

Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
am Klinikum rechts der Isar
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Gradinger)

Effekte von radialen extrakorporalen Stoßwellen auf gesundes Knochengewebe am Kaninchenmodell

Tobias Maximilian Gloeck

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. R. Gradinger
2. apl. Prof. Dr. Dr. H. P. Rechl

Die Dissertation wurde am 05.08.2008 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.01.2009 angenommen.

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis:

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	7
1.1	Geschichte der Stoßwellenanwendung in der Medizin	7
1.2	Die Stoßwellentechnologie	8
1.3	Stand der Grundlagenforschung	13
1.3.1	Wirkung von Stoßwellen in biologischen Geweben	13
1.3.2	Wirkung von Stoßwellen auf Knochengewebe	14
1.3.3	Wirkung von Stoßwellen auf Wachstumsfaktoren der Knochenneubildung	15
1.4	Klinische Indikationen der Stoßwellentherapie in der Orthopädie	16
1.5	Nebenwirkungen der Stoßwellentherapie beim Einsatz in der Orthopädie	20
1.6	Aufgabenstellung	21
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	Tierversuch	22
2.1.1	Materialien	22
2.1.1.1	Medikamente	22
2.1.1.2	Farbstoffe	22
2.1.1.3	rESWT-Gerät	22
2.1.1.4	Überwachungsgerät	23
2.1.2	Methoden	23
2.1.2.1	Versuchstiere	23
2.1.2.2	Versuchsplanung	23
2.1.2.3	Versuchsgruppen	24
2.1.2.4	Behandlungsvorbereitung und Anästhesie	24
2.1.2.5	Durchführung der rESWT	24
2.1.2.6	Posttherapeutisches Monitoring	25
2.1.2.7	Polyfluorochrome Sequenzmarkierung	26

2.1.2.8 Euthanasie und Sektion	26
2.2 Histopathologische Aufbereitung der Knochenpräparate	27
2.2.1 MMA-Einbettung	27
2.2.1.1 Materialien	27
2.2.1.2 Herstellung einer 13-prozentigen MMA-Lösung	27
2.2.1.3 MMA-Bodenguss in Glasbehältern	28
2.2.1.4 Knochenpräparatvorbereitung	28
2.2.1.5 Einbettung der Knochenpräparate	29
2.2.2 Weiterverarbeitung der Präparate in Trenn-/Dünnschlifftechnik	29
2.2.2.1 Materialien	29
2.2.2.2 Trenn-/Dünnschlifftechnik	30
2.3 Mikroskopische Untersuchung der Knochenpräparate	31
2.3.1 Materialien	31
2.3.2 Polyfluorochrome Sequenzanalyse	31
2.4 Radiologische Untersuchungen der Knochenpräparate	32
2.4.1 Materialien	32
2.4.2 Kontaktradiographie	32
2.4.3 Mikroradiographie	33
2.5 Histopathologische Aufarbeitung der Lungenpräparate	33
2.5.1 Materialien	33
2.5.2 Herstellung der Präparate	34
2.5.2.1 Grobzuschnitt	34
2.5.2.2 Feinzuschnitt	34
2.5.2.3 Färbung	34
2.6 Histologische Untersuchung der Lungenpräparate	34
2.6.1 Materialien	34
2.6.2 Mikroskopische Untersuchung	34

2.7	Statistische Auswertung.....	35
3	ERGEBNISSE	37
3.1	Mikroskopische Untersuchung der Knochenpräparate.....	37
3.1.1	Polyfluorochrome Sequenzanalyse.....	37
3.1.1.1	Untersuchung der Osteoneogenese und deren Dynamik.....	37
3.1.1.2	Differenzierung der ventralen und dorsalen Osteoneogenese.....	40
3.1.2	Histologisch-mikroskopische Untersuchung.....	43
3.2	Radiologische Untersuchungen der Knochenpräparate.....	43
3.3	Histologische Untersuchung der Lungenpräparate.....	44
4	DISKUSSION	45
4.1	Material und Methoden.....	45
4.2	Wirkung der Stoßwellen auf die Knochenneubildung.....	45
4.3	Dynamik der durch Stoßwellen induzierten Knochenneubildung.....	50
4.4	Wirkung von Stoßwellen auf Faktoren der Neovaskularisation und Schmerzwahrnehmung.....	51
4.5	Antibakterielle Wirkung von Stoßwellen.....	52
4.6	Wirkung von Stoßwellen auf Sehngewebe.....	53
4.7	Nebenwirkungen der Stoßwellentherapie.....	54
4.8	Schlussfolgerung und klinische Relevanz.....	54
5	ZUSAMMENFASSUNG	56
6	LITERATURVERZEICHNIS	58
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	63

8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	65
9	ANHANG	67
10	LEBENS LAUF	74
11	DANKSAGUNG	75

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1. Geschichte der Stoßwellenanwendung in der Medizin

Der Einsatz extrakorporaler Stoßwellen in der Medizin wurde erstmals vor über 60 Jahren 1947 in den USA beschrieben. Frank Rieber meldete ein Patent zur Therapie von Hirntumoren mittels eines elektrohydraulischen Stoßwellengenerators an (HAAKE, 2004, S. 8). Diese Indikation für die Stoßwellentherapie schaffte allerdings nie den Weg in den klinischen Alltag.

Durch die Erkenntnis, dass Stoßwellen ohne größeren Schaden zu verursachen Bindegewebe, Fett und Muskulatur durchdringen können, wurden zu Beginn der siebziger Jahre des 20. Jahrhunderts erste Untersuchungen zur berührungslosen Zerstörung von Nierensteinen angestellt (HAAKE, 2004, S. 8). Es dauerte über zehn Jahre, bis 1983 der erste kommerzielle Lithotripter von Dornier produziert wurde. Die extrakorporale Stoßwellenlithotripsie wurde in den achtziger und neunziger Jahren zum Mittel der Wahl zur Behandlung von Nieren- und Uretersteinen (RENNER, 1999, S. 71ff). Dies war die erste Indikation für den Einsatz extrakorporaler Stoßwellen im klinischen Alltag.

Stoßwellen wurden auch für andere Steinarten wie Gallen-, Pankreas- und Speichelsteine erprobt. Sie konnten sich aber nicht als Methode der Wahl in der klinischen Praxis etablieren.

Der erste Einsatz extrakorporaler Stoßwellen am Bewegungsapparat erfolgte 1987 durch Karpman (KARPMAN, 1987, S. 38ff). Sein Ziel war es, vor einem operativen Endoprothesenwechsel am Hüftgelenk den das Implantat umgebenden Knochenzementmantel zu zertrümmern. Diese Annahme stellte sich aber in der Praxis als unzureichend heraus. Vier Jahre später versuchte Valchanou erstmals Pseudarthrosen mit Stoßwellen zu therapieren (VALCHANOU, 1991, S. 181ff). Durch die desintegrierende Wirkung der Stoßwellen wurde auch die Therapie der Tendinitis calcarea der Schulter erstmals evaluiert (DAHMEN, 1992, S. 25ff). Da im Verlauf der ersten klinischen Forschungsarbeiten eine analgesierende Wirkung der behandelten Region durch die Stoßwellen festgestellt werden konnte, wurden 1993 erste

Therapieversuche bei Insertionstendopathien wie der Epikondylitis humeri radialis durchgeführt (DAHMEN, 1993, S. 143ff). Als dritte häufige Indikation für die ESWT etablierte sich in den neunziger Jahren die Plantarfasciitis (BUCH, 2002, S. 637ff).

Nach den ersten klinischen Erfolgen wurde verstärkt versucht, durch Grundlagenforschung den Effekt der radialen Stoßwellen im Knochen- und Weichteilgewebe nachzuweisen. Es wurde anhand mehrerer Tiermodelle nachgewiesen, dass Stoßwellen Knochenneubildung induzieren. Dies zeigte sich sowohl für normale und frakturierte Knochen als auch für Knochen nach Osteotomie und für Knochendefekte (DELIUS, 1995, S. 1219ff, MCCORMACK, 1996, S. 20ff, WANG, 2001, S. 112ff, WANG, 2004, S. 225ff).

Als zugrunde liegende Mechanismen wurden dabei die Induktion von Sauerstoffradikalen und die Membranhyperpolarisation entdeckt (WANG, 2001, S. 648ff), gefolgt von der Stimulation von knochenbildenden Zellen (WANG, 2002, S. 457ff, WANG, 2002, S. 10931ff) und der Expression von Wachstumsfaktoren (CHEN, 2004, S. 526ff).

Im Weiteren wird nun auf die Details der Stoßwellentechnologie, der Grundlagenforschung, der klinischen Einsatzmöglichkeiten und der Nebenwirkungen der Stoßwellentherapie eingegangen.

1.2 Die Stoßwellentechnologie

Stoßwellen sind hochfrequente Schallwellen, eine Sonderform von Druckwellen. Sie werden als transiente Druckschwankungen definiert, die sich dreidimensional ausbreiten und bei denen es typischerweise innerhalb einer sehr kurzen Zeit im Nanosekundenbereich zu einem deutlichen Anstieg des Druckes kommt. Neben diesem sehr rasch ansteigenden positiven Druckimpuls P_+ zeichnen sich Stoßwellen durch eine sich daran unmittelbar anschließende Zugphase mit negativen Drucken P_- aus (siehe Abbildung 1). Die vollständige Stoßwelle hat einen zeitlichen Umfang von wenigen Mikrosekunden bis Millisekunden (GERDESMEYER, 2002, S. 611).

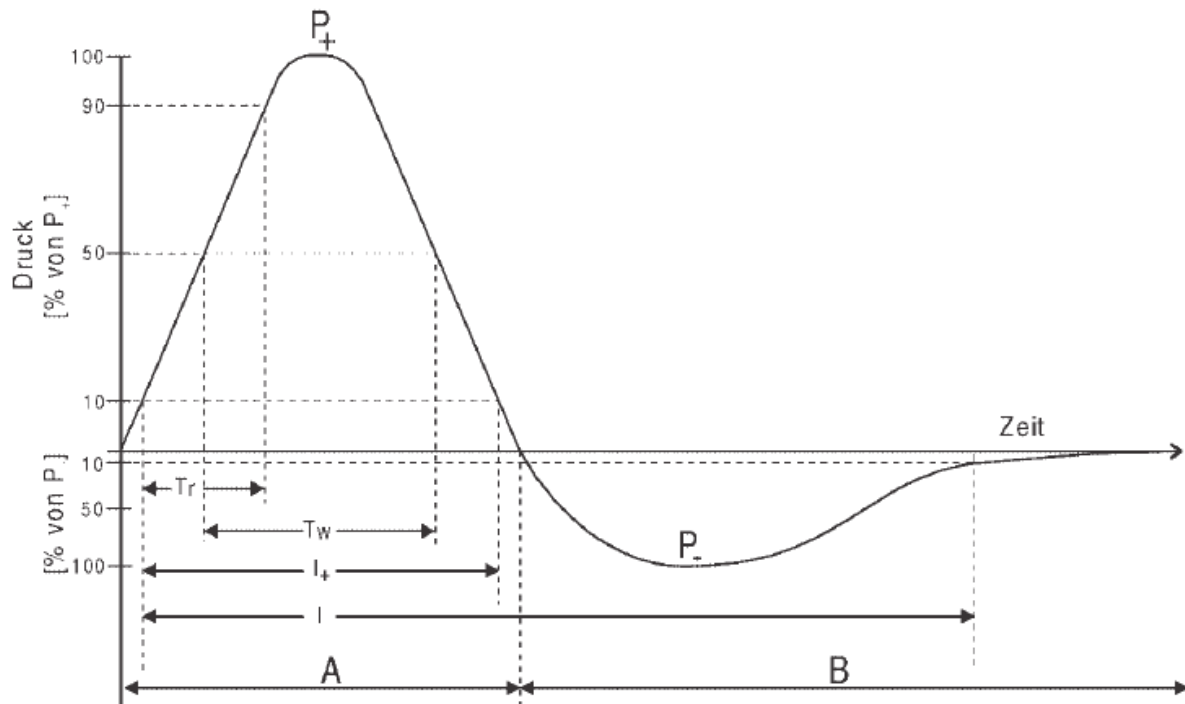


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Stoßwelle (aus GERDESMEYER 2002, S. 611)

[A = Anteil der Stoßwelle mit positivem Druck, B = Anteil der Stoßwelle mit negativem Druck, P_+ = positiver Spitzendruck, P_- = negativer Spitzendruck, T_r Anstiegszeit, T_w Pulsbreite, I_+ = Standardzeitintervall zur Berechnung der sog. „positiven Energie“ der Stoßwelle, I = Standardzeitintervall zur Berechnung der sog. „totalen Energie“ der Stoßwelle]

Neben den in der Abbildung 1 beschriebenen Faktoren werden verschiedene weitere akustische Parameter definiert. Diese sind: Gesamtenergieflussdichte (ED), positive Energieflussdichte (ED+) und maximaler Spitzendruck (P_{max}). Die Energieflussdichte wird zur Festlegung verschiedener Energiebereiche benutzt und in mJ/mm^2 angegeben (GERDESMEYER, 2002, S. 610ff). Nach Rompe et al. werden die Energiebereiche folgendermaßen eingeteilt: „niederenergetisch“ bis zu einer Energieflussdichte von $0,08 \text{ mJ}/\text{mm}^2$, „mittelenergetisch“ bis zu $0,28 \text{ mJ}/\text{mm}^2$ und bei Werten darüber als „hochenergetisch“ (ROMPE, 1998, S. 105ff).

Zur Erzeugung der Stoßwellen sind derzeit im Wesentlichen vier technische Verfahren in der klinischen Anwendung zu finden. Das in dieser Doktorarbeit verwendete, relativ neue und weit verbreitete Verfahren ist die mechanische Erzeugung der Druckwellen. Bei dieser ballistischen Technik wird ein Projektil mittels Druckluft stark beschleunigt. Dann trifft dieses mit hoher kinetischer Energie auf einen Applikator, der auf der Haut des Patienten aufliegt. Dieser transferiert die

entstandene kinetische Energie in radiär expandierende Druckwellen, die sich nicht in einem Fokus vereinigen (siehe Abbildung 2 und 4). Unter Verwendung eines Kopplungsmediums, wie beispielsweise Ultraschallgel, wird die entstandene Stoßwelle in das Gewebe eingeleitet (GERDESMEYER, 2002, S. 614). Für diese Art der Druckwelle hat sich der Begriff radiale Stoßwelle etabliert.

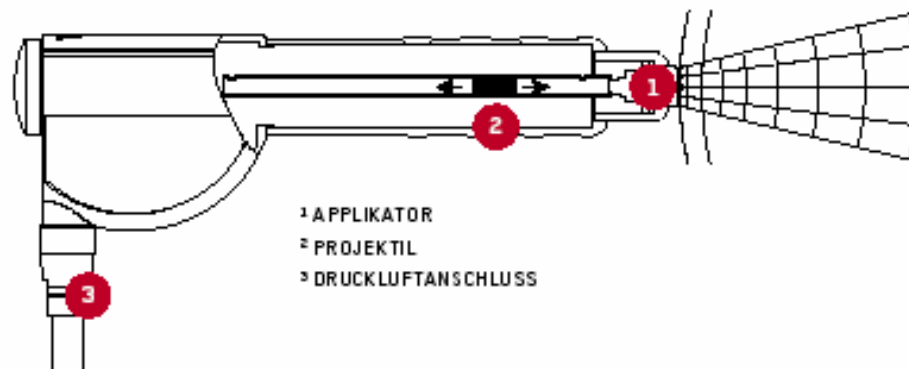


Abbildung 2: Ballistische Erzeugung der radialen Stoßwelle im Handstück des Swiss Dolorclast® von EMS (aus: ELECTRO MEDICAL SYSTEMS, 2008, S. 4)

Die drei weiteren Verfahren zur Erzeugung von Stoßwellen werden alle zur Produktion fokussierter Stoßwellen eingesetzt. Am weitesten verbreitet ist hierbei die elektromagnetische Erzeugung. Elektrohydraulische und piezoelektrische Verfahren vervollständigen die in der Klinik relevanten Erzeugungsprinzipien (OGDEN, 2001, S. 8ff).

Ein physikalischer Unterschied der radialen Stoßwelle zur fokussierten Stoßwelle stellt die fehlende Aufsteilung der radialen Stoßwellen dar. Druckwellen können sich aufsteilen, wenn deren Amplituden sehr hohe Werte annehmen (typisch 10-100 MPa). Die Ursache dafür ist die Nichtlinearität der Ausbreitungsgeschwindigkeit im Ausbreitungsmedium. Darunter versteht man die Tatsache, dass sich die Druckschwankung bei sehr hohem Druck schneller ausbreitet als bei geringem Druck. Der Vorgang der Aufsteilung einer Wellenfront ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

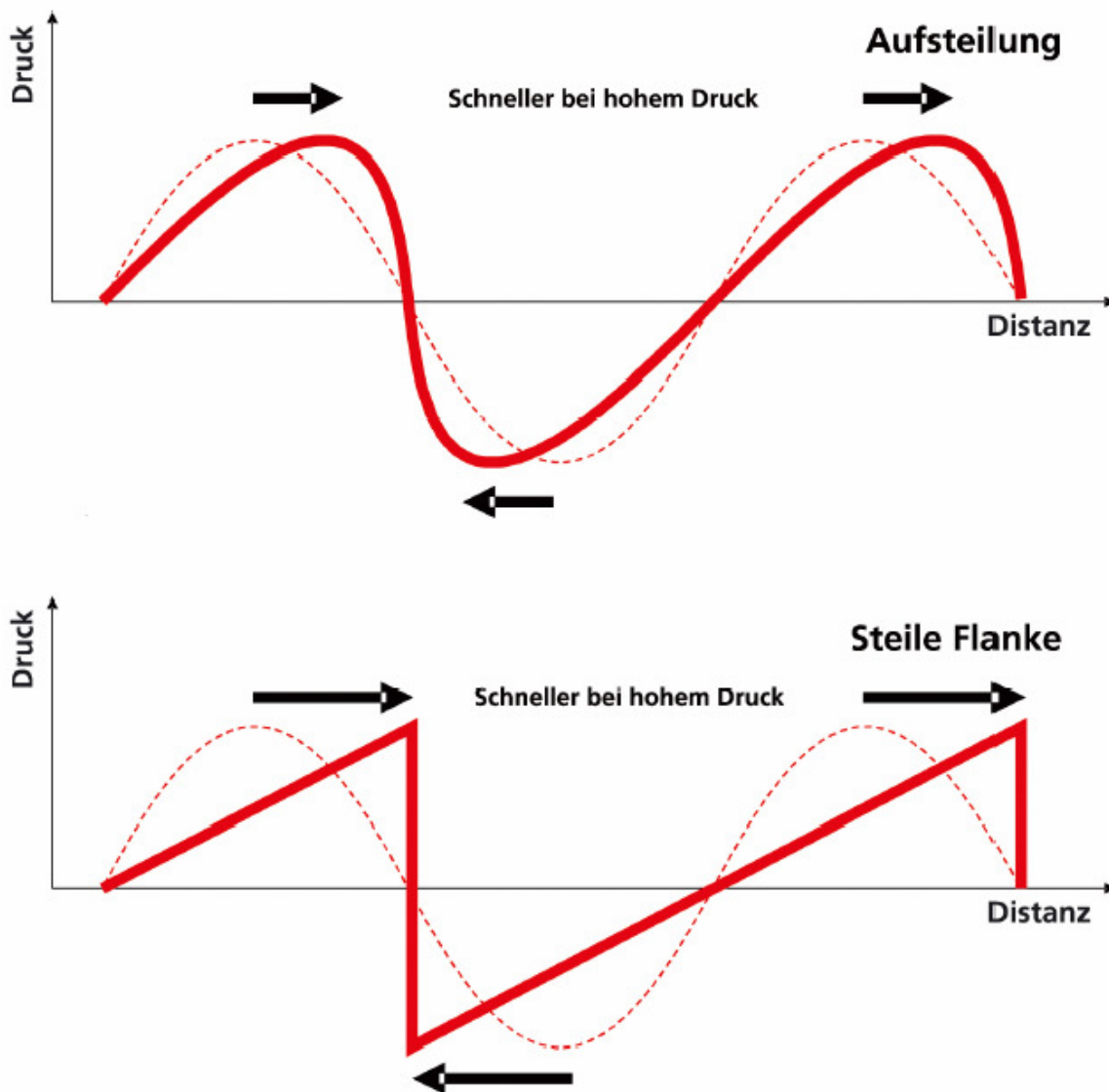


Abbildung 3: Aufsteilung einer Druckwelle zu einer Stoßwelle (aus FEHRE, 2005, S.4)

Erst wenn Druckwellen bzw. Druckpulse diese besonderen Eigenschaften (Steilheit) aufweisen, bezeichnet man sie als Stoßwellen. Durch die fehlende Aufsteilung der radialen Stoßwellen sollte man diese demzufolge besser als Druckwellen bezeichnen (FEHRE, 2005, S. 1ff). Zudem bildet sich durch die fehlende Aufsteilung kein klassischer Stoßwellenfokus, der sich in tieferen Gewebereichen platzieren ließe, aus. Allerdings kann durch die fehlende Fokussierung ein größeres erkranktes Gewebeareal erreicht werden (Abbildung 4).

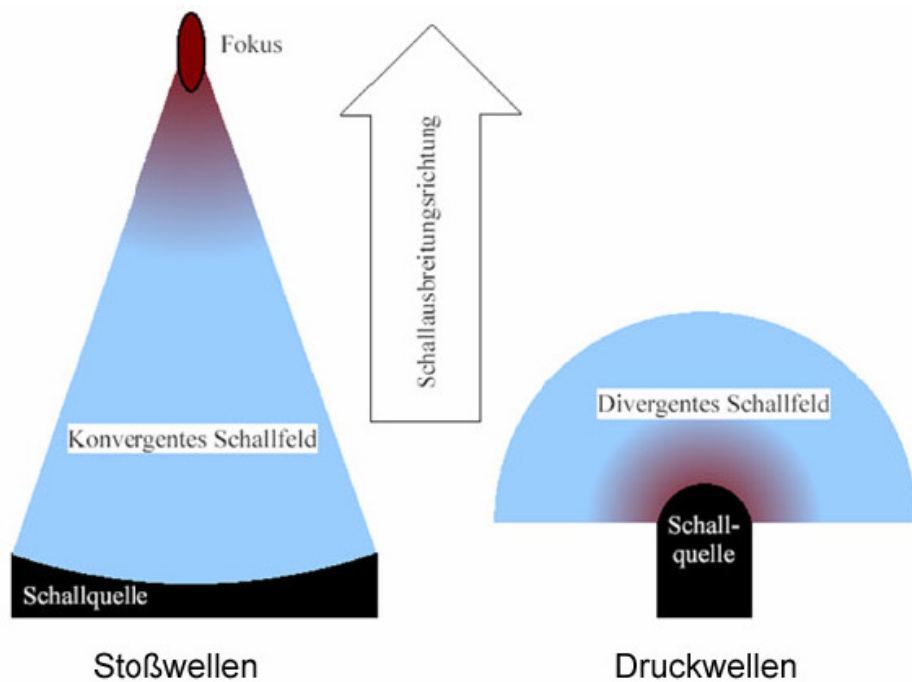


Abbildung 4: Schallausbreitung bei fokussierten (links) und unfokussierten (rechts) Stoßwellensystemen (aus FEHRE, 2005, S. 13)

Wegen der radiären Ausbreitungsart nehmen Druck und Energiedichte der unfokussierten Stoßwelle nach dem Austreten aus dem Applikator stetig ab. Dadurch resultiert eine geringere Gewebepenetration. Deshalb wurde bisher die rESWT für die Behandlung von tiefen Knochenerkrankungen kritisch betrachtet (WESS, 1997, S. 59ff). Für oberflächennahe Strukturen ist die radiale Stoßwelle aber ideal geeignet. Neue und verbesserte Techniken haben inzwischen zu einer Modifikation der im Rahmen der ballistischen Stoßwelle zur Anwendung kommenden Applikatorsysteme geführt. Durch eine spezielle Geometrie und Veränderungen der Applikatoren kann man die ballistisch generierten Stoßwellen derart beeinflussen, dass sich höher konzentrierte Zonen fokussieren lassen (GERDESMAYER, 2004, S. 37). Bis dato wurde der Effekt von niedrig energetischen nicht fokussierten radialen Stoßwellen auf den Knochen noch in keiner Studie untersucht. Zudem ist bis heute nicht genau bekannt, welche technischen Parameter für die möglichen biologischen Effekte oder klinischen Ergebnisse verantwortlich sind (HAAKE, 2002, S. 222ff).

Zu unterscheiden sind also prinzipiell zwei verschiedene Arten von „Stoßwellen“, fokussierte Stoßwellen und nicht fokussierte radiale Druckwellen.

1.3 Stand der Grundlagenforschung

Nach den ersten klinischen Erfolgen der Stoßwellentherapie in den neunziger Jahren wurde die Grundlagenforschung auf diesem Gebiet zu Beginn des 21. Jahrhunderts zunehmend verstärkt. So konnten beispielsweise als Effekte der Stoßwellen die Induktion von Knochenwachstum, die Stimulation von molekularen Wachstumsfaktoren der Knochenneubildung, antibakterielle Effekte und eine Wirkung auf Sehngewebe nachgewiesen werden.

1.3.1 Wirkung von Stoßwellen in biologischen Geweben

Eine große Relevanz hat die grundlegende Frage, welche Effekte extrakorporale Stoßwellen in biologischen Geweben haben. Es lassen sich thermische und chemische Effekte nachweisen. Am bedeutendsten sind aber die mechanischen Effekte. Diese entstehen dadurch, dass Gewebe mit unterschiedlichen akustischen Kenndaten durchschallt werden. An den Grenzflächen treten dabei Impedanzsprünge auf. Durch diese kommt es an Grenzflächen zweier Medien zur Umwandlung von akustischer in mechanische, thermische und chemische Energie. Die Größe des Impedanzunterschiedes ist dabei proportional zur entstehenden mechanischen Energie (GERDESMEYER, 2002, S. 615f). Relevante Impedanzwerte für die Stoßwellentherapie von Knochengewebe finden sich in Tabelle 1 (KRAUSE, 1997, S. 15ff).

Medium	Impedanz [x10 ³ ns/m ³]
Fett	1380
Wasser	1480
Muskel	1650-1740
Knochen	3200-7400
Nierenstein	5600-14400

Tabelle 1: Akustische Impedanz verschiedener Gewebemedien (nach KRAUSE, 1997, S. 15ff)

Die Induktion von Kavitation ist ein weiterer wichtiger Wirkungsmechanismus der extrakorporalen Stoßwellentherapie. Als Kavitation bezeichnet man das Auftreten gasgefüllter Hohlräume in einem flüssigen Medium unter dem Einfluss negativer Druckgradienten. Durch den negativen Zugwellenanteil der Stoßwelle kommt es zur Absenkung des Druckes mit einem Aufreißen der Verbindung zwischen den Wassermolekülen und der Entstehung von Wasserdampf. Dieser sammelt sich kurzfristig in gasgefüllten Hohlräumen, die man als Kavitationsblasen bezeichnet. Diese können in Wasser eine Größe von mehreren Millimetern annehmen. Nachdem die Druckwelle das Gewebe passiert hat, kommt es zu einer Normalisierung der Druckverhältnisse und die Blasen kollabieren. Sehr häufig kommt es dabei zu einem asymmetrischen Kollaps der Blasen und es treten infolgedessen Hochgeschwindigkeitsflüssigkeitsströme mit bis zu 800 m/s auf, die sogenannten „Jet-streams“. Dies führt zu lokal wirkenden zerstörerischen Effekten (GERDESMEYER, 2002, S. 616).

1.3.2 Wirkung von Stoßwellen auf Knochengewebe

Die Wirkung von fokussierten Stoßwellen auf den Knochen konnte 1993 von Sukul et al. am Kaninchenknochen in einer In-vitro-Studie nachgewiesen werden. In dieser Forschungsarbeit konnte die Entstehung von Mikro- und Makrofrakturen in der Kortikalis in Abhängigkeit von der Energiedichte der Stoßwellen aufgezeigt werden. Zudem wurde postuliert, dass hochenergetische Stoßwellen die Knochenneubildung unterstützen können (KAULESAR SUKUL, 1993, S. 49ff).

1995 konnten Delius et al. in einer Studie am Kaninchenknochen nachweisen, dass fokussierte hochenergetische Stoßwellen auch in vivo einen Effekt auf gesundes Knochengewebe haben. Mittels histologischer Untersuchungstechniken und polyfluorochromer Sequenzanalyse konnte gezeigt werden, dass die Stoßwellen trabekuläre Mikrofrakturen und subperiostale Hämatome erzeugen sowie die Knochenneubildung anregen können (DELIUS, 1995, S. 1224f). Weitere Studien bestätigten die Erkenntnis, dass hochenergetische fokussierte Stoßwellen die Osteoneogenese induzieren (Abbildung 5, IKEDA, 1999, S. 946ff, MAIER, 2004, S. 1404ff, WANG, 2004, S. 227ff).

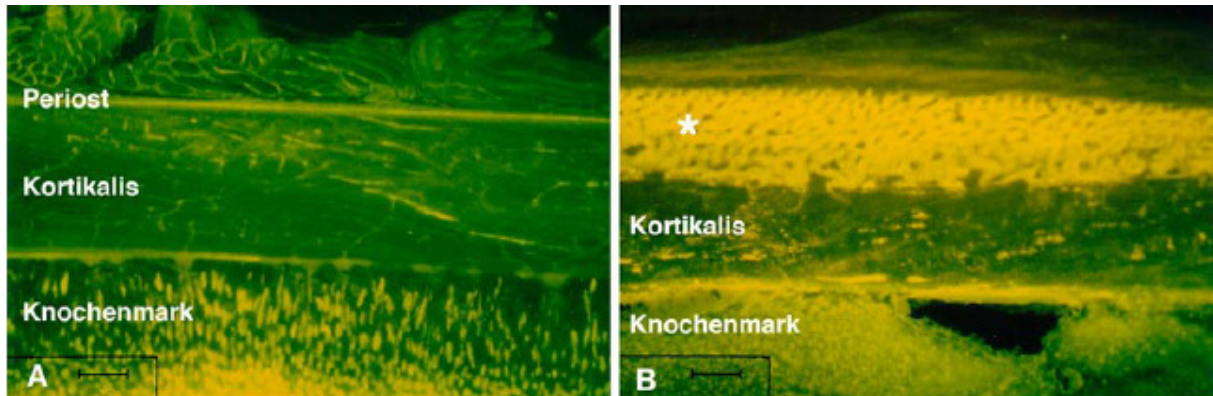


Abbildung 5: Breitbandfluoreszenzmikroskopie eines distalen Kaninchenfemurs [10 Tage nach extrakorporaler Stoßwellenbehandlung und nach Oxytetracyclininjektion an den Tagen 5–9 nach Stoßwellenbehandlung; A = unbehandeltes Femur, B = behandeltes Femur, * = Knochenneubildung] (aus Maier 2004, S. 1404)

Sowohl die In-vitro- als auch die In-vivo-Studien zeigen histologisch, dass die fokussierten extrakorporalen Stoßwellen die Knochenneubildung fördern. Bisher wurde noch keine Studie durchgeführt, die den Effekt der radialen niedrig-energetischen Stoßwellen auf den Knochen untersucht hat.

1.3.3 Wirkung von Stoßwellen auf Wachstumsfaktoren der Knochenneubildung

Ein weiterer nachgewiesener Effekt von Stoßwellen ist die Induktion von Wachstumsfaktoren im Knochengewebe und im Knochenmark.

Wang et al. konnten zeigen, dass durch Stoßwellen vermehrt transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) im Knochenmark exprimiert und dadurch die Zelldifferenzierung hin zu Zellen der Knochenneubildung gefördert wird (WANG, 2002, S. 457ff). In weiteren Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass die Stoßwellen Potentialveränderungen an der Zellmembran auslösen, dadurch eine intrazelluläre Ras-Kaskade in Gang setzen und damit letztlich grundlegende molekulare Mechanismen zur Aktivierung der Knochenneubildung darstellen (WANG, 2001, S. 653f).

Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass Stoßwellen durch die Schädigung von Zellen im Knochenmark einen lokalen oxidativen Stress auslösen. Durch diesen

werden der ERK-abhängige osteogene Transkriptionsfaktor CBFA1 und die p38-Kinase induziert, welche unter anderem eine Differenzierung von mesenchymalen Zellen hin zu Zellen der Knochenneubildung auslösen (CHEN, 2004, S. 475f, WANG, 2002, S. 10936f).

Als weiteren wichtigen molekularen Faktor für die Knochenneubildung und eine gesteigerte Expression der Knochenregeneration nach Stoßwellenapplikation entdeckten Wang et al. die "bone morphogenic proteins" BMP-2,-3,-4 und -7, die zur Familie der TGF gehören. Diese Proteine regulieren die Differenzierung von mesenchymalen Zellen hin zu Zelllinien der Osteoneogenese. In einer In-vivo-Studie an Ratten konnte gezeigt werden, dass die BMP-Konzentration nach Stoßwellenapplikation signifikant erhöht ist. Damit könnten die BMP eine wichtige Rolle für den osteogenen Effekt der fokussierten Stoßwellen spielen (WANG, 2003, S. 392ff).

Somit zeigen sich auch auf molekularer Ebene deutliche Anzeichen, dass die fokussierte extrakorporale Stoßwellenapplikation die Knochenneubildung fördert. Eine komplette Aufklärung des Wirkmechanismus gibt es jedoch bis heute nicht. Für die radiale Stoßwellentechnologie fehlt dieser Nachweis bisher noch vollständig.

1.4 Klinische Indikationen der Stoßwellentherapie in der Orthopädie

Die extrakorporale Stoßwellentherapie wird in der Orthopädie derzeit für verschiedene pathologische Weichteilerkrankungen verwendet. Mehrere randomisierte Studien mit hoher wissenschaftlicher Qualität zeigten eine Effektivität der ESWT für Enthesiopathien wie die Plantarfasciitis oder die kalzifizierende Tendinitis der Schulter (GERDESMAYER, 2003, S. 2576ff, MALAY, 2006, S. 196ff). Zudem zeigten mehrere Studien (Abbildung 6), dass die hochenergetische fokussierte ESWT auch für die Pseudarthrosentherapie im Sinne einer Knochenstoffwechselstimulation geeignet sein könnte (GOLLWITZER, 2006, S. 142ff, ROMPE, 2001, S. 102ff, SCHADEN, 2001, S. 90ff).

Autor	Jahr	Anzahl Patienten	Lokalisation	Erfolgsrate [%]	Evidenzgrad
Valchanou u. Michailov [66]	1991	82	Diverse	85	IV
Schleberger u. Senge [57]	1992	4	Diverse	75	IV–V
Bürger et al. [9]	1992	30	Untere Extremität	57 ^a	IV
Haist [26]	1995	40	Diverse	75	IV
Haupt u. Katzmeier [30]	1995	30	Diverse	73	IV
Schleberger [56]	1995	45	Diverse	89	IV
Rompe et al. [50]	1997	52	Diverse	52	IV
Russo et al. [52]	1997	125	Diverse	88 ^a	IV
Vogel et al. [67]	1997	52	Diverse	52	IV
Diesch u. Haupt [16]	1997	172	Diverse	66	IV
Beutler et al. [4]	1999	27	Diverse	41	IV
Schaden [54]	2000	80	Diverse	78	IV
Brandner u. Späth [8]	2001	105	Diverse	85 ^a	IV
Rompe et al. [51]	2001	43	Tibia und Femur	72	IV
Wang et al. [68]	2001	72	Diverse	80	IV
Schaden et al. [55]	2001	115	Diverse	76	IV
Biedermann et al. [6]	2003	57	Diverse	56	IV

Vergleich klinischer Studien

^aKnöchelne Konsolidierung oder deutliche Zunahme der Durchbauung

Abbildung 6: ESWT bei Pseudarthrosen (aus GOLLWITZER, 2006, S. 147)

In letzter Zeit wurde auch über eine Wirksamkeit der Stoßwellentherapie durch eine verstärkte Knochenregeneration im Rahmen einer avaskulären Knochennekrose (WANG, 2005, S. 2380ff) und eine Stimulation der Knochenfrakturheilung berichtet (WANG, 2007, S. 137ff).

Nach den Empfehlungen der Deutschsprachigen Internationalen Gesellschaft für Extrakorporale Stoßwellentherapie DIGEST gibt es derzeit folgende Indikationen für die ESWT (GERDESMEYER, 2008, S. 1):

- I) Anerkannte Standardindikationen
 - a) Chronische Tendinopathien
 - 1) Plantare Fasziitis m/o Sporn
 - 2) Achillessehne
 - 3) Rad. Epikondylopathie (Tennisellenbogen)
 - 4) Rotatorenmanschette m/o Kalk
 - 5) Patellasehne
 - 6) Trochanter Schmerzsyndrom (Greater Trochanter Pain Syndrom)
 - b) Knochenheilungsstörung
 - 1) Verzögerte Knochenheilung
 - 2) Stressfrakturen
 - 3) Avaskuläre Knochennekrose im Frühstadium (Nativ Rö.-bild o.B)

-
- 4) OD nach Wachstumsabschluss im Frühstadium
 - c) Urologie: Lithotrypsie (extrakorporal und endokorporal)
- II) Empirisch erprobte verbreitete klinische Anwendung
- a) Tendinopathie
 - 1) Ulnare Epikondylopathie
 - 2) Adduktorensyndrom
 - 3) Pes anserinus Syndrom
 - 4) Peronealsehnensyndrom
 - b) Muskuläre Pathologien
 - 1) Myofaszielles Schmerzsyndrom (unter Ausschluss einer Fibromyalgie)
 - 2) Verletzung ohne Diskontinuität
 - c) Wundheilungsstörung
 - d) Verbrennungsverletzungen
 - e) Speichelstein
- III) Ausnahmeindikation/Expertenindikation
- a) Spastizität
 - b) OD im Frühstadium vor Wachstumsabschluss
 - c) Apophysitis (M. Schlatte)
 - d) Induratio penis plastica
- IV) Anwendungen unter kontrollierten experimentellen Bedingungen
- a) Myokardischämie
 - b) Periphere Nervenläsion
 - c) Abakterielle Prostatitis
 - d) Parodontosen
 - e) Arthrosen

Neben den Forschungsprojekten, die einen positiven Effekt der ESWT nachweisen konnten, gibt es auch einige Studien, die keinen signifikanten Unterschied zwischen einer mit fokussierten Stoßwellen therapierten Patientengruppe und einer Kontrollgruppe zeigen konnten. So zeigte eine Studie von Speed et al. keinen

signifikanten Unterschied einer Stoßwellenapplikation mit mittlerer Energieflussdichte bei Patienten mit chronischer Plantarfasziitis gegenüber einer Placebobehandlung (SPEED, 2003, S. 938). In einer prospektiv-randomisierten Multicenterstudie konnten Haake et al. ebenfalls keinen Unterschied zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe bei Patienten mit chronischer Plantarfasziitis feststellen. Die Patienten beider Gruppen wiesen nach einem Jahr einen vergleichbaren Schmerzscore auf (HAAKE, 2003, S. 75ff). Ursächlich für die widersprüchlichen Studienergebnisse sind vornehmlich die unterschiedlichen Studienprotokolle und ESWT-Parameter, welche eine entscheidende Bedeutung für die Wirksamkeit haben. Dieser wesentliche Einfluss der Studienparameter (Energie, Impulszahl, etc.) macht eine explizite Prüfung der rESWT am Knochengewebe notwendig.

In klinischen Studien hat auch die rESWT bereits ihre Wirksamkeit gezeigt. Cacchio et al. konnten in einer prospektiv-randomisierten Studie nachweisen, dass die mit radialen Stoßwellen therapierten Patienten mit kalzifizierender Tendinitis signifikant weniger Beschwerden nach der Therapie aufwiesen als die nicht therapierte Kontrollgruppe (CACCHIO, 2006, S. 678f). Rompe et al. konnten ebenfalls in einer prospektiv-randomisierten Studie zeigen, dass die rESWT auch bei chronischen Tendinopathien der Achillessehne die Beschwerden der therapierten Patienten signifikant im Vergleich mit den Patienten der nicht therapierten Kontrollgruppe reduzierte (ROMPE, 2007, S. 380).

Um die Knochenheilung in einem klinischen Rahmen zu aktivieren, werden für gewöhnlich hochenergetische Stoßwellen verwendet. Dies macht den Einsatz einer Analgosedierung oder eines anästhetischen Verfahrens nötig. Zudem muss die ESWT in Intervallen von etwa vier bis sechs Wochen wiederholt werden (BRANDNER, 2004, S. 253ff). Allerdings sind derzeit weder Daten für die minimal nötige Energie, die zur Knochenwachstumsstimulation nötig ist, noch über die Dynamik und Persistenz der durch die Stoßwellen induzierten Knochenneubildung verfügbar. Die Empfehlungen zur Wiederholung der ESWT nach vier bis sechs Wochen beruhen rein auf empirischen Daten.

Die Vergleichbarkeit der einzelnen Studien untereinander ist allerdings nur eingeschränkt möglich. Zu Grunde liegt dieser Tatsache, dass in den Studien unter

anderem unterschiedliche Therapieregime in Bezug auf die Energieflussdichte, die Anzahl der applizierten Stoßwellen und den Abstand zwischen den einzelnen Therapiesitzungen angewendet werden. Zudem werden häufig unterschiedliche Geräte mit verschiedenen Verfahren zur Erzeugung der Stoßwellen verwendet.

Dies macht deutlich, dass im Bereich der Grundlagenforschung Antworten auf die Fragen nach einem sinnvollen Therapieregime gefunden werden müssen. Einen großen Stellenwert hat dabei die Frage, wie lange der Effekt einer Stoßwellentherapie anhält bevor eine weitere Therapiesitzung notwendig wird. In Bezug auf die Knochenneubildung soll diese Dissertation eine erste Antwort für die radiale Stoßwellentherapie liefern.

1.5 Nebenwirkungen der Stoßwellentherapie beim Einsatz in der Orthopädie

Neben den positiven Effekten der Stoßwellen sind für fokussierte Stoßwellen auch einige Nebenwirkungen beschrieben.

In mehreren experimentellen Untersuchungen an Tierknochen konnte die Entstehung von Mikro- und Makrofrakturen nachgewiesen werden. Während den Mikrofrakturen ein positiver Effekt im Sinne der Induktion der Knochenneubildung zugeschrieben wird (IKEDA, 1999, S. 946ff), sind die Makrofrakturen als Komplikation der Stoßwellentherapie zu werten (MAIER, 2004, S. 1401 ff). Als Grenzwert für die Energieflussdichte der applizierten Stoßwellen ist der Wert von $0,5 \text{ mJ/mm}^2$ von entscheidender Bedeutung. Bei Werten oberhalb dieser Marke entstehen Sehnennekrosen sowie die unerwünschten Makrofrakturen. Dabei sind deutliche Zeichen der periostalen Knochenneubildung zu erkennen (MAIER, 2004, S. 1408f). Eine weitere lokale Nebenwirkung, die in mehreren Studien beobachtet werden konnte, ist die Entstehung von lokalen Hämatomen und oberflächlichen Hautläsionen. Diese bilden sich allerdings bereits nach kurzer Zeit zurück (IKEDA, 1999, S. 946ff, ROMPE, 2001, S. 102ff, SCHADEN, 2001, S. 90ff).

Neben dem lokalen Auftreten von Nebenwirkungen nach der Applikation von fokussierten Stoßwellen sind auch Nebenwirkungen auf andere Organsysteme

bekannt. In einer Studie konnten nach einer hochenergetischen Stoßwellentherapie Knochenfragmente im Lungengewebe nachgewiesen werden. Dadurch besteht die potentielle Gefahr einer Lungenembolie (MAIER, 2003, S. 226). Zudem treten häufig Schmerzen während der Behandlung auf, die den Einsatz von anästhetischen Verfahren notwendig machen (DAHMEN, 1993, S. 143ff).

Insgesamt betrachtet gilt die extrakorporale Stoßwellentherapie am Bewegungsapparat jedoch als ausgesprochen nebenwirkungsarm (HELLER, 1998, S. 390ff, SISTERMANN, 1998, S. 175ff).

1.6 Aufgabenstellung

Bisher konnte lediglich für die fokussierte Stoßwellenapplikation ein osteogener Effekt nachgewiesen werden. Hauptziel der vorliegenden Dissertation war es daher, am Kaninchenmodell den Effekt der radialen nicht fokussierten extrakorporalen Stoßwellentherapie auf das Knochengewebe aufzuzeigen. Zu diesem Zweck wurden radiologische Analysen und die polyfluorochrome Sequenzanalyse durchgeführt.

Zudem sollte die Dynamik der durch die radialen Stoßwellen induzierten Osteogenese mittels polyfluorochromer Sequenzanalyse erforscht werden. Dies ist für die Entwicklung eines effektiven Behandlungsprotokolls in Bezug auf die Knochenneubildung durch die rESWT erforderlich.

Nachdem für die extrakorporale fokussierte Stoßwellentherapie einige Nebenwirkungen in der Literatur beschrieben sind (siehe 1.5), war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, mögliche negative Effekte der radialen Stoßwellen an der Applikationsstelle, am Knochen und im Lungengewebe nachzuweisen. Hierzu wurden der klinische Hautbefund der Versuchstiere dokumentiert, die Kontakt- und Mikroradiographie der Knochenpräparate sowie histologische Untersuchungen am Knochen und an den Kaninchenlungen durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1. Tierversuch

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß § 8a des Deutschen Tierschutzgesetzes vom 18.08.1986 bei der Regierung von Oberbayern angezeigt. Der Versuch wurde von der Tierärztin Dr. med. vet. Michaela Rößner betreut.

2.1.1 Materialien

2.1.1.1 Medikamente

- Medetomidin (Domitor®, Pfizer, Karlsruhe)
- Esketamin (Ketanest-S®, Parke-Davis GmbH, Berlin)
- Metamizol (Novaminsulfon®, Ratiopharm, Ulm)
- Bepanthen® Augensalbe (Hoffmann-La Roche AG, Grenzach- Whylen)
- Atipamezol (Antisedan®, Pfizer, Karlsruhe)
- Pentobarbital (Narcoren®, Merial GmbH, Hallbergmoos)
- medizinischer Sauerstoff

2.1.1.2. Farbstoffe

- Oxytetracyclin (Terramycin-100®, Pfizer, Karlsruhe)
- Calcein-Grün (3,0% in Natriumbicarbonat 2,0%, sterilisiert, Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München)
- Alizarin-Rot (3,0% in Natriumbicarbonat 2,0%, Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München)
- Calcein-Blau (3,0% in Natriumbicarbonat 2,0%, Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München)

2.1.1.3. rESWT-Gerät

- Swiss Dolorclast® Classic (EMS Electro-Medical Systems, Nyon, Schweiz)

2.1.1.4. Überwachungsgerät

- Pulsoxymeter (NPB-40, Nellcor, Pleasanton, USA)

2.1.2 Methoden

2.1.2.1 Versuchstiere

Die tierexperimentelle Studie wurde mit 13 weiblichen Kaninchen mit einem Durchschnittsgewicht von 3,9 kg (3,4 bis 4,5 kg) der Rasse „Weiße Neuseeländer“ durchgeführt. Sie wurden von einer zugelassenen Versuchstierzucht (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln) bezogen. Die Unterbringung der Tiere erfolgte in Einzelkäfigen aus Kunststoff in einem fensterlosen klimatisierten Raum (Raumtemperatur 20 bis 22 °C, relative Luftfeuchtigkeit 50 bis 60 %). Den Kaninchen stand ein spezielles Alleinfutter (Altromin Standard Diät, Altromin GmbH; Lage) sowie Wasser ad libitum zur Verfügung. Mit Hilfe eines automatischen Lichtprogramms wurde der natürliche Tag-Nacht-Rhythmus simuliert. Dabei herrschte von 6.00 bis 18.00 Uhr eine Lichtintensität von max. 100 Lux, danach folgten 12 Stunden Dunkelheit.

2.1.2.2 Versuchsplanung

Die 13 Versuchstiere wurden im Bereich eines randomisierten distalen Femurs mittels rESWT behandelt. Das kontralaterale Bein diente als intraindividuelle Kontrolle. Jedes Kaninchen erhielt am Tag 0 und 7 je eine rESWT mit gleicher Dosis. Den Tieren wurden nach einem festgelegten Injektionsschema fluorochrome Farbstoffe gespritzt. Am Ende des Versuchszeitraumes wurden die Kaninchen mit einer Überdosis Pentobarbital geopfert. Die beiden Femora, die zugehörigen anterioren Muskelgruppen und die Lungen der einzelnen Tiere wurden zur histologischen Weiterbearbeitung in Fixierlösungen eingelegt. Zur genauen Beschreibung der einzelnen Versuchsschritte siehe folgende Abschnitte.

2.1.2.3 Versuchsgruppen

Die Versuchstiere wurden in drei gleichgroße Versuchsgruppen mit jeweils vier Kaninchen randomisiert, ein Tier diente als Reserve (Tabelle 2). Die Auswahl der Tiere für die Gruppen erfolgte randomisiert. Da das Reservetier in seiner geplanten Funktion nicht benötigt wurde, wurde es am Ende des Versuches der Gruppe III zugeordnet.

Gruppe	Kaninchenanzahl	Opferung	rESWT
I	4	Tag 14	Tag 0 und 7
II	4	Tag 28	Tag 0 und 7
III	5	Tag 42	Tag 0 und 7

Tabelle 2: Gruppenzuordnung, Untersuchungszeitraum und rESWT-Termin

2.1.2.4 Behandlungsvorbereitung und Anästhesie

Die Tiere wurden vor der Operation gewogen und klinisch untersucht. Im Anschluss daran wurde den Tieren eine 22 G Venenverweilkanüle an einem Ohr zur Applikation von Medikamenten gelegt. Diese Kanüle wurde mittels isotoner NaCl-Infusion offen gehalten. Die Anästhesie der Tiere erfolgte mit Medetomidin (0,25 mg/kg i.m.) und Esketamin (17 mg/kg i.m.) in einer Mischspritze. Zusätzlich wurde zur intra- und postoperativen Analgesie Metamizol (30 mg/kg i.v.) verabreicht. Auf die Kornea beider Augen wurde Bepanthen® Augensalbe aufgetragen. Die Kaninchen erhielten eine Sauerstoffvorlage mit einem Flow von 5l/min. Die Narkose wurde je nach Bedarf mit einer Verdünnung von 70 mg Ketanest-S® und 1 mg Medetomidin auf 10 ml NaCl i.v. aufrechterhalten. Die Narkoseüberwachung erfolgte mittels Pulsoxymetrie. Zur Behandlungsvorbereitung wurde jedem Versuchstier das zu behandelnde Bein großzügig im Bereich cranial und caudal des Kniegelenkes rundum geschoren.

2.1.2.5 Durchführung der rESWT

Zur Applikation der radialen Stoßwellen wurde das Ansatzstück mit einem Durchmesser von fünf Millimeter gewählt. Das Handstück des rESWT-Gerätes wurde

an der ventralen Femurseite in der Mittellinie direkt cranial der Patella angesetzt (siehe Abbildung 7), wobei das Kniegelenk in ca. 45° Beugung gehalten wurde.

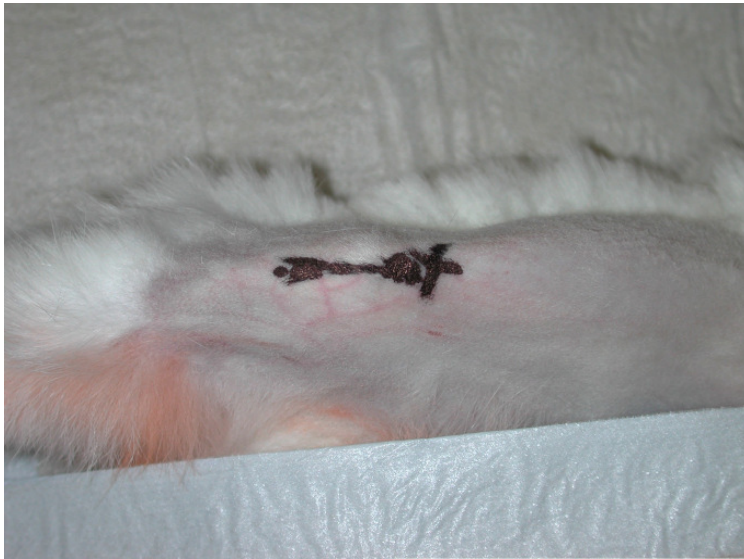


Abbildung 7: Applikationsstelle der radialen Stoßwellen [Kreuz: Applikationsstelle, Linie: Durchmesser der Patella]

Ein spezielles Ultraschallgel diente als Ankopplungsmedium. Danach wurde das Handstück des Swiss Dolorclast® Classic im 90° Winkel zur Haut platziert und mit geringem Ankoppelungsdruck angepresst. Dadurch erfolgte die Applikation der radialen Stoßwellen durch die Quadrizepssehne auf das distale Femur. Das rESWT-Gerät wurde auf 4000 Stoßwellen, eine Applikationsfrequenz von acht Herz und einen Applikationsdruck von vier Bar eingestellt. Die Behandlung wurde mittels eines Fußpedals ausgelöst. Jede Behandlung dauerte somit 500 Sekunden. Nach Beendigung der Therapie wurde die Medetomidinwirkung mit der Gabe von Atipamezol (0,25 mg/kg KG i.m.) antagonisiert.

2.1.2.6 Posttherapeutisches Monitoring

Die Tiere wurden täglich hinsichtlich ihres Allgemeinbefindens und des Lokalbefundes an der Applikationsstelle (Hautbefund, Überwärmung, Schwellung, Schmerzhaftigkeit und Lahmheit) untersucht. Futter- und Wasserverbrauch wurden täglich registriert, das Körpergewicht wurde jeden dritten Tag kontrolliert.

2.1.2.7 Polyfluorochrome Sequenzmarkierung

Die fluorochromen Farbstoffe wurden den Versuchstieren nach einem festgelegten Injektionsschema (Tabelle 3) je nach Gruppenzugehörigkeit subkutan injiziert. Alle Kaninchen erhielten an den Tagen -4, -3, -2 und -1 einmal täglich je 25 mg/kg Oxytetracyclin. An den Tagen 10, 11, 12 und 13 erhielten alle Tiere einmal täglich je 20 mg/kg Calcein-Grün. Den Versuchstieren der Gruppen II und III wurden an den Tagen 24, 25, 26 und 27 zusätzlich je 30 mg/kg Alizarin-Rot injiziert. Schließlich wurden den Kaninchen der Gruppe III an den Tagen 38, 39, 40 und 41 je 30 mg/kg Calcein-Blau gespritzt.

Tag	rESWT/Farbstoffgabe	Opferung
-4 bis -1	Oxytetracyclin (25 mg/kg s.c.)	
0	rESWT (4000 Impulse, 0.16 mJ/mm ² , 4 bar, 8 Hz)	
7	rESWT (4000 Impulse, 0.16 mJ/mm ² , 4 bar, 8 Hz)	
11 bis 13	Calcein-Grün (20 mg/kg s.c.)	
14		Gruppe I (n = 4)
25 bis 27	Alizarin-Rot (30 mg/kg s.c.)	
28		Gruppe II (n = 4)
38 bis 41	Calcein-Blau (30 mg/kg, s.c.)	
42		Gruppe III (n = 5)

Tabelle 3: Übersicht der Stoßwellenbehandlungen, Applikation der fluorochromen Farbstoffe und Opferungstermine

2.1.2.8 Euthanasie und Sektion

Die Euthanasie der Versuchstiere der Gruppe I erfolgte am Tag 14, der Tiere der Gruppe II am Tag 28 und der Kaninchen der Gruppe III am Tag 42 (siehe Tabelle 1). Die Opferung der Tiere erfolgte durch eine i.v. Überdosis Pentobarbital mit 50 mg/kg Körpergewicht.

Nach Exitus wurden den Versuchstieren die beiden hinteren Extremitäten im Hüftgelenk und im Kniegelenk exartikuliert. Beide Femora wurden entnommen, die Muskulatur und die Knochen auf pathologisch-anatomische Veränderungen hin untersucht und das Weichgewebe entfernt. Anschließend wurden die Knochen in 100%-igem Methanol fixiert. Die anteriore Muskelgruppe wurde in einen Behälter mit 10%-igem Formalin eingelegt.

Die beiden Lungenflügel wurden ebenfalls jedem Kaninchen entnommen und in einem Gefäß mit 10%-igem Formalin fixiert.

Bei zwei Versuchstieren wurden zusätzlich die Nieren entfernt und ebenfalls in 10%-iges Formalin eingelegt.

2.2 Histopathologische Aufarbeitung der Knochenpräparate

2.2.1 MMA-Einbettung

2.2.1.1 Materialien

- Methylmethacrylat (MMA, mit Hydrochinon stabilisiert, Merck, Darmstadt)
- Dibutylphthalat (Weichmacher, Merck, Darmstadt)
- Benzoylperoxid (BPO, Polymerisationsinitiator, Merck, Darmstadt)
- runde, luftdicht verschließbare Glasbehälter (7 cm Durchmesser, 10 cm Höhe) mit Deckel
- Vakuumexsikkator

2.2.1.2 Herstellung einer 13-prozentigen MMA-Lösung

24h vor Herstellung des 13-prozentigen MMA wurde das BPO in einem Brutschrank bei konstant 37 °C getrocknet. Am darauf folgenden Tag wurden unter einer Abzugshaube in einen Messbecher 130 ml Dibutylphthalat eingefüllt und anschließend auf insgesamt 1 Liter mit stabilisiertem MMA aufgefüllt. Dann wurde das Gemisch auf einen Magnetrührer gestellt und 25g BPO hinzugegeben. Nach ca. 30 min war das BPO aufgelöst und die MMA-Lösung fertig zur Verarbeitung. Zur längeren Haltbarkeit wurde die Lösung in eine dunkle Glasflasche gefüllt und im Kühlschrank gelagert.

2.2.1.3 MMA-Bodenguß in Glasbehältern

Zur Vorbereitung der Einbettung der Knochenpräparate wurden die Böden der Glasbehälter mit etwa 1 cm MMA-Lösung bedeckt und mit Deckeln luftdicht verschlossen. Anschließend wurden die befüllten Glasgefäße zur Polymerisation der Böden auf einer Arbeitsplatte mit konstant 20 °C gelagert. Der Polymerisationsvorgang dauerte zwischen zwei und drei Wochen.

2.2.1.4 Knochenpräparatvorbereitung

- Fixation

Unmittelbar nach der Sektion der Kaninchen wurden die entnommenen Knochen (rechtes und linkes Femur von 13 Kaninchen der Rasse „Weiße Neuseeländer“) in 100% Methanol fixiert. Die Wahl des Methanols als Fixationsmedium erfolgte, um eine mögliche Auswaschung der fluorochromen Farbstoffe durch z.B. Formalin 6% zu vermeiden.

- Entwässerung und Entfettung

Nach ca. 1-wöchiger Lagerung der Präparate im Fixationsmedium wurden die Knochenpräparate in der Mitte des Femurs mit einem Trennschleifer („Wassersäge“) in transversaler Ebene geteilt. Der distale Anteil wurde zur Weiterverarbeitung in Gaze eingewickelt, mit einem Papierschildchen mit der Kaninchennummer und der Femurseite markiert und zur Entwässerung in ein mit Ethanol absolut (100%) gefülltes Glasgefäß gegeben. Da als Fixationsmedium 100% Methanol verwendet wurde, konnte auf die klassische Alkoholreihe (Ethanol 70%, 80%, 90%, 100%) verzichtet und direkt mit Ethanol absolut begonnen werden. Die Präparate wurden 5 Tage lang in 100% Ethanol, das täglich gewechselt wurde, gelagert. Das Gefäß wurde regelmäßig von Hand geschüttelt. Nach Abschluss der Alkoholreihe wurden die Knochenpräparate 24 Stunden lang in Xylol zur Entfettung gelagert.

- Infiltration der Präparate mit MMA

Zur Infiltration der Präparate mit MMA wurden 1,5 Liter MMA (wie oben angegeben) hergestellt. Das Xylol wurde aus dem Glasgefäß mit den Knochenproben entfernt und durch das MMA ersetzt. Danach wurde das Glas ohne Deckel in einem Vakuumexikkator platziert. Der Deckel des Exikkators wurde auf diesem platziert. Mit Hilfe einer elektrischen Pumpe wurde danach der Vakuumexikkator evakuiert. Im Anschluss daran wurde die gesamte Apparatur in einen Kühlschrank mit 4 °C verbracht. Nach 6 Tagen wurde das MMA 1x gewechselt, um Gaseinschlüsse in den Präparaten zu vermeiden. Danach wurde erneut ein Vakuum erzeugt und der Exsikkator mit den Präparaten für weitere fünf Tage in den Kühlschrank gestellt.

2.2.1.5 Einbettung der Knochenpräparate

Zur Einbettung der Knochenpräparate wurden 2 Liter MMA analog zum oben angegebenen Schema hergestellt. Die in den Glasgefäßen bereits polymerisierten MMA-Böden wurden mit etwas neuem MMA übergossen, um die Böden etwas anzulösen. Nach ca. 30 min wurden jeweils zwei Präparate mit der anterioren Seite des Femurs nach unten in ein Glas gegeben und mit ausreichend MMA übergossen. Die Präparate wurden mit einem Papierschildchen mit Kaninchennummer sowie Femurseite markiert und das Gefäß luftdicht mit einem Deckel verschlossen. Insgesamt wurden so 13 Gläser mit je 2 Knochenpräparaten befüllt und zur Polymerisation des MMA auf eine Arbeitsplatte mit konstant 20 °C platziert. Der Polymerisationsvorgang dauerte 7 Tage.

2.2.2 Weiterverarbeitung der Präparate in Trenn-/Dünnschlifftechnik

2.2.2.1 Materialien

- Trockentrennschleifer FK 20 (Bizerba, Balingen)
- Nasstrennschleifer Wasser-Trennschleifsystem Exakt Standard 300 CP (PSI Grünewald GmbH & Co KG, Laudenbach)
- Schleifmaschine Planopol-V inklusive Aufsatz Drehteller Pedemax-2 (Struers, Willich)

- Schleifpapier Waterproof Silicon Carbide Paper FEPA P #400, #800, #1000, #1200, #2400, #4000 (Struers, Willich)
- Sekundenkleber Hyoglue 150 (Wirkstoff Cyanacrylat, Marston-Domsel, Zülpich)

2.2.2.2 Trenn-/Dünnschlifftechnik

Nach beendeter Polymerisation des MMA in den 13 Einbettgefäßen wurden die Gläser zur Gewinnung der MMA-Blöcke in Zellstoff eingewickelt und mit einem Hammer zerstört. Die jeweils zwei Knochenpräparate in einem Block wurden mit einem Trockentrennschleifer voneinander getrennt (jetzt 26 Präparate). Das überflüssige PMMA um die Präparate herum wurde ebenfalls mit dem Trennschleifer entfernt. Im Anschluss daran wurden die Femurproben unter Zuhilfenahme des Nasstrennschleifers mit einem medianen Sagittalschnitt geteilt (jetzt 52 Präparate).

Zur Herstellung der Schliffe wurden die eingebetteten Femurhälften zunächst auf der medialen Seite geschliffen. Dies erfolgte mit einer Schleifmaschine der Firma Stuers mit wasserdichtem Schleifpapier unterschiedlicher Korngröße. Der Grobschliff erfolgte mit Papier der Körnung 400. Es folgten nacheinander Arbeitsschritte mit Schleifpapier der Körnung 800, 1000 und 1200. Danach wurden die Präparate mit Papier der Körnung 2400 und 4000 poliert. Die frisch polierte Seite der Präparate wurde daraufhin mit mittelviskösem Sekundenkleber Hyoglue 150 der Firma Marston-Donsell (Wirkstoff Cyanacrylat) auf einen 2 mm Objektträger geklebt. Anschließend wurden die Präparate samt Objektträger mit Gewichten beschwert und 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

Nach der Trocknungszeit wurden die Präparate auf der noch nicht bearbeiteten Seite zugeschnitten und geschliffen. Dazu wurde jeweils eine Probe mit dem Objektträger in ein Vakuumhaltegerät eingespannt und mit einem Nasstrennschleifer zielgenau auf ca. 2 mm Präparatdicke zugeschnitten.

Im Anschluss daran wurde die laterale Seite der Femurhälfte mit der Schleifmaschine der Firma Struers mit Schleifpapier der Korngrößen 1000 und 4000 und einem von oben aufgesetzten Drehteller, an dem das Präparat mit Doppelklebeband befestigt wurde, auf eine Dicke von 50-100 µm zugeschliffen. Als letzter Arbeitsschritt wurden die Präparate poliert und damit fertig gestellt (siehe Abbildung 8).

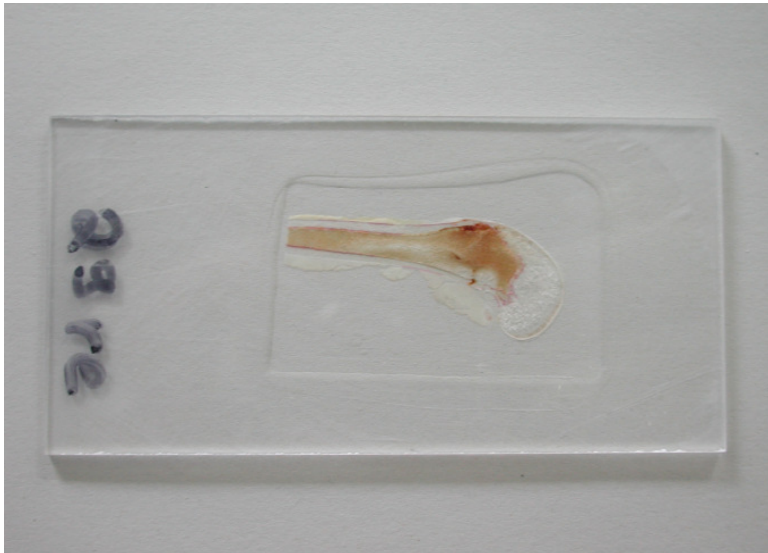


Abbildung 8: Knochenpräparat nach Bearbeitung mit Trenn-Dünnschlifftechnik

2.3 Mikroskopische Untersuchung der Knochenpräparate

2.3.1 Materialien

- Lichtmikroskop Leitz DMRB (Leica Microsystems, Wetzlar)
- Kamera Wild MPS 48 (Leica Microsystems, Wetzlar)
- UV-Filter Filter 02 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena)
- UV-Filter Filter 09 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena)

2.3.2 Polyfluorochrome Sequenzanalyse

Die Analyse der Knochenneubildung erfolgte verblindet durch die mikroskopische Betrachtung aller Dünnschliffpräparate der drei Versuchsgruppen mittels Breitband-Fluoreszenzmikroskopie unter UV-Lichtanregung. Dazu wurde für die fluorochromen Farbstoffe Tetrazyklin, Calcein-Grün und Alizarin-Rot der Filter 09 sowie für Alizarin-Rot und Calcein-Blau der Filter 02 verwendet. Die Ergebnisse wurden mittels einer Fotokamera dokumentiert. Die Auswertung der akkumulierten Knochenneubildung unter Einbeziehung aller fluorochromer Farbbanden wurde mittels semiquantitativen Klassifikationssystemen durchgeführt.

2.4 Radiologische Untersuchungen

2.4.1 Materialien

- Röntgengerät Cabinet X-Ray System – Faxitron Series Modell 43855A (Faxitron X-Ray, Whelling, USA)
- Entwicklungsgerät Kodak RP X-OMAT Processor Modell M6B (Kodak, Stuttgart)
- Röntgenfilm: Kodak X-OMAT MA Film 24x30 cm (Kodak, Stuttgart)

2.4.2 Kontaktradiographie

Die nativen Kaninchenfemora wurden aus der Fixationslösung für den Zeitraum der radiologischen Untersuchung entnommen. Die Zeiträume während der Röntgenuntersuchungen, in denen die Knochen nicht in der Fixationslösung aufbewahrt werden konnten, wurden möglichst kurz gehalten, um Veränderungen an den Knochen zu vermeiden.

Die Knochenpräparate wurden für die Anfertigung von Seitenaufnahmen horizontal auf dem Röntgenfilm platziert. Aufgrund der Größe der Präparate konnten je Film 6 Präparate gleichzeitig geröntgt werden. Zur möglichen späteren Zuordnung der Präparate zu den Röntgenbildern wurden die Positionen der Femora außen auf der Filmhülle mit Bleistift markiert. Die Präparate wurden nun auf dem Röntgenfilm liegend im Röntgengerät Cabinet X-Ray Faxitron platziert. Nacheinander wurden alle Präparate mit einer Röhrenspannung von 30 kV und einer Stromstärke von 3mA mit einer Belichtungszeit von 60 Sekunden geröntgt. Diese Werte erwiesen sich im Rahmen der Untersuchung als am besten geeignet.

Im Anschluss daran wurden die Präparate wieder in die Fixierlösung gegeben und die Röntgenfilme mit dem Entwicklungsgerät Kodak RP X-OMAT entwickelt. Die Röntgenbilder wurden auf Anzeichen einer endostalen und periostalen Knochenneubildung, Kallusbildung und auf kortikale sowie trabekuläre Frakturen hin untersucht.

2.4.3 Mikroradiographie

Die nach der histopathologischen Aufarbeitung mit der Trenn-/Dünnschlifftechnik hergestellten Knochenpräparate wurden nochmals radiologisch mittels Mikroradiographie untersucht.

Wie bereits unter dem Punkt 2.3.2 beschrieben, wurden die Präparate horizontal auf dem Röntgenfilm positioniert und analog für die spätere Zuordnung markiert. Dabei zeigte die Präparatseite in Richtung Röntgenfilm, der Objektträger in Richtung Strahlungsquelle. Die Präparate wurden wieder auf dem Röntgenfilm liegend im Röntgengerät Cabinet X-Ray Faxitron platziert. Die Knochenpräparate wurden mit den Parametern 15 kV Röhrenspannung und 3mA Stromstärke mit einer Belichtungszeit von 45 Sekunden geröntgt. Diese Werte erwiesen sich im Rahmen der Untersuchung als geeignet.

Anschließend wurde der Röntgenfilm mit dem Entwicklungsgerät Kodak RP X-OMAT entwickelt. Die Röntgenbilder wurden erneut auf Anzeichen einer endostalen und periostalen Knochenneubildung, Kallusbildung und auf kortikale sowie trabekuläre Frakturen hin untersucht.

2.5 Histopathologische Untersuchungen der Lungenpräparate

2.5.1 Materialien

- Microtom HM 335 E (MICROM International GmbH, Walldorf)
- Kühlplatte (PSI Grünwald GmbH & Co KG, Laudenbach)
- Paraffin-Streckbad Typ TFB 35 (MEDITE GmbH, Burgdorf)
- Objektträger Starfrost 76x26 mm, geputzt/geschnitten/weiß (Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig)
- Schneidmesser Feather S35 Microtome Blades (Feather Safety Razor Co, Osaka, Japan)

2.5.2 Herstellung der Präparate

2.5.2.1 Grobzuschnitt

Die Lungenpräparate wurden für vier Wochen in Formalin fixiert. Nach diesem Zeitraum wurden die Lungen makroskopisch auf Auffälligkeiten hin untersucht. Dabei wurde besonders auf Zeichen einer Lungenembolie geachtet. Im Anschluss daran wurden aus jedem Lungenflügel exemplarisch zwei 1x1x1 cm kleine Präparate herausgeschnitten. Diese wurden in Paraffin eingebettet.

2.5.2.2 Feinzuschnitt

Die hergestellten Paraffinblöcke wurden auf einer Kühlplatte (-25 °C) für 15 min gelagert. Danach wurden aus jedem Paraffinblock mit dem Mikrotom zwei repräsentative Schnitte der Stärke 2 µm hergestellt. Diese Schnitte wurden unter Zuhilfenahme eines warmen Paraffin-Streckbades (38 °C) auf einen Objektträger aufgebracht.

2.5.2.3 Färbung

Die sich auf einem Objektträger befindenden Lungenpräparate wurden im Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der TU München routinemäßig einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen.

2.6 Histologische Untersuchung der Lungenpräparate

2.6.1 Materialien

- Lichtmikroskop Leitz DMRB (Leica Microsystems, Wetzlar)

2.6.2 Mikroskopische Untersuchung

Alle HE-gefärbten Lungenpräparate der drei Versuchsgruppen wurden mit einem Leitz-Lichtmikroskop auf pathologische Veränderungen hin verblindet untersucht.

Hierbei wurde besonders auf Lungenembolien und Knochensplitter in den Lungengefäßen geachtet.

2.7 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der polyfluorochromen Sequenzanalyse wurden einer statistischen Auswertung unterzogen.

Die Farbbanden und damit die Knochenneubildung wurden nach der Fluorochromart, Intensität, Ausdehnung und Lokalisation (endostal/periostal; ventral/dorsal) ausgewertet. Die Stärke und Ausbreitung der Osteoneogenese wurde mit einer semiquantitativen, verblindeten Analyse ausgewertet.

Die Auswertung der akkumulierten Knochenneubildung unter Einbeziehung aller fluorochromer Farbbanden wurde mittels des Klassifikationssystems I (modifiziert nach MAIER, 2004, S. 1401ff) durchgeführt.

Klassifikationssystem I (Akkumulierte Knochenneubildung):

Klasse 0	keine Zeichen der Knochenneubildung
Klasse 1	Knochenneubildung im Bereich der periostalen und/ oder der endostalen Oberfläche, ohne die gesamte Oberfläche zu bedecken
Klasse 2	Knochenneubildung im Bereich der periostalen und/ oder der endostalen Oberfläche, die gesamte Oberfläche bedeckend

Für die Auswertung der osteogenetischen Aktivität zu den unterschiedlichen Zeitpunkten (Analyse der einzelnen fluorochromen Farbbanden) wurde das Klassifikationssystem modifiziert (Klassifikationssystem II) und in fünf Klassen eingeteilt.

Klassifikationssystem II (Knochenneubildung zu unterschiedlichen Zeitpunkten):

Klasse 0	Ort: keine Bande erkennbar oder diffuse Verteilung Ausprägung: keine Bande erkennbar oder geringe Intensität, Inhomogenität der Bande
Klasse 1	Ort: ventral Ausprägung: mittlere Intensität, Homogenität der Bande
Klasse 2	Ort: ventral Ausprägung: starke Intensität, Homogenität der Bande scharfe Begrenzung der Bande
Klasse 3	Ort: ventral und dorsal Ausprägung: mittlere Intensität, Homogenität der Bande
Klasse 4	Ort: ventral und dorsal Ausprägung: starke Intensität, Homogenität der Bande scharfe Begrenzung der Bande

Die statistische Analyse der Knochenneubildung an behandelten und unbehandelten Femora erfolgte mit dem Fisher-Exakt-Test. Ein $p < 0,05$ (zweiseitig) wurde als signifikant angesehen.

Da sich bei den radiologischen Untersuchungen der Knochenpräparate und den histologischen Untersuchungen der Lungenpräparate keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zeigten, wurde keine statistische Auswertung durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Mikroskopische Untersuchung der Knochenpräparate

3.1.1 Polyfluorochrome Sequenzanalyse

3.1.1.1 Untersuchung der Osteoneogenese und deren Dynamik

Die Einlagerung der fluorochromen Farbbanden in den neu gebildeten Knochen wurde durch die Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. Die verschiedenen fluorochromen Farbbanden ermöglichen es, die Dynamik der Osteoneogenese im Zeitverlauf darzustellen.

In allen mit radialen Stoßwellen behandelten Femora konnten klar abgrenzbare und homogene Banden der eingelagerten fluorochromen Farbstoffe nachgewiesen werden (Abbildung 9). Zu erkennen und deutlich voneinander abgrenzbar waren in Abbildung 9/1b und 9/1c die Calcein-Grün-Bande sowie die Alizarin-Rot-Bande. In Abbildung 10 waren die Alizarin-Rot und Calcein-Blau-Bande zu erkennen. Die Calcein-Grün-Bande zeigte die Knochenneubildung zwei Wochen nach der ersten rESWT, die Alizarin-Rot-Bande vier Wochen nach der ersten rESWT und die Calcein-Blau-Bande sechs Wochen nach der ersten rESWT. Es war zu erkennen, dass die Knochenneubildung auch vier bis sechs Wochen nach der ersten rESWT persistierte.

Im Gegensatz dazu zeigte sich in den unbehandelten Kontrollfemora lediglich eine sporadische und schwache Knochenneubildung (Abbildung 9/1a). Diese war auf diesem niedrigen Niveau während der gesamten Studiendauer zu beobachten (Abbildung 11 und 12).

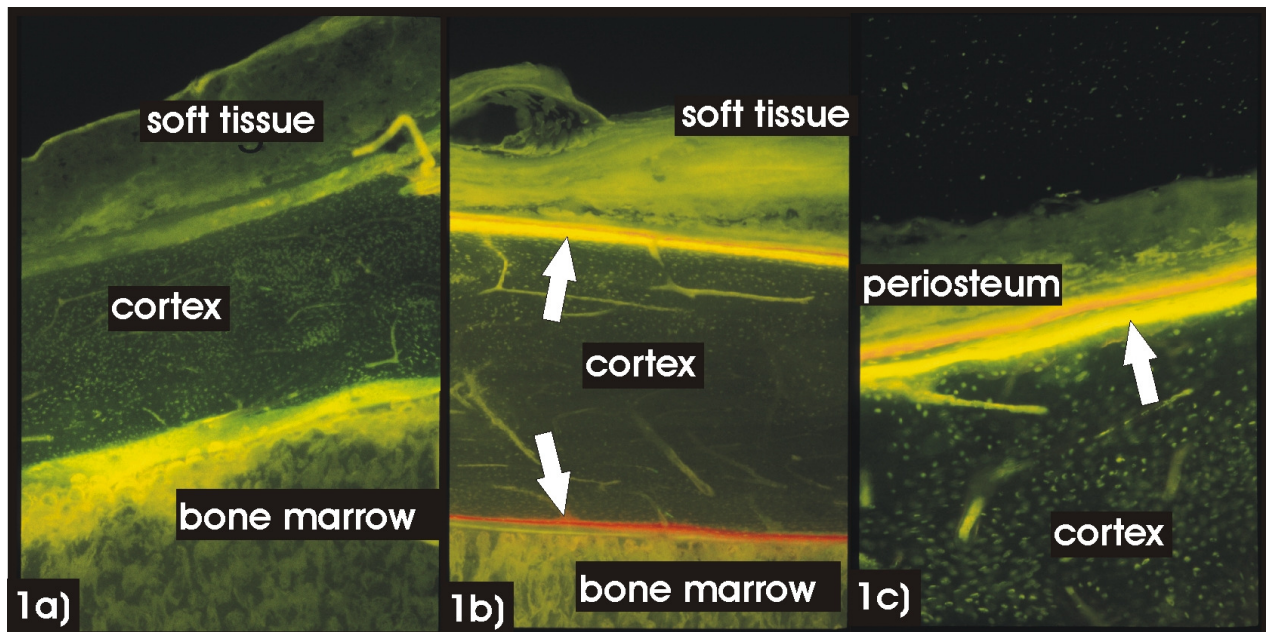


Abbildung 9: Bilder der fluorochromen Sequenzmarkierung als Zeichen der Knochenneubildung am ventralen Femur vier Wochen nach der ersten rESWT

1a) unbehandeltes Femur (Vergrößerung 50x, Zeiss-Filter 09)

1b) mit rESWT behandeltes Femur (Vergrößerung 50x, Zeiss-Filter 09)

1c) mit rESWT behandeltes Femur (Vergrößerung 100x, Zeiss-Filter 09)]

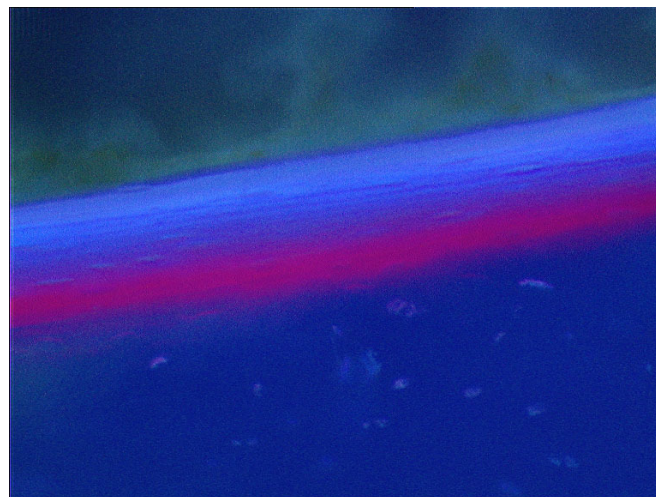


Abbildung 10: Bilder der homogenen fluorochromen Farbbanden Alizarin-Rot und Calcein-Blau sechs Wochen nach der ersten rESWT (Vergrößerung 100x, Zeiss-Filter 02)

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe war die Knochenneubildungsrate in den Therapiegruppen nach den beiden rESWT- Sitzungen zu allen Zeitpunkten erhöht (Abbildung 11 und 12).

In Abbildung 11 ist die akkumulierte Knochenneubildung zu den Zeitpunkten zwei, vier und sechs Wochen nach der ersten rESWT in den Therapiegruppen (○-Linie "rESWT") und der nicht behandelten Kontrollgruppe (■-Linie "control") dargestellt. Die Osteoneogenese wurde semiquantitativ nach dem Klassifikationssystem I beurteilt (siehe 2.7). Zum Zeitpunkt zwei Wochen nach der ersten rESWT konnte noch kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Therapiegruppen festgestellt werden ($p = 0,229$). Zu den Zeitpunkten vier und sechs Wochen war der Unterschied signifikant (4 Wochen $p = 0,029$, 6 Wochen $p = 0,008$).

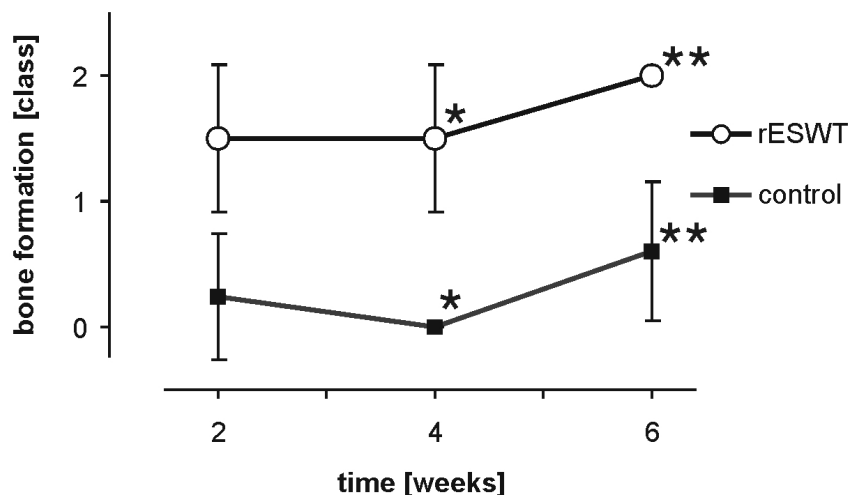


Abbildung 11: Auswertung der akkumulierten Osteoneogenese gemäß Klassifikationssystem I [Zeitpunkte zwei, vier und sechs Wochen nach der ersten rESWT; die Sterne markieren signifikante Unterschiede (* $p = 0,029$; ** $p = 0,008$, Exakter-Test nach Fisher)]

Um die Stärke der Knochenneubildung zu den einzelnen Zeitpunkten zwei, vier und sechs Wochen nach der ersten rESWT nachvollziehen zu können, wurden die fluorochromen Farbbanden einzeln nach dem Klassifikationssystem II (siehe 2.7) semiquantitativ ausgewertet (Abbildung 12).

Die Knochenneubildung in den behandelten Femora (○-Linie "rESWT") im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollfemora (■-Linie "control") war zu allen Zeitpunkten

signifikant erhöht ($p < 0,05$). Eine signifikante Verstärkung ($p < 0,001$) der Osteoneogenese konnte bereits zwei Wochen nach der rESWT durch den verstärkten Einbau von Calcein-Grün in den Knochen demonstriert werden. Die Knochenneubildung persistierte auf einem signifikant erhöhten Niveau bis zur sechsten Woche nach der Stoßwellenbehandlung, was durch den Knocheneinbau der fluorochromen Farbstoffe Alizarin-Rot ($p < 0,001$) und Calcein-Blau ($p = 0,008$) in der späten Phase des Tierversuchs dokumentiert werden konnte. Die Stärke der Knochenneubildung erreichte vier Wochen nach der rESWT einen Höhepunkt. Sechs Wochen nach der Stoßwellentherapie nahm die Intensität wieder ab.

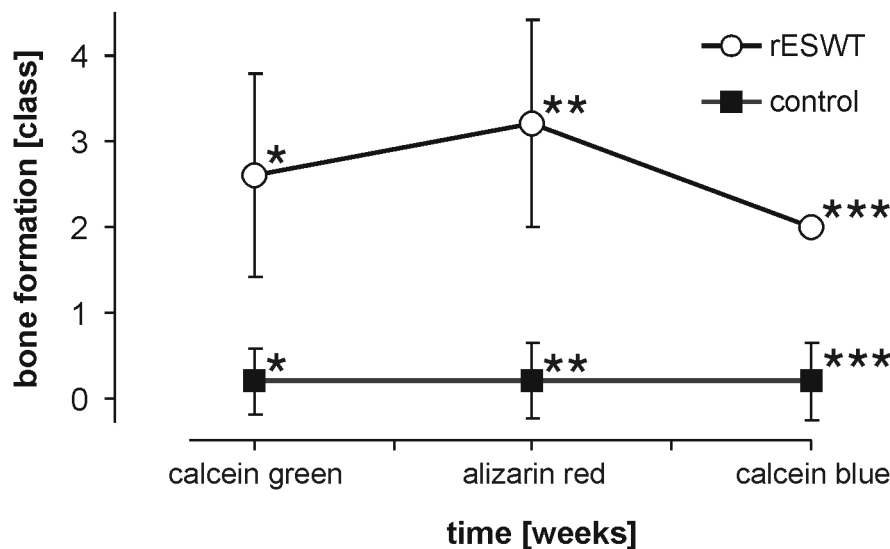


Abbildung 12: Statistische Auswertung der nach dem Klassifikationssystem II

beurteilten Osteoneogenese [Zeitpunkte zwei bis sechs Wochen nach der ersten

rESWT anhand der Ausprägung der einzelnen fluorochromen Farbbanden:

Calcein-Grün: Zwei Wochen nach der ersten rESWT-Behandlung

Alizarin-Rot: Vier Wochen nach der ersten rESWT-Behandlung

Calcein-Blau: Sechs Wochen nach der ersten rESWT Behandlung

Die Sterne markieren statistisch signifikante Unterschiede (* $p < 0,001$;

** $p < 0,001$; *** $p = 0,008$, Exakter-Test nach Fisher)]

3.1.1.2 Differenzierung der ventralen und dorsalen Osteoneogenese

Neben der Betrachtung der akkumulierten Knochenneubildung ließ sich auch die rESWT-induzierte Osteoneogenese an der ventralen und dorsalen femoralen

Kortikalis differenzieren. Da die Stoßwellen über die ventrale Femurseite appliziert wurden, war eine distanzbedingte Verminderung der Stoßwellenenergie und damit der Knochenneubildung auf der dorsalen Seite zu erwarten.

In den mit radialen Stoßwellen behandelten Femora (○-Linie "rESWT") war neben der ventralen Osteoneogenese auch eine dorsale periostale und endostale Knochenneubildung zu beobachten. In den Kontrollfemora (■-Linie „control“) war dies nicht festzustellen. Dabei war die Osteoneogenese an der ventralen Kortikalis zu allen untersuchten Zeitpunkten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant gesteigert (Abbildung 13a), an der dorsalen Kortikalis nur zu den Zeitpunkten zwei ($p < 0,002$) und vier Wochen ($p < 0,009$) nach der rESWT (Abbildung 13b). Nach diesem Zeitpunkt nahm die dorsale Knochenneubildungsrate ab und war im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht mehr signifikant.

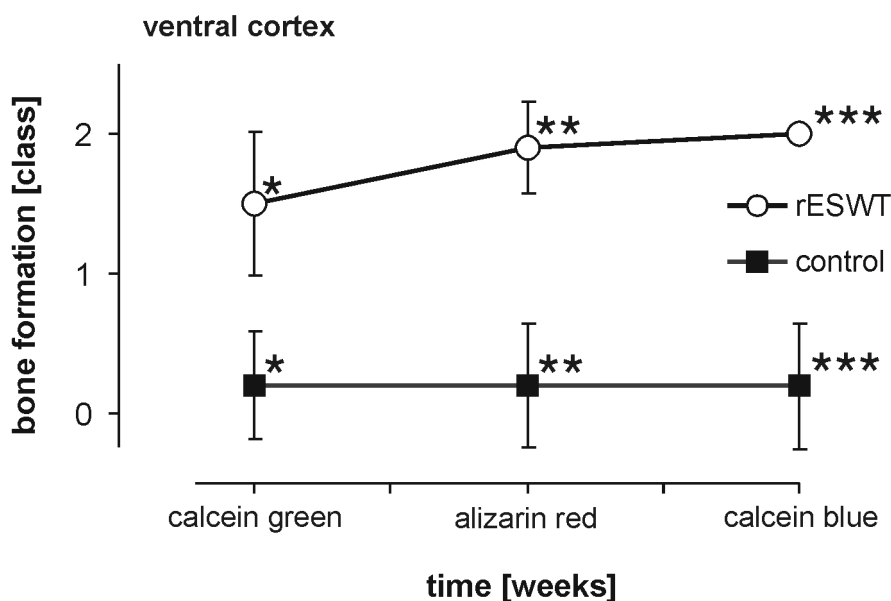


Abbildung 13a: Statistische Auswertung der Osteoneogenese an der ventralen Femurkortikalis [Zeitpunkte zwei, vier und sechs Wochen nach der ersten rESWT-Behandlung anhand der korrespondierenden fluorchromen Farbbanden; statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem Stern markiert (* $p < 0,001$; ** $p < 0,001$; *** $p = 0,008$, Exakter-Test nach Fisher)]

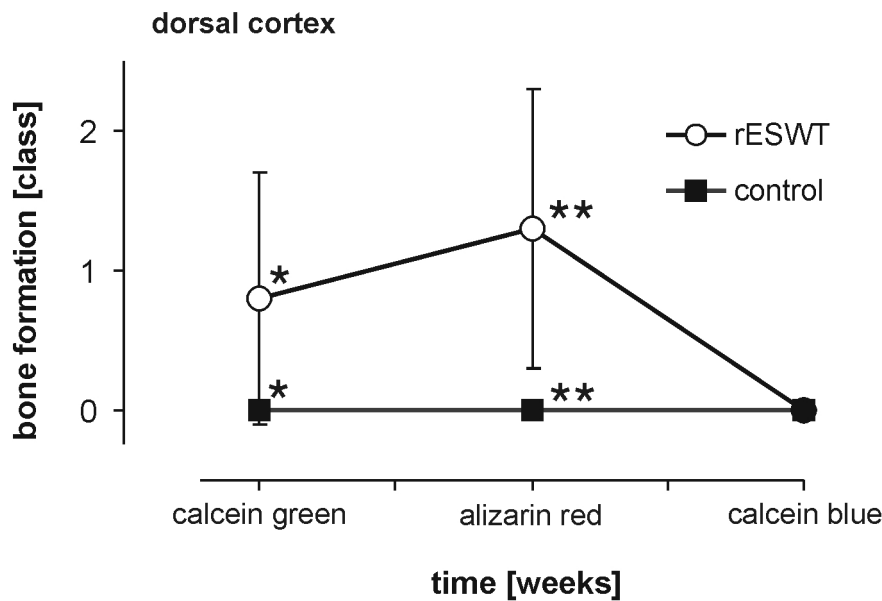


Abbildung 13b: Statistische Auswertung der Osteoneogenese an der dorsalen Femurkortikalis [Zeitpunkte zwei, vier und sechs Wochen nach der ersten rESWT-Behandlung anhand der korrespondierenden fluorochromen Farbbanden; statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem Stern markiert (* $p = 0,002$; ** $p = 0,009$, Exakter-Test nach Fisher)]

Vergleicht man die ventrale und dorsale Kortikalis, so war die rESWT-induzierte Osteoneogenese an den ventralen Knochenabschnitten in der frühen Versuchsphase (zwei Wochen nach rESWT, Calcein-Grün-Bande, $p=0,031$) und in der späten Versuchsphase (sechs Wochen nach rESWT, Calcein-Blau-Bande, $p=0,008$) signifikant erhöht im Vergleich zur dorsalen Kortikalis. Zum Zeitpunkt der höchsten Knochenneubildungsrate vier Wochen nach der rESWT (Alizarin-Rot-Bande, $p=0,206$) war dies nicht der Fall (Abbildung 14).

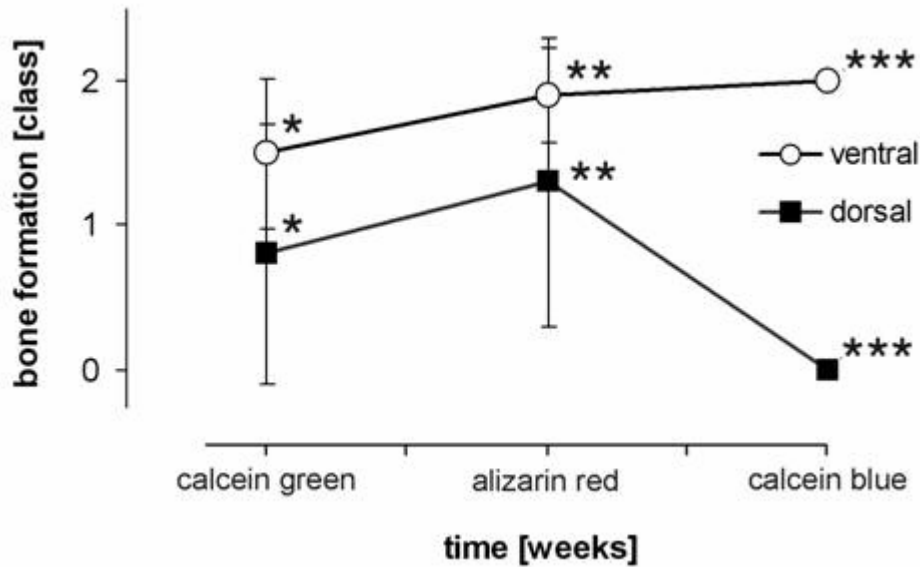


Abbildung 14: Statistische Auswertung der Osteoneogenese an der ventralen und dorsalen Femurkortikalis im Vergleich [Zeitpunkte zwei, vier und sechs Wochen nach der ersten rESWT-Behandlung anhand der korrespondierenden fluorochromen Farbbanden; die p-Werte zu den einzelnen Zeitpunkten sind mit einem Stern markiert (* $p = 0,031$; ** $p = 0,206$, * $p = 0,008$, Exakter-Test nach Fisher)]**

Es gab keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die endostale oder periostale Osteoneogenese. Zudem konnte man keine signifikante trabekuläre Knochenneubildung beobachten.

3.1.2 Histologisch-mikroskopische Untersuchung

In der histologisch-mikroskopischen Untersuchung zeigten sich in keiner der Untersuchungsgruppen intraossäre Blutungen, periostale Ablösungen oder Mikrofrakturen.

3.2 Radiologische Untersuchungen der Knochenpräparate

Sowohl in der Kontaktradiographie (Abbildung 15) als auch in der Mikroradiographie (Abbildung 16) konnte weder in den mit radialen Stoßwellen therapierten Gruppen noch in den Kontrollgruppen eine kalkhaltige Knochenumbildung, Knochenresorption,

Osteolyse oder Kallusbildung demonstriert werden. Zudem gab es keine Hinweise auf kortikale oder trabekuläre Frakturen.



Abbildung 15: Exemplarische Kontaktradiographien der unbearbeiteten Knochenfemora [links nach rESWT, links Kontrollgruppe]

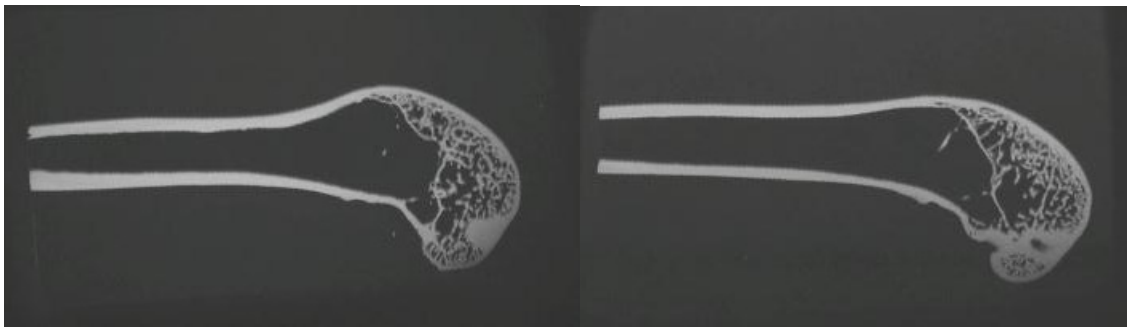


Abbildung 16: Exemplarische Mikroradiographien der Knochenfemora nach Bearbeitung mit der Trenn-Dünnschlifftechnik [links nach rESWT, links Kontrollgruppe]

3.3 Histologische Untersuchung der Lungenpräparate

In den Lungenpräparaten zeigten sich makroskopisch und mikroskopisch keine Zeichen einer Lungenembolie. Es waren keine Knochenfragmente in der Lungenstrombahn nachweisbar. Abgesehen von kleinen Hämatomen und temporären Hautverletzungen an den rESWT-Applikationsstellen am Femur konnten keine weiteren Nebenwirkungen beobachtet werden.

4. Diskussion

4.1 Material und Methoden

Das Hauptziel dieser Dissertation war es, den Effekt der nieder-energetischen radialen extrakorporalen Stoßwellentherapie auf die Knochenneubildung zu untersuchen und die Dynamik der ESWT-induzierten Knochenneubildung zu erforschen. Dazu wurden die distalen Femora von Kaninchen der Rasse „Weiße Neuseeländer“ mit Stoßwellen behandelt und die Knochenneubildung mit Hilfe der Verabreichung von mehreren fluorochromen Farbstoffen dargestellt.

Das Kaninchenmodell hatte sich bereits in mehreren Studien zur Untersuchung des Effektes von Stoßwellen auf Knochengewebe bewährt (MAIER, 2004, S. 1401 ff, TISCHER, 2002, S. 281ff, WANG, 2004, S. 225ff). Auch die in dieser Doktorarbeit verwendete Applikationsstelle für die Stoßwellentherapie am distalen Femur hat bereits in Studien gezeigt, dass sie dazu geeignet ist, die Knochenneubildung zu untersuchen (MAIER, 2004, S. 1401ff).

Die Verwendung von fluorochromen Farbstoffen zum In-vivo-Nachweis der Knochenneubildung und deren Dynamik ist ein seit vielen Jahrzehnten etabliertes Verfahren (FROST, 1969, S. 211ff, MILCH, 1957, S. 87ff). Die in dieser Doktorarbeit verwendete Trenn-Dünnschlifftechnik ist ein Standardverfahren in der histologischen Aufarbeitung von Knochenpräparaten und wurde gemäß etablierten Arbeitsschritten durchgeführt (BURCK, 1988, S. 527ff).

Die mikroskopische fluorochrome Sequenzanalyse wurde verblindet durchgeführt, um eine Verfälschung der Ergebnisse auszuschließen. Die zur Beurteilung der Knochenneubildung verwendeten Klassifikationssysteme wurden bereits in ähnlicher Form für diesen Zweck verwendet (MAIER, 2004, S. 1401 ff) und haben sich bewährt.

4.2 Wirkung der Stoßwellen auf die Knochenneubildung

Mehrere Studien haben den Effekt der fokussierten Stoßwellen auf normalen, frakturierten und osteotomierten Knochen in verschiedenen Tiermodellen und

Zellkulturen untersucht (Abbildung 17).

Autor	Jahr	Tiermodell	ESWT-Wirkung an Knochen und Bindegewebe
Graff et al. [25]	1988	Kaninchen (normaler Knochen)	Subperiostale Blutungen Aseptische Knochenmarknekrose Osteozytenschädigung Osteoneogenese Kallusbildung
Seemann et al. [59]	1992	Ratte (Osteotomie, Knochendefekt)	Keine Stimulation der Knochenheilung
Ekkernkamp et al. [17]	1992	Schaf (Osteotomie)	Positiver Einfluss auf Knochenheilung/Kallusproliferation
Haupt et al. [31]	1992	Ratte (Fraktur)	Signifikante Beschleunigung der Frakturheilung Tendenziell Erhöhung der Bruchstabilität
Johannes et al. [33]	1994	Hund (Pseudarthrose)	Signifikant verbesserte Konsolidierung der Knochendefekte (5/5 bei ESWT, 1/5 bei Kontrolle)
Forriol et al. [18]	1994	Schaf (Osteotomie)	Verzögerung der Defektheilung
Augat et al. [1]	1995	Schaf (Osteotomie)	Kein signifikanter Unterschied der Knochenheilung durch ESWT Tendenziell Verminderung der mechanischen Stabilität (dosisabhängig)
Delius et al. [14]	1995	Kaninchen (normaler Knochen)	Periostabhebung Subperiostale und medulläre Einblutungen Trabekelzerstörung mit Mikrofrakturen Kräftige peri- und endostale Knochenneubildung
Uslu et al. [65]	1999	Kaninchen (Knochendefekt)	Vermehrte Kallusbildung Neu gebildete Knochenstruktur desorganisiert
Wang et al. [69]	2001	Hund (Fraktur)	Verstärkte Kallusformation nach 12 Wochen
Maier et al. [38]	2002	Kaninchen (normaler Knochen)	Reduktion von Durchblutung und Knochenstoffwechsel nach 10 Tagen, Steigerung nach 28 Tagen Periostales und Knochenmarködem sowie Hämorrhagie bei 0,9mJ/mm ²
Wang et al. [71]	2002	Ratte, ex vivo	Erzeugung von Sauerstoffradikalen, dadurch Aktivierung von TGF-β1, Tyrosinkinase, ERK und CBFA1 Induktion von Differenzierung und Wachstum mesenchymaler Osteoprogenitorzellen Kein Einfluss durch NO-Radikale
Wang et al. [72]	2002	Ratte (Knochendefekt)	Selektive dosisabhängige Stimulation von Osteoprogenitorzellen Steigerung von TGF-β1 Keine Stimulation der Hämatopoese
Maier et al. [40]	2003	Kaninchen (normaler Knochen)	Periostale Expression von Peptiden der Nozizeption (Substanz P): initial Steigerung, langfristig Senkung
Wang et al. [74]	2003	Ratte (Knochendefekt)	Gesteigerte Expression der mRNA für BMP-2, BMP-3, BMP-4 und BMP-7
Wang et al. [73]	2003	Kaninchen (gesundes Gewebe)	Neovaskularisation und Expression von VEGF, eNOS und PCNA am Sehnen-Knochen-Übergang
Chen et al. [11]	2004	Ratte (Knochendefekt)	Gesteigerte Rekrutierung und Differenzierung mesenchymaler Stammzellen Expression von TGF-β1 und VEGF-A
Chen et al. [10]	2004	Ratte (Knochendefekt)	Expression von Mediatoren des Knochenwachstums (ERK, p-38-Kinase) Steigerung der Aktivität von alkalischer Phosphatase und der Synthese von Kollagen I, Kollagen II und Osteokalzin und der enchondralen Ossifikation
Maier et al. [42]	2004	Kaninchen (normaler Knochen)	Knochenneubildung auch ohne Mikrofrakturen und periostale Ablösung bei niedrigerer Energieflussdichte möglich
Wang et al. [75]	2004	Kaninchen (Fraktur)	Dosisabhängige Steigerung von Knochenmasse, Kallusformation und mechanischer Stabilität nach Fraktur
Gollwitzer et al. [24]	2006	Kaninchen (normaler Knochen)	Gesteigerte Knochenneubildung über mehr als 5 Wochen Endostale und periostale Osteoneogenese Dauer und Stärke der Stimulation dosisabhängig Radiale ESWT ebenfalls wirksam

TGF-β1 transforming growth factor-β1, VEGF vessel endothelial growth factor, ERK extracellulär signal-regulated kinase, BMP bone morphogenetic protein, eNOS endothelial nitric oxide synthase, PCNA proliferating cell nuclear antigen, CBFA1 core binding factor A1 (osteogenic transcription factor)

Abbildung 17: Tierexperimentelle Ergebnisse zur ESWT-Wirkung auf Knochengewebe (aus: GOLLWITZER, 2006, S. 142ff)

Während die Effektivität der ESWT die Knochenheilung nach einer Fraktur zu stimulieren kontrovers diskutiert wird, gilt der positive Effekt auf die Osteoneogenese bei gesundem Knochengewebe und bei Pseudarthrosen als erwiesen.

Wang et al. untersuchten intensiv die molekularen Mechanismen der Stoßwellen auf Knochengewebe und entdeckten einige Grundprinzipien. Hierbei kristallisierten sich zwei Hauptmechanismen heraus, die die Generierung einer biologischen Antwort auf die mechanischen Stoßwellen erklären. Diese sind die Membranhypervolarisation und die Bildung freier Radikale. Wang et al. und Chen et al. demonstrierten, dass Stoßwellen eine Hypervolarisation der Zellmembran erzeugten. Darauf folgend war eine Ras-Aktivierung und ein lokaler Anstieg von Stimulationsfaktoren wie TGF- β 1, VEGF-A und MAP-Kinasen zu beobachten (CHEN, 2004, S. 466ff, CHEN, 2004, S. 526ff, WANG, 2001, S. 648ff, WANG, 2002, S. 10931ff). Als Folge hiervon konnte eine verstärkte Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen hin zu Osteoblasten beobachtet werden. Man nimmt an, dass G-Proteine der Zellmembran, welche auf mechanischen Stress reagieren, eine bedeutende Rolle bei der Umwandlung der kinetischen Energie der Stoßwellen hin zur Ras-Aktivierung und damit zur biologischen Reaktion spielen. Zudem wurde gezeigt, dass Stoßwellen freie Sauerstoffradikale erzeugen. Von diesen nimmt man ebenfalls an, dass sie eine Schlüsselrolle bei der Induzierung biologischer Prozesse durch die mechanische Stoßwellenenergie spielen (WANG, 2002, S. 10931ff).

Wang et al. zeigten außerdem, dass auf die Entstehung der Sauerstoffradikale eine Kaskade von Kinasen in Gang gesetzt wurde und dadurch die Bildung von Wachstumsfaktoren wie VEGF, TGF- β 1, BMP-1, BMP-2, BMP-7, etc. induziert wurde. Auf deren Freisetzung folgte ein gesteigertes Wachstum und eine verstärkte Differenzierung mesenchymaler Zellen hin zu Osteoprogenitorzellen (CHEN, 2004, S. 526ff, WANG, 2002, S. 457ff, WANG, 2002, S. 10931ff, WANG, 2003, S. 387ff, YIP, 2008, S. 150ff).

Einen weiteren unter Umständen bedeutenden molekularen Faktor der Osteoneogenese konnten Maier et al. nachweisen. So konnte gezeigt werden, dass durch die Stoßwellenapplikation die Substanz P aus dem Periost freigesetzt wird. Die

Substanz P hat unter anderem einen lokal osteogen stimulierenden Effekt (MAIER, 2004, S. 1401ff).

Im Zusammenhang mit der ESWT-induzierten Knochenneubildung wurde das Auftreten von Begleiterscheinungen wie Mikrotraumata (periostale Abhebungen, kortikale und trabekuläre Mikrofrakturen) kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite demonstrierten mehrere Studien, ebenso wie die vorliegende, dass es durch die ESWT zu einer signifikanten Knochenneubildung ohne das Auftreten von Mikrofrakturen oder periostaler Abhebungen kommt (MAIER, 2004, S. 1401ff, TISCHER, 2002, S. 281ff).

Andererseits war die Osteoneogenese bei diesen Studien auf endostale und periostale Bereiche limitiert. Im Gegensatz dazu berichteten Forschungsgruppen von Knochenneubildung in trabekulären Arealen, die in Verbindung mit Mikrofrakturen in diesen Bereichen standen (DELIUS, 1995, S. 1219ff, GOLLWITZER, 2006, S. 142ff). Deshalb kann man zu dem Schluss kommen, dass histologisch erfassbare Mikrotraumen keine Voraussetzung für die periostale und endostale Osteoneogenese sind. Allerdings könnten Mikrofrakturen in der Spongiosa ein Stimulus für die trabekuläre Knochenneubildung sein.

Eine dosisabhängige Stimulation von Knochenzellen durch eine Stoßwellenapplikation wurde von Kusnierczak et al. in vitro beobachtet. Dabei gab es einen minimal notwendigen Energiegrenzwert, der für die Auslösung von Knochenwachstum notwendig war. Dennoch wurde die Knochenzellstimulation der applizierten Gesamtenergie zugerechnet und nicht einzelnen Parametern wie der Energieflussdichte oder der Anzahl der verabreichten Impulse. Zudem wurde ein Zellschaden bei der Verabreichung einer sehr hohen Energieflussdichte beobachtet (KUSNIERCZAK, 2000, S. 29ff).

Wang et al und Chen et al bestätigten die Entdeckungen in vivo, indem sie einen dosisabhängigen Effekt der ESWT auf Knochengewicht und Knochenstärke nachweisen konnten. Dies gelang in zwei Tierversuchen, bei denen die Frakturheilung eines frischen Knochenbruches im Kaninchenmodell (WANG, 2004, S. 225ff) und die Therapie der Knochenheilungsstörung im Rattenmodell (WANG, 2002, S. 457ff) untersucht wurden. Neben den Studien mit

Knochenheilungsstörungen beschrieben andere Autoren knochenstimulierende Effekte mit niedrigeren applizierten Energien. Tischer et al entdeckten Zeichen der Knochenneubildung in Bereichen deutlich außerhalb der Fokuszone des Stoßwellengerätes (TISCHER, 2002, S. 281ff).

Ein Ziel der vorliegenden Studie war es deshalb herauszufinden, ob nicht-fokussierte radiale Stoßwellen mit einer niedrigeren Energiedosis ebenfalls eine Knochenneubildung induzieren können. Es konnte demonstriert werden, dass eine signifikante Osteoneogenese im gesunden Kaninchenknochen durch die rESWT bei niedrigen Energieflussdichten ($0,16 \text{ mJ/mm}^2$) mit einer relativ hohen Impulsrate (2×4000 Impulse) induziert werden kann. War die Knochenneubildung induziert, persistierte sie für mindestens 5 Wochen nach der letzten Stoßwellenapplikation.

Trotz der relativ niedrigen Energieflussdichte konnte auch in der dorsalen femoralen Kortikalis ein Knochenwachstum angeregt werden. Dies beweist die Durchdringungsfähigkeit der radialen Stoßwellen durch Weichteilgewebe und Knochen. Allerdings war die Induktion der Knochenneubildung in der ventralen Kortikalis signifikant stärker und hielt signifikant länger an als in der dorsalen Kortikalis. Die ventrale Seite war dem Stoßwellenapplikator zugewandt. Diese Beobachtungen lassen sich durch die entfernungsabhängige Abschwächung der Stoßwellenenergie durch die Gewebsdurchdringung erklären. Sie bestätigten die dosisabhängig gesteigerte Stimulation der Osteoneogenese.

Als erste Schlussfolgerung ist zu empfehlen, dass im klinischen Einsatz die Stoßwellenapplikation von verschiedenen Seiten des Knochens durchgeführt werden sollte, um die notwendige und optimierte Energieflussdichte in allen Bereichen der Kortikalis zu erzielen.

Die vorliegende Studie ist die erste ihrer Art, die eine signifikante Induktion der Knochenneubildung durch die nicht-fokussierte, radiale ESWT beweist. Unsere Daten sind im Einklang mit Ergebnissen anderer Forschungsgruppen die zeigten, dass kortikale Frakturen und periostale Ablösungen keine Voraussetzungen für die ESWT-induzierte Osteoneogenese sind (MAIER, 2004, S. 1401ff). Allerdings könnten Mikrofrakturen ein zusätzlicher Stimulus für die Bildung von trabekulärem Knochen

sein (DELIUS, 1995, S. 1219ff), da in unserer Studie lediglich die Induktion von endostalem und periostalem Knochen beobachtet werden konnte. In der vorliegenden Studie konnten keine trabekulären Mikrofrakturen, aber auch keine trabekuläre Knochenneubildung beobachtet werden.

In der Literatur finden sich reichlich klinische und experimentelle Daten, dass mechanische Stimuli sowohl einen positiven als auch einen negativen Effekt auf die Frakturheilung, Knochenregeneration und das Knochengewicht (zum Beispiel bei Osteoporose) haben können (GOLLWITZER, 2006, S. 142ff, WANG, 2004, S. 225). Neben der fokussierten Stoßwelle wurde besonders das Konzept der zyklischen Belastung sowie die Vibrationsstimulation in zahlreichen Studien untersucht und ein positiver Effekt auf die Knochenregeneration in frakturiertem und normalem Knochen nachgewiesen (FRITTON, 2005, S. 1030ff, GARDNER, 2006, S. 1679ff, WANG, 2004, S. 225ff). Die rESWT muss auch in diesem Kontext diskutiert werden, weil sie repetitive mechanische Stimuli durch kontrollierte Kompression und Ausdehnung senkrecht auf den therapierten Knochen erzeugt. Diese können in einem klinischen Rahmen leicht appliziert werden. Weitere Studien müssen zeigen, ob die rESWT einen positiven Beitrag zur Behandlung und Vorbeugung von Knochenerkrankungen, wie beispielsweise der Osteoporose, liefern kann und welche Therapieparameter (vor allem Energie und Zeitpunkt der Behandlung) für ein optimales Ergebnis nötig sind.

4.3 Dynamik der durch Stoßwellen induzierten Knochenneubildung

Bei der Behandlung von Knochenkrankheiten wird die ESWT gewöhnlich in drei bis sechs Sitzungen angewendet. Dazwischen befindet sich ein therapiefreies Intervall von vier bis acht Wochen (GOLLWITZER, 2006, S. 142ff). Diese Empfehlungen begründen sich hauptsächlich auf empirischen klinischen Beobachtungen und nicht auf kontrollierten experimentellen Daten. In unserer Studie wurde die Knochenneubildung durch die rESWT bereits innerhalb der ersten Woche nach der Stoßwellentherapie in signifikanter Höhe induziert. Der Gipfel der Osteoneogenese konnte vier Wochen nach der ersten rESWT beobachtet werden. Darauf folgend nahm die Knochenneubildung bis zur sechsten Woche nach der ESWT wieder ab. Diese Abnahme war am eindrucksvollsten in der dorsalen Kortikalis nachvollziehbar,

wo hingegen die Knochenneubildung in der ventralen Knochenneubildung auch nach sechs Wochen persistierte.

Es ist daher der Schluss zu ziehen, dass sowohl die Intensität der Knochenneubildung als auch deren zeitliche Persistenz dosisabhängig ist. Eine höhere verabreichte Energie am Knochen könnte nicht nur in einer höheren Knochenneubildungsrate sondern auch in einer verlängerten zeitlichen Knochenstimulation resultieren. Aus den Resultaten dieser Arbeit lässt sich der Schluss ziehen, dass die rESWT ungefähr fünf bis sechs Wochen nach der ersten Therapieeinheit wiederholt werden sollte, da im Anschluss an diesen Zeitraum in Teilen des therapierten Knochenareals eine signifikante Abnahme der Knochenneubildung beobachtet werden konnte.

Interessanterweise zeigten sich in der Fluoreszenzmikroskopie auch schwache inhomogene Tetrazyklinbanden in den mit radialen Stoßwellen behandelten Knochenarealen. Im Gegensatz dazu fanden sich in der Kontrollgruppe keine Tetrazyklinablagerungen. Es ist zu vermuten, dass bereits kurz nach der ersten ESWT die Knochenneubildung induziert und noch von der präinterventionellen Injektion zirkulierendes Tetrazyklin in die Knochenmatrix eingebaut wurde.

4.4 Wirkung von Stoßwellen auf Faktoren der Neovaskularisation und Schmerzwahrnehmung

Ein weiterer bemerkenswerter Effekt der Stoßwellen ist deren Wirkung auf molekulare Faktoren der Neovaskularisation. Gutersohn et al. konnten 2000 erstmalig zeigen, dass nach einer Stoßwellenapplikation die Konzentration des vascular endothelial growth factors (VEGF) in Endothelzellen erhöht ist (GUTERSOHN, 2000, S. 42).

Nishida et al. konnten in einem Tiermodell zeigen, dass nach einer ESWT die Angiogenese im ischämischen Myokard gefördert wird und es in Folge zu einer Verbesserung der kardialen Pumpfunktion kommt (NISHIDA, 2004, S. 3055ff). Neben der Wirkung auf ischämisches Myokard konnten Aicher et al nachweisen, dass Stoßwellen auch einen Effekt auf ischämisches Skelettmuskelgewebe haben. Es kam durch eine verstärkte mRNA-Expression von stromal cell derived factor 1

(SDF-1) zu einer chemotaktischen Rekrutierung von VEGF-positiven endothelialen Vorläuferzellen in das ischämische Gewebe. Infolgedessen wurde die Durchblutung des betroffenen Areals verstärkt (AICHER, 2006, S. 2826f).

In einer aktuellen Studie konnten Yip et al. zeigen, dass es nach der Stoßwellenapplikation auf mononukleäre Zellen des Knochenmarks ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme des VEGF kommt und vermehrt CD-31 positive Endothelzellen nachgewiesen werden können. Dies ist ein möglicher molekularer Mechanismus für die Förderung der Angiogenese durch Stoßwellen (YIP, 2008, S. 154f).

Da die mononukleären Zellen des Knochenmarks mit großer Wahrscheinlichkeit zukünftig in der Stammzelltherapie von ischämischen Herz- und Skelettmuskelerkrankungen eingesetzt werden, könnte die Stoßwellentherapie einen Beitrag zur erfolgreichen Therapie dieser Erkrankungen durch eine Verstärkung der Neovaskularisation in ischämischen Geweben liefern (YIP, 2008, S. 155).

Maier et al. konnten einen molekularen Faktor der Entzündungsreaktion und Schmerzvermittlung nach extrakorporaler Stoßwellenapplikation nachweisen, die Substanz P. Dieses Molekül wird unter anderem aus Nervenendigungen des Periostes freigesetzt. 6 bis 24 Stunden nach der ESWT konnte eine erhöhte Konzentration der Substanz P im therapierten Gewebe nachgewiesen werden. Dies könnte eine mögliche Ursache für die initiale Schmerzempfindung unmittelbar nach der Stoßwellenapplikation darstellen. 6 Wochen nach der ESWT konnte im Gegensatz hierzu eine stark verminderte Konzentration der Substanz P im therapierten Gewebe beobachtet werden. Dies wiederum könnte ein möglicher Mechanismus der lang anhaltenden Schmerzreduktion durch die ESWT nach der initialen Schmerzphase, beispielsweise bei Insertionstendopathien, darstellen (MAIER, 2003, S. 237ff).

4.5 Antibakterielle Wirkung von Stoßwellen

Neben den bereits erwähnten Wirkungen der Stoßwellen lässt sich auch ein antibakterieller Effekt nachweisen. Bereits 1990 wurde in einer Studie beobachtet,

dass bei einer Stoßwellenlithotripsie von Infektsteinen des Harnleiters, ausgelöst durch *Proteus mirabilis*, die Zahl der Bakterien signifikant abnahm (REID, 1990, S. 427).

Von Eiff et al. zeigten in einer In-vitro-Studie, dass die extrakorporalen Stoßwellen auch einen bakteriziden Effekt auf *Staphylokokkus aureus* haben. Dieser Effekt hängt von der Anzahl der applizierten Stoßwellenimpulse und der damit verabreichten Energie ab (VON EIFF, 2000, S. 710f). Eine weitere In-vitro-Studie zeigte, dass Bakterienarten unterschiedlich sensitiv für die Stoßwellenapplikation sind. Während *Staphylokokkus aureus* und *Staphylokokkus epidermidis* sensibel reagierten, war *Enterokokkus faecalis* weniger empfindlich gegenüber extrakorporalen Stoßwellen (GOLLWITZER, 2004, S. 464ff).

Auf der Basis dieser Erkenntnisse ist als weitere Indikation für die Stoßwellentherapie beispielsweise ein Einsatz bei bakteriellen Infektionen des Knochens denkbar.

4.6 Wirkung von Stoßwellen auf Sehngewebe

In mehreren Studien wurden die Effekte der extrakorporalen Stoßwellen auf Sehngewebe untersucht.

So zeigte sich in Studien von Rompe et al. und Maier et al., dass es je nach Stärke der applizierten Stoßwellenenergie zu unterschiedlichen sonographisch und histologisch nachweisbaren Veränderungen am Sehngewebe kommt. Bei hohen Energieflussdichten sind fibrinoide Nekrosen und die Einwanderung von Entzündungszellen zu beobachten (MAIER, 2002, S. 440f, ROMPE, 1998, S. 548ff). Als Folge aus diesen Erkenntnissen empfehlen beide Autoren hohe Energieflussdichten am Sehngewebe zu vermeiden. Zudem war zu beobachten, dass bereits niedrig dosierte Stoßwellenapplikationen einen nachweisbaren Effekt im biologischen Gewebe auslösen können.

Eine weitere Studie zeigte, dass durch Stoßwellen eine Gefäßneubildung auch im Sehngewebe induziert werden kann. Durch die Applikation von niedrig energetischen Stoßwellen konnte beobachtet werden, dass eine

Kapillareinsprossung in das therapierte Sehngewebe ausgelöst wird (WANG, 2003, S. 984ff).

4.7 Nebenwirkungen der Stoßwellentherapie

Durch die Applikation von sehr hohen Energiedosen konnte eine Suppression der Knochenneubildung beobachtet werden. Maier et al. demonstrierten den schädlichen Effekt extrem hoher Energieflussdichten ($\geq 0,9 \text{ mJ/mm}^2$). Es zeigten sich Weichteilödeme, kortikale Frakturen, periostale Ablösungen, intraossäre Blutungen und sogar die Verschleppung von Knochenfragmenten in Lungengefäße mit der Gefahr der Lungenembolie (MAIER, 2003, S. 237ff, MAIER, 2003, S. 223ff, MAIER, 2004, S. 1401ff).

In unserer Studie kamen niedrige Energieflussdichten ($0,16 \text{ mJ/mm}^2$) zum Einsatz. Wir konnten keine histologisch oder radiologisch erfassbaren Traumen wie Frakturen, intraossäre Hämatoome oder periostale Ablösungen nach der radialen Stoßwellenapplikation nachweisen. Zudem konnten keinerlei Knochensplinter in den Lungengefäßen nachgewiesen werden. Es zeigten sich nach den Stoßwellenapplikationen lediglich temporäre Hautverletzungen und Hämatoome. Die rESWT kann somit als äußerst sicheres Therapieverfahren angesehen werden.

4.8 Schlussfolgerung und klinische Relevanz

Aufgrund der gewonnenen Daten lässt sich der Schluss ziehen, dass der Effekt der rESWT auf die Knochenneubildung eine komplexe, dosisabhängige biologische Reaktion auf die mechanische Stimulation ist, die auch mehrere Wochen nach der Applikation anhält. Zudem konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass für die Induktion der Osteoneogenese das Auftreten von Mikrofrakturen durch die Stoßwellentherapie nicht zwingend notwendig ist. Es konnte gezeigt werden, dass die rESWT effektiv die Osteoneogenese im gesunden Knochengewebe induzieren kann und einen Vorteil gegenüber der fokussierten Stoßwellentherapie in Bezug auf die Größe des behandelten Areals hat. Mögliche neue klinische Einsatzmöglichkeiten der rESWT könnten im Bereich der Osteoporosetherapie bei Knochenarealen direkt unter dem Hautniveau (beispielsweise im Bereich des distalen Radius) liegen, da die

radialen Stoßwellen durch repetitive mechanische Stimuli die Knochenregeneration fördern. Dies sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Die durch die radialen Stoßwellen induzierte Knochenneubildung persistierte in dieser Arbeit für einen Zeitraum von sechs Wochen nach der ersten Stoßwellenapplikation. Der Höhepunkt der Knochenneubildung war nach vier Wochen zu beobachten. Daher ist nach unseren Daten ein Intervall zwischen den einzelnen Stoßwellenapplikationen von sechs Wochen zu empfehlen. Die Intensität und zeitliche Persistenz der durch Stoßwellen induzierten Osteoneogenese ist dosisabhängig. Dies konnte durch die unterschiedlich ausgeprägte Knochenneubildung an der applikationsnahen ventralen Femurkortikalis und der applikationsfernen distalen Femurkortikalis gezeigt werden. Eine mögliche Limitation der rESWT könnte daher bei pathologischen Prozessen weit unterhalb des Hautniveaus auftreten, da es entfernungsabhängig zu einer Abnahme der Stoßwellenenergie kommt. Trotz allem könnte die rESWT neue Perspektiven bei der Behandlung von Knochenerkrankungen aufzeigen, da größere Gewebeareale kostengünstig und effektiv therapiert werden können.

5. Zusammenfassung

Die extrakorporale Stoßwellentherapie ist ein in der Orthopädie weit verbreitetes, prinzipiell nebenwirkungsarmes Verfahren. Während für die fokussierte Stoßwellentherapie bereits der Nachweis erbracht wurde, dass sie einen osteogenen Effekt hat, fehlte dieser bisher für die niedrig-energetischen radialen Stoßwellen. Für die fokussierten Stoßwellen sind zudem vereinzelte Nebenwirkungen, wie Lungenembolien und Knochensplitter in den Lungengefäßen, beschrieben worden.

Ziel dieser Arbeit war es daher, den Effekt der radialen extrakorporalen Stoßwellen auf das gesunde Knochengewebe am Kaninchenmodell in vivo zu untersuchen und die Dynamik der Knochenneubildung zu erforschen. Zudem wurde beobachtet, welche Nebenwirkungen die radialen Stoßwellen an der Applikationsstelle und im Lungengewebe verursachen.

Jeweils ein distales Femur von 13 Kaninchen der Rasse „Weiße Neuseeländer“ wurde in zwei Sitzungen im Abstand von sieben Tagen einer radialen Stoßwellentherapie unterzogen. Als Parameter der rESWT wurden pro Applikation eine Impulszahl von 4000, eine Frequenz von 8 Hz, ein Druck von 4 bar und eine Energieflussdichte von 0,16 mJ/mm² verwendet. Als Kontrolle diente das kontralaterale nicht therapierte Femur. Die Kaninchen wurden in drei Gruppen eingeteilt, um die Knochenneubildung und deren Dynamik zu unterschiedlichen Zeitpunkten erforschen zu können. Den Versuchstieren wurden zu diesem Zweck in verschiedenen Zeiträumen fluorochrome Farbstoffe injiziert. Nach der Opferung der Kaninchen wurden die Knochenpräparate mit der Trenn-Dünnschlifftechnik bearbeitet und einer fluorochromen Sequenzanalyse unterzogen. Die Lungen der Kaninchen wurden auf Lungenembolien und Knochensplitter untersucht.

Es konnte demonstriert werden, dass die niedrig-energetische radiale Stoßwellentherapie in der Lage ist, die Knochenneubildung in gesundem Knochengewebe in einem signifikanten Ausmaß zu induzieren. Der Beginn der Osteoneogenese war unmittelbar nach der radialen Stoßwellenapplikation zu beobachten und persistierte für mindestens sechs Wochen mit einem Maximum vier Wochen nach der ersten Stoßwellenapplikation. Basierend auf diesem Ergebnis kann

ein Intervall von 6 Wochen zwischen den einzelnen Therapiesitzungen empfohlen werden. Für die Induktion der Osteoneogenese waren keine Mikrofrakturen notwendig. Die Knochenneubildung erwies sich als dosisabhängig und war an der applikationsnahen ventralen Femurkortikalis stärker und länger anhaltend ausgeprägt als an der tiefer liegenden dorsalen Kortikalis.

Die rESWT erwies sich als ausgesprochen nebenwirkungsarm und gut verträglich. Es zeigten sich lediglich temporäre Nebenwirkungen in Form von Hämatomen und kleineren Hautläsionen an der Applikationsstelle. Systemische Nebenwirkungen in den Lungen wie Embolien und Knochensplitter konnten nicht demonstriert werden. Die mechanischen Eigenschaften der radialen Stoßwellen könnten in der Zukunft einen Einsatz auf dem Gebiet der Osteoporosetherapie möglich machen.

6. Literaturverzeichnis

- Aicher, A., Heeschen, C., Sasaki, K., Urbich, C., Zeiher, A.M., Dimmeler, S. Low-energy shock wave for enhancing recruitment of endothelial progenitor cells: a new modality to increase efficacy of cell therapy in chronic hind limb ischemia. *Circulation* 114 (2006), 2823-2830
- Brandner, H., Späth, K. Extrakorporale Stoßwellentherapie bei Knochenheilungsstörungen. *Trauma Berufskrankh* 3 (2004), 253-261
- Buch, M., Knorr, U., Fleming, L., Theodore, G., Amendola, A., Bachmann, C., Zingas, C., Siebert, W.E. [Extracorporeal shockwave therapy in symptomatic heel spurs. An overview]. *Orthopade* 31 (2002), 637-644
- Burck H.C. Histologische Technik. Thieme Verlag, Stuttgart, 1988, 6. Auflage
- Cacchio, A., Paoloni, M., Barile, A., Don, R., de, P.F., Calvisi, V., Ranavolo, A., Frascarelli, M., Santilli, V., Spacca, G. Effectiveness of radial shock-wave therapy for calcific tendinitis of the shoulder: single-blind, randomized clinical study. *Phys.Ther.* 86 (2006), 672-682
- Chen, Y.J., Wurtz, T., Wang, C.J., Kuo, Y.R., Yang, K.D., Huang, H.C., Wang, F.S. Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGF-beta 1 and VEGF in the early stage of shock wave-promoted bone regeneration of segmental defect in rats. *J.Orthop.Res.* 22 (2004), 526-534
- Chen, Y.J., Kuo, Y.R., Yang, K.D., Wang, C.J., Sheen Chen, S.M., Huang, H.C., Yang, Y.J., Yi-Chih, S., Wang, F.S. Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p38 kinase in shock wave-promoted bone formation of segmental defect in rats. *Bone* 34 (2004), 466-477
- Dahmen, GP., Meiss, L., Nam, VC. Extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWT) im knochennahen Weichteilbereich an der Schulter. *Extr Orthopaedica* 11 (1992), 25-27
- Dahmen, GP., Nam, VC., Meiss, L. Extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWT) zur Behandlung von knochennahen Weichteilschmerzen. Indikation, Technik und vorläufige Ergebnisse. Konsensus Workshop der Deutschen Gesellschaft für Stoßwellenlithotripsie Attempto-Verlag, Tübingen, 1993, 143-148
- Delius, M., Draenert, K., Al, D.Y., Draenert, Y. Biological effects of shock waves: in vivo effect of high energy pulses on rabbit bone. *Ultrasound Med.Biol.* 21 (1995), 1219-1225
- Electro Medical Systems (2008), Swiss Dolorclast, (http://www.ems-company.com/pdf/swiss_dolorclast_brochure_fa-207_de.pdf), Stand: 20.01.2008
- Fehre, J., Krauß, W., Lutz, A., Reitmajer, R., Tóth-Kischkat, A., Ueberle, F., Wess, O. (2005), Fokussierte und unfokussierte Druck- und Stoßwellen – Unterschiede und Gemeinsamkeiten, (www.stosswellentherapie.org/redaktion/_data/DIGEST-paper-V10.pdf?PHPSESSID=9a5c90e50cb82902d2fa7ff160063b85), Stand 03.05.2008

- Fritton, J.C., Myers, E.R., Wright, T.M., van der Meulen, M.C. Loading induces site-specific increases in mineral content assessed by microcomputed tomography of the mouse tibia. *Bone* 36 (2005), 1030-1038
- Frost, H.M. Tetracycline-based Histological Analysis of Bone Remodeling. *Calc Tiss Res* 3 (1969), 211-237
- Gardner, M.J., van der Meulen, M.C., Demetrakopoulos, D., Wright, T.M., Myers, E.R., Bostrom, M.P. In vivo cyclic axial compression affects bone healing in the mouse tibia. *J Orthop.Res.* 24 (2006), 1679-1686
- Gerdesmeyer, L., Maier, M., Haake, M., Schmitz, C. [Physical-technical principles of extracorporeal shockwave therapy (ESWT)]. *Orthopade* 31 (2002), 610-617
- Gerdesmeyer, L., Wagenpfeil, S., Haake, M., Maier, M., Loew, M., Wortler, K., Lampe, R., Seil, R., Handle, G., Gassel, S., Rompe, J.D. Extracorporeal shock wave therapy for the treatment of chronic calcifying tendonitis of the rotator cuff: a randomized controlled trial. *JAMA* 290 (2003), 2573-2580
- Gerdesmeyer, L., Diehl, P., Gollwitzer, H., Wagner, K. Radiale extrakorporale Stoßwellentherapie in der Orthopädie. *J Miner Stoffwechs* 11 (2004), 36–39
- Gerdesmeyer, L., Rompe, J.D. (2008), DIGEST Internationales Expertenforum am 26.01.2008, www.digest-ev.de, Stand 03.05.2008
- Gollwitzer, H., Horn, C., von Eiff, C., Henne, M., Gerdesmeyer, L. [Antibacterial effectiveness of high-energetic extracorporeal shock waves: an in vitro verification]. *Z.Orthop.Ihre Grenzgeb.* 142 (2004), 462-466
- Gollwitzer, H., Brandner, H., Gloeck, T. [Extracorporeal shock wave therapy for bony non-union: Evidence-based therapy - Review of the literature and personal results.]. *Trauma Berufskrankh* 8 (2006), 142-152
- Gutersohn, A., Caspari, G., Erbel, R. Upregulation of Vascular endothelial growth factor m-RNA in Human umbilical vascular endothelial cells via shock waves. *Eur J Heart Fail* 102 (2000), 42-42
- Haake, M., Boddeker, I.R., Decker, T., Buch, M., Vogel, M., Labek, G., Maier, M., Loew, M., Maier-Boerries, O., Fischer, J., Betthausen, A., Rehack, H.C., Kanovsky, W., Muller, I., Gerdesmeyer, L., Rompe, J.D. Side-effects of extracorporeal shock wave therapy (ESWT) in the treatment of tennis elbow. *Arch.Orthop.Trauma Surg.* 122 (2002), 222-228
- Haake, M., Buch, M., Schoellner, C., Goebel, F., Vogel, M., Mueller, I., Hausdorf, J., Zamzow, K., Schade-Brittinger, C., Mueller, H.H. Extracorporeal shock wave therapy for plantar fasciitis: randomised controlled multicentre trial. *BMJ* 327 (2003), 75
- Haake, M., Gerdesmeyer L. Kapitel 1: Grundlagen - Geschichte der Stoßwellentherapie. In: "Extrakorporale Stoßwellentherapie - Schwerpunkt Radiale Technologie, Grundlagen, Klinische Ergebnisse.", Gerdesmeyer, L. (Hrsg.), Books on Demand GmbH, Norderstedt, 2004, 8-18

- Heller, K.D., Niethard, F.U. [Using extracorporeal shockwave therapy in orthopedics-- a meta-analysis]. *Z.Orthop.Ihre Grenzgeb.* 136 (1998), 390-401
- Ikeda, K., Tomita, K., Takayama, K. Application of extracorporeal shock wave on bone: preliminary report. *J.Trauma* 47 (1999), 946-950
- Karpman, R.R., Magee, F.P., Gruen, T.W., Mobley, T. Work-in-progress #1. The lithotripter and its potential use in the revision of total hip arthroplasty. *Orthop.Rev.* 16 (1987), 38-42
- Kaulesar Sukul, D.M., Johannes, E.J., Pierik, E.G., van Eijck, G.J., Kristelijin, M.J. The effect of high energy shock waves focused on cortical bone: an in vitro study. *J.Surg.Res.* 54 (1993), 46-51
- Krause, H. Physik und Technik medizinischer Stoßwellensysteme. In: "Extrakorporale Stoßwellentherapie", Rompe, J.D. (Hrsg.), Chapman & Hall, Weinheim, 1997, 15-34
- Kusnierczak, D., Brocai, D.R., Vettel, U., Loew, M. [Effect of extracorporeal shockwave administration on biological behavior of bone cells in vitro]. *Z.Orthop.Ihre Grenzgeb.* 138 (2000), 29-33
- Maier, M., Tischer, T., Milz, S., Weiler, C., Nerlich, A., Pellengahr, C., Schmitz, C., Refior, H.J. Dose-related effects of extracorporeal shock waves on rabbit quadriceps tendon integrity. *Arch.Orthop.Trauma Surg.* 122 (2002), 436-441
- Maier, M., Averbek, B., Milz, S., Refior, H.J., Schmitz, C. Substance P and prostaglandin E2 release after shock wave application to the rabbit femur. *Clin.Orthop.Relat Res.*(2003), 237-245
- Maier, M., Freed, J.A., Milz, S., Pellengahr, C., Schmitz, C. [Detection of bone fragments in pulmonary vessels following extracorporeal shock wave application to the distal femur in an in-vivo animal model]. *Z.Orthop.Ihre Grenzgeb.* 141 (2003), 223-226
- Maier, M., Hausdorf, J., Tischer, T., Milz, S., Weiler, C., Refior, H.J., Schmitz, C. [New bone formation by extracorporeal shock waves. Dependence of induction on energy flux density]. *Orthopade* 33 (2004), 1401-1410
- Malay, D.S., Pressman, M.M., Assili, A., Kline, J.T., York, S., Buren, B., Heyman, E.R., Borowsky, P., LeMay, C. Extracorporeal shockwave therapy versus placebo for the treatment of chronic proximal plantar fasciitis: results of a randomized, placebo-controlled, double-blinded, multicenter intervention trial. *J.Foot Ankle Surg.* 45 (2006), 196-210
- McCormack, D., Lane, H., McElwain, J. The osteogenic potential of extracorporeal shock wave therapy. an in-vivo study. *Ir.J.Med.Sci.* 165 (1996), 20-22
- Milch, R.A., Rall, D.P., Tobie, J.E. Bone localization of the tetracyclines. *J Nat Cancer Inst* 19 (1957), 87-93
- Nishida, T., Shimokawa, H., Oi, K., Tatewaki, H., Uwatoku, T., Abe, K., Matsumoto, Y., Kajihara, N., Eto, M., Matsuda, T., Yasui, H., Takeshita, A., Sunagawa, K.

Extracorporeal cardiac shock wave therapy markedly ameliorates ischemia-induced myocardial dysfunction in pigs in vivo. *Circulation* 110 (2004), 3055-3061

Ogden, J.A., Toth-Kischkat, A., Schultheiss, R. Principles of shock wave therapy. *Clin.Orthop.Relat Res.*(2001), 8-17

Reid, G., Jewett, M.A., Nickel, J.C., McLean, R.J., Bruce, A.W. Effect of extracorporeal shock wave lithotripsy on bacterial viability. Relationship to the treatment of struvite stones. *Urol.Res.* 18 (1990), 425-427

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

Rompe, J.D., Kirkpatrick, C.J., Kullmer, K., Schwitalle, M., Krischek, O. Dose-related effects of shock waves on rabbit tendo Achillis. A sonographic and histological study. *J.Bone Joint Surg.Br.* 80 (1998), 546-552

Rompe, J.D., Krischek, O., Eysel, P., Hopf, C. Chronische Insertionstendopathie am lateralen Epicondylus humeri - Ergebnisse der extrakorporalen Stoßwellenapplikation. *Schmerz* 12 (1998), 105-111

Rompe, J.D., Rosendahl, T., Schollner, C., Theis, C. High-energy extracorporeal shock wave treatment of nonunions. *Clin.Orthop.Relat Res.*(2001), 102-111

Rompe, J.D., Nafe, B., Furia, J.P., Maffulli, N. Eccentric loading, shock-wave treatment, or a wait-and-see policy for tendinopathy of the main body of tendo Achillis: a randomized controlled trial. *Am.J.Sports Med.* 35 (2007), 374-383

Schaden, W., Fischer, A., Sailer, A. Extracorporeal shock wave therapy of nonunion or delayed osseous union. *Clin.Orthop.Relat Res.*(2001), 90-94

Sistermann, R., Katthagen, B.D. [Complications, side-effects and contraindications in the use of medium and high-energy extracorporeal shock waves in orthopedics]. *Z.Orthop.Ihre Grenzgeb.* 136 (1998), 175-181

Speed, C.A., Nichols, D., Wies, J., Humphreys, H., Richards, C., Burnet, S., Hazleman, B.L. Extracorporeal shock wave therapy for plantar fasciitis. A double blind randomised controlled trial. *J.Orthop.Res.* 21 (2003), 937-940

Tischer, T., Milz, S., Anetzberger, H., Muller, P.E., Wirtz, D.C., Schmitz, C., Ueberle, F., Maier, M. [Extracorporeal shock waves induce ventral-periosteal new bone formation out of the focus zone--results of an in-vivo animal trial]. *Z.Orthop.Ihre Grenzgeb.* 140 (2002), 281-285

Valchanou, V.D., Michailov, P. High energy shock waves in the treatment of delayed and nonunion of fractures. *Int.Orthop.* 15 (1991), 181-184

von Eiff, C., Overbeck, J., Haupt, G., Herrmann, M., Winckler, S., Richter, K.D., Peters, G., Spiegel, H.U. Bactericidal effect of extracorporeal shock waves on *Staphylococcus aureus*. *J.Med.Microbiol.* 49 (2000), 709-712

- Wang, C.J., Huang, H.Y., Chen, H.H., Pai, C.H., Yang, K.D. Effect of shock wave therapy on acute fractures of the tibia: a study in a dog model. *Clin.Orthop.Relat Res.*(2001), 112-118
- Wang, C.J., Wang, F.S., Yang, K.D., Weng, L.H., Hsu, C.C., Huang, C.S., Yang, L.C. Shock wave therapy induces neovascularization at the tendon-bone junction. A study in rabbits. *J.Orthop.Res.* 21 (2003), 984-989
- Wang, C.J., Yang, K.D., Wang, F.S., Hsu, C.C., Chen, H.H. Shock wave treatment shows dose-dependent enhancement of bone mass and bone strength after fracture of the femur. *Bone* 34 (2004), 225-230
- Wang, C.J., Wang, F.S., Huang, C.C., Yang, K.D., Weng, L.H., Huang, H.Y. Treatment for osteonecrosis of the femoral head: comparison of extracorporeal shock waves with core decompression and bone-grafting. *J.Bone Joint Surg.Am.* 87 (2005), 2380-2387
- Wang, C.J., Liu, H.C., Fu, T.H. The effects of extracorporeal shockwave on acute high-energy long bone fractures of the lower extremity. *Arch.Orthop.Trauma Surg.* 127 (2007), 137-142
- Wang, F.S., Wang, C.J., Huang, H.J., Chung, H., Chen, R.F., Yang, K.D. Physical shock wave mediates membrane hyperpolarization and Ras activation for osteogenesis in human bone marrow stromal cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 287 (2001), 648-655
- Wang, F.S., Wang, C.J., Sheen-Chen, S.M., Kuo, Y.R., Chen, R.F., Yang, K.D. Superoxide mediates shock wave induction of ERK-dependent osteogenic transcription factor (CBFA1) and mesenchymal cell differentiation toward osteoprogenitors. *J.Biol.Chem.* 277 (2002), 10931-10937
- Wang, F.S., Yang, K.D., Chen, R.F., Wang, C.J., Sheen-Chen, S.M. Extracorporeal shock wave promotes growth and differentiation of bone-marrow stromal cells towards osteoprogenitors associated with induction of TGF-beta1. *J.Bone Joint Surg.Br.* 84 (2002), 457-461
- Wang, F.S., Yang, K.D., Kuo, Y.R., Wang, C.J., Sheen-Chen, S.M., Huang, H.C., Chen, Y.J. Temporal and spatial expression of bone morphogenetic proteins in extracorporeal shock wave-promoted healing of segmental defect. *Bone* 32 (2003), 387-396
- Wess, O., Ueberle F., Dührssen RN., Hilcken D., Krauss W., Reuner TH., Schultheiss R., Staudenraus I., Rattner M., Haaks W., Granz B. Working Group Technical Developments - Consensus Report. In: "High Energy Shock Waves in Medicine.", Chaussy, C., Eisenberger, F., Jocham, D., Wilbert, D. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1997, 59-71
- Yip, H.K., Chang, L.T., Sun, C.K., Youssef, A.A., Sheu, J.J., Wang, C.J. Shock Wave Therapy Applied to Rat Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells Enhances Formation of Cells Stained Positive for CD31 and Vascular Endothelial Growth Factor. *Circ.J.* 72 (2008), 150-156

7. Abkürzungsverzeichnis

AG	Aktiengesellschaft
BMP	bone morphogenic protein
BPO	Benzoylperoxid
°C	Grad Celsius
CBFA-1	core binding factor alpha 1
CD-31	cluster of differentiation molecule 31
cm	Zentimeter
DIGEST	Deutschsprachige Internationale Gesellschaft für Extrakorporale Stoßwellentherapie
ESWT	extrakorporale Stoßwellentherapie
f	folgende Seite
ff	mehrere folgende Seiten
G	Gage
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
Hz	Herz
I	Standardzeitintervall zur Berechnung der sog. „totalen Energie“ der Stoßwelle
I+	Standardzeitintervall zur Berechnung der sog. „positiven Energie“ der Stoßwelle
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
m ³	Kubikmeter
mA	Milliamper
MAP	mitogen-activated protein
mg	Milligramm
mJ	Milli-Joule
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MMA	Methylmetacrylat

mRNA	messenger ribonucleic acid
µm	Mikrometer
ns	Nanosekunde
OD	Osteochondrosis dissecans
P+	positiver Spitzendruck
P-	negativer Spitzendruck
Prof.	Professor
Ras	rat sarcoma
rESWT	radiale extrakorporale Stoßwellentherapie
S.	Seite
s.c.	subkutan
SDF-1	stromal cell derived factor 1
TGF	transforming growth factor
TGF-β1	transforming growth factor β1
Tr	Anstiegszeit
Tw	Pulsbreite
Univ.-Prof.	Universitätsprofessor
UV	Ultraviolett
VEGF	vascular endothelial growth factor

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung einer Stoßwelle.....	9
Abbildung 2:	Ballistische Erzeugung der radialen Stoßwelle im Handstück des Swiss Dolorclast® von EMS.....	10
Abbildung 3:	Aufsteilung einer Druckwelle zu einer Stoßwelle.....	11
Abbildung 4:	Schallausbreitung bei fokussierten (links) und unfokussierten (rechts) Stoßwellensystemen.....	12
Abbildung 5:	Breitbandfluoreszenzmikroskopie eines distalen Kaninchenfemurs.....	15
Abbildung 6:	ESWT bei Pseudarthrosen.....	17
Abbildung 7:	Applikationsstelle der radialen Stoßwellen.....	25
Abbildung 8:	Knochenpräparat nach Bearbeitung mit Trenn- Dünnschlifftechnik.....	31
Abbildung 9:	Bilder der fluorochromen Sequenzmarkierung als Zeichen der Knochenneubildung am ventralen Femur vier Wochen nach der ersten rESWT.....	38
Abbildung 10:	Bilder der homogenen fluorochromen Farbbanden Alizarin-Rot und Calcein-Blau sechs Wochen nach der ersten rESWT	38
Abbildung 11:	Auswertung der akkumulierten Osteoneogenese gemäß Klassifikationssystem I.....	39
Abbildung 12:	Statistische Auswertung der nach dem Klassifikationssystem II beurteilten Osteoneogenese.....	40

Abbildung 13a: Statistische Auswertung der Osteoneogenese an der ventralen Femurkortikalis.....	41
Abbildung 13b: Statistische Auswertung der Osteoneogenese an der dorsalen Femurkortikalis.....	42
Abbildung 14: Statistische Auswertung der Osteoneogenese an der ventralen und dorsalen Femurkortikalis im Vergleich.....	43
Abbildung 15: Exemplarische Kontaktradiographien der unbearbeiteten Knochenfemora.....	44
Abbildung 16: Exemplarische Mikroradiographien der Knochenfemora nach Bearbeitung mit der Trenn-Dünnschlifftechnik.....	44
Abbildung 17: Tierexperimentelle Ergebnisse zur ESWT-Wirkung auf Knochengewebe.....	46

9. Anhang

Beobachtete Nebenwirkungen/Sektionsbefund der Versuchstiere (zu 4.4 und 2.1.2.8)

Kaninchennr.	nach 1. rESWT	nach 2. rESWT	Opferung
CQLV (Nr.14)	Hautverletzung	Hämatom	re Muskel flächige Einblutung, Femur bds, li Muskel, Lungen opB
EEN6 (Nr.17)	Hämatom	Hämatom	minimale Einblutung im re Femur, Muskel bds, li Femur, Lungen opB
CQNU (Nr.21)	Hämatom	Hämatom	li Femur und li Muskel punktförmige Einblutung, re Femur + re Muskel, Lungen opB
EEO8 (Nr.27)	Hämatom Hautverletzung	Hämatom	li Femur Einblutung, re Femur, Muskel bds, Lungen opB
EFB6 (Nr.10)		Hämatom	Femur bds, Muskel bds, Lungen opB
EES6 (Nr.19)	Hämatom Hautverletzung	Hämatom	Femur bds, Muskel bds, Lungen opB
EFB3 (Nr.23)	Hämatom Hautverletzung	Hämatom	re Muskel leichte Einblutung, Femur bds, li Muskel, Lungen opB
EEZ1 (Nr.25)	Hämatom	Hämatom	Femur bds, Muskel bds, Lungen opB
CQNQ (Nr.20)	Hämatom	Hämatom	re Femur Osteophyt am med. Condyl, li Femur, Muskeln bds, Lungen opB
CQNR (Nr.22)	Hautverletzung	Hämatom	re Femur Osteophyt am med. Condyl, li Femur, Muskeln bds, Lungen opB
EEN8 (Nr.24)	Hämatom Hautverletzung	Hämatom Hautverletzung	li Femur Osteophyt am med Condyl, re Femur, Muskeln bds, Lungen opB
EEQ3 (Nr.26)	Hämatom Hautverletzung	Hämatom	Femur bds, Muskel bds, Lungen opB
EEP9 (Nr.29)	Hämatom Hautverletzung	Hämatom	Femur bds, Muskel bds, Lungen opB

Semiquantitative Auswertung der Flurochromensequenzanalyse (zu 3.1.1.1, akkumulierte Knochenneubildung gemäß Klassifikationssystem I)

Gruppe 1 (Opferung nach 1 Woche)

Tetrazyklin prä-ESWT

Calcein-Grün 1 Woche post-ESWT

Schnittnr.	Klasse 0	Klasse 1	Klasse 2
14 li (unbehandelt)	X		
14 re (behandelt)			X
17 li (unbehandelt)	X		
17 re (behandelt)		X	
21 li (behandelt)			X
21 re (unbehandelt)	X		
27 li (behandelt)		X	
27 re (unbehandelt)		X	

Gruppe 2 (Opferung nach 3 Wochen)

Tetrazyklin prä-ESWT

Calcein-Grün 1 Woche post-ESWT

Alizarin-Rot 3 Wochen post-ESWT

Schnittnr.	Klasse 0	Klasse 1	Klasse 2
10 li (behandelt)		X	
10 re (unbehandelt)	X		
19 li (behandelt)		X	
19 re (unbehandelt)	X		
23 li (unbehandelt)	X		
23 re (behandelt)			X
25 li (unbehandelt)	X		
25 re (behandelt)			X

Gruppe 3 (Opferung nach 5 Wochen)

Tetrazyklin prä-ESWT

Calcein-Grün 1 Woche post-ESWT

Alizarin-Rot 3 Wochen post-ESWT

Calcein-Blau 5 Wochen post-ESWT

Schnittnr.	Klasse 0	Klasse 1	Klasse 2
26 li (behandelt)			X
26 re (unbehandelt)	X		
22 li (unbehandelt)		X	
22 re (behandelt)			X
20 li (unbehandelt)		X	
20 re (behandelt)			X
29 li (unbehandelt)	X		
29 re (behandelt)			X
24 li (behandelt)			X
24 re (unbehandelt)		X	

**Semiquantitative Auswertung der Fluorochromensequenzanalyse
(zu 3.1.1.1, Auswertung der einzelnen fluorochromen Farbbanden
gemäß Klassifikationssystem II)****Gruppe 1 (Opferung nach 1 Woche)**

Tetrazyklin prä-ESWT

Calcein-Grün 1 Woche post-ESWT

Schnittnr.	Tetrazyklin	Calcein-Grün
14li (unbehandelt)	0	0
14 re (behandelt)	1	1
17 li (unbehandelt)	0	0
17 re (behandelt)	1	2
21 li (behandelt)	1	4
21 re (unbehandelt)	0	0
27 li (behandelt)	1	1
27 re (unbehandelt)	0	1

Gruppe 2 (Opferung nach 3 Wochen)

Tetrazyklin prä-ESWT

Calcein-Grün 1 Woche post-ESWT

Alizarin-Rot 3 Wochen post-ESWT

Schnittnr.	Tetraklin	Calcein-Grün	Alizarin-Rot
10 li (behandelt)	1	2	1
10 re (unbehandelt)	0	0	0
19 li (behandelt)	0	2	2
19 re (unbehandelt)	0	0	0
23 li (unbehandelt)	0	0	0
23 re (behandelt)	0	4	4
25 li (unbehandelt)	0	0	0
25 re (behandelt)	1	4	4

Gruppe 3 (Opferung nach 5 Wochen)

Tetrazyklin prä-ESWT

Calcein-Grün 1 Woche post-ESWT

Alizarin-Rot 3 Wochen post-ESWT

Calcein-Blau 5 Wochen post-ESWT

Schnittnr.	Tetraklin	Calcein-Grün	Alizarin-Rot	Calcein-Blau
26 li (behandelt)	0	3	4	2
26 re (unbehandelt)	0	0	0	0
22 li (unbehandelt)	0	1	1	0
22 re (behandelt)	0	1	2	2
20 li (unbehandelt)	0	0	0	0
20 re (behandelt)	0	3	4	2
29 li (unbehandelt)	0	0	0	1
29 re (behandelt)	0	4	4	2
24 li (behandelt)	0	3	4	2
24 re (unbehandelt)	0	0	1	0

**Semiquantitative Auswertung der Flurochromensequenzanalyse
(zu 3.1.1.2, ventrale Kortikalis gemäß Klassifikationssystem I)**

Gruppe 1 (Opferung nach 1 Woche)

Tetrazyklin prä-ESWT

Calcein-Grün 1 Woche post-ESWT

Schnittnr.	Tetrazyklin	Calcein-Grün
14li (unbehandelt)	0	0
14 re (behandelt)	1	1
17 li (unbehandelt)	0	0
17 re (behandelt)	1	2
21 li (behandelt)	1	2
21 re (unbehandelt)	0	0
27 li (behandelt)	1	1
27 re (unbehandelt)	0	1

Gruppe 2 (Opferung nach 3 Wochen)

Tetrazyklin prä-ESWT

Calcein-Grün 1 Woche post-ESWT

Alizarin-Rot 3 Wochen post-ESWT

Schnittnr.	Tetrazyklin	Calcein-Grün	Alizarin-Rot
10 li (behandelt)	1	2	1
10 re (unbehandelt)	0	0	0
19 li (behandelt)	0	2	2
19 re (unbehandelt)	0	0	0
23 li (unbehandelt)	0	0	0
23 re (behandelt)	0	2	2
25 li (unbehandelt)	0	0	0
25 re (behandelt)	1	2	2

Gruppe 3 (Opferung nach 5 Wochen)

Tetrazyklin prä-ESWT

Calcein-Grün 1 Woche post-ESWT

Alizarin-Rot 3 Wochen post-ESWT

Calcein-Blau 5 Wochen post-ESWT

Schnittnr.	Tetrazklin	Calcein-Grün	Alizarin-Rot	Calcein-Blau
26 li (behandelt)	0	1	2	2
26 re (unbehandelt)	0	0	0	0
22 li (unbehandelt)	0	1	1	0
22 re (behandelt)	0	1	2	2
20 li (unbehandelt)	0	0	0	0
20 re (behandelt)	0	1	2	2
29 li (unbehandelt)	0	0	0	1
29 re (behandelt)	0	2	2	2
24 li (behandelt)	0	1	2	2
24 re (unbehandelt)	0	0	1	0

**Semiquantitative Auswertung der Flurochromensequenzanalyse
(zu 3.1.1.2, dorsale Kortikalis gemäß Klassifikationssystem I)****Gruppe 1 (Opferung nach 1 Woche)**

Tetrazyklin prä-ESWT

Calcein-Grün 1 Woche post-ESWT

Schnittnr.	Tetrazyklin	Calcein-Grün
14li (unbehandelt)	0	0
14 re (behandelt)	0	0
17 li (unbehandelt)	0	0
17 re (behandelt)	0	0
21 li (behandelt)	0	2
21 re (unbehandelt)	0	0
27 li (behandelt)	0	0
27 re (unbehandelt)	0	0

Gruppe 2 (Opferung nach 3 Wochen)

Tetrazyklin prä-ESWT

Calcein-Grün 1 Woche post-ESWT

Alizarin-Rot 3 Wochen post-ESWT

Schnittnr.	Tetrazklin	Calcein-Grün	Alizarin-Rot
10 li (behandelt)	0	0	0
10 re (unbehandelt)	0	0	0
19 li (behandelt)	0	0	0
19 re (unbehandelt)	0	0	0
23 li (unbehandelt)	0	0	0
23 re (behandelt)	0	2	2
25 li (unbehandelt)	0	0	0
25 re (behandelt)	0	2	2

Gruppe 3 (Opferung nach 5 Wochen)

Tetrazyklin prä-ESWT

Calcein-Grün 1 Woche post-ESWT

Alizarin-Rot 3 Wochen post-ESWT

Calcein-Blau 5 Wochen post-ESWT

Schnittnr.	Tetrazklin	Calcein-Grün	Alizarin-Rot	Calcein-Blau
26 li (behandelt)	0	1	2	0
26 re (unbehandelt)	0	0	0	0
22 li (unbehandelt)	0	0	0	0
22 re (behandelt)	0	0	0	0
20 li (unbehandelt)	0	0	0	0
20 re (behandelt)	0	1	2	0
29 li (unbehandelt)	0	0	0	0
29 re (behandelt)	0	2	2	0
24 li (behandelt)	0	1	2	0
24 re (unbehandelt)	0	0	0	0

10. Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name	Tobias Maximilian Gloeck
Geburtsdatum	11. September 1980
Geburtsort	Bamberg
Familienstand	ledig
Nationalität	Deutsch
Eltern	Christian und Martina Gloeck, Physiotherapeuten

Schul- und Berufsausbildung

09/1991 – 06/2000	Staffelsee-Gymnasium Murnau
06/2000	Allgemeine Hochschulreife
11/2000 – 09/2001	Zivildienst BRK Bad Tölz-Wolfratshausen, Bereich Rettungsdienst
10/2001 – 09/2003	Studium der Humanmedizin im vorklinischen Abschnitt an der LMU München
09/2003	Ärztliche Vorprüfung
10/2003 – 11/2007	Studium der Humanmedizin im klinischen Abschnitt an der TU München
04/2004 – 11/2007	Stipendiat der Hanns-Seidel-Stiftung e.V.
08/2006 – 12/2006	Aufenthalt am Weill Medical College der Cornell University und am Memorial Sloan Kettering Cancer Center in New York City/USA als Austauschstudent der TU München
11/2007	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Approbation als Arzt
seit 02/2008	Assistenzarzt an der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der TU München

11. Danksagung

Danken möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. R. Gradinger (Direktor der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, Ärztlicher Direktor des Klinikums rechts der Isar), der es mir ermöglichte, die vorliegende Dissertation an seiner Klinik durchzuführen.

Im Besonderen möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Hans Gollwitzer für die ausgezeichnete Betreuung und fachkundige Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Für die Einweisung und die Unterstützung bei den histopathologischen Arbeiten gilt mein Dank Herrn Dr. med. R. Langer und Frau Dr. med. S. Kerschbaumer.

Für die tatkräftige Hilfe während der Tierversuche danke ich Frau Dr. med. vet. M. Rößner.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie für die Unterstützung während der Zeit der Erstellung dieser Doktorarbeit und meines Medizinstudiums.

Tobias Gloeck