexiblen Hautstruktur. Fibronectin fördert die Wundheilung und Zellwanderung. Von Elastin und Fibronectin werden durch alternatives Spleißen der mRNA eines einzigen Gens unterschiedliche Isoformen gebildet. Bei der Hyaluronsäuresynthese sind hingegen verschiedene Typen bekannt, die sich durch die Länge und die Funktion der an ihnen produzierten Hyaluronsäure unterscheiden. HAS2 synthetisiert Hyaluronsäure mittlerer Molekülgrößen, die für den Aufbau der extrazellulären Matrix von Bedeutung ist [100].

Die zusätzliche Untersuchung der sekretorischen Aktivität der Fibroblasten sollte die Ergebnisse der Genexpression unterstützen und einen Eindruck über eine breitere Zeitspanne vermitteln. Die Sekretionsanalyse nivelliert die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse, da keine punktuelle Analyse gemacht wird. Es kann eine Auswertung über den gesamten Zeitraum, in dem die Zellen mit dem Medium überschichtet waren, gemacht werden. Da das in der Leber produzierte Fibronectin für die Wundheilung eine größere Rolle spielt, als das in

Fibroblasten synthetisierte unlösliche Fibronectin und in der Analyse nur eine Bestimmung aus serumfreien Medium heraus möglich war, wurde die Sekretion an dieser Stelle nicht untersucht.

Bedeutung der Ergebnisse für die Wundheilung und Hautstraffung

Auf Kollagen war der Einfluss bei vergleichbaren Energieflussdichten beider Geräte sehr gering. Für die Behandlung der gealterten Haut konnte über diesen Weg somit kein positiver Effekt der Stoßwellen gezeigt werden. Die Ausheilung von Wunden hingegen profitiert nicht unbedingt von einer erhöhten Kollagenproduktion. Physiologisch tritt diese unter großer Zugbelastung der Wunde ein und führt zu hypertrophen Narben [137]. Im Gegensatz dazu kann eine verminderte Kollagenproduktion zu atrophen Narben führen, wodurch ein Gleichgewicht für die ebenmäßige Ausheilung der Wunde entscheidend ist [138]. Die Korrelation der Sekretion und Expression zeigte, dass von weiteren Kollagentypen keine starke Produktion vorgelegen haben kann. In der Isolation von Kollagen für die Sekretionsanalyse wird das gesamte Kollagen im Überstand erfasst.

Für Elastin konnte hingegen ein Anstieg gemessen werden, der bis zu 72 Stunden nach Stoßwellenapplikation signifikant erhöht war. In Narben wird Elastin häufig erst lange nach Heilung einer Wunde nachgewiesen, wenn das Gewebe langsam an Elastizität gewinnt [139]. Die erhöhte Produktion könnte daher zur narbenfreien Ausheilung beitragen. Für die gealterte Haut bedeutet dies ein Gewinn an Elastizität.

Für Fibronectin war erst nach 5 Tagen ein leichter Anstieg der Expression sichtbar. Da in den Analysen nur das durch die Fibroblasten produzierte, unlösliche Fibronectin analysiert werden konnte, welches für den Struktur- aufbau des Bindegewebes und die Zellmigration wichtig ist, kann auch hier ein Vorteil für Heilung und Straffung abgeleitet werden.

Die Werte für die Hyaluronsäuresynthase veränderten sich ebenfalls mit Abstand zur Behandlung. Erst 5 bis 7 Tage nach Applikation stieg der Wert mit einer Intensität, die in Abhängigkeit vom verwendeten Gerät stand, an. Der verzögerte Eintritt von Stoßwellenwirkungen ist aus anderen Therapiebereichen

bekannt. Wodurch er entsteht konnte bislang jedoch nicht entschlüsselt werden. Ein schnellerer Eintritt der Wirkung könnte früher die Wundheilung unterstützen oder einen zügigen Effekt in der Hautstraffung zeigen, was hier nicht gegeben war. Dennoch kann auch die späte Steigerung als positiv bewertet werden, da sie längere Zeit nach der Behandlung diverse Prozesse wie die Migration und Adhäsion von Zellen unterstützt.

Aufgrund der verzögerten Wirkung nach Applikation hoher Energieflussdichten mit dem PiezoWave könnte eine von den Zellen benötigte Regenerationszeit diskutiert werden. Dies würde mit den Ergebnissen der Proliferation einhergehen, bei denen ebenfalls zunächst eine Verlangsamung der Zellteilungszeit gesehen werden konnte, die sich später jedoch ins Gegenteil umkehrte.

5.1.5 Klinische Umsetzung der Ergebnisse

Ein direkter Umsatz der in-vitro gefundenen Ergebnisse auf die klinische Anwendung in-vivo ist selten möglich. Bereits bei der Wahl der Behandlungsparameter muss dieser Unterschied beachtet werden. Dennoch können die gemessenen Effekte einen Hinweis geben, wie sich stoßwellenabhängige Wirkungen in-vivo äußern könnten.

Wahl der Behandlungsparameter in-vitro und in-vivo

Für die Analyse des Einflusses der Stoßwellenbehandlung auf Fibroblasten wurde innerhalb der zum Einsatz kommenden Parameter des Erzeugungsprinzips, der Energiestufe, der Frequenz, sowie der Anzahl der Impulse eine breite Untersuchung durchgeführt. Dadurch sollte ein Hinweis auf die optimale Wahl der Behandlungsparameter gefunden werden. Dennoch dürfen die genannten Werte nicht direkt für die Behandlung in der Praxis verwendet werden. Die behandelten Zellen unterliegen dem Einfluss der Stoßwelle ohne Abschirmung durch Gewebeumgebung. Bei der Behandlung in-vivo finden diffuse Verteilungsphänomene der Energie statt. Dadurch kann die eingetragene akkumulierte Energieflussdichte nicht direkt verglichen werden. Der Abstand zwischen Zellfläche und Applikator wurde so gewählt, dass eine Korrelation zu der klinischen Durchführung ebenfalls nicht möglich ist. Die

Zellen befanden sich bei allen Versuchen hinter dem Fokus. Dort ist die Energieflussdichte durch die Aufweitung des Wellenverlaufes geringer. Auch bei der Behandlung von Gewebe muss durch die Veränderung des Abstandes mit einer Variation der resultierenden Energieflussdichten gerechnet werden. Im Vergleich von akkumulierten Energieflussdichten von in-vitro zu in-vivo kann ein Faktor, der sich zwischen 20 und 100 bewegt, kalkuliert werden, wobei sich die Spanne aus dem Bereich, der in-vitro gut vertragen wurde ($1-4 \text{ mJ/mm}^2$) und klinisch in-vivo angewendet wird (ca. 100 mJ/mm^2), ergibt [28].

Bei den durchgeführten Experimenten konnte auch gezeigt werden, dass die Wirkungen der Stoßwelle von allen Parametern gemeinschaftlich getragen werden. Bei höherer Energieflussdichte werden weniger Impulse für denselben Effekt benötigt als bei geringerer Energieflussdichte, wobei insgesamt ein breites Spektrum an Kombinationen, welches positive Wirkungen verursacht, möglich ist, bevor es zu einer schädigenden Wirkung kommt. Damit kann die therapeutische Breite der Stoßwellentherapie als hoch bewertet werden, was die Sicherheit der Methode erhöht und das Risiko für Fehlbehandlungen minimiert. Behandlungsparameter, die später zu einer deutlichen Verbesserung von Proliferation, Expression oder Sekretion führten, zeigten dennoch zunächst häufig einen schädigenden Effekt.

Vergleich des piezoelektrischen und elektrohydraulischen Prinzips

Der direkte Vergleich der Erzeugungsverfahren erschien aus den Auswertungen der Proliferation heraus möglich. Eine deutliche Korrelation der akkumulierten Energieflussdichten mit den gemessenen Effekten erlaubte eine Verbindung zwischen dem piezoelektrischen und dem elektrohydraulischen Prinzip herzustellen. Dennoch scheinen weitere Einflüsse eine Rolle zu spielen, die bislang unbekannt sind. In der Expression hingen die Ergebnisse zusätzlich von dem Gerät, mit dem die Behandlung durchgeführt wurde, ab. Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet sind daher nötig, um die Hintergründe der Beobachtungen kennen lernen und einen Vergleich der Geräte für die Anwendung in-vivo herstellen zu können.

5.2 Analytische Methoden zur Untersuchung der Hyaluronsäure

In dieser Arbeit wurden zwei Methoden zur Analytik der Hyaluronsäure gewählt, die in der gemeinschaftlichen Auswertung eine Aussage über die Reinheit, den Gehalt und die Molekülgröße geben konnten. Zur Reinheits- und Gehaltsbestimmung wurde ein elektrophoretisches Verfahren verwendet, welches eine Auftrennung von verschiedenen Makromolekülen ohne vorherige Spaltung ermöglichte. Bei einer starken Reduktion der Molmasse kann dies mit der Elektrophorese ebenfalls detektiert werden. Deutlich reduzierte Molekülgrößen äußern sich in einer Verschiebung der Retentionszeiten [140]. Im Weiteren wurde der Polymerisierungsgrad der Hyaluronsäure genauer über die Messung der Viskosität bestimmt, was den Vorteil bot, dass über die Anwendung der Mark-Houwink Gleichung ein Rückschluss auf die Molmasse und damit mittlere Größe der Spaltprodukte möglich war [116].

Neben den verwendeten Methoden werden in der Analytik von Hyaluronsäure klassischerweise die Dünnschichtchromatographie, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, Gelpermeationschromatographie und Massenspektrometrie eingesetzt. Bei den chromatographischen Bestimmungsmethoden, die zur Reinheitsprüfung und Gehaltsbestimmung geeignet wären, besteht der Nachteil, dass nur Oligomere für eine Auftrennung zugänglich sind, wodurch die Hyaluronsäure zunächst gespalten werden müsste. In der Dünnschichtchromatographie führen Kettenlängen oberhalb von 12 Monomeren zu einer starken Reduktion der Mobilität [141, 142]. In der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie erzwingt die Ausbildung eines hohen Gegendruckes ebenfalls die Reduktion der Molmasse [119, 143, 144]. Auch in der Massenspektrometrie sollten Oligomere eingesetzt werden, die während des Elektrosprayprozesses weiter fragmentiert werden können [145]. Damit würde der Hinweis auf den Abbau durch die Stoßwellenapplikation verloren gehen.

5.2.1 Behandlung der Hyaluronsäure mit Stoßwellen für die Analytik

Für die Behandlung der Hyaluronsäure wurden die Extremfälle des Verlaufes der Stoßwelle getestet. Dieses ist zum einen der einfache Durchgang durch ein Medium und zum anderen die Totalreflektion an einer Grenzfläche großen Impedanzunterschiedes. Tatsächlich befindet sich die resorbierte Hyaluronsäure während der Studie in den oberen Hautschichten. Die Einwirkung der Energie kann somit schwächer eingeschätzt werden als in der experimentellen Durchführung. Da die Behandlung durchgängig auf von Knochen unterlegter Haut erfolgte, musste davon ausgegangen werden, dass ein Teil der Welle reflektiert werden kann und das Gewebe erneut durchläuft.

In dem entwickelten Versuchsaufbau erfolgte eine direkte Ankopplung des Applikators an die Hyaluronsäurelösung. Außerdem fand keine Resorption durch umliegendes und abschirmendes Gewebe statt. Es kann daher bei dieser Anordnung davon ausgegangen werden, dass die Belastung für die Hyaluronsäure stärker war als in der Studie. Der einfache Durchgang der Welle wurde durch einen Wassertank hinter der Probelösung gewährleistet, während an der verwendeten 2 mm dicken Metallplatte ein großer Impedanzsprung auftrat, wodurch die Welle zu einem großen Teil zurückgebrochen wurde.

Bei der verwendeten Hyaluronsäurelösung wurde weitestgehend versucht das Produkt Viscontour Serum[®], welches in der Studie Anwendung fand, nachzuahmen. Es handelt sich bei dem Produkt um eine 0,5%ige Lösung in einem isohydrischen Phosphatpuffer, der mit Natriumchlorid zusätzlich isoton eingestellt wurde. Diese Bedingungen wurden von dem im Ph. Eur. 6.0 beschriebenen Puffer für die Hyaluronsäureanalytik erfüllt [146].

Die Behandlungsparameter wurden an die Einstellungen, die innerhalb der Studie verwendet wurden, angepasst, wobei für die Studie die Energiestufe des Applikators F7G3 nach Ablauf der analytischen Untersuchungen von 10 auf 5 reduziert wurde, um eine bessere Verträglichkeit und Toleranz seitens der Probanden zu erzielen. Durch niedrigere Energien war auch eine niedrigere Zerstörung zu erwarten, wodurch die Veränderung der Einstellung keinen

negativen Einfluss nehmen konnte. Um auch eine weiterführende Aussage über die Kraft der Stoßwelle tätigen zu können, wurden außerdem Belastungen getestet, die die Studienparameter weit überschritten.

5.2.2 Kapillarelektrophorese

Das Prinzip der Kapillarelektrophorese beruht auf der Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld. Da es sich bei der in Lösung befindlichen Hyaluronsäure um ein polyanionisches Molekül handelt, kann eine Bewegung in Richtung der Kathode nur durch eine Zugwirkung der Elektrolytlösung im EOF stattfinden. Unter Ausschluss weiterer Wechselwirkungen müsste sich für alle Polymerisationsgrade der Hyaluronsäure eine gleichmäßige, eigenständige Wanderungsgeschwindigkeit einstellen, denn das Ladungs-/Masseverhältnis würde konstant bleiben. Der EOF würde zunächst größere Moleküle erfassen und in Richtung des Detektors bewegen, da diese durch ihren hohen Reibungswiderstand eine schlechte anodische Beweglichkeit aufweisen. In der von Kinoshita et al. publizierten Methode konnte dennoch eine genau umgekehrt verlaufende lineare Abhängigkeit zwischen der molekularen Masse und der elektrophoretischen Mobilität gezeigt werden [118]. Dabei wurde ein Anstieg der Mobilität zu kleineren Molekülgrößen beobachtet. Dieser paradoxe Effekt könnte mit der dreidimensionalen Konformation der Hyaluronsäure zusammenhängen, welche nicht über die Reibungseffekte im Stokes'schen Gesetz beschrieben werden kann. Für größere Moleküle werden daher auch bei der Bewegung im EOF starke Reibungskräfte angenommen, die diese im Fluss zurückhalten [147].

Andere Methoden bedienen sich der Ausbildung komplexer Filtrationssysteme im Puffer, welche in ihrer Konzentration genau auf das Trennproblem eingestellt werden. Sie erlauben die Auftrennung der Hyaluronsäure während eines Laufes nach ihrer Größe, wobei größere Moleküle zurückgehalten werden und später eluieren [140]. Dennoch können auf diese Weise nur sehr große Masseunterschiede von 1000 Dalton durch eine geringe Verschiebung des Detektionspeaks analysiert werden.

Die Wahl der Kapillarelektrophorese wurde daher neben der Analyse starker Zerstörungsprozesse zur Reinheitsprüfung der Hyaluronsäure verwendet. Die Alternative einer direkten photometrischen Quantifizierung wurde durch die mangelnde Aussagekraft einer Messung bei 200 nm, die ein breites Spektrum an Chromophoren erfassen würde, ausgeschlossen. Die Wahl dieser niedrigen Wellenlänge war jedoch aufgrund der Struktur der Hyaluronsäure nötig. Die Absorption wird im Wesentlichen durch die Carbonylgruppe getragen. In den, bei der Elektrophorese gleichzeitig beobachteten, Referenzwellenlängen konnten weitere Stoffe, die als Verunreinigen vorliegen könnten, analysiert werden. Durch den biotechnologischen Herstellungsprozess kämen dafür in erster Linie Proteine und Nucleinsäuren in Frage. Proteine weisen bei 220 nm, Nucleinsäuren bei 260 nm ein Absorptionsmaximum auf. Diese Wellenlängen wurden daher als Referenz gewählt. Biopolymere ähnlicher Eigenschaften und Struktur, wie Heparin und Chondroitin könnten durch die Elektrophorese ebenfalls abgetrennt werden. Eine Reduktion der gemessenen Peakfläche hätte somit auf eine Zerstörung des Chromophors hingedeutet. Eine Spaltung des Moleküls hingegen würde nur im ausgeprägten Maßstab messbar werden.

Entwicklung der kapillarelektrophoretischen Methode

Die größte Problematik in der Methodenentwicklung stellte die Verschiebung der Retentionszeiten im Verlauf von mehreren Analysen dar. Dieses wird als Phänomen der Adsorption von Makromolekülen an der Kapillarwand häufig beobachtet und erfordert regulierende Schritte um die Reproduzierbarkeit der Methode zu gewährleisten [148]. Eine Maßnahme ist das Aufbringen eines Überzugs an der inneren Oberfläche der Kapillare, die keine ionischen Wechselwirkungen möglich macht. Dadurch wird auch der EOF zurückgedrängt, was vollkommen neue Trennbedingungen erfordert hätte. Getestet wurden in dieser Arbeit daher die beiden weiteren Möglichkeiten, die einerseits die Zugabe von kationisch wirksamen Salzen und andererseits die Befreiung der Kapillaroberfläche durch Spülschritte waren. Durch Erhöhung der Pufferkonzentration und damit der kationisch wirksamen Salze konnte die Stromstärke nicht in den Bereichen gehalten werden, die vom Hersteller als optimal angegeben werden und zwischen 20 μA und 80 μA liegen [149]. Durch

Spülen mit Natronlauge hingegen konnten die Silanolgruppen nach jedem Lauf regeneriert werden. Die Entfernung von adsorptiv gebundenen Stoffen, sowie die kurzzeitige Einstellung des pH-Wertes im alkalischen Milieu ermöglichten in jedem Lauf einen gleichmäßigen EOF. Dadurch konnte sich über eine große Anzahl von Läufen eine konstante Mobilität der Hyaluronsäure einstellen.

Bedeutung der Ergebnisse der Kapillarelektrophorese

Die Validierung der in dieser Arbeit entwickelten Methode zeigte sehr gute Ergebnisse in Bezug auf Linearität und Präzision. Damit wurde ein geeignetes Verfahren für die Quantifizierung und Reinheitsprüfung gefunden. Es wurde nachgewiesen, dass keine Totalzerstörung der Hyaluronsäure durch den Einfluss von Stoßwellen eintrat, da keine Veränderungen des Gehaltes beobachtet werden konnten. Bei der in der klinischen Studie verwendeten Hyaluronsäure wurde außerdem eine absolute Reinheit festgestellt, wodurch die Wirkung des Produkts allein auf diesen Inhaltsstoff bezogen werden konnte. Die Ergebnisse der Kapillarelektrophorese führten in Kombination mit den Auswertungen der Rheologie zu der Annahme, dass die Migration der Hyaluronsäure in der Kapillare bei der verwendeten Methode über den Bereich von 700 bis 1200 kDa unabhängig von der Molmasse ist.

5.2.3 Rheologie

Eine Lösung von Hyaluronsäure kann als kolloiddisperses System verstanden werden. Der Bereich der Teilchengrößen und Zuordnungen zur Klasse des Systems ist dabei bislang nicht einheitlich. Die Obergrenze wird zwischen 400 nm und 1 μm angegeben [150]. Aufgrund der besonderen Struktur der Hyaluronsäure kann diese gestreckt eine Länge von bis zu 25 μm annehmen [151]. Durch das reversible Strukturverhalten sind dennoch die Voraussetzungen, wie die Filtrierbarkeit durch Papier und Unsichtbarkeit im Mikroskop, für die Zuordnung zum kolloiddispersen System gegeben. Die rheologische Bestimmung kann mit geringem Geräteaufwand durchgeführt werden, bleibt jedoch in der Genauigkeit hinter instrumentell hoch entwickelten Methoden, wie der Molekülgrößenbestimmung mit einem Multi Angle Laser Light Scattering

Detektor, zurück [152]. Bei der Messung der Viskosität wird immer eine mittlere Molekülgröße bzw. molare Masse ermittelt. Dadurch kann die Mehrfachspaltung eines Hyaluronsäuremoleküls, bei gleichzeitiger Strukturhaltung eines anderen Moleküls, nicht vom Vorliegen einer gleichmäßig geringeren Molmasse unterschieden werden. Die Näherung und Angabe der mittleren Molekülgröße nach Stoßwellenbehandlung war für diese Arbeit jedoch ausreichend.

Entwicklung und Hintergründe der rheologischen Methode

Aufgrund der β -glykosidisch verknüpften Disaccharideinheiten, die wiederum β -glykosidisch verknüpft sind, kommt es zu einer Streckung des Polymers. Bei neutralem pH-Wert und physiologischer Ionenstärke wurde von Laurent et. al eine ausgedehnte helicale Konformation bestimmt [147]. Bei höheren Konzentrationen kann es zu einer Verknotung der Moleküle kommen, wodurch der mit der Konzentration stark ansteigende gelbildende Effekt verursacht wird. Für die rheologische Bestimmung musste unterhalb dieser Schwelle gearbeitet werden, da die relative Viskosität der zu bestimmenden Lösung zwischen 1,1 und 1,5 liegen sollte [153]. Dies konnte mit den eingesetzten Konzentrationen zwischen 0,05% und 0,5% erreicht werden.

Die Viskosität von Hyaluronsäurelösungen hängt, wie bei allen kolloiddispersen Systemen, einerseits von der mittleren molaren Masse ab, andererseits ist die Ausbildung der dreidimensionalen Struktur von Bedeutung. Reversible Strukturphänomene können zu einer Veränderung der Viskosität führen. So erniedrigt sich diese bereits beim Durchfließen von Kanülen oder durch Filtration [154]. Daher musste nach Aufbringen der Probe eine Ruhezeit zur Restrukturierung eingehalten werden. Um zu Beginn der Aufzeichnung der Messdaten Gleichförmigkeit in der Lage der Moleküle zu erlangen, wurde zusätzlich vorgeschert. Die dadurch erreichte Ausrichtung der Polymere verringert viskositätsverändernde Effekte durch intramolekulare Wechselwirkungen in der dreidimensionalen Struktur. Bei der Auswertung und Bestimmung der Grenzviskosität $[\eta]$ über die Huggins-Gleichung kann außerdem der Einfluss von intermolekularen Verknäuelungen auf die Viskosität eliminiert werden [155].

Bedeutung der Ergebnisse der Rheologie

Durch die Abnahme der Grenzviskosität konnte eine dosisabhängige Reduktion der mittleren molaren Masse der Hyaluronsäure ermittelt werden. Trotz identischer akkumulierter Energieflussdichten war die Reduktion bei der Verwendung der Platte als Untergrund höher als bei der Folie. Damit konnte eine Wirkungsverstärkung über Reflektion der Stoßwellen nachgewiesen werden. Die Anwendung der planaren Quelle FP4 führte zu keinem Einfluss auf die Molmasse. Aufgrund des linearen Verlaufes der Wellen dieses Applikators, kann hier von einer gleichmäßigen Belastung der Hyaluronsäure ausgegangen werden. Bei der Behandlung durch die fokussierte Quelle F7G3 kommt es dagegen zu punktuell deutlich höheren Energieflussdichten, die Spaltungen verursachen können.

Die Effekte einer Stoßwellenbehandlung setzen sich aus den einzelnen Parametern Energiestufe, Anzahl der Impulse und Form der Stoßwelle zusammen. Dieses Zusammenspiel zeigt auch in den rheologischen Untersuchungen die Abhängigkeit der einzelnen Parameter. Es konnte gezeigt werden, dass bei nahezu gleichen Werten akkumulierter Energie eine stärkere Zerstörung durch eine tiefe Energiestufe und höhere Stoßzahl auftrat als bei hoher Energiestufe und geringer Stoßzahl. Dies war bei den in-vitro Experimenten nicht zu beobachten. Es darf also nicht nur die Gesamtdosis der Energieflussdichte beachtet werden, es müssen auch die, die Dosis ergebenden Parameter, sinnvoll gewählt werden, um eine schädigende Reaktion auszuschließen.

5.2.4 Bedeutung der Ergebnisse der Hyaluronsäureanalytik für das Studiendesign

Der Einsatz der Hyaluronsäure in der Studie sollte den zusätzlichen Nutzen der Hydratation der Haut und Förderung des Zellwachstums erfüllen [156]. In der Kombination mit der Stoßwelle sollte sie die Migration von Fibroblasten, die durch die Behandlung angeregt werden könnte, fördern [157]. Sollte es durch die Behandlung zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies kommen, könnten diese außerdem gut durch die Hyaluronsäure abgefangen werden [103].

Vor Beginn der Studie musste ausgeschlossen werden, dass die Hyaluronsäure, die durch die Haut aufgenommen wurde, zerstörende Einflüsse durch die Stoßwelle erfährt, da dadurch auch eine Verkürzung der Wirkzeit eintritt. Hyaluronidasen im Gewebe spalten das Polymer und bauen es ab [158]. Dieser Prozess findet natürlicherweise in der Haut statt. Je länger der Prozess andauert, bis das Molekül abgebaut ist, desto länger kann die Wirkung erhalten werden. Bei größeren Molekülen oder künstlich erzeugten Quervernetzungen, die in Hyaluronsäurelösungen zur Unterspritzung zu finden sind, dauert der Vorgang entsprechend länger [112].

Die Dosis für die eine beginnende Spaltung der Ketten beobachtet wurde, liegt wegen der hohen Energiestufe, die in den Versuchen gewählt wurde, jedoch weit über den Studienparametern, so dass sich für die Hyaluronsäure keine Konsequenzen ergeben sollten.

Die akkumulierten Energieflussdichten, die bei der Hyaluronsäure zu einer Schädigung geführt haben, dürfen jedoch nicht als Richtwert für die allgemeine Wahl von Behandlungsparametern gewählt werden. Wie der Vergleich mit den akkumulierten Energieflussdichten, die bei der Behandlung der Fibroblasten angewendet wurden zeigt, ist die Toleranz für die Energie sehr unterschiedlich. Während die Zellen bei Werten von 4 mJ/mm^2 erste negative Effekte zeigten, waren es bei der Hyaluronsäure Werte über 400 mJ/mm^2 . Somit ist es grundsätzlich nicht möglich über in-vitro Versuche die idealen Parameter für in-vivo Behandlungen vorherzusagen. Die in der Studie gewählten Parameter ergaben sich daher aus Erfahrungswerten und der Toleranz der Studienteilnehmer. Es wurde davon ausgegangen, dass sich schädigende Einflüsse über die Ausbildung eines Schmerzes äußern würden. Im Rahmen der Behandlungen wurde dies jedoch nicht beobachtet.

Darüber hinaus wurde mit der Analytik der Kapillarelektrophorese eine absolute Reinheit für das verwendete Hyaluronsäure-Produkt Viscontour Serum[®] nachgewiesen. Damit können alle Ergebnisse, die mit der Anwendung in Verbindung gebracht werden, auf die Wirkung der Hyaluronsäure bezogen werden.

5.3 Hintergründe und Auswertung der Studie

Die Ergebnisse, die in Kapitel 4.1 in-vitro gezeigt wurden, sollten in-vivo überprüft werden. Da für die Wundheilung aus rechtlichen Gründen keine klinische Studie durchgeführt werden konnte, die Ergebnisse bereits durchgeführter Studien überzeugende Erfolge zeigten und in der kosmetischen Indikation bislang keine Ergebnisse zur Verfügung standen, wurden weitere Untersuchungen in diesem Bereich durchgeführt [20, 28]. Der Rahmen von drei Probanden je Gruppe lässt zunächst nur eine Gesamtaussage über die Tendenzen machen. Mögliche Wirkmechanismen stehen anschließend zur Diskussion.

5.3.1 Die Studienentwicklung

Aus dem Bereich der Cellulite Forschung ist ein hautstraffender Effekt durch Stoßwellen nachgewiesen worden. Diese Wirkung steht im Zusammenhang mit einer Stärkung des Bindegewebes [25-27]. Da Einzelbeobachtungen eine Hautstraffung im Gesicht nach Behandlung ebenfalls zeigen konnten, wurde im Rahmen der rechtlichen und praktischen Möglichkeiten die Studie durchgeführt. Um den Effekt von Stoßwellen und der Anwendung von Hyaluronsäure voneinander abgrenzen zu können, sowie synergistische Effekte nachzuweisen, wurde das vierarmige Design gewählt. Die verschiedenen Applikatoren wurden im Halbseitenvergleich gegenüber gestellt.

Eine exakte Vorhersage des Verlaufes der Stoßwelle bei der Anwendung im Gesicht ist nicht möglich. Um das gesundheitliche Risiko der Studienteilnehmer einschätzen zu können, wurden physikalische Berechnungen durch die Herstellerfirma durchgeführt. Ein Durchdringen der Stoßwelle durch den Knochen wurde wegen des großen Impedanzsprunges ausgeschlossen [159]. Die Applikation von Stoßwellen auf den Gesichtsmuskel bei Mäusen konnte ebenfalls kein Risiko der Behandlung aufzeigen [160].

5.3.2 Bewertung und Interpretation der Studienergebnisse

Aufgrund der geringen Anzahl der Studienteilnehmer und der hohen Messschwankungen kann die Studie eher als Hinweis, als ein absolutes Ergebnis gesehen werden. Die hohe Schwankungsbreite der Ergebnisse lässt statistische Signifikanz häufig nicht erkennen, obwohl die Mittelwerte einen deutlichen Hinweis auf einen Effekt geben. Zu dieser Schwankungsbreite tragen verschiedene Faktoren bei. Physikalischen Einfluss können Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsveränderungen nehmen, die die Haut aufquellen und damit glatter erscheinen lassen [161-163]. Für die Messungen stand kein klimatisierter Raum bereit, womit Messunsicherheiten zu erwarten sind. Der Verlauf der Studie ging von April bis Juli. Durch den jahreszeitlichen Einfluss kann ebenfalls eine Veränderung der Hautbeschaffenheit stattfinden. Die Produktion von hauteigenen Lipiden, die die Glattheit der Haut unterstützen, kann sich verringern [164]. Im Sommer nehmen außerdem UV-Schäden, die in Abhängigkeit von der Exposition zu stärkerer Faltenbildung führen können, zu [165]. Darüber hinaus muss sowohl das unterschiedliche Ansprechen der Studienteilnehmer auf die Therapie als auch deren Eignung zur Faltenmessung genannt werden. Diese ist nur bei absoluter Bewegungslosigkeit gegeben, was nicht alle Teilnehmer einhalten konnten.

Effekte durch die Hyaluronsäure

Die Auswertung der Studie konnte zeigen, dass alle Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Verbesserung der Hautstruktur aufwiesen. Die Effekte der Hyaluronsäuregruppe waren dabei von der kürzesten Dauer. Nach acht Wochen war nur noch ein geringer Effekt messbar, der jedoch nicht mehr signifikant war. Dies steht im Zusammenhang mit dem raschen Abbau unvernetzter Moleküle durch Hyaluronidasen innerhalb weniger Tage [166, 167]. Über den Anwendungszeitraum konnte der in der Literatur beschriebene optisch auffällende Effekt bestätigt werden [168, 169]. Dieser war besonders deutlich für feinere Linien sichtbar, was sich in den guten Ergebnissen der Verbesserung der Rauheitsparameter erkennen ließ. Sie weisen auf eine Glättung des gesamten Profils hin. Auch über die Anwendung hinaus wurde

eine Verbesserung gegenüber dem Beginn der Studie gemessen, wodurch eine nachhaltige Wirkung in Betracht gezogen werden kann.

Effekte durch die Stoßwelle

Der statistische Vergleich zwischen der Anwendung von Stoßwellen und der kombinierten Anwendung zeigte keinen Unterschied in der Wirksamkeit. Gegenüber der Kontrollgruppe hingegen konnte durchgehend eine bessere Wirkung der Kombinationstherapie nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Probandenzahlen könnte dies sowohl mit einer verstärkten Wirkung, als auch mit einem verbesserten Ansprechen der Probanden einer Gruppe zusammen hängen. Aus medizinischen Untersuchungen anderer Indikationsgebiete ist bekannt, dass im natürlichen Rahmen nicht alle behandelten Personen gleichermaßen auf die Therapie reagieren. Heilungsraten bei chronischen Wunden liegen in klinischen Studien zwischen 36% und 100% [20]. Die erfolgreiche Therapie von Pseudoarthrosen wird in verschiedenen Studien mit Werten zwischen 52% und 91% angegeben [18]. Die große Variabilität der Studienergebnisse deutet darauf hin, dass auch die unterschiedlich gewählten Behandlungsparameter für die Ergebnisse entscheidend sind. Um diese Fragestellungen klären zu können, wären somit weiterführende Untersuchungen größeren Probandenkollektivs von Nöten.

Die verstärkte Wirkung der Kombinationstherapie ließe sich außerdem mit dem Zusatznutzen der Hyaluronsäure erklären. Hyaluronsäure erfüllt in der Dermis und Epidermis eine Reihe von Funktionen (Kapitel 1.3.2). Zellteilung und Migration könnten nach der Anregung durch die Stoßwelle gefördert werden, wodurch der überadditive Effekt entsteht. Des Weiteren kann die verbesserte Aufnahme der Hyaluronsäure durch eine Lockerung der Lipidschicht durch den Einfluss der Stoßwelle diskutiert werden [170-172]. Es konnte mit Hilfe von Makromolekülen gezeigt werden, dass eine erhöhte Penetration unter der Anwendung von Stoßwellen auftritt [173]. Ob dies in verminderte Form auch nach der Behandlung möglich ist, bliebe ebenfalls zu untersuchen.

Bedeutung der Ergebnisse für die Hautstruktur

Die Behandlung zeigte im Probandenvergleich, sowie in der Differenzierung nach Regionen, eine gleichmäßige Wirkung für Falten in Bewegung und dauerhafte Falten der Klassifikation nach Glogau [174]. Außerdem konnten trotz der nicht-invasiven Behandlungsmethode auch deutlich sichtbare Falten erfolgreich behandelt werden.

Die Glabellafalte ist, bedingt durch Ihre Entstehung über wiederholte Muskelbewegungen der Mimik und die ausgeprägte Tiefe, besser mit Hilfe von muskel-lähmenden Stoffe wie Botox oder Unterspritzungen zu behandeln [175, 176]. Die feineren, vor allem durch Lächeln verursachten, Periorbitalfalten sprechen hingegen häufig zufriedenstellend auf topische Behandlungen an [162, 177, 178]. Die deutliche Reduzierung des Faltenvolumens der Glabellafalte könnte somit durch eine Lockerung der Muskulatur unterstützt worden sein. Ähnliches ist aus der Anwendungsbeobachtung eines Zahnarztes bekannt. Er konnte berichten, dass nach der Applikation von Stoßwellen eine weitere Öffnung des Kiefers seiner Patienten möglich war. Dies könnte die Theorie der Lockerung der Muskulatur unterstützen.

Der intensivste Effekt der Stoßwelle war an den Rauigkeitsparametern messbar. Da dort vor allem kleine Veränderungen und Glättungen sichtbar sind, muss auch eine allgemeine Hautstraffung zur Wirksamkeit beitragen. Die in den in-vitro Versuchen gemessene verstärkte Produktion von Kollagenen und Elastin könnte hier ebenso eine Rolle spielen, wie die erhöhte Proliferation der dermalen Fibroblasten. Eine Aussage über die Dauer der Wirkung ist bedingt durch den Studienzeitraum nur bis acht Wochen nach Behandlungsende möglich. Da auch bei dieser Messung bessere Ergebnisse für die mit Stoßwellen behandelten Studienteilnehmer sichtbar waren, kann im Gegensatz zu rein topischen Therapien von einer ausgeprägteren Nachhaltigkeit gesprochen werden.

5.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit werfen eine Reihe weiterer interessanter Fragestellungen auf, deren Untersuchung zu der Aufklärung des Wirkmechanismus beitragen, aber auch die Stoßwellenapplikation für die kosmetische Anwendung attraktiver werden lassen kann.

So wurde die ablaufende Signalkaskade der Mechanotransduktion über die eine Wirkung zustande kommt nicht tiefer untersucht. Es wäre interessant zu ermitteln wie es zu einer gesteigerten Migration, Proliferation, Expression und Sekretion kommt. Dazu kann die Analyse von Einflüssen auf das Aktinskelett und Veränderungen der Zellzyklusphasen möglicherweise weitere Erkenntnisse liefern. Darüber hinaus ist es wichtig die Wirkungen über ein größeres Zeitfenster zu beobachten, um weitere Spätreaktionen auf die Stoßwellenapplikation zu erkennen.

Bei der Behandlung der gealterten Haut wurde das in dieser Arbeit verwendete Behandlungsschema Einzelbeobachtungen angepasst. Weitere Untersuchungen können dazu beitragen die Behandlung und damit auch die erreichbaren Resultate zu optimieren, sowie Unterschiede zwischen den Applikatoren aufzudecken. In-vitro konnten Makromoleküle Lipidschichten mit Hilfe von Stoßwellen besser durchdringen, was die Möglichkeit einer Penetrationsförderung von Hyaluronsäure durch die Haut aufzeigt. Dieser zusätzliche Nutzen könnte sich in den Ergebnissen ebenfalls deutlich widerspiegeln, was die Effektivität der Behandlung steigern würde.

Außerdem wäre ein weiterer Vergleich verschiedener Erzeugungsprinzipien der Stoßwelle von großem Nutzen für die klinische Anwendung. Weder in-vitro noch in-vivo wurden bislang konkrete Gegenüberstellungen durchgeführt um die Therapien vergleichen zu können. Inwiefern sich die Wirkungen bei gleicher akkumulierter Energieflussdichte ähneln, würde zu einer Optimierung von Therapieschemen beitragen.

6 Zusammenfassung

Die extrakorporale Stoßwellentherapie wird erfolgreich in der Therapie schlecht heilender Wunden eingesetzt und kann auch bei der gealterten Haut eine Wirkung, die sich durch Straffung äußert, zeigen. Für die Wundheilung und den gesunden Aufbau des dermalen Bindegewebes spielen Fibroblasten eine entscheidende Rolle. Sie synthetisieren Strukturproteine und Bestandteile der extrazellulären Matrix. Die Fibroblastenaktivität bestimmt damit durch den Aufbau des Gewebes, die Förderung von Migration und Adhäsion von Zellen und die Regulation des Feuchtigkeitshaushaltes das Erscheinungsbild der Haut. Hyaluronsäure gehört als Glykosaminoglykan zu den von Fibroblasten synthetisierten Bestandteilen der extrazellulären Matrix, welche durch die Bindung von Wasser zu den genannten Prozessen beiträgt.

Durch die Untersuchung der Wirkungen von Stoßwellen auf Fibroblasten in-vitro konnten Mechanismen, die Wundheilung und Hautregeneration fördern, gefunden werden. Direkt nach der Applikation kam es zu einem intensivierten Stoffwechsel und einer verstärkten Migration von Fibroblasten. Die Produktion von Elastin war drei Tage nach Behandlung verdoppelt, während Kollagen ein geringeres Ansprechen zeigte. Auch spätere Effekte der Behandlung wurden gemessen. Die Zellteilungszeit reduzierte sich, so dass nach sieben Tagen eine Erhöhung der Zellzahl gegenüber der Kontrolle gesehen wurde. Eine leichte, aber nicht signifikante Steigerung der Proteinsynthese ging mit dieser Beobachtung zeitlich einher. Fibronectin und Hyaluronsäure wurden fünf Tage nach der Einwirkung von Stoßwellen verstärkt synthetisiert, wobei die erreichten Werte vom verwendeten Gerät und den gewählten Einstellungen abhingen.

Diese Beobachtungen tragen zu einer Straffung der Haut bei, welche in-vivo nachgewiesen werden konnte. Insbesondere die kombinierte Anwendung von Hyaluronsäure und Stoßwellen konnte über einen Zeitraum von drei Monaten Falten und Rauheit der Periorbital- und Glabellaregion reduzieren, womit sie der einfachen Stoßwellenapplikation oder Hyaluronsäureanwendung in Wirkung

und Nachhaltigkeit überlegen war. Die Zerstörung der Hyaluronsäure durch die Behandlung mit Stoßwellen wurde zuvor ausgeschlossen.

Ein Vergleich des piezoelektrischen und elektrohydraulischen Erzeugungsprinzips war durch die Korrelation der akkumulierten Energieflussdichte mit den Ergebnissen der Proliferation möglich. Die dort gezeigte Beziehung konnte bei der Messung der Genexpression jedoch nicht bestätigt werden. Weitere Faktoren scheinen die Wirksamkeit unterschiedlicher Geräte zu beeinflussen.

Im Rahmen der Arbeit wurden Mechanismen identifiziert, die einen Beitrag zum Verständnis der Stoßwellenwirkung auf die Haut liefern. Die Wirkung auf die gealterte Haut konnte zudem über ein objektives Messverfahren nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden erstmalig Ansätze zum Vergleich verschiedener Generationsverfahren von Stoßwellen formuliert.

Summary

Extracorporeal shock-wave therapy is carried out successfully in bad healing wounds and even for matured skin a tightening effect was shown. Fibroblasts play a crucial role in wound healing and integrity of the connective tissue, because they synthesize proteins for the structure and constituent parts of the extracellular matrix. Their activity defines the appearance of the skin by tissue organization, enhancement of cell migration and adhesion as well as regulation of hydrodynamic processes. Hyaluronic acid, a glycosaminoglycan, is produced by fibroblasts and contributes with its water binding capacity to these processes.

Some underlying mechanisms for wound healing and regeneration of skin were found, examining the effect of shock-waves on fibroblasts in-vitro. After their application an intensified metabolism and enhanced migration of fibroblasts was measured. Three days later production of elastin was doubled, whereas collagen showed just slight response. Later effects of the therapy, like a reduced doubling time of cells caused seven days after treatment and increase

of cell numbers compared to control, were also shown. A slight, but not significant increase of protein production was accompanied by this observation. According to chosen device and treatment parameters synthesis of fibronectin and hyaluronic acid was enhanced five days after shock-wave application.

These observations have a share in skin tightening, which was proven in-vivo. Especially the combined appliance of shock-waves and hyaluronic acid reduced wrinkles and roughness at the glabella- and periorbitalregion more effective than simple application of shock-waves or hyaluronic acid. Destruction of hyaluronic acid by the shock waves was excluded before.

With the correlation of accumulated energy flux density and proliferation results comparison of piezoelectric and electrohydraulic devices was possible. However shown connection was not approved in gene expression experiments. Further ascendancies seem to influence the efficiency of different machines.

In this thesis new mechanisms that contribute to the comprehension of the effects of shock-waves on skin were found. The effect on matured skin was proven by an objective procedure of measuring. Technics to compare different shock-wave generating principles were verbalized for the first time.

7 Literaturverzeichnis

1. Chaussy, C., W. Brendel, and E. Schmiedt, *Extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves*. Lancet, 1980. **2**: p. 1265-8.
2. Wess, O., et al., *High Energy Shock Waves in Medicine*. 1997, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
3. Wess, O., *Physikalische Grundlagen der extrakorporalen Stoßwellentherapie*. J Miner Stoffwechs, 2004. **4**: p. 7-18.
4. Holfeld, J., *IVSWT - In Vitro Shock Wave Treatment*. Newsletter of the International Society of Medical Shock Wave Therapy, 2010. **6**: p. 6-7.
5. Chaussy, C., et al., *First clinical experience with extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves*. J Urol, 1982. **127**: p. 417-20.
6. Rassweiler, J., et al., *Shock wave technology and application: an update*. Eur Urol, 2011. **59**: p. 784-96.
7. Chaussy, C.G. and G.J. Fuchs, *Current state and future developments of noninvasive treatment of human urinary stones with extracorporeal shock wave lithotripsy*. J Urol, 1989. **141**: p. 782-9.
8. Rassweiler, J.J., et al., *Treatment of renal stones by extracorporeal shockwave lithotripsy: an update*. Eur Urol, 2001. **39**: p. 187-99.
9. Thuroff, S. and C. Chaussy, *Ureteral calculi. In situ ESWL treatment with booster technique*. Urologe A, 1997. **36**: p. 209-16.
10. Renner, C. and J. Rassweiler, *Treatment of renal stones by extracorporeal shock wave lithotripsy*. Nephron, 1999. **81**: p. 71-81.
11. Darzi, A., et al., *Extension of selection criteria for extracorporeal shock wave lithotripsy for gall stones*. Br Med J, 1989. **299**: p. 302-3.
12. Soehendra, N., et al., *Pulverisation of calcified and non-calcified gall bladder stones: extracorporeal shock wave lithotripsy used alone*. J Gastroen Hepatol, 1994. **35**: p. 417-22.
13. Uchiyama, K., et al., *Extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL) for biliary stones: a nationwide survey in Japan*. Arch Jpn Chir, 1994. **63**: p. 199-207.
14. Capaccio, P., S. Torretta, and L. Pignataro, *Extracorporeal lithotripsy techniques for salivary stones*. Otolaryngol Clin North Am, 2009. **42**: p. 1139-59.
15. Iro, H., et al., *Extracorporeal piezoelectric shock wave lithotripsy of salivary gland stones: first clinical experiences*. J Stone Dis, 1992. **4**: p. 8-12.

16. Schleberger, R. and T. Senge, *Non-invasive treatment of long-bone pseudarthrosis by shock waves (ESWL)*. Arch Orthop Trauma Surg, 1992. **111**: p. 224-7.
17. Valchanou, V.D. and P. Michailov, *High energy shock waves in the treatment of delayed and nonunion of fractures*. Int Orthop, 1991. **15**: p. 181-4.
18. Birnbaum, K., et al., *Use of extracorporeal shock-wave therapy (ESWT) in the treatment of non-unions. A review of the literature*. Arch Orthop Trauma Surg, 2002. **122**: p. 324-30.
19. Qureshi, A., et al., *Shock Wave Therapy in Wound Healing*. Plast Reconstr Surg, 2011. **128**: p. 721-7.
20. Schaden, W., et al., *Extracorporeal shock wave therapy in skin lesions*. Newsletter of the International Society for Medical Shock Wave Therapy, 2006. **2**: p. 13-14.
21. Silveira, A., et al., *Effects of unfocused extracorporeal shock wave therapy on healing of wounds of the distal portion of the forelimb in horses*. Am J Vet Res, 2010. **71**: p. 229-34.
22. Ottomann, C., et al., *Prospective randomized phase II Trial of accelerated reepithelialization of superficial second-degree burn wounds using extracorporeal shock wave therapy*. Ann Surg, 2012. **255**: p. 23-9.
23. Saggini, R., et al., *Extracorporeal shock wave therapy for management of chronic ulcers in the lower extremities*. Ultrasound Med Biol, 2008. **34**: p. 1261-71.
24. Mittermayr, R., et al., *Extracorporeal shock wave therapy (ESWT) minimizes ischemic tissue necrosis irrespective of application time and promotes tissue revascularization by stimulating angiogenesis*. Ann Surg, 2011. **253**: p. 1024-32.
25. Angehrn, F., C. Kuhn, and A. Voss, *Can cellulite be treated with low-energy extracorporeal shock wave therapy?* Clin Interv Aging, 2007. **2**: p. 623-30.
26. Kuhn, C., et al., *Impact of extracorporeal shock waves on the human skin with cellulite: a case study of an unique instance*. Clin Interv Aging, 2008. **3**: p. 201-10.
27. Siems, W., et al., *Anti-fibrosclerotic effects of shock wave therapy in lipedema and cellulite*. Biofactors, 2005. **24**: p. 275-82.
28. Schaden, W., et al., *Shock wave therapy for acute and chronic soft tissue wounds: a feasibility study*. J Surg Res, 2007. **143**: p. 1-12.
29. Peters, J., et al., *Extracorporeal shock wave therapy in calcific tendinitis of the shoulder*. Skeletal Radiol, 2004. **33**: p. 712-8.

30. Schmitt, J., et al., *Low-energy extracorporeal shock-wave treatment (ESWT) for tendinitis of the supraspinatus. A prospective, randomised study.* J Bone Joint Surg Br, 2001. **83**: p. 873-6.
31. Buchbinder, R., et al., *Shock wave therapy for lateral elbow pain.* Cochrane Database Syst Rev, 2005. **3**: p. CD003524.
32. Rompe, J.D., C. Theis, and N. Maffulli, *Shock wave treatment for tennis elbow.* Der Orthopäde, 2005. **34**: p. 567-70.
33. Gerdesmeyer, L., et al., *Radial extracorporeal shock wave therapy is safe and effective in the treatment of chronic recalcitrant plantar fasciitis: results of a confirmatory randomized placebo-controlled multicenter study.* Am J Sports Med, 2008. **36**: p. 2100-9.
34. Haake, M., et al., *Extracorporeal shock wave therapy for plantar fasciitis: randomised controlled multicentre trial.* Br Med J, 2003. **327**: p. 75.
35. Cole, C., C. Seto, and J. Gazewood, *Plantar fasciitis: evidence-based review of diagnosis and therapy.* Am Fam Physician, 2005. **72**: p. 2237-42.
36. Lohrer, H., et al., *Comparison of radial versus focused extracorporeal shock waves in plantar fasciitis using functional measures.* Foot Ankle Int, 2010. **31**: p. 1-9.
37. Vulpiani, M.C., et al., *Extracorporeal shockwave therapy (ESWT) in Achilles tendinopathy. A long-term follow-up observational study.* J Sports Med Phys Fitness, 2009. **49**: p. 171-6.
38. Dumfarth, J., et al., *Prophylactic low-energy shock wave therapy improves wound healing after vein harvesting for coronary artery bypass graft surgery: a prospective, randomized trial.* Ann Thorac Surg, 2008. **86**: p. 1909-13.
39. Zimpfer, D., et al., *Direct epicardial shock wave therapy improves ventricular function and induces angiogenesis in ischemic heart failure.* J Thorac Cardiovasc Surg, 2009. **137**: p. 963-70.
40. Gollwitzer, H., et al., *Safety and effectiveness of extracorporeal shockwave therapy: results of a rabbit model of chronic osteomyelitis.* Ultrasound Med Biol, 2009. **35**: p. 595-602.
41. Jung, K., et al., *Excretion of urinary enzymes after extracorporeal shock wave lithotripsy: a critical reevaluation.* J Urol, 1993. **149**: p. 1409-13.
42. Torrecilla, O.C., et al., *Renal hematoma after shockwave extracorporeal lithotripsy.* Actas Urol Esp, 1997. **21**: p. 752-7.
43. Straub, M., J. Gschwend, and C. Zorn, *Pediatric urolithiasis: the current surgical management.* Pediatr Nephrol, 2010. **25**: p. 1239-44.
44. Delius, M., et al., *Biological effects of shock waves: kidney damage by shock waves in dogs - dose dependence.* Ultrasound Med Biol, 1988. **14**: p. 117-22.

45. Delius, M., *Twenty years of shock wave research at the Institute for Surgical Research*. Eur Surg Res, 2002. **34**: p. 30-6.
46. Chen, J., T. Deng, and Z. Tian, *Cavitation in ESWL*. J Xinjiang Univ Natur Sci, 2007. **30**: p. 128-33.
47. Crum, L.A., *Cavitation microjets as a contributory mechanism for renal calculi disintegration in ESWL*. J Urol, 1988. **140**: p. 1587-90.
48. Delacretaz, G., et al., *Importance of the implosion of ESWL-induced cavitation bubbles*. Ultrasound Med Biol, 1995. **21**: p. 97-103.
49. Rodola, F., et al., *Anaesthesia for shock wave therapy in musculoskeletal disorders: a preliminary report*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2002. **6**: p. 133-8.
50. Lifshitz, D.A., et al., *Quantitation of shock wave cavitation damage in vitro*. Ultrasound Med Biol, 1997. **23**: p. 461-71.
51. Jaalouk, D.E. and J. Lammerding, *Mechanotransduction gone awry*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**: p. 63-73.
52. Tidball, J.G., *Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaptation*. J Appl Physiol, 2005. **98**: p. 1900-8.
53. Ye, C., et al., *Shear stress and vascular smooth muscle cells promote endothelial differentiation of endothelial progenitor cells via activation of Akt*. Clin Biomech, 2008. **23**: p. 118-24.
54. Vollrath, M.A., K.Y. Kwan, and D.P. Corey, *The micromachinery of mechanotransduction in hair cells*. Annu Rev Neurosci, 2007. **30**: p. 339-65.
55. Delhasse, Y., *Dissertation: Stoßwelleninduzierte Mechanotransduktion bei humanen mesenchymalen Stammzellen*. 2011, Justus-Liebig-Universität Gießen.
56. Vetrano, M., et al., *Extracorporeal shock wave therapy promotes cell proliferation and collagen synthesis of primary cultured human tenocytes*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2011. **19**: p. 2159-68.
57. Dorotka, R., et al., *Effects of extracorporeal shock waves on human articular chondrocytes and ovine bone marrow stromal cells in vitro*. Arch Orthop Trauma Surg, 2003. **123**: p. 345-8.
58. Martini, L., et al., *Shock wave therapy as an innovative technology in skeletal disorders: study on transmembrane current in stimulated osteoblast-like cells*. Int J Artif Organs, 2005. **28**: p. 841-7.
59. Zhang, D., et al., *Extracorporeal shockwave-induced expression of lubricin in tendons and septa*. Cell Tissue Res, 2011. **346**: p. 255-62.
60. Duchstein, H.-J. and H. Neuland, *Reactive oxygen and nitrogen species and mechanotransduction during shock wave application*. 2007, 10th International Congress of the ISMST: Toronto, Canada.

61. Mariotto, S., et al., *Extracorporeal shock waves: From lithotripsy to anti-inflammatory action by NO production*. Nitric Oxide, 2005. **12**: p. 89-96.
62. Mariotto, S., et al., *Extracorporeal shock wave therapy in inflammatory diseases: molecular mechanism that triggers anti-inflammatory action*. Curr Med Chem, 2009. **16**: p. 2366-72.
63. Moretti, B., et al., *Extracorporeal shock waves down-regulate the expression of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in osteoarthritic chondrocytes*. BMC Musculoskelet Disord, 2008. **9**: p. 16.
64. Yan, X., et al., *Improvement of blood flow, expression of nitric oxide, and vascular endothelial growth factor by low-energy shockwave therapy in random-pattern skin flap model*. Ann Plast Surg, 2008. **61**: p. 646-53.
65. Aicher, A., et al., *Low-energy shock wave for enhancing recruitment of endothelial progenitor cells: a new modality to increase efficacy of cell therapy in chronic hind limb ischemia*. Circulation, 2006. **114**: p. 2823-30.
66. Hausdorf, J., et al., *Selective loss of unmyelinated nerve fibers after extracorporeal shockwave application to the musculoskeletal system*. Neuroscience (Oxford, U. K.), 2008. **155**: p. 138-44.
67. Hausdorf, J., et al., *Extracorporeal shockwave application to the distal femur of rabbits diminishes the number of neurons immunoreactive for substance P in dorsal root ganglia L5*. Brain Res, 2008. **1207**: p. 96-101.
68. Gerdesmeyer, L., et al., *Antibacterial effects of extracorporeal shock waves*. Ultrasound Med Biol, 2005. **31**: p. 115-9.
69. Gambihler, S., M. Delius, and J.W. Ellwart, *Permeabilization of the plasma membrane of L1210 mouse leukemia cells using lithotripter shock waves*. J Membr Biol, 1994. **141**: p. 267-75.
70. Zhu, S. and P. Zhong, *Shock wave-inertial microbubble interaction: a theoretical study based on the Gilmore formulation for bubble dynamics*. J Acoust Soc Am, 1999. **106**: p. 3024-33.
71. Schaaf, A., et al., *In vitro transfection of human bladder cancer cells by acoustic energy*. Anticancer Res, 2003. **23**: p. 4871-5.
72. Weiss, N., et al., *Effect of shock waves and cisplatin on cisplatin-sensitive and -resistant rodent tumors in vivo*. Int J Cancer, 1994. **58**: p. 693-9.
73. *Vorrichtung und Verwendung einer Druckschallquelle zur Behandlung von Pilzkrankungen*. Patent Nr: DE 10 2009 049 716 A1. 2009, Kosmig GmbH: Deutschland.
74. Fritsch, P., *Dermatologie und Venerologie für das Studium*. 2009, Berlin, Heidelberg: Springer. p. 26-9.
75. Juhlin, L., *Hyaluronan in skin*. J Intern Med, 1997. **242**: p. 61-6.

76. Uitto, J. and E.F. Bernstein, *Molecular mechanisms of cutaneous aging: connective tissue alterations in the dermis*. J Invest Dermatol Symp Proc, 1998. **3**: p. 41-4.
77. Gilchrist, B.A., *A review of skin ageing and its medical therapy*. Br J Dermatol, 1996. **135**: p. 867-75.
78. Varani, J., et al., *Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation*. Am J Pathol, 2006. **168**: p. 1861-8.
79. Ghersetich, I., et al., *Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging*. Int J Dermatol, 1994. **33**: p. 119-22.
80. Brinck, M., et al., *Sex hormones and skin collagen content in postmenopausal women*. Br Med J, 1983. **287**: p. 1337-8.
81. Slobodianik, G.I., *Current views on the morphology of wound healing*. Lik Sprava, 2001:129-33.
82. Lippert, H., *Wundatlas Kompendium der komplexen Wundbehandlung*. Vol. 2. 2001, Stuttgart: Georg Thieme Verlag. p. 28-37.
83. Ross, R., *The fibroblast and wound repair*. Biol Rev Camb Philos Soc, 1968. **43**: p. 51-96.
84. Hunt, T.K., et al., *Anaerobic metabolism and wound healing: an hypothesis for the initiation and cessation of collagen synthesis in wounds*. Am J Surg, 1978. **135**: p. 328-32.
85. Kurkinen, M., et al., *Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue*. Lab Invest, 1980. **43**: p. 47-51.
86. Badylak, S.F., *The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction*. Semin Cell Dev Biol, 2002. **13**: p. 377-83.
87. Robson, M.C., *Growth factors as wound healing agents*. Curr Opin Biotechnol, 1991. **2**: p. 863-7.
88. Mensing, H., *Importance of fibroblast chemotaxis in wound healing and tumor cell evasion*. Klin Wochenschr, 1985. **63**: p. 145-51.
89. Boyden, S.V., *The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes*. J Exp Med, 1962. **115**: p. 453-66.
90. Rodriguez, L.G., X. Wu, and J.-L. Guan, *Wound-healing assay*. Methods Mol Biol, 2005. **294**: p. 23-9.
91. Enoch, S., et al., *Increased oral fibroblast lifespan is telomerase-independent*. J Dent Res, 2009. **88**: p. 916-21.

92. Liu, Y., et al., *Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction*. J Neurochem, 1997. **69**: p. 581-93.
93. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**: p. 76-85.
94. Winkelman, J. and S.S. Spicer, *Staining with tetraphenylporphinesulfonate in vivo*. Stain Technol, 1962. **37**: p. 303-5.
95. Greenberg, S.R., *A new method for the histological study of collagen*. Lab Med, 1986. **17**: p. 474-5.
96. Meyer, K. and J.W. Palmer, *The polysaccharide of the vitreous humor*. J Biol Chem, 1934. **107**: p. 629-34.
97. Laurent, T.C. and J. Gergely, *Light scattering studies on hyaluronic acid*. J Biol Chem, 1955. **212**: p. 325-33.
98. Ogston, A.G. and J.E. Stanier, *Physiological function of hyaluronic acid in synovial fluid; viscous, elastic, and lubricant properties*. J Physiol, 1953. **119**: p. 244-52.
99. Wohlrab, W., R.H.H. Neubert, and J. Wohlrab, *Hyaluronsäure und Haut*. Vol. 3. 2004, Aachen: Shaker Verlag. p.19.
100. Nishida, Y., et al., *Antisense inhibition of hyaluronan synthase-2 in human articular chondrocytes inhibits proteoglycan retention and matrix assembly*. J Biol Chem, 1999. **274**: p. 21893-9.
101. Tammi, R. and M. Tammi, *Correlations between hyaluronan and epidermal proliferation as studied by [3H]glucosamine and [3H]thymidine incorporations and staining of hyaluronan on mitotic keratinocytes*. Exp Cell Res, 1991. **195**: p. 524-7.
102. Pauloin, T., et al., *High molecular weight hyaluronan decreases UVB-induced apoptosis and inflammation in human epithelial corneal cells*. Mol Vision, 2009. **15**: p. 577-83.
103. Jahn, M., J.W. Baynes, and G. Spiteller, *The reaction of hyaluronic acid and its monomers, glucuronic acid and N-acetylglucosamine, with reactive oxygen species*. Carbohydr Res, 1999. **321**: p. 228-34.
104. Tammi, R., et al., *Degradation of newly synthesized high molecular mass hyaluronan in the epidermal and dermal compartments of human skin in organ culture*. J Invest Dermatol, 1991. **97**: p. 126-30.
105. Spicer, A.P. and J.Y.L. Tien, *Hyaluronan and morphogenesis*. Birth Defects Res, 2004. **72**: p. 89-108.
106. Dougherty, G.J., et al., *Regulation of the functional activity and ligand binding specificity of the adhesion protein CD44*. Trends Glycosci Glycotechnol, 1995. **7**: p. 45-56.

107. Cheung, W.F., T.F. Cruz, and E.A. Turley, *Receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM), a hyaladherin that regulates cell responses to growth factors*. *Biochem Soc Trans*, 1999. **27**: p. 135-42.
108. Longas, M.O., C.S. Russell, and X.Y. He, *Evidence for structural changes in dermatan sulfate and hyaluronic acid with aging*. *Carbohydr Res*, 1987. **159**: p. 127-36.
109. Brown, T.J., D. Alcorn, and J.R.E. Fraser, *Absorption of hyaluronan applied to the surface of intact skin*. *J Invest Dermatol*, 1999. **113**: p. 740-6.
110. Sattler, G., *Successful treatment of periorbital wrinkles with a gel containing 0,5% hyaluronic acid*. *Kosmet Med*, 2007. **28**: p. 130-2.
111. Gold, M.H., *Use of hyaluronic acid fillers for the treatment of the aging face*. *Clin Interventions Aging*, 2007. **2**: p. 369-76.
112. Segura, T., et al., *Crosslinked hyaluronic acid hydrogels: a strategy to functionalize and pattern*. *Biomaterials*, 2005. **26**: p. 359-71.
113. Kubo, K., et al., *Depolymerization of hyaluronan by sonication*. *Glycoconjugate J*, 1993. **10**: p. 435-9.
114. Rehakova, M., et al., *Depolymerization reactions of hyaluronic acid in solution*. *Int J Biol Macromol*, 1994. **16**: p. 121-4.
115. Engelhardt, H., W. Beck, and T. Schmitt, *Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten*. Vol. 1. 1994, Braunschweig/Wiesbaden: Vieweg Verlagsgesellschaft. p. 3-19.
116. Martin, A.N. and H. Leuenberger, *Physikalische Pharmazie: Pharmazeutisch angewandte und physikalisch-chemische Grundlagen*. Vol. 4. 2002, Stuttgart. p. 579-80.
117. Bloemen, M.C.T., et al., *An objective device for measuring surface roughness of skin and scars*. *J Am Acad Dermatol*, 2011. **64**: p. 706-15.
118. Kinoshita, M., et al., *Determination of molecular mass of acidic polysaccharides by capillary electrophoresis*. *Biomed Chromatogr*, 2002. **16**: p. 141-5.
119. Alkrad, J.A., Y. Merstani, and R.H.H. Neubert, *New approaches for quantifying hyaluronic acid in pharmaceutical semisolid formulations using HPLC and CZE*. *J Pharm Biomed Anal*, 2002. **30**: p. 913-9.
120. Bothner, H., T. Waaler, and O. Wik, *Limiting viscosity number and weight average molecular weight of hyaluronate samples produced by heat degradation*. *Int J Biol Macromol*, 1988. **10**: p. 287-91.
121. Lath, D., et al., *Molar mass-intrinsic viscosity relationship of high-molar-mass hyaluronans: Involvement of shear rate*. *Chem Pap*, 2005. **59**: p. 291-3.

122. Mendichi, R., L. Soltes, and A.G. Schieroni, *Evaluation of Radius of Gyration and Intrinsic Viscosity Molar Mass Dependence and Stiffness of Hyaluronan*. *Biomacromolecules*, 2003. **4**: p. 1805-10.
123. Orlandi, R., et al., *Determination of the molecular weight of hyaluronic acid by viscometry*. *Boll Chim Farm*, 1996. **135**: p. 546-51.
124. Stankovska, M., et al., *Study of hyaluronan degradation by means of rotational viscometry: Contribution of the material of viscometer*. *Chem Pap*, 2004. **58**: p. 348-52.
125. Freed, K.F. and S.F. Edwards, *Huggins coefficient for the viscosity of polymer solutions*. *J Chem Phys*, 1975. **62**: p. 4032-5.
126. Ginter, S. and W. Krauß, *Sound field measurement report for the Piezowave / F7G3 shock wave source (Interner Messbericht)*. 2008, Richard Wolf GmbH: Knittlingen.
127. Ohl, C.-D. and B. Wolfrum, *Detachment and sonoporation of adherent HeLa-cells by shock wave-induced cavitation*. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2003. **1624**: p. 131-8.
128. Mott, R.E. and B.P. Helmke, *Mapping the dynamics of shear stress-induced structural changes in endothelial cells*. *Am J Physiol*, 2007. **293**: p. 1616-26.
129. Kasper, G., et al., *Insights into mesenchymal stem cell aging: involvement of antioxidant defense and actin cytoskeleton*. *Stem Cells*, 2009. **27**: p. 1288-97.
130. Martini, L., et al., *Primary osteoblasts response to shock wave therapy using different parameters*. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 2003. **31**: p. 449-66.
131. Bonner, J.C., et al., *PDGF-stimulated fibroblast proliferation is enhanced synergistically by receptor-recognized α 2-macroglobulin*. *J Cell Physiol*, 1990. **145**: p. 1-8.
132. Lauffenburger, D.A. and A.F. Horwitz, *Cell migration: a physically integrated molecular process*. *Cell*, 1996. **84**: p. 359-69.
133. Ando, J., H. Nomura, and A. Kamiya, *The effect of fluid shear stress on the migration and proliferation of cultured endothelial cells*. *Microvasc Res*, 1987. **33**: p. 62-70.
134. Vetterkind, S., et al., *Binding of Par-4 to the actin cytoskeleton is essential for Par-4/Dlk-mediated apoptosis*. *Exp Cell Res*, 2005. **305**: p. 392-408.
135. Morgan, D.M.L., *Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity*. *Methods Mol Biol*, 1998. **79**: p. 179-83.
136. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. *J Immunol Methods*, 1983. **65**: p. 55-63.

137. Tuan, T.-L. and L.S. Nichter, *The molecular basis of keloid and hypertrophic scar formation*. Mol Med Today, 1998. **4**: p. 19-24.
138. Sato, M., O. Ishikawa, and Y. Miyachi, *Distinct patterns of collagen gene expression are seen in normal and keloid fibroblasts grown in three-dimensional culture*. Br J Dermatol, 1998. **138**: p. 938-43.
139. Williams, G., *The late phases of wound healing: histological and ultrastructural studies of collagen and elastic-tissue formation*. J Pathol, 1970. **102**: p. 61-8.
140. Hayase, S., et al., *High-performance capillary electrophoresis of hyaluronic acid: determination of its amount and molecular mass*. J Chromatogr, 1997. **768**: p. 295-305.
141. Shimada, E. and G. Matsumura, *Thin-layer chromatography of hyaluronate oligosaccharides*. J Biochem, 1984. **96**: p. 721-5.
142. Shimada, E. and G. Matsumura, *Comparison of relationships between the chemical structures and mobilities of hyaluronate oligosaccharides in thin-layer and high-performance liquid chromatography*. J Chromatogr, 1985. **328**: p. 73-80.
143. Ambrosius, M., K. Kleesiek, and C. Goetting, *Quantitative determination of the glycosaminoglycan Δ -disaccharide composition of serum, platelets and granulocytes by reversed-phase high-performance liquid chromatography*. J Chromatogr, 2008. **1201**: p. 54-60.
144. Frazier, S.B., et al., *The quantification of glycosaminoglycans: A comparison of HPLC, carbazole, and Alcian Blue methods*. Open Glycosci, 2008. **1**: p. 31-9.
145. Mahoney, D.J., et al., *Novel methods for the preparation and characterization of hyaluronan oligosaccharides of defined length*. Glycobiology, 2001. **11**: p. 1025-33.
146. *Europäisches Arzneibuch 4. Ausgabe Grundwerk* Vol. 2. 2002 Eschborn: Deutscher Apothekerverlag Stuttgart - Govi-Verlag - Pharmazeutischer Verlag GmbH
147. Laurent, T.C. and J. Gergely, *Light-scattering studies in hyaluronic acid*. J Biol Chem, 1955. **212**: p. 325-33.
148. Engelhardt, H., W. Beck, and T. Schmitt, *Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten*. Vol. 1. 1994, Braunschweig/Wiesbaden: Vieweg Verlagsgesellschaft. p. 98-104.
149. Serwe, M., *Troubleshooting and Preventive Maintenance in CE*. Vol. 1. 1996, Walbronn: Hewlett-Packard Company. p. 1-51.
150. Everett, D.H., *Basic Principles of Colloid Science*. Vol. 1. 1988, London: Royal Society of Chemistry. p. 5.
151. Wohlrab, W., R.H.H. Neubert, and J. Wohlrab, *Hyaluronsäure und Haut*. Vol. 3. 2004, Aachen: Shaker Verlag. p. 9.

152. Al-Assaf, S., P.A. Williams, and G.O. Phillips, *Hyaluronan*. Molecular characterization of hyaluronan and hylan using GPC-MALLS and asymmetrical flow FFF-MALLS. Vol. 1. 2002, Cambridge: Woodhead Publishing Ltd. p. 55-65.
153. Martin, A.N. and H. Leuenberger, *Physikalische Pharmazie: Pharmazeutisch angewandte und physikalisch-chemische Grundlagen*. Vol. 4. 2002, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. p. 734.
154. Westphal, G. and L.G. Fleischer, *Eigenschaften von Hyaluronsäure*. Parfuem Kosmet, 1996. **77**: p. 342-6.
155. Dort, I., *Comment on the Huggins viscosity coefficient*. Chem Prum, 1986. **36**: p. 377-8.
156. Shepard, S., H. Becker, and J.X. Hartmann, *Using hyaluronic acid to create a fetal-like environment in vitro*. Ann Plast Surg, 1996. **36**: p. 65-9.
157. Ito, T., et al., *Hyaluronan and proximal tubular cell migration*. Kidney Int, 2004. **65**: p. 823-33.
158. Ludowieg, J., B. Vennesland, and A. Dorfman, *Mechanism of action of hyaluronidases*. J Biol Chem, 1961. **236**: p. 333-9.
159. Gerdesmeyer, L., et al., *Physical-technical principles of extracorporeal shockwave therapy (ESWT)*. Der Orthopäde, 2002. **31**: p. 610-7.
160. Calcagni, M., et al., *Microvascular response to shock wave application in striated skin muscle*. J Surg Res, 2011. **171**: p. 347-54.
161. Hegner, G., et al., *Skin moisture and age. Age- and sex-specific skin moisture topography*. Fortschr Med, 1981. **99**: p. 486-90.
162. Kim, H., et al., *Improvement in skin wrinkles from the use of photostable retinyl retinoate: a randomized controlled trial*. Br J Dermatol, 2010. **162**: p. 497-502.
163. Tang, W., et al., *A study of the influence of temperature and humidity on skin friction property*. J Biomed Eng, 2009. **26**: p. 523-5, 549.
164. Conti, A., et al., *Seasonal influences on stratum corneum ceramide 1 fatty acids and the influence of topical essential fatty acids*. Int J Cosmet Sci, 1996. **18**: p. 1-12.
165. Jariashvili, K., et al., *UV damage of collagen: Insights from model collagen peptides*. Biopolymers, 2012. **97**: p. 189-98.
166. Reed, R.K., et al., *Removal rate of [³H]hyaluronan injected subcutaneously in rabbits*. Am J Physiol, 1990. **259**: p. 532-5.
167. Davidson, E.A. and W. Small, *Metabolism in vivo of connective-tissue mucopolysaccharides. II. Chondroitin sulfate B and hyaluronic acid of skin*. Biochim Biophys Acta, 1963. **69**: p. 453-8.

168. Andre, P., *Hyaluronic acid and its use as a "rejuvenation" agent in cosmetic dermatology*. Semin Cutan Med Surg, 2004. **23**: p. 218-22.
169. Ascher, B., et al., *Soft tissue filling with hyaluronic acid*. Ann Chir Plast Esthet, 2004. **49**: p. 465-85.
170. Koshiyama, K., et al., *Structural change in lipid bilayers and water penetration induced by shock waves: molecular dynamics simulations*. Biophys J, 2006. **91**: p. 2198-205.
171. Koshiyama, K., et al., *Molecular dynamics simulation of structural changes of lipid bilayers induced by shock waves: Effects of incident angles*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**: p. 1423-8.
172. Koshiyama, K., et al., *Molecular delivery into a lipid bilayer with a single shock waves using molecular dynamic simulation*. AIP Conf Proc, 2005. **754**: p. 104-6.
173. Kodama, T., M.R. Hamblin, and A.G. Doukas, *Cytoplasmic molecular delivery with shock waves: importance of impulse*. Biophys J, 2000. **79**: p. 1821-32.
174. Glogau, R.G., *Aesthetic and anatomic analysis of the aging skin*. Semin Cutan Med Surg, 1996. **15**: p. 134-8.
175. Knapp, T.R., E.N. Kaplan, and J.R. Daniels, *Injectable collagen for soft tissue augmentation*. Plast Reconstr Surg, 1977. **60**: p. 398-405.
176. Rzany, B., B. Ascher, and G.D. Monheit, *Treatment of glabellar lines with botulinum toxin type A: a clinical overview*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2010. **24**: p. 1-14.
177. Hantash, B.M. and H.B. Gladstone, *A pilot study on the effect of epinephrine on botulinum toxin treatment for periorbital rhytides*. Dermatol Surg, 2007. **33**: p. 461-8.
178. Piccioni, A., et al., *Efficacy and tolerability of 5-aminolevulinic acid 0.5% liposomal spray and intense pulsed light in wrinkle reduction of photodamaged skin*. J Dermatolog Treat, 2011. **22**: p. 247-53.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis und Glossar

$\Delta\Delta Ct$	Berechnungsmethode mit der bei der qRT-PCR die n-fache Expression angegeben werden kann
ad	auffüllen auf
BCA	Bicinchoninic acid = Bicinchoninsäure
CCD	Charge-coupled device = ladungsgekoppelter Sensor der Kamera
CD44	Glykoprotein auf Zelloberflächen, in Zellinteraktion, -adhäsionen und -migration involviert
cDNA	complementary DNA = komplementäre DNA
CE	Capillary Electrophoresis = Kapillarelektrophorese
COL1A2	Genequenz für Kollagen Typ I Untereinheit alpha 2
COL3A1	Genequenz für Kollagen Typ III Untereinheit alpha 1
CP-155	Applikator des dermagold Stoßwellengerätes
C_t	Cycle threshold = Schwellenwert Zyklus
Da	Dalton
dem.	demineralisiert
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay = Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ELN	Genequenz für Elastin

eNOS	endotheliale NO-Synthase
F7G3	Applikator des PiezoWave (fokussiert)
FCS	Fetal calf serum = fötales Kälberserum
FN1	Gensequenz für Fibronektin Typ 1
FP4	Applikator des PiezoWave (planar)
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
HAS2	Hyaluronsäuresynthase Typ 2
HRP	Horseradish peroxidase = Meerrettichperoxidase
IVSWT	In-vitro schock wave therapy
mRNA	messenger RNA = Boten-RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid
NHDF	Normale humane dermale Fibroblasten
PBS	Phosphate buffered saline = Phosphat-gepufferte-Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PMS	Phenazinmethosulfat
PRIMOS	Phaseshift rapid in-vivo measuring of human skin = Streifenlichtprojektionsverfahren zur Vermessung der Haut
qRT-PCR	quantitative Real Time-PCR = quantitative Echtzeit PCR

RHAMM	Receptor for hyaluronan-mediated motility = Rezeptor für hyaluronsäurevermittelte Motilität
RNA	Ribonucleic acid = Ribonukleinsäure (RNS)
rpm	Umdrehungen per Minute (min^{-1})
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SD	Standard deviation = Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl sulfate = Natriumdodecylsulfat
t-12,5/25/75	Zellkulturflaschen mit Angabe der Wachstumsfläche in cm^2
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	TRIS buffered saline = TRIS gepufferte Salzlösung
TNS	Trypsin Neutralization Solution = Trypsin Neutrali- sierungslösung
TPPS	5,10,15,20-Tetraphenyl-21,23-porphine-tetra-sulfonat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	O-[4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenoxy]polyethoxy- ethanol
Tween 20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaurat
Well	Loch / Vertiefung in Gewebe- / Zellkulturplatte
XTT	2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H- tetrazolium-5-carboxanilid

Gefahrstoffe und KMR-Substanzen

Mit denen in Kapitel 3.1.2 aufgeführten Chemikalien und Reagenzien wurde im Rahmen dieser Arbeit umgegangen. Dabei wurden die aufgeführten Gefahrenmerkmale (Hazard) und Sicherheitsratschläge (Precaution) beachtet. Die Angaben erfolgen gemäß Globally Harmonized System of Classification, Labelling and Packaging of Chemicals (GHS) bzw. Verordnung Nr. 1272/2008 (Annex VI) des Europäischen Parlaments und des Rates (GHS Verordnung).

Für die aufgeführten Stoffe, die nach GHS Verordnung 1272/2008 in die KMR Kategorien fallen, wurde daher zusammen mit der Dissertation die geforderte Dokumentation nach der Leitlinie für Tätigkeiten mit krebserzeugenden, erbgutverändernden und fortpflanzungsgefährdenden Stoffen (KMR Stoffen) der Kategorie I und II im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg eingereicht.

CAS-RN	Stoffname	Cat.
10043-35-3	Borsäure	R I
1239-45-8	Ethidiumbromid	M II

Veröffentlichungen

Publikationen:

Neumann, K.; Duchstein H.-J.

Accumulated Total Energy Flux Density - An Indicator to Compare Electrohydraulic and Piezoelectric Devices?; ISMST Newsletter, June 2012, Volume 8, Issue 1

Neumann, K.; Duchstein H.-J.; Neuland, H.

Influence of Shock-Wave-Treatment on Migration, Proliferation and Genetic Expression of Fibroblasts; ISMST Newsletter, May 2011, Volume 7, Issue 1

Eingeladene Vorträge:

Neumann, K.; Duchstein H.-J.; Neuland, H.

Influence of Shockwave Therapy on Fibroblasts - Special Meaning for Skin Remodeling; 14th congress of the International Society for Medical Shockwave Treatment; Juni 2011, Kiel, Deutschland

Neumann, K.; Duchstein H.-J.

Accumulated Total Energy – An Indicator to Compare Electrohydraulic and Piezoelectric Devices?; 2nd ISMST Basic Research Meeting; Januar 2012; Innsbruck, Österreich

Posterbeiträge:

Neumann, K.; Duchstein H.-J.

Einfluss von Stoßwellen auf die Wundheilung - mögliche zelluläre Wirkmechanismen durch Fibroblasten; Tag der Pharmazie 2011; Juli 2011; Hamburg, Deutschland

Neumann, K.; Duchstein H.-J.; Baldus S.; Klinke A.; Lau D.

Shock-Waves Influence Mechanism in Fibroblasts that Improve Wound Healing and Skin Remodeling; Joint Meeting ÖPhG-DPhG; September 2011; Innsbruck, Österreich

Danksagung

Für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Überlassung des Themas und die fachliche, engagierte und sehr freundliche Betreuung danke ich Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein. Besonders dankbar bin ich, dass er mir den wissenschaftlichen Austausch auf internationaler Ebene und die Durchführung verschiedener Forschungsprojekte ermöglicht hat. Die damit zusammenhängenden gemeinsamen Kongress- und Dienstreisen waren zugleich interessant wie angenehm.

Bei Herrn Prof. Dr. Michael Korth bedanke ich mich sehr herzlich für die freundliche Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau Prof. Dr. Elke Oetjen und Herr Dr. Ulrich Riederer haben freundlicherweise ihre Zusage gegeben als Prüfer an meiner Disputation teilzunehmen, wofür ich Ihnen danke.

Bei Herrn Dr. Neuland möchte ich mich für die zahlreiche Anregungen, die er hinterlassen hat, bedanken. Mit seiner Leidenschaft für die Wissenschaft hat er neue Wege aufgezeigt, die ich in dieser Arbeit verfolgen konnte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stephan Baldus für die Ermöglichung der Arbeit in seinen Laboratorien am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf. Durch ihn konnten die in-vitro Versuche an Fibroblasten realisiert werden. Seine Arbeitsgruppe hat mich mit großer Freundlichkeit aufgenommen und mich mit viel Hilfsbereitschaft unterstützt, wofür ich Ihnen sehr dankbar bin. Insbesondere Dr. Anna Klinke und Dr. Denise Lau möchte ich für ihre wertvolle Betreuung und Hilfe in dieser Zeit danken.

Für die Möglichkeit zu einem lehrreichen Forschungsaufenthalt am Institut für Biophysik in Brünn (Tschechische Republik) danke ich Dr. Lukas Kubala.

Für viele Anregungen sowie einen interessanten und fruchtbaren Ideenaustausch, was die Vergleichbarkeit verschiedener Stoßwellenprinzipien betrifft, danke ich Christian Dorfmueller von der MTS Europe GmbH.

Bei Martina und Dr. Andreas Lang möchte ich mich für die großartige Unterstützung bei der Durchführung der Studie ganz besonders bedanken. Durch Ihren Einsatz, die Hilfsbereitschaft sowie die familiäre und liebevolle Aufnahme konnte nicht nur ein tolles Projekt realisiert werden, ich durfte auch eine sehr nette Zeit bei Ihnen in Höchstberg verbringen.

Diese Arbeit wurde durch die Bereitstellung von Stoßwellengeräten durch die Firmen Richard Wolf GmbH und MTS Europe GmbH ermöglicht, wofür ich sehr dankbar bin. Bei der Richard Wolf GmbH und der Niemann-Stiftung möchte ich mich außerdem für die finanzielle Unterstützung bei Kongressreisen bedanken.

Am Institut für Pharmazie bedanke ich mich bei Tamara Palmieri und Annika Bahr für die schöne, freundschaftliche gemeinsame Zeit und den wissenschaftlichen Austausch. Christine Bostedt möchte ich für ihre immerwährende Unterstützung und Hilfsbereitschaft danken. Zudem bedanke ich mich bei den gegenwärtigen und ehemaligen Mitgliedern des Instituts Dr. Sebastian Kruggel, Michaela Seeger, Moritz Münsterberg, Eva Griewel und Dr. Annabelle Fenske für die gute Zusammenarbeit bei der Betreuung der Praktika. Jan-Hendrik Löhr und Bernhard Poll sei, neben den anderen Herren meines Arbeitskreises, für die hilfsbereite Unterstützung meiner Arbeit gedankt. Dr. Ulrich Riederer und Dr. Thomas Lemcke danke ich für die angenehme Zusammenarbeit in der Praktikumsbetreuung. Allen Mitgliedern des Instituts möchte ich außerdem für die gute Arbeitsatmosphäre und die fröhlichen Stunden, die ich mit ihnen verbringen durfte danken.

Meinen Freunden, insbesondere Nicole, danke ich für viel Verständnis, Motivation und Kraft.

Ein großer Dank gilt Christoph für Ablenkung, Kritik, viele Satzzeichen und noch mehr liebevolle Verpflegung von Leib und Seele.

Von Herzen danken möchte ich meiner Familie für die uneingeschränkte Unterstützung jeglicher Art und dass sie immer für mich da war und ist. Meinen Eltern Regina und Burkhard danke ich ganz besonders, dass sie mir auf allen Ebenen diesen Weg ermöglicht und jederzeit Rückhalt gegeben haben.

Versicherung an Eides statt

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die an der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Untersuchung der Wirkung Extrakorporaler Stoßwellentherapie auf die Haut: Effekte der Mechanotransduktion auf Fibroblasten in-vitro und Analyse von Hautveränderungen in-vivo

am Institut für Pharmazie sowie am Cardiovascular Research Center des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf unter der Leitung und Betreuung von Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein aus dem Department Chemie, ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Hamburg, den 10.04.12

Kerstin Neumann