

Aus der  
Anatomischen Anstalt  
Institut der Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Christoph Schmitz

**Induktion von Biomineralisierung durch radiale Stoßwellentherapie  
am Tiermodell (*Dreissena polymorpha*)**

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

vorgelegt von  
Lukas Meindlhumer

aus  
Grieskirchen, Österreich

Jahr  
2025

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Schmitz  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Joachim Heinrich

Mitbetreuung durch die Dr. Katharina Sternecker  
promovierte Mitarbeiterin:  
Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2025

# Inhalt

<b>Abkürzungen</b> .....	6
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	7
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	8
<b>Zusammenfassung</b> .....	10
Hintergrund.....	10
Methoden .....	10
Ergebnisse .....	10
Fazit.....	10
<b>Abstract</b> .....	12
Background .....	12
Results.....	12
Conclusion.....	12
<b>Einleitung</b> .....	14
Die Stoßwelle .....	14
Erzeugungsprinzipien von Stoßwellen .....	14
Charakteristika einer Stoßwelle .....	15
Radiale und fokussierte Stoßwelle.....	17
Anwendungsgebiete .....	19
Pseudarthrosen .....	21
Behandlung von Pseudarthrosen.....	23
Ausbreitung von extrakorporalen Stoßwellen im Gewebe .....	23
Effekte auf biologisches Gewebe .....	25
Vorteile der Stoßwellentherapie .....	26
Nebenwirkungen.....	27
Kontraindikationen .....	27
Dreissena polymorpha.....	28
Muschelschale.....	29
Periostrakum.....	29
Ostrakum.....	30
Hypostrakum.....	30
Mineralisierung.....	31
Kalzifizierung .....	31
Schalenumbau und Reparatur .....	32

Muschel als Modellorganismus .....	33
Knochenwachstum und -umbau beim Menschen.....	35
Osteoblasten.....	35
Osteozyten.....	36
Osteoklasten .....	36
Knochenstoffwechsel.....	36
Mechanosensoren .....	37
Gemeinsamkeiten von Muschelschale und Knochen .....	37
Unterschiede von Muschelschalen und Knochen.....	38
<b>Fragestellung .....</b>	<b>39</b>
<b>Methoden .....</b>	<b>40</b>
Versuchsablauf.....	41
Versuchsaufbau .....	42
Weiterer Versuchsablauf .....	44
Fluoreszenzmikroskopische Messungen.....	49
Statistische Auswertung .....	52
<b>Ergebnisse.....</b>	<b>53</b>
<b>Diskussion.....</b>	<b>58</b>
Limitierungen .....	65
Fazit .....	67
Literaturverzeichnis.....	68
<b>Danksagung .....</b>	<b>82</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>83</b>
<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>84</b>



## Abkürzungen

BMP	Bone morphogenic protein
dB	Dezibel
ESW	extrakorporale Stoßwelle
fESW	fokussierte extrakorporale Stoßwelle
rESW	radiale extrakorporale Stoßwelle
ESWT	extrakorporale Stoßwellentherapie
rESWT	radiale extrakorporale Stoßwellentherapie
fESWT	fokussierte extrakorporale Stoßwellentherapie
EFD	Energieflussdichte
Hz	Hertz
l	Liter
ml	Milliliter
min	Minute
µm	Mikrometer
MPa	Megapascal
ns	Nanosekunde

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Druckkurvenprofile fokussierter und radialer Stoßwellen sowie Visualisierung von durch fokussierte und radiale extrakorporale Stoßwellengeräte induzierte Kavitation	16
Abbildung 2	Ausbreitung von Stoßwellen.	17
Abbildung 3	Schematische Darstellung der Schichten von Muschelschalen.	28
Abbildung 4	Versuchsaufbau dieser Arbeit.	41
Abbildung 5	Schematische Detailansicht des Versuchsaufbaus dieser Arbeit	42
Abbildung 6	Schemazeichnung einer Glasschale mit Calcein-Grün-Lösung zur Inkubation auf einem Rüttler.	44
Abbildung 7	Exemplarisches analoges Röntgenbild von Muscheln zur Detektion von Schäden an der Schale. Die Beschriftung entspricht der internen Registrierung der Tiere im Labor des Lehrstuhls II der Anatomischen Anstalt der LMU München.	45
Abbildung 8	Lage des Schnitts innerhalb einer Schalenhälfte; Perspektive auf die Schalenhälfte von der Seite.	47
Abbildung 9	Schematische Darstellung der Messstellen an einer Muschelschale.	48
Abbildung 10	Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von linken Muschelschalen-Hälften nach Exposition mit rESWs mit unterschiedlicher Energie (bzw. unterschiedlicher Einstellung des verwendeten rESWT-Geräts).	50

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Evidenzlevel der exemplarischen Anwendungsgebiete entsprechend der ISMST.	20
Tabelle 2	Nummern der Tiere, die in der vorliegenden Arbeit behandelt, aufgearbeitet und ausgewertet wurden	39
Tabelle 3	Ermittelte Fluoreszenzsignale (Rohdaten) aller in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tiere	52
Tabelle 4	Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Fluoreszenzsignale für die einzelnen Intensitätsgruppen, Messstellen und Schalenhälften.	55
Tabelle 5	Ergebnisse der statistischen Auswertung der in Tabelle 4 gezeigten Ergebnisse	56
Tabelle 6	gepoolten Rohdaten die Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Fluoreszenzsignale	60
Tabelle 7	Ergebnisse der statistischen Auswertung der in Tabelle 6 gezeigten Ergebnisse	61



# Zusammenfassung

## Hintergrund

Die extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWT) stellt in der Medizin ein etabliertes, nichtinvasives Verfahren mit vielen Einsatzmöglichkeiten dar, insbesondere bei muskuloskelettalen Krankheitsbildern. In Bezug auf fokussierte extrakorporale Stoßwellen (fESWs) wurde bereits am Tiermodell der Zebramuschel (*Dreissena polymorpha*) gezeigt, dass durch die Anwendung dieser eine Biomineralisierung in der Schale induziert werden kann und die erzielte Wirkung nicht nur auf das direkt exponierte, kalzifizierte Gewebe begrenzt ist. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, zu zeigen, dass dies auch mit radialen extrakorporalen Stoßwellen (rESWs) möglich ist, um Hinweise auf eine Wirksamkeit in der klinischen Anwendung der radialen ESWT (rESWT) z.B. bei der Behandlung von Pseudarthrosen zu erlangen.

## Methoden

Zebramuscheln wurden an der linken Schalenhälfte mit je 1000 rESWs unterschiedlicher Intensitäten (2,0 bis 4,0 bar Arbeitsdruck des verwendeten rESWT Geräts) behandelt und anschließend in eine Calcein-grünhaltige Lösung gegeben, um eine Calciumeinlagerung in der Schale zu kennzeichnen. Dies entspricht der Induktion einer Biomineralisierung. Danach wurden histologische Schnitte der beiden Schalenhälften angefertigt, an denen anschließend quantitative Messungen des Fluoreszenzsignals der Schale an jeweils 4 gleichbleibenden Stellen pro Schnitt unter dem Mikroskop durchgeführt und ausgewertet wurden.

## Ergebnisse

Statistisch signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) der Exposition mit rESWs konnten mittels generalisierter linearer Modellanalyse sowohl hinsichtlich Seite (exponiert vs. nicht exponiert), Region (direkt am Applikator vs. weiter davon entfernt) und Stärke der rESWs im Sinne einer gesteigerten Fluoreszenz durch Calciumeinlagerung in die Schale gezeigt werden. Zusätzlich zeigten sich auch statistisch signifikante Zusammenhänge in der kombinierten Auswertung von Energie x Region ( $p < 0,001$ ), und Energie x Seite x Region ( $p = 0,005$ ).

## Fazit

Ähnlich der Exposition mit fESWs konnte auch durch Exposition mit rESWs im untersuchten Tiermodell eine Biomineralisierung ausgelöst werden. Diese war nicht unmittelbar auf die

direkt exponierte Region der Schale begrenzt. Zusätzlich lieferte die Studie Hinweise, dass eine gesteigerte Energiedichte der applizierten rESWs nicht unbedingt mit vermehrter Biomineralisierung einherging, was evtl. auf Sättigungseffekte hindeutet.

## Abstract

### Background

Extracorporeal shock wave therapy (ESWT) is an established, non-invasive procedure in medicine with many possible applications, especially in musculoskeletal conditions. With regard to focused extracorporeal shock waves (fESWs), it has already been shown in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) as animal model that the application of fESWs can induce biomineralization in the shell, and that the effect achieved is not only limited to the directly exposed, calcified tissue. The aim of this study was to show that this is also possible with radial extracorporeal shock waves (rESWs) in order to obtain evidence of effectiveness in the clinical application of radial ESWT (rESWT), e.g. in the treatment of pseudoarthroses.

### Methods

Zebra mussels were treated on the left half of the shell with 1000 rESWs of different intensities (2.0 to 4.0 bar working pressure of the rESWT device used) and then placed in a solution containing calcein green to mark calcium deposition in the shell. This corresponds to the induction of biomineralization. Histological sections of the two halves of the shell were then prepared, on which quantitative measurements of the fluorescence signal of the shell were subsequently carried out and evaluated under the microscope at four constant locations per section.

### Results

Statistically significant results ( $p < 0.05$ ) of exposure to rESWs could be shown using generalized linear model analysis both with regard to side (exposed vs. not exposed), region (directly at the applicator vs. further away) and strength of the rESWs in the sense of increased fluorescence due to calcium deposition in the shell. In addition, statistically significant correlations were also found in the combined evaluation of energy x region ( $p < 0.001$ ) and energy x side x region ( $p = 0.005$ ).

### Conclusion

Similar to the exposure to fESWs, exposure to rESWs also triggered biomineralization in the animal model studied. The effect was not limited to the directly exposed region of the shell. In addition, the study provided evidence that an increased energy density of the applied rESWs

was not necessarily associated with increased biomineralization, which may indicate saturation effects.

## Einleitung

### Die Stoßwelle

Stoßwellen sind einzelne, transiente Druckwellen mit hoher Amplitude, die sich dreidimensional in Medien ausbreiten und somit Teile der Materie oder nur einzelne Atome in Schwingung versetzen. Ultraschall hingegen besteht aus einer kontinuierlichen Oszillation (Novak, 2015). Bei der Stoßwelle erfolgt der Anstieg des Drucks sehr schnell (< 10ns), ferner erfolgt nach einer positiven Phase des Druckes anschließend eine negative Druckphase (Folberth et al., 1992).

Während dieser Phase des Unterdrucks kann es dann zur Bildung von Kavitationsblasen kommen (Chitnis & Cleveland, 2006; Csaszar et al., 2015). Dies sind Hohlräume, die mit gesättigtem Dampf gefüllt sind und danach in einer Phase des positiven Drucks aufgrund der Oberflächenspannung kollabieren. Hierbei kommt es zu einer starken Energiefreisetzung, was wiederum diverse Effekte auf das umliegende Gewebe haben kann, wie etwa Hämorrhagien und lokale Ödeme (Debus et al., 1991; Jenne, 2001).

Die physikalischen Parameter und Eigenschaften von Stoßwellen basieren auf den Vorgaben der International Electrotechnical Commission (IEC) und den Arbeiten der Shock Wave Therapy Consensus Group. Diese beiden Parteien definieren, welche physikalischen Parameter in der Beschreibung von Stoßwellen verwendet werden und tragen daher zur größtmöglichen Transparenz für den Anwender bei. Dies sind beispielsweise Werte wie der Spitzendruck, Gesamtenergie oder die Pulsfrequenz (Fuente et al., 2015). Dabei werden jedoch keine Aussagen über die medizinische Relevanz und die entstehenden biologischen Effekte gemacht (Ueberle, 1998).

### Erzeugungsprinzipien von Stoßwellen

Stoßwellen können mittels vier verschiedener Prinzipien erzeugt werden (elektrohydraulisch, elektromagnetisch, piezoelektrisch und ballistisch) (Schmitz et al., 2015).

- 1) Beim elektrohydraulischen Prinzip kommt es durch eine Funkenentladung einer Elektrode in Wasser zu einer Erhitzung, wodurch Plasmabläschen generiert werden. Das umgebende Wasser wird dadurch explosionsartig komprimiert. Dies wiederum resultiert in einer Druckwelle (Stoßwelle), die sich initial nach allen Richtungen sphärisch ausbreitet, mittels eines Spiegels jedoch in einem Brennpunkt gebündelt wird. Nachteilig ist hierbei, dass die Stoßwellen einer Schwankung in ihrer Energie und Form unterliegen, was jedoch klinisch

irrelevant ist (Sommerfeld und Müller, 1988).

- 2) Beim elektromagnetischen Prinzip werden Wirbelströme mit einer Flachspule in einer Folie aus Kupfer ausgelöst. Gemäß des Lorenz-Effekts kommt es dann zu einer impulsartigen Auslenkung der Folie, die wiederum das umgebende Wasser auslenkt, was zu einer Stoßwellengenerierung führt. Durch eine optische Linse kann diese dann gebündelt werden (Wilbert et al., 1987).
- 3) Beim piezoelektrischen Prinzip wird Spannung an einer Schale, die mit Piezokristallen ausgekleidet und mit Wasser gefüllt ist, angelegt. Dadurch werden Druckwellen durch Änderung der 3D-Konformation der piezoelektrischen Kristalle erzeugt, die anschließen gebündelt werden (Riedlinger et al., 1987; Tavakkoli et al., 1997).
- 4) Beim ballistischen Prinzip wird ein Projektil, das sich in einem mit Luft gefülltem Lauf befindet, stark beschleunigt und trifft dann auf einen Applikator (üblicherweise aus Metall), welcher den Impuls an das gekoppelte Medium weitergibt. Dies ähnelt entfernt dem Prinzip eines Presslufthammers (Pang und Goldsmith, 1992). Dessen Spitze stellt dann den Ausgangspunkt einer radialen Stoßwelle dar (Cleveland et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde das ballistische Prinzip verwendet. Hinsichtlich der klinischen Resultate scheint es aber irrelevant zu sein, mit welcher der genannten Methoden die Stoßwellen erzeugt werden – zumindest solange sichergestellt ist, dass mit den verwendeten Stoßwellen das Zielgewebe mit ausreichender Stoßwellenenergie erreicht werden kann (Schmitz et al., 2015).

### Charakteristika einer Stoßwelle

Um die Eigenschaften von Stoßwellen zu beschreiben, bedarf es verschiedener Parameter (vgl. Gerdesmeyer et al., 2002):

- Der Positive Spitzendruck ( $P^+$ ) ist definiert durch die Differenz zwischen dem maximalen positiven Spitzendruck und dem Umgebungsdruck, und kann je nach verwendeten Geräten Werte von 5-120 Megapascal (Mpa) erreichen.
- Der Negative Spitzendruck ( $P^-$ ) ist definiert als der maximal negative Druck in der zweiten Phase der Stoßwelle und erreicht (in Bezug auf seinen absoluten Wert) Werte im Bereich zwischen 10%- 20% von  $P^+$ .

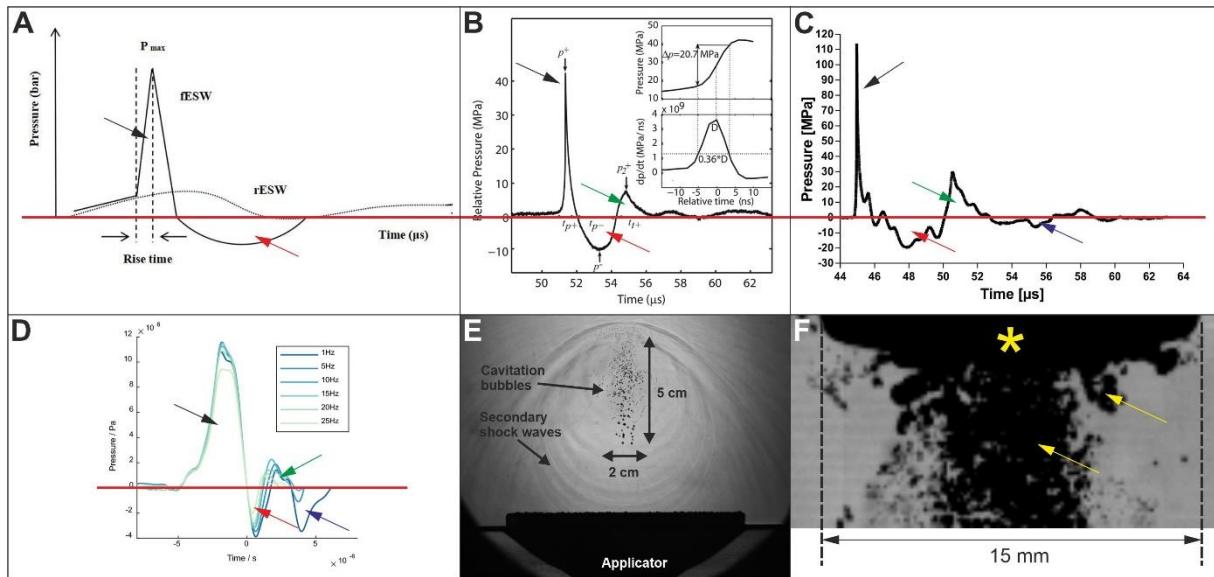
- Die Anstiegszeit  $T(r)$  wird als Intervall angegeben, zwischen dem der Druck der Welle von 10% zum Erreichen von 90% von  $P^+$  benötigt, und ist abhängig von den verwendeten Geräten. Die Dauer reicht von einigen Nanosekunden bis zu einer oder wenigen Mikrosekunden.
- Die Impulsbreite ( $Tw$ ) wird als Zeitintervall vom erstmaligen Erreichen des 50%-Werts von  $P^+$  bis zum exponentiellen Abfall des Drucks in der ersten Phase auf Werte von < 50% von  $P^+$  definiert. Bei fESWT-Geräten reichen die Werte dabei von 200-500 ns; bei rESWT-Geräten liegen diese Werte höher. Der Ausdruck des „full-width-half-maximums“ (FWHM) wird dabei als Synonym verwendet. Dieser Wert hat direkten Einfluss auf die Energieflussdichte von Stoßwellen.

Alle genannten Werte hängen stark von der verwendeten Quelle und den jeweils verwendeten Intensitätseinstellungen ab.

Hinzu kommt der sogenannte 5 mm-Fokus; dieser bezieht sich auf die räumliche Ausdehnung bezogen auf die Längsachse der Stoßwellenausbreitung.

Die Energieflussdichte ist jene Energie, die über die Zeit innerhalb von einer Fläche von  $1 \text{ mm}^2$  wirkt. Einheit ist hierfür Millijoule pro Quadratmillimeter ( $\text{mJ/mm}^2$ ). Der Zeitpunkt hierfür wird jeweils mit Über- sowie Unterschreiten eines Zehntel des positiven Druckmaximums festgelegt. Je nachdem worauf die Berechnung bezogen wird (-6dB-Fokus, 5-Mpa-Fokus oder 5 mm-Fokus) können verschiedene Energieflussdichten berechnet werden (Gerdesmeyer et al., 2002).

Verschiedene Druckkurvenprofile von klinisch verwendeten Stoßwellen sind schematisch in Abb. 1 veranschaulicht.



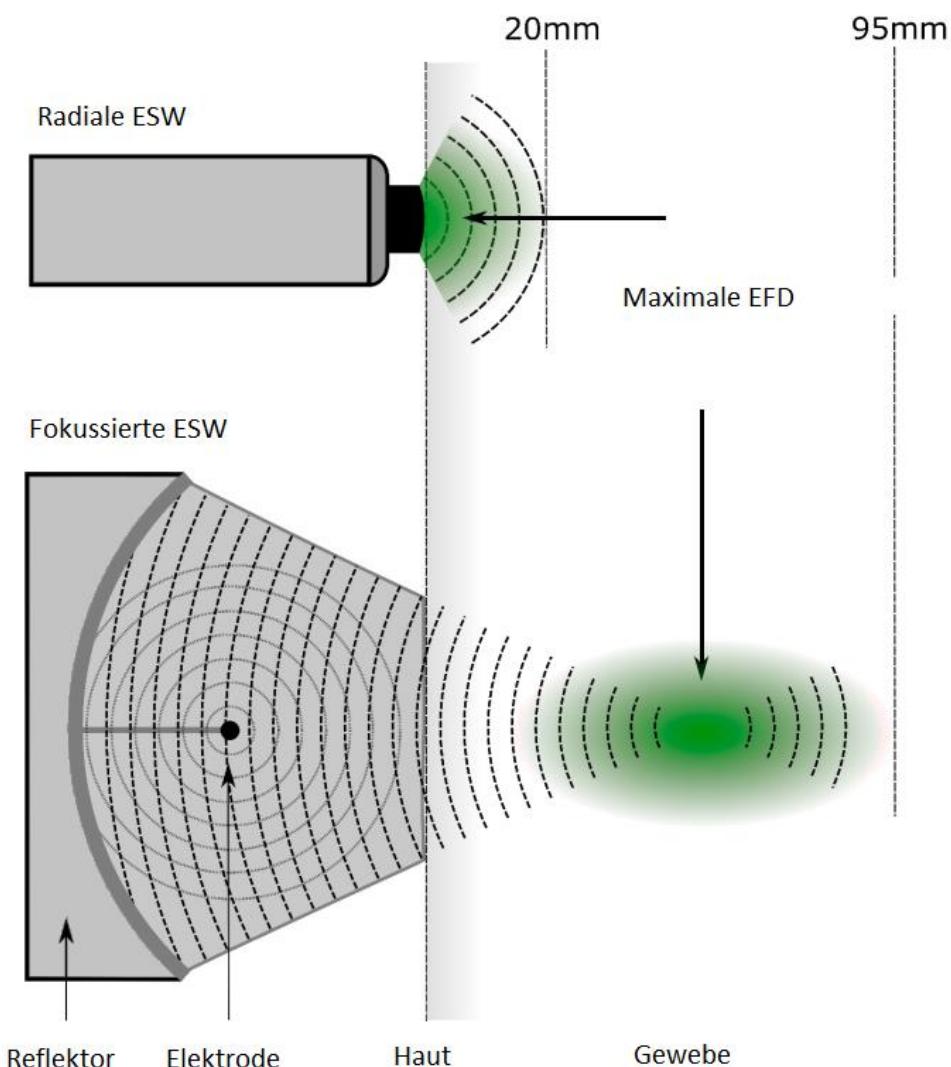
**Abbildung 1:** Druckkurvenprofile fokussierter und radialer Stoßwellen sowie Visualisierung von durch fokussierte und radiale extrakorporale Stoßwellengeräte induzierte Kavitation. (A) Schematische Darstellung in Guo et al. (2022); die Darstellung ist sowohl in Bezug auf fokussierte extrakorporale Stoßwellen (fESWs) als auch in Bezug auf radiale extrakorporale Stoßwellen (rESWs) nicht korrekt (Details in Jokinen et al., 2023). (B) Messung von Druckkurvenprofilen von fESWs, die mit dem Duolith SD1 (Storz Medical, Tägerwillen, Schweiz) generiert wurden (publiziert in Perez et al., 2013). (C) Messung von Druckkurvenprofilen von fESWs, die mit dem PiezoClast (Electro Medical Systems (EMS), Nyon, Schweiz) generiert wurden (publiziert in Sternecker et al., 2018). (D) Messung von Druckkurvenprofilen von rESWs, die mit dem Swiss DolorClast (EMS) generiert wurden (publiziert in Reinhardt et al., 2022). (E) Mit dem PiezoClast (EMS) generiertes Kavitationsfeld (publiziert in Schmitz et al., 2013). (F) Mit dem Swiss DolorClast (EMS) generiertes Kavitationsfeld (publiziert in Csaszar et al., 2015). Die Abbildung wurde der Publikation Jokinen et al. (2023) entnommen.

## Radiale und fokussierte Stoßwelle

Die Unterschiede zwischen radialen und fokussierten Stoßwellen sind bedingt durch ihre physikalischen Eigenschaften und technischen Prinzipien. Fokussierte Stoßwellen können durch das elektrohydraulische, das elektromagnetische und das piezoelektrische Prinzip generiert werden. Anschließend erfolgt eine Fokussierung bzw. Bündelung durch Reflexion oder Brechung an Linsen (Moya et al., 2018).

Bei fESWs kann der maximale Druck ( $P^+$ ) in der gewünschten Tiefe im Gewebe erzeugt werden. Damit können fESWs bevorzugt in tieferen Gewebsschichten eine größere Energiedichte aufweisen und eine lokale Wirkung am gewünschten Ziel, beispielsweise der zu behandelnden Pseudarthrose, erzielen (Maier et al., 2002).

Durch den ballistischen Erzeugungsmechanismus von rESWs breiten sich diese, sofern die Energie nicht weiter gebündelt wird, radial beziehungsweise sphärisch von der Applikatorspitze ausgehend aus. Auf eben diese trifft zuvor das Projektil. Im nächsten Medium, zum Beispiel dem Weichteilgewebe der zu behandelnden Person, kommt es dann zur radialen Ausbreitung der Stoßwelle. Daher stammt auch die Bezeichnung „radial“. Die Energieflussdichte und der Druck sind direkt an der Applikatorspitze maximal und nehmen dann mit zunehmender Entfernung ab. Gleiches gilt auch hinter der Fokuszone bei der fokussierten Stoßwelle (vgl. Abb. 2, modifiziert nach ISMST 2018)



*Abbildung 2: Ausbreitung von Stoßwellen.*

## Anwendungsgebiete

Erste Erkenntnisse über die Wirkung von extrakorporalen Stoßwellen auf biologisches Gewebe stammen aus der Zeit um den zweiten Weltkrieg. Damals wurde bemerkt, dass Personen mitunter tödliche Lungenschäden durch detonierende Bomben davontrugen, falls sich die Menschen im Umfeld dieser zum Zeitpunkt der Detonation befunden hatten, obwohl keine äußerlichen Verletzungen ersichtlich waren (Osborn, 1941; Zuckerman, 1941).

Die erstmalige klinische Anwendung der ESWT erfolgte 1980 in München zur Zertrümmerung von Harnleiterkonkrementen durch den deutschen Chirurgen und Urologen Christian Chaussy (Chaussy et al., 1982). Diese Form der Verwendung extrakorporaler Stoßwellen wird in der Literatur üblicherweise als „Extrakorporale Stoßwellenlithotripsie“ (ESWL) bezeichnet und in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

Die vielschichtigen Anwendungsbereiche der ESWT als nicht invasive Behandlungsmethode wurden im Laufe der Zeit stetig erweitert und erstrecken sich von Wundheilungsstörungen, über Pseudoarthrosen, Endoprothetik, Osteochondrosen, verschiedensten Tendinopathien, bis hin zu kalzifizierenden Tendinitiden alleine im Gebiet der Orthopädie (Haupt, 1997; Schmitz et al., 2015). Auf Pseudarthrosen soll im weiteren Verlauf noch explizit eingegangen werden.

Vor allem für die Ziele dieser Studie ist von Interesse, dass sowohl bei der Therapie der Osteoporose als auch der Osteopenie eine positive Wirkung der ESWT nachgewiesen werden konnte (Shi et al., 2017). Diese Effekte beruhen zum einen auf einer Aktivierung von mesenchymalen Stammzellen durch ESWT, welche sich im Verlauf zu Osteoblasten differenzieren (Wang et al., 2002a). Zum anderen kommt es durch ESWT zu einer gesteigerten Ausschüttung von verschiedenen Wachstumsfaktoren (Link et al., 2013). Beim Anwendungsgebiet der Osteoporose könnte auch eine punktuelle Therapie an Prädilektionsstellen für Frakturen erfolgen, um diesen präventiv entgegenzuwirken (van der Jagt et al., 2009).

Darüber hinaus erscheinen auch Wundheilungsstörungen im Weichteilgewebe als Indikationen für Stoßwellentherapie (Dolibog et al., 2018). In der Urologie stellt die ESWT neben der Zertrümmerung von Konkrementen im Harntrakt auch in der Behandlung von erektiler Dysfunktion ein mittlerweile etabliertes Verfahren dar (Desai et al., 2024). Zusätzlich wird die ESWT auch im Rahmen von angiographischen Interventionen, zum Beispiel bei

Koronarangiographien oder Interventionen zur Behandlung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) angewendet (Brinton et al., 2019; Adams et al., 2022). Ferner berichten Studien auch über gute Ergebnisse bei der Anwendung von kardialer ESWT zur Behandlung einer koronaren Herzkrankung anstelle von angiographischen Eingriffen oder Bypassoperationen (Takakuwa et al., 2018). Eine aktuelle Übersichtsarbeit berichtete auch über analgetische Effekte bei myofaszialem Schmerzsyndrom (MSF). Hier kann die ESWT dazu beitragen, den Analgetikaverbrauch bei Patienten zu senken (Paoletta et al., 2022).

Hinzu kommen noch Anwendungsgebiete in anderen Fachbereichen wie etwa der Neurologie zur Behandlung von Spastik (Jia et al., 2020).

Die Internationale Gesellschaft für medizinische Stoßwellenbehandlung (ISMST) hat in einem *consensus statement* einen Überblick über die Vielzahl der Anwendungsgebiete der ESWT und deren Evidenzgrade vorgelegt (Eid, 2016); repräsentative Beispiele daraus sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Hierzu muss jedoch angemerkt werden, dass die von der ISMST genannten Anwendungsgebiete keinerlei juristische und praktische Relevanz haben, da für die Festlegung von Anwendungsgebieten (Indikationen) bei der Verwendung eines Medizinprodukts gemäß international geltendem Recht ausschließlich der Hersteller des entsprechenden Medizinprodukts zuständig und verantwortlich ist. So ist für das in der vorliegenden Arbeit verwendete rESWT-Gerät die Behandlung von Spastizität eine zugelassene Indikation mit hoher klinischer und experimenteller Evidenz (Vidal et al., 2011; Kenmoku et al., 2012; Wang et al., 2016; Vidal et al., 2020; Kenmoku et al., 2021); die Einschätzung der ISMST als "Ausnahme- bzw. Expertenindikation" trifft definitiv nicht zu. Die Liste der Anwendungsgebiete (Indikationen) findet sich immer in den *Instructions for Use* eines Medizinprodukts; diese sind jedoch alleine (d.h., ohne das Medizinprodukt selber) meistens nicht verfügbar. Somit kann letztlich keine generelle Aussage über Anwendungsgebiete (Indikationen) von ESWT-Geräten getroffen werden.

**Tabelle 1:** Evidenzlevel der exemplarischen Anwendungsgebiete entsprechend der ISMST.

Evidenzlevel	Übergruppen	Beispiele
Anerkannte Standardindikationen	Chronische Tendinopathien Knöcherne Pathologien Hautläsionen	Tendinosis calcarea, Epicondylitis lateralis Pseudarthrosen, Stressfrakturen Wundheilungsstörungen
Häufige, klinisch getestete Indikationen	Tendinopathien Knöcherne Pathologien Muskuläre Probleme Hauterkrankungen	Epicondylitis medialis, Pes anserinus Syndrom M. Osgood Schlatter, Shin Splints Zerrungen Cellulite, Hautulcera
Ausnahme- bzw. Expertenindikationen	Muskuloskelettale Indikationen Neurologische Krankheitsbilder Urologische Beschwerden	M. Dupuytren, Tendovaginitis Stenosans de Quervain Spastik, Karpaltunnelsyndrom Erektile Dysfunktion Lymphödem
Experimentelle Indikationen		CRPS, periphere Nervenläsionen

## Pseudarthrosen

Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit soll das Erlangen von Erkenntnissen über den Einsatz von rESWs am Tiermodell (Zebramuscheln) sein. Dies soll dazu dienen, dass diese

Erkenntnisse später in Behandlung von Pseudarthrosen am Menschen, im Englischen meist als „fracture non-unions“ bezeichnet, Anwendung finden.

Eine Pseudarthrose wird definiert als das Ausbleiben der knöchernen Durchbauung nach einer Fraktur oder auch Osteosynthese nach einem Zeitraum von sechs Monaten (Tscherne, 1996; Bachmann et al., 1999). Histologisch bestehen sie aus bindegewebigen und knorpelhaltigen Anteilen mit teilweise atrophen Veränderungen (Dickson et al., 2008; Wu et al., 2021b). In Pseudarthrosen konnte ein reduziertes Vorkommen von Osteoblasten gezeigt werden (Qu & Von Schroeder, 2008).

Eine Vorstufe stellt die verzögerte Knochenheilung (delayed non-union) dar. Dieser Begriff trifft zu, wenn nach drei bis vier Monaten die Frakturheilung noch nicht abgeschlossen ist (Tscherne, 1996).

Dieses zeitliche Kriterium stellt eine mögliche Definition dar. Es herrscht jedoch teilweise Uneinigkeit in der Literatur über die exakte Definition von fracture non-unions. Einen möglichen Lösungsansatz bietet dabei die NUSS-Klassifikation (non-union scoring system). Hierbei findet nicht nur anhand radiologischer Kriterien die Diagnosestellung statt, sondern es werden auch Punkte wie Knochenqualität, bisher erfolgte Interventionen, offene Frakturen, das umgebende Weichteilgewebe sowie die ASA-Klassifikation miteinbezogen. Somit wird auch der gesundheitliche Zustand der zu behandelnden Person selbst berücksichtigt. Dieses Scoring System gibt anschließend Hilfestellung hinsichtlich der optimalen Versorgung der Pseudarthrose, wobei bei einer niedrigen Punktzahl eine Standardbehandlung mit beispielsweise Debridement und bei einer sehr hohen Punktzahl eine Amputation als probate Maßnahmen empfohlen wird (Calori et al., 2008).

Im klinischen Alltag sind Pseudarthrosen von großer Bedeutung, da bei bis zu 10% aller Frakturen Heilungsstörungen vorhanden sind (Mills et al., 2016). Bei zusätzlichen Weichteildefekten ist die Anzahl nochmals deutlich höher, wobei bei offenen Frakturen mit freiliegenden Knochen bei bis zu 80% Pseudarthrosen entstehen können (Sanders et al., 1994). Gehäuft treten Pseudarthrosen an der Diaphyse auf, da hier zum einen eine kleinere Kontaktfläche vorliegt und auch die Durchblutung meist schlechter ist als im Bereich der Metaphyse. Aufgrund der höheren mechanischen Belastung sind die unteren Extremitäten zudem häufiger betroffen als andere Körperregionen (Meiners et al., 2009).

Weitere Risikofaktoren stellen unter anderem die Größe des Frakturpalts, männliches Geschlecht, Osteoporose und Diabetes mellitus (Typ 1 und Typ 2) dar (Claes et al., 2002; Zura et al., 2016).

## Behandlung von Pseudarthrosen

Herkömmliche Therapieverfahren sind meist sehr invasiv. So bedarf es oftmals einer osteosynthetischen Versorgung, gegebenenfalls Markraumaufbohrungen als auch Spongiosaanlagerungen oder, je nach Lokalisation, sogar der Versorgung mit einer Endoprothese (Weber & Cech 1973; Franzen et al., 1990; Tabsh et al., 1997). Alternativ oder zusätzlich können osteoinduktive Wachstumsfaktoren wie bone morphogenic protein 7 (BMP-7) oder Thrombozytenkonzentrate aus Eigenblut verwendet werden (Meiners et al., 2009).

## Ausbreitung von extrakorporalen Stoßwellen im Gewebe

Entsprechend der Schallgeschwindigkeit breiten sich Stoßwellen mit etwa 1500 m/s in homogenem Weichteilgewebe aus. Zur Kopplung von Stoßwellen vom Applikator an das zu behandelnde Gewebe wird in der Regel Wasser benutzt, da dieses ähnliche physikalisch-akustische Eigenschaften besitzt und somit über eine ähnliche Impedanz verfügt. Wäre diese Voraussetzung nicht gegeben, würde es bereits an der Haut zu einer starken Wirkung durch die physikalischen Phänomene von Reflexion oder Beugung kommen und nicht erst am zu behandelnden Gewebe. Dies beugt unerwünschten Wirkungen an der Haut, sowie einem Verlust an Wirkung am gewünschten Ort vor (Jocham et al., 1986; Howard & Sturtevant, 1997; Cartledge, 2001).

Bei Einführung der Stoßwellentherapie war es erforderlich, dass sich die zu behandelnde Person in einem Wasserbad befand, um dadurch eine Kopplung zu ermöglichen. Mit Aufkommen der dry-head Technologie wurde dies später obsolet. Die Ergebnisse mit dieser neueren Technologie konnte jedoch nicht an jene, welche in einem Wasserbad erzielt wurden, heranreichen (Matin & Streem, 2001; Gerber et al., 2005), wobei sich dies ausschließlich auf die ESWL bezieht.

Auf der Suche nach einem geeigneten Kopplungsmedium zeigte sich, dass beim Übergang von Luft in Wasser beinahe die gesamte Energie reflektiert wird (Pishchalnikov et al., 2006). Beim direkten Vergleich verschiedener Kopplungsmedien konnte gezeigt werden, dass die besten Ergebnisse hinsichtlich der Kopplung mit gewöhnlichem, wasserlöslichem Gel erreicht

werden. Vaseline sowie handelsübliches Ultraschallgel erwiesen sich als am schlechtesten geeignet (Cartledge et al., 2001).

Durch eine asymmetrische Dämpfung ergibt sich die charakteristische Form einer Stoßwelle mit ihrer steilen und kurzen Anstiegsphase bis zum Druckmaximum; dieses Phänomen wird Aufsteilung genannt. Das Prinzip dahinter ist, dass die verschiedenen Frequenzanteile an der Stoßwellenfront unterschiedlich stark gedämpft werden und auch in ihrer Ausbreitungsgeschwindigkeit nicht gleich sind. So ist die Schallgeschwindigkeit für höhere Frequenzen größer als für niedrige in dispersiven Medien (Everest & Pohlmann, 2021). Diese ist wiederum abhängig vom Druck und der Temperatur des Mediums, welches von den akustischen Wellen durchquert wird. Dabei wirken die ersten Anteile einer Stoßwelle erwärmend auf das Gewebe und sorgen so dafür, dass sich nachkommende Anteile schneller ausbreiten und infolgedessen die frühen Anteile sogar wieder einholen können. Dadurch kommt es zu einer progredienten asymmetrischen Deformierung, der Druckimpuls wird aufgesteilt und es bildet sich die typische Stoßwelle im Fokus. Diese Form geht dann im weiteren Verlauf im Gewebe verloren, da sich die einzelnen Anteile gemäß ihrer Frequenz und Intensität unterschiedlich im Gewebe verhalten - die Stoßwelle wird dadurch defokussiert (Staudenraus, 1995).

Ein weiterer wichtiger physikalischer Faktor ist die Impedanz, die den Schalleitungswiderstand des jeweiligen Mediums darstellt. Sie spielt vor allem beim Übertritt von einem in ein anderes Medium eine Rolle. An einer Grenzfläche zweier Medien wird die Stoßwelle gemäß den Gesetzen der Beugung und Reflexion beeinflusst und nicht die gesamte Welle fortgeleitet (Krause, 1997). Dies führt zu einer Transformation der akustischen Energie in mechanische Energie, die dann die gewünschten Effekte nach sich zieht (Granz & Köhler, 1992; Loew et al., 1995; Lokhandwalla & Sturtevant, 2000). Falls die Stoßwelle dabei auf ein Medium mit höherer Impedanz, wie zum Beispiel ein Harnwegskonkrement, trifft, so wird der Hauptanteil der akustischen Energie in dieses weitergeleitet (Ueberle, 1998). Beim folgenden Austritt daraus tritt somit der umgekehrte Fall auf und die akustische Energie wird zu einem großen Teil reflektiert. Daher kann man erklären, dass der Haupteffekt von fokussierten Stoßwellen zumindest an Kalkkonkrementen (z.B. Nierensteine) an der abgewandten Seite von der Quelle auftritt (Ueberle, 1998).

Hinzu kommt synergistisch die Wirkung der Schallbeugung. Diese bewirkt, dass Stoßwellen zum Medium der größeren Dichte hin gebeugt werden. So werden beispielsweise Stoßwellen,

die an einem Kalkdepot vorbeilaufen, auf das Medium der höheren Impedanz hingelenkt und können dort wirken. Es erfolgt daher hier eine weitere Art Fokussierung von Stoßwellen (Staudenraus, 1995).

Zusätzlich beeinflussen jegliche Störfaktoren, wie etwa Mikroverkalkungen oder Knochen zwischen dem Schallkopf und der zu behandelnden Stelle, bzw. der Stelle des gewünschten Fokus bei Verwendung von fESWs, die Wirkung von Stoßwellen. Dies hat zur Folge, dass es zu einer Abschwächung der EFD der fokussierten Stoßwelle am Zielgebiet von bis zu 50% kommen kann. Für rESWs trifft dies nicht zu (Kearney et al., 2010).

## Effekte auf biologisches Gewebe

Da Stoßwellen akustische Energie auf Gewebe übertragen, ist die Wirkung auf biologisches Gewebe letztlich physikalisch bedingt. Energie kann entsprechend dem Energieerhaltungssatz nie vernichtet, sondern lediglich zwischen verschiedenen Energieformen umgewandelt werden. Daher kommt es, bedingt durch die Impedanzunterschiede verschiedener Medien, an den Grenzflächen zum Auftreten der Wirkung, da hier diese Umwandlungen teilweise stattfinden (Loew et al., 1995; Howard und Sturtevant, 1997). Zusätzlich wirken Stoßwellen auch thermisch und chemisch. Diese weiteren Effekte sind dabei jedoch nur von untergeordneter Bedeutung. Sie sind zwar experimentell messbar, bringen jedoch keine klinische Bedeutung mit sich (Gerdesmeyer et al., 2002).

Der angenommene Wirkmechanismus war lange Zeit die Mechanotransduktion, welche auf das Kanal- und Hohlraumsystem der Knochen Scherkräfte, Druck und Zug wirken lässt (Burger & Klein-Nulend, 1999). Zusätzlich wurde angenommen, dass es durch Stoßwellen zur Entstehung von Mikrofrakturen in Knochen kommt, welche über die konsekutive Ausbildung von Hämatomen zu einer Kallusbildung am Knochen führt (Wang et al., 2004). Weitere Faktoren sind das Auftreten von Jet-Streams nach dem Kollabieren von Kavitationsblasen und die Induktion der Bildung von freien Radikalen durch ESWT (Suhr et al., 1991; Csaszar et al., 2015).

Freie Nervenenden afferenter / sensibler Nerven setzen neben Glutamat als Neurotransmitter auch Neuropeptide wie Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) und Substanz P frei (Maier et al., 2003; Takahashi et al., 2003). In einer Vielzahl an Studien wurde ein Einfluss von Substanz P auf die Pathogenese von Tendinopathien beschrieben. Dort ist Substanz P im Entzündungsprozess, der Gewebsproliferation, insbesondere auf Fibroblasten

relevant und beeinflusst auch Nozizeptoren (Ackermann et al., 1999; Fedorczyk et al., 2010; Backman et al., 2011; Carlsson et al., 2011). Ferner konnte auch ein zeitlicher Zusammenhang zwischen Schmerzepisoden, als auch der Schmerzabnahme und der Substanz P-Konzentration nach Behandlung mit fESWs beschrieben werden (Maier et al., 2003). Es wird eine Stimulation von C-Fasern als verantwortlich angesehen. Initial kommt es zum Auftreten von Schmerzen durch die Freisetzung von Substanz P und CGRP. Im weiteren Verlauf entwickelt sich die analgetische Wirkung, da keine Neuropeptide mehr freigesetzt werden. Dies kann durch eine Desensibilisierung oder auch direkte Zerstörung von Nervenfasern erklärt werden (Schelling et al., 1994; Maier et al., 2003; Takahashi et al., 2003; Hausdorf et al., 2008).

Die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie BMPs, VEGF oder auch basic fibroblast growth factor (bFGF) wird über verschiedene Kinase-Kaskaden durch die Hyperpolarisation von Zellwänden wie auch durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ausgelöst (Hofmann et al., 2008; Klonschinski et al., 2011; Sun et al., 2013; Alavi et al., 2021). In weiterer Folge werden dadurch Zellen wie Osteoblasten und Fibroblasten aktiviert, was schließlich zur Gewebsregeneration führen kann (Cheng und Wang, 2015).

### Vorteile der Stoßwellentherapie

Die Nicht-Invasivität der ESWT stellt einen klaren Vorteil dar. Für die Anwendung wird weder ein chirurgischer Eingriff mit den damit verbunden Anforderungen hinsichtlich benötigtem Material, räumlichen Gegebenheiten, Hygienebestimmungen oder Analgesie benötigt (Cacchio et al., 2009; Ko et al., 2022). Hinzu kommen noch potentielle peri- bzw. postoperative Komplikationen.

Die Anwendung der ESWT gilt auch als sehr sicher und ist mit wenigen bzw. lediglich milden Nebenwirkungen verbunden. Eine Übersichtsarbeit kam beispielsweise zu dem Schluss, dass keine schwerwiegenden Nebenwirkungen bei der Behandlung von muskuloskeletalen Krankheitsbildern berichtet wurden (Schmitz et al., 2015).

Die mit der Anwendung verbundenen Kosten sind ebenfalls oftmals deutlich geringer als ein chirurgischer Eingriff, zumal das verwendete Gerät vor allem lediglich die Anschaffungskosten mit sich bringt und über Jahre verwendet werden kann. Auch für das Gesundheitssystem bedeutet eine Reduktion von Komplikationen wie Gewebsnekrosen oder Wundheilungsstörungen potentielle Ersparnisse. Diese würden im Fall einer primären Anwendung anstatt eines chirurgischen Eingriffes gar nicht auftreten. Andererseits stellt die

ESWT auch ein probates Mittel zur Behandlung dieser dar, was ebenso einen verlängerten Krankenhausaufenthalt oder weitere notwendige Eingriffe verhindern kann (Mittermayr et al., 2011).

## Nebenwirkungen

Typische Nebenwirkungen, welche bei ESWT beim Menschen lokal auftreten können, sind Hautrötungen, Schmerzen und Hämatome, aber auch das Auftreten von Kopfschmerz oder Synkopen wurde vereinzelt beschrieben (Haake et al., 2002). Andere Autoren berichteten ferner über Hämolyse als auch Myolyse, verursacht durch die Behandlung (Kishimoto et al., 1986). Zusätzlich wurden auch Herzrhythmusstörungen im Zusammenhang mit der Anwendung von ESWT berichtet (Zanetti et al., 1999). Diese schwereren Nebenwirkungen (Kopfschmerzen, Synkopen, Hämolyse, Myolyse, Herzrhythmusstörungen traten aber nur vereinzelt auf, und nur nach Anwendung der fESWT.

Eine depressive Wirkung auf die Hämatopoese wird durch die Anwendung von Stoßwellentherapie an Knochen jedoch nicht verursacht (Wang et al., 2002a).

## Kontraindikationen

Die Internationale Gesellschaft für Stoßwellentherapie (ISMST) unterscheidet zwei Gruppen von Kontraindikationen - zum einen für rESWT und fESWT mit niedriger Intensität und zum anderen für hochenergetische fESWT.

Zu den Kontraindikationen für erstere zählen zum Beispiel maligne Tumore sowie, im Falle einer Schwangerschaft, eine Anwendung mit enger Lagebeziehung des Fetus zum Behandlungsbereich. Für hochenergetische, fokussierte Stoßwellen dürfen sich weder Lungengewebe, Epiphysen, maligne Tumore, Gehirn oder Rückenmark sowie ein Fetus im Behandlungsbereich befinden. Ferner darf auch keine schwere Koagulopathie bestehen (Eid, 2016).

Einschränkend muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die von der ISMST genannten Kontraindikationen keinerlei juristische und praktische Relevanz haben, da für die Festlegung von Kontraindikationen bei der Verwendung eines Medizinprodukts gemäß international geltendem Recht ausschließlich der Hersteller des entsprechenden Medizinprodukts zuständig und verantwortlich ist. So ist für das in der vorliegenden Arbeit verwendete rESWT-Gerät die Behandlung von Schwangeren prinzipiell eine Kontraindikation, obwohl dies gemäß den o.g. Kriterien der ISMST nicht der Fall wäre. Die Liste der

Kontraindikationen findet sich immer in den *Instructions for Use* eines Medizinprodukts; diese sind jedoch alleine (d.h., ohne das Medizinprodukt selber) meistens nicht verfügbar. Somit kann letztlich keine generelle Aussage über Kontraindikationen von ESWT-Geräten getroffen werden.

### Dreissena polymorpha

Die Zebramuschel, *Dreissena polymorpha*, ist eine Süßwassermuschel, die bereits seit hunderten Jahren in Europa endemisch ist; sie zählt aber zu den Neobiota (Brümmer et al., 2020). Dies sind Arten, die durch den Einfluss des Menschen in ein Gebiet gelangt sind, wo sie zuvor noch nicht vorhanden waren (Essl et al., 2018; Richardson et al., 2000). Die wenige Zentimeter großen Tiere kommen insbesondere in den Uferregionen von Flüssen und Seen, dem Litoral vor (Brümmer et al., 2021). Im Zuge des vermehrten Schiffsverkehrs wurde die Zebramuschel unter anderem nach Europa eingeführt und verbreitete sich hier sehr stark (Stańczykowska, 1977). So entwickelte sie sich innerhalb eines Jahrhunderts zur dominierenden Komponente im britischen Frischwassersystem. Erste Aufzeichnungen aus Deutschland stammen aus den 20er Jahren des 19. Jahrhunderts (Brümmer et al., 2021). Faktoren für die rapide Ausbreitung in lokalen Gewässern sind unter anderem der passive Transport durch die Schifffahrt über lange Strecken, der Transport im Rahmen von Überführung, beispielsweise von Sportbooten in andere Gewässer, sowie der Fischbesatz, wo die Muscheln als Beifang mittransportiert werden (Böhmer et al., 2001). Die starke Verbreitung der Zebramuschel in einheimischen Gewässern brachte auch negative Konsequenzen mit sich. So kam es unter anderem zur Suppression endemischer Muscheln wie beispielsweise der Flussmuschel (*Union tumidus*) (Böhmer et al., 2001) als auch Schäden an Wasserleitungen (Booy et al., 2017). Durch die enorme Ausbreitung der fremden Art kam es in vielen Gewässern zu fundamentalen Beeinflussungen derer, wie zum Beispiel in der Konzentration von Plankton oder Auswirkungen auf den pH-Wert, welcher teilweise um mehr als 0,5 Punkte verändert wurde (Caraco et al., 1997; Effler et al., 2004).

Als Modellorganismus erweist sich die Zebramuschel als interessant aufgrund des verbreiteten, weltweiten Vorkommens in großen Populationen und der, aufgrund ihres charakteristischen Aussehens, einfachen Identifizierbarkeit (Beggel et al., 2015). Ferner kommt hinzu, dass sie aufgrund des Vorkommens in Uferregionen leicht gesammelt werden kann (Strayer, 2009). Da es sich um eine wirbellose Spezies handelt, kann sie auch im Gegensatz zu

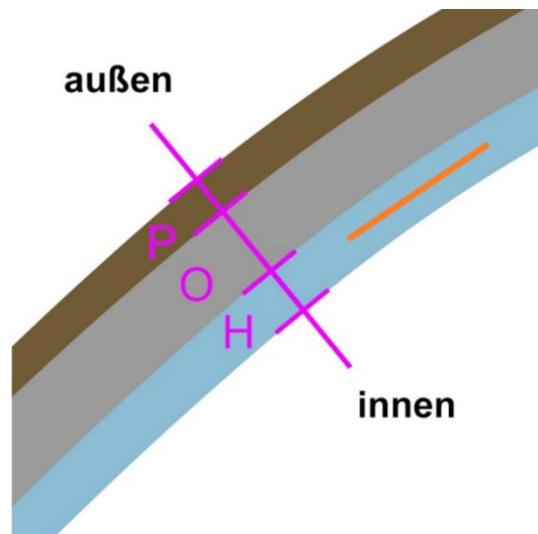
Vertebraten ohne Genehmigung in Tierversuchsstudien verwendet werden. Ein aufwendiges Genehmigungsverfahren entsprechend des Tierschutzgesetzes ist nicht nötig (Lorz & Metzger, 2019).

## Muschelschale

Um die Wirkung von Stoßwellen auf die Muschelschale zu verstehen, ist es wichtig, einen Überblick über die Muschelschale an sich als auch über deren Auf- und Umbau zu haben.

Die Schale von Muscheln besteht aus mehreren kalzifizierten Schichten und einer organischen Schicht (Marin et al., 2012). Das Grundgerüst für die mineralisierten Schichten stellt eine Matrix dar, welche vorrangig aus  $\beta$ -Chitin, einem Polysacharid, und weiteren hydrophilen, asparaginsäurehaltigen Proteinen beststeht (Lowenstam & Weiner, 1989).

Hier soll vereinfachend vor allem auf drei Schichten eingegangen werden, nämlich das Periostrakum, das Ostrakum und das Hypostrakum (vgl. Abb. 3).



*Abbildung 3: Schematische Darstellung der Schichten von Muschelschalen. Abkürzungen: P = Periostrakum, O = Ostrakum, H = Hypostrakum. Die orange Linie zeigt die Position der in der vorliegenden Arbeit vorgenommenen Fluoreszenzmessungen.*

## Periostrakum

Die äußerste Schicht der Muschelschale stellt das Periostrakum dar. Es besteht aus gegerbten, hochgradig quervernetzten Proteinen, Kohlehydraten und Lipiden (Beedham, 1958; Addadi, 2006). Seine Aufgaben sind vielschichtig. Zum einen stellt es die primäre Vorlage für die

extrazelluläre Biomineralisierung dar; es begrenzt und versiegelt aber auch den extrapallialen Raum, welcher sich zwischen dem Mantelgewebe und der Schale selbst befindet. Eigentlicher Zweck des Periostrakums ist, dass die Biomineralisierung in einem Raum stattfinden kann, welcher von der Umwelt abgegrenzt ist. Somit kann Calciumcarbonat über die Löslichkeitsgrenze hinaus angereichert werden, was für die Mineralisierung essentiell ist (Marin et al., 2012).

Eine weitere Nebenaufgabe ist beispielsweise das Ausbilden eines Schutzes gegen den Abbau durch Mikroorganismen, sowie die Zersetzung durch äußere, chemische Einflüsse (Isaji, 1993; Bers et al., 2006; Takeuchi & Endo, 2006). Die Färbung und Musterung dient auch dem Zweck der Tarnung vor Fressfeinden.

Das Periostrakum besteht während des gesamten Lebens der Muschel (Waite, 1983; Marin et al., 2012).

## Ostrakum

Unter dem Periostrakum befindet sich die Hauptschicht der Schale, das Ostrakum. Es besteht aus calciumcarbonathaltigen Kristallen, welche senkrecht zur Fläche des Ostrakums ausgerichtet sind (Marin et al., 2012). Das Ostrakum trägt zur mechanischen Stabilität als auch zu den elastischen Eigenschaften der Schale bei (Duan et al., 2023). Zusätzlich konnten in dieser Schicht hohe Konzentrationen von Mangan und Eisen nachgewiesen werden, welche sowohl für die mechanischen Eigenschaften der Schale als auch für das Wachstumsverhalten relevant sind (Mackenzie et al., 2014).

## Hypostrakum

Die innerste Schicht bildet die Perlmuttschicht, welche auch Hypostrakum genannt wird. Sie stellt die mechanisch stabilste Schicht der Schale dar (Taylor & Layman, 1972; Jackson et al., 1990). Sie ist aufgrund ihrer optischen Eigenschaften bekanntermaßen auch in der Schmuckindustrie beliebt. Zusätzlich stellt sie aufgrund des Potentials zur Knochenregenerierung (als Quelle bioaktiver organischer Moleküle) in der Medizin ein attraktives Material dar (Lopez et al., 1992; Westbroek & Marin, 1998). Sie besitzt osteoinduktive und osteoblastische Eigenschaften (Atlan et al., 1997; Rousseau et al., 2003). Das Hypostrakum besteht aus einer laminaren Mikrostruktur, welche wiederum aus polygonalen bis runden aragonitischen Platten bestehen (Carter & Clark, 1985), die durch eine

Art organischen, chitinhaltigen Zement, der sogenannten interkristallinen Matrix, dicht gepackt zusammenliegen (Marin et al., 2012).

## Mineralisierung

Für die Mineralisierung wird Calciumcarbonat benötigt, was aus dem Wasser aufgenommen oder auch von der Muschel selbst produziert werden kann (Fournié & Chétail, 1982). Es kann durch die Hämolymphe transportiert werden und wird innerhalb von Matrixvesikeln gespeichert (Anderson, 2003; Tunholi-Alves et al., 2013). Das dafür essentielle Bicarbonat kann durch die Zellen des Mantelepithels direkt vor Ort gebildet werden (Dillaman & Ford, 1982). Das benötigte Calcium wird ebenfalls durch Hämolymphe transportiert und kann bei Bedarf im Mantelepithel oder als Vesikel gespeichert werden (Mount et al., 2004). Calcium und Bicarbonat werden dann durch Transporterproteine in den extrapallialen Raum sezerniert. Zusätzlich produzieren die äußeren Epithelzellen die notwendigen Proteine und Glykoproteine, welche mittels Exozytose ebenfalls in den extrapallialen Raum abgegeben werden (Weiner & Addadi, 2011). Bei Überschreitung der entsprechenden Löslichkeitskapazität von Calcium und Phosphor kommt es zur Bildung von  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (Tricalciumphosphat). Die entstehenden Kristalle werden nun in den extrazellulären Raum freigesetzt, wo sie die Freiräume zwischen den Kollagenfibrillen füllen (Yoshiko et al., 2007).

Insgesamt ist jedoch anzumerken, dass über die Vorgänge der Biomineralisierung viele Details noch nicht geklärt sind, und weitere Studien notwendig sind, um zu einem besseren Verständnis zu gelangen (Marin et al., 2012).

Alle notwendigen Komponenten bilden dann miteinander die entsprechenden Strukturen der Schale.

## Kalzifizierung

Für den Prozess der Kalzifizierung spielen die folgenden drei Elemente eine Rolle: das Mantelgewebe inklusive dessen äußeres Epithel, das Periostrakum und die wachsende Schale selber (Marin et al., 2012). Andere Studien betonten zusätzlich die Funktion von Hämozyten im Prozess des Calciumtransports. Mount und Kollegen kamen beispielsweise zu der Hypothese, dass Granulozyten Calcium-Kristalle ( $\text{CaCO}_3$ ) an die Stelle der Schalenreparatur transportieren und freisetzen (Mount et al., 2004).

Das Mantelorgan besteht aus mehreren Schichten, dem inneren Epithel, der Grenzfläche und dem äußeren kalzifizierenden Epithel, die beide einschichtige Epithelien mit Mikrovilli und

dazwischen eingestreuten Becherzellen sind (Jolly et al., 2004; Marie et al., 2012). Die Mantelzellen besitzen auch Kanäle und Pumpen in der Membran, um Bestandteile des späteren Calciumcarbonats in ionischer Form gerichtet transportieren zu können (Marin et al., 2012).

Am Rand des Mantelorgans liegt in einer Rinne zwischen der inneren und der mittleren von drei Falten, die diese Schicht typischerweise bildet, die sogenannte periostale Rinne oder auch Mantelrinne. Dort befinden sich spezialisierte Zellen, die das Periostrakum sezernieren. Das Periostrakum wird als Flüssigkeit sezerniert, die später unlöslich wird und sklerosiert, sobald sie in den extrazellulären Raum gelangt. Sowohl die Struktur als auch die chemische Zusammensetzung des Periostrakums sind gut untersucht (Waite, 1983), jedoch konnten aufgrund der schlechten Löslichkeit nicht alle Einzelheiten geklärt werden (Marin et al., 2012).

Der extrapalliale Raum ist mit der extrapallialen Flüssigkeit gefüllt, die mit Calciumcarbonat übersättigt ist. Die Flüssigkeit besteht unter anderem aus anorganischen Ionen, Proteinen und Glykosaminoglykanen (Misogianes & Chasteen, 1979; Lopes-Lima et al., 2005; Yin et al., 2005). Neben Calcium und Bicarbonat befinden sich auch noch Natrium, Kalium, Magnesium, Chlor und Sulfate in dieser leicht basischen Flüssigkeit (Marin et al., 2012). Die enthaltenen Makromoleküle halten das Calcium vorübergehend in Lösung, um dann später eine Kristallisierung an der gewünschten Stelle sicherzustellen. Der Weg des Calciums von der Aufnahme bis zur letztendlichen Sekretion ist jedoch trotz zahlreicher Studien noch nicht gänzlich geklärt (Dillaman & Ford, 1982). Der Calciumtransport erfolgt im Organismus in Form von löslichen Ionen in der Hämolymphe und in amorphen Granuli (Roinel et al., 1973). Letzteres ist aufgrund der schnellen Verfügbarkeit von großen Mengen an Calcium, insbesondere bei akutem Bedarf, wie zum Beispiel bei der Schalenreparatur, von Bedeutung (Fleury et al., 2008).

Das benötigte Bicarbonat kann einerseits aufgenommen, andererseits aber auch von der Muschel selbst mit Hilfe einer Carboanhydrase gebildet werden (Simkiss & Wilbur, 1989).

## Schalenumbau und Reparatur

Obwohl die Schale selbst ein azelluläres Gewebe ist, besitzt sie die Fähigkeit einer gewissen Plastizität und eines Umbauvermögens (Mount et al., 2004; Fleury et al., 2008). Die Muschel ist dabei in der Lage, verschiedenste Arten von Traumata zu reparieren. Dabei zeigen sich mikrostrukturelle Unterschiede an Stellen, wo ebensolche Umbau- und Reparaturvorgänge

stattgefunden hatten, verglichen zu regulär gebildeter Schale. Daher wird vermutet, dass das äußere Mantelepithel im Falle einer Reparatur anders funktioniert als beim regulären Wachstum der Muschel. An den reparierten Stellen, sowie in der Nähe derselben, konnten übermäßig viele der calciumhaltigen Granuli sowie Hämozyten gefunden werden (Marin et al., 2012). Erste Reparaturvorgänge finden dabei schon wenige Stunden, beziehungsweise wenige Tage nach dem Auftreten der Läsion statt (Mount et al., 2004). In diversen Studien wurden Reparaturantworten der Muschel auf einzelne Traumata, wie das Bohren von Löchern in die Schale als auch repetitive Belastungen, untersucht (Cho & Jeong, 2011; Crane et al., 2021).

Bei Schäden an der Muschelschale kommt es zur Ansammlung von granulären Blutzellen, amöboide Zellen mit makrophagen-ähnlicher Funktion, um den Regenerationsprozess an der Läsion zu unterstützen. Es wird angenommen, dass ein erster Anstieg der Hämozyten-Konzentration eine nicht spezifische Immunantwort im Zusammenhang mit der Wundheilung darstellt, der dann zu einer Änderung des Pallialflüssigkeitsflusses führt und somit zu einer  $\text{CaCO}_3$ -Ablagerung beiträgt (Li et al., 2016). Die genaue Funktion der Hämozyten ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Sie sollen im Rahmen der physiologischen Schalenbildung keine Rolle spielen. Bekannt ist jedoch, dass sie in der Immunabwehr sowie bei der Gewebereparatur eine bedeutende Stellung innehaben (Dauphin & Marin, 1995).

Im Gegensatz zu Vertebraten befinden sich die Mechanorezeptoren und Effektoren des Schalenumbaus bei Muscheln nicht innerhalb der mineralisierten Matrix, sondern im sogenannten Mantelgewebe. Diese besonderen Zellen haben sich als essenziell in ihrer Funktion hinsichtlich der Neubildung von Schalengewebe gezeigt (Machado et al., 1988; Immel et al., 2016).

Durch die Epithelzellen der Mantelschicht, welche sowohl für physikalische als auch chemische Reize sensibel sind, wird die Mineralisierung gesteuert und Perlmutt in Richtung des Hypostrakums sezerniert. Somit sind die Mantelepithelzellen sowohl als Sensor, aber auch als Effektor tätig (Machado et al., 1988; Soares-da-Silva et al., 1998; Lopes-Lima et al., 2008).

## Muschel als Modellorganismus

In den letzten Dekaden wurde vieles für die Anwendung von Vertebraten in Tierversuchen auf Gesetzesebene reglementiert. In Deutschland ist hierfür das Tierschutzgesetz (TierSchG) bindend (Lorz & Metzger, 2019).

Da es sich bei *Dreissena polymorpha* um eine wirbellose Spezies handelt, gelten besondere Regelungen hinsichtlich der Verwendung zu wissenschaftlichen Zwecken. Muscheln fallen nicht unter die Auflagen des allgemeinen Tierschutzgesetzes, sondern werden in §8 TierSChG gesondert behandelt. Dieser Paragraph besagt, dass Tierversuche an Wirbeltieren genehmigungspflichtig sind. Arbeiten mit Wirbellosen, worunter auch die Art *Dreissena polymorpha* fällt, müssen lediglich bei der zuständigen Landesbehörde angemeldet werden. Es liegen jedoch keine Einschränkungen bezüglich der Anzahl an Versuchstieren oder ähnlichem vor (Lorz & Metzger, 2019).

Was Muscheln als Modellorganismen interessant macht, ist die Tatsache, dass die Prinzipien der Biomineralisierung bei Nichtwirbeltieren mit kalzifiziertem Gewebe, insbesondere Muscheln, viele Gemeinsamkeiten zu denen der Knochen von Wirbeltieren aufweisen. Somit kann vermutet werden, dass viele Erkenntnisse im Bereich der Biomineralisierung, die an Muscheln gewonnen werden können, zu einem gewissen Maße auch auf Wirbeltiere übertragbar sind. Muscheln und Vertebraten unterscheiden sich jedoch durch unterschiedliche Mineralisierungstypen. Bei den meisten Muscheln handelt es sich vorrangig um Aragonit; bei Wirbeltieren ist Calcit der vorherrschende Typ. Es ist jedoch anzumerken, dass diesbezüglich keine vollständige Dichotomie vorherrscht, da in diversen Muschelarten sowohl Calcit als auch Aragonit vorhanden sein können (Simkiss & Wilbur, 1989; Addadi et al., 2006; Mahamid et al., 2011).

Die vorliegende Arbeit wurde an der Zebramusche (*Dreissena polymorpha*) als Modellorganismus durchgeführt. Die Zebramusche ist bereits sehr etabliert in den Umweltwissenschaften sowie der Ökotoxikologie und wurde dort beispielsweise in diversen Studien zur Umweltverschmutzung zur Datengewinnung verwendet (Reeders & Bij De Vaate, 1989; Zuykov et al., 2013). So wurde sie beispielsweise anfangs zur Überwachung der Cadmium-Belastung und später der Schwermetallverschmutzung in Gewässern verwendet (Bias & Karbe, 1985; Camusso et al., 2001; Immel et al., 2016). Im Rahmen einer anderen Studie konnte auch die Eignung dieses Tiermodells für Experimente mit extrakorporalen Stoßwellen, im konkreten Fall für fESWs, nachgewiesen werden (Sternecker et al., 2018).

Speziell für Versuche mit extrakorporalen Stoßwellen erweist sich die Zebramusche im Vergleich zu Säugetieren als vorteilhaft, da sie problemlos im Wasser gelagert und behandelt werden kann. Säugetiere müssten aufgrund der Mobilität zusätzlich fixiert und sediert werden. Unter Wasser wäre gegebenenfalls auch eine Beatmung der Tiere während des Versuchs

notwendig, da in der vorliegenden Arbeit allein die Dauer der Exposition mit Stoßwellen über 2 Minuten pro Muschel betrug. Auch dies würde einen erheblichen Mehraufwand und Kosten bedeuten.

Die Haltung der Muscheln unter Laborbedingungen erwies sich unter Beachtung etablierter Standards als sehr einfach. Sie bedarf keiner intensiven Pflege, wie dies beispielsweise bei Ratten oder ähnlichen Säugetieren nötig wäre (Busch et al., 2017).

Generell kamen Wirbellose seit Ende des vorletzten Jahrhunderts als Versuchstiere in der Wissenschaft gehäuft zur Anwendung (Vernon, 1895). Im Laufe des 20. und des 21. Jahrhunderts kam es dann zu einer stetigen Zunahme an wissenschaftlichen Publikationen, in denen diverse wirbellose Spezies verwendet wurden, um zu neuen Erkenntnissen zu kommen und die Wissenschaft voranzutreiben (Wilson-Sanders, 2011).

## Knochenwachstum und -umbau beim Menschen

In Knochen von Vertebraten, insbesondere beim Menschen, gibt es verschiedenste Zellarten, welche für den Knochenstoffwechsel als auch für die Umbauvorgänge notwendig sind. Wichtig ist hierbei die Funktion der einzelnen Zellen, die als Sensor, Transduktoren oder Effektor dienen können (Klein-Nulend et al., 1995; Weiner und Wagner, 1998; Burger und Klein-Nulend, 1999). Hierbei soll zur Veranschaulichung relevanter Prozesse ein kurzes Augenmerk auf einige wenige Zellarten gelegt werden.

### Osteoblasten

Die Osteoblasten sind in erster Linie für die Knochenbildung verantwortlich. Sie differenzieren sich aus mesenchymalen Stammzellen über die Vorstufe der Osteoprogenitor-Zellen unter Einfluss diverser Wachstumsfaktoren wie beispielsweise bone-morphogenic Protein 2 (BMP2) schließlich in Osteoblasten (Chen et al., 2012). Sie synthetisieren Kollagen und steuern die Mineralisation des noch nicht mineralisierten Osteoids. Die Knochenbildung beruht auf zwei Prozessen: erstens der Freisetzung von organischer Matrix und zweitens der Mineralisierung dieser (Huang et al., 2007). Ferner regulieren Osteoblasten durch Ihren Einfluss auf die Aktivität der Osteoklasten aber auch den Abbau des Knochens. Osteoblasten können sich im weiteren Verlauf ihres Lebens in Osteozyten umwandeln oder durch Apoptose zugrunde gehen (Kim et al., 2015).

## Osteozyten

Osteozyten stellen mit 90-95% den Großteil der Zellen im menschlichen Knochen dar (Parfitt, 1977). Sie werden in der mineralisierten Knochenmatrix eingeschlossen und sind über ein fein verzweigtes Hohlraumsystem über ihre spinnenbeinförmigen Ausläufer miteinander verbunden. Die eigentliche Aufgabe dieser Zellen ist noch nicht vollständig geklärt; sicher ist jedoch, dass sie als Mechanorezeptoren fungieren und für die Vitalität des Knochens essentiell sind (Parfitt, 1977; Knothe Tate et al., 2008). Sie werden als Schlüsselzellen für die Steuerung des Knochenumbaus angesehen (Goggin et al., 2016). Das Kanalikulsystem und die noch nicht mineralisierte Matrix werden aufgrund ihrer besseren Permeabilität für Wasser und andere kleine Moleküle als Sitz der Mechanorezeptoren und der Mechanotransduktion betrachtet (Klein-Nulend et al., 2013).

## Osteoklasten

Die Osteoklasten sind vor allem für den Abbau und die Reparatur von Knochensubstanz verantwortlich. Diese mehrkernigen Zellen stammen der Granulozyten-Makrophagen-Zelllinien ab (Chambers, 1985; Bruzzaniti & Baron, 2006). Sie befinden sich in der mineralisierten Knochenmatrix und fressen sogenannte Howship-Resorptionslakunen in den Knochen. Das gänzliche Fehlen dieser Zellart führt zum Krankheitsbild der Osteopetrose (Tanaka et al., 1993).

## Knochenstoffwechsel

Die Knochenmasse befindet sich zeitlebens ständig im Umbau, um sich an die aktuellen Gegebenheiten und Anforderungen anzupassen, aber auch um Wachstum und Heilung von Defekten zu ermöglichen (Wolff, 1893; Huiskes et al., 2000). Der Knochenstoffwechsel wird zum einen über systemische Transmitter und Hormone reguliert, aber auch auf lokaler Ebene durch den parakrinen Weg als Austausch zwischen den einzelnen relevanten Zellen. Einer der hierfür relevanten Botenstoffe ist M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) (Felix et al., 1990). Zusätzlich ist der RANKL/RANK-Signalweg, vor allem auf dem Niveau der Zell-zu Zell Interaktion zwischen Osteoblasten und Präosteoblasten, essenziell. Die Bindung des Liganden führt zu einer Reifung der Präosteoblasten zu den eigentlichen Osteoblasten (Lacey et al., 1998). Eine weitere Rolle in diesem Geschehen spielt Osteoprotegerin (OPG). Es fungiert als Decoy Rezeptor für RANKL und hemmt die Osteoklastenbildung und somit den Abbau des Knochens (Simonet et al., 1997; Tripodo et al., 2011).

Die Auswirkung von mechanischer Belastung auf den Knochenstoffwechsel führt zu Scherkräften, welche wiederum von Osteozyten in biochemische Signale umgewandelt werden (Klein-Nulend et al., 2013). Da die Exposition von Gewebe mit ESWs ebenfalls zu Scherkräften im Gewebe führt, vor allem durch den Kollaps der Kavitationsblasen (Delacretaz et al., 1995), scheint der Effekt von ESWs auf die Induktion von Biomineralisierung (eben über den Effekt der Scherkräfte) naheliegend (Ueberle, 1998; Tischer et al., 2008).

Bezüglich des osteogenen Effekts von Stoßwellen auf Knochen konnten mehrere Studien die Bildung von freien Radikalen und eine Hyperpolarisierung der Zellmembranen nachweisen (Wang et al., 2003; Chen et al., 2004). Anschließend kommt es zur Aktivierung von VEGF (Vascular endothelial growth factor) sowie verschiedenen BMPs (Bone morphogenic protein), was schließlich zur Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Osteoprogenitorzellen führt (Wang et al., 2001; 2002a; 2002b; 2003; 2004).

Studien an Osteozyten konnten nachweisen, dass pulsierender Fluss interstitieller Flüssigkeit einen höheren Einfluss auf die Proliferation von Osteoblasten und die Knochenbildung hat als intermittierende hydrostatische Kompression der Zellmassen (Klein-Nulend et al., 1995, Ajubi et al., 1996).

## Mechanosensoren

Die Osteozyten dienen in Knochen von Wirbeltieren, wie bereits erwähnt, als Mechanosensoren und stimulieren anschließend dann selbst mit den Osteoblasten die eigentlichen Effektorzellen. Da sich die Osteozyten aber eingemauert in der Knochenmatrix befinden, sind sie für Untersuchungen nur sehr schwer bis gar nicht zugänglich (Klein-Nulend et al., 2013).

## Gemeinsamkeiten von Muschelschale und Knochen

Die Mineralisierung in der Muschelschale findet im EPR statt. Dieser weist erhebliche Ähnlichkeiten zu der Mineralisationsfront im Knochen von Vertebraten auf. Bei beidem handelt es sich um ein von der Außenwelt getrenntes Kompartiment (Veis, 2005). Die Mantelzellen wirken in diesem Prozess ähnlich den Osteoblasten im Knochen oder den Odontoblasten im Dentin der Zähne (Sasaki & Garant, 1996).

Ferner kann durch Belastungen, denen die Muschel ausgesetzt wird, auch eine Verbesserung der mechanischen Resistenz des Gewebes erzielt werden, abhängig von der Stärke der Belastung. So konnte gezeigt werden, dass Tiere, die einer stärkeren Belastung

ausgesetzt waren, im Anschluss an diese standhafter gegenüber Traumata waren als Tiere, auf die eine geringere mechanische Belastung ausgeübt wurde. Dies ist eine Folge der postwendenden Anpassung und Reparaturvorgänge in der Schale (Crane et al., 2021). Ähnliches gilt auch für die Knochenqualität, welche auch als Anpassung an Belastung verbessert werden kann (Cowin, 1984). Bei einem Mangel an mechanischer Beanspruchung kommt es hingegen zu einer Abnahme der Knochendichte und einer damit verbundenen erhöhten Suszeptibilität für Frakturen (Takata & Yasui, 2001).

### Unterschiede von Muschelschalen und Knochen

Das Wachstum von Muschelschalen ist stark beeinflusst von den Umweltbedingungen, in denen Muscheln leben, der Wassertiefe als auch der Jahreszeit. Es kommt beispielsweise insbesondere im Frühjahr zu einer jährlichen Phase von Größenwachstum (Garton & Johnson, 2008). Beim Knochen ist das Wachstum ein komplexer, hochgradig regulierter Prozess, welcher durch osteogenetische und angiogenetische Wachstumsfaktoren gesteuert wird (Zhang et al., 2018).

## **Fragestellung**

Die Stoßwellentherapie stellt eine attraktive Behandlungsmöglichkeit für eine Vielzahl von Krankheitsbildern aus verschiedenen Fachgebieten dar. Um die Wirkung von rESWs auf die Schale der Zebramuschel zu untersuchen, sollen folgende Fragen in dieser Arbeit beantwortet werden.

**1. Kann durch rESWs eine Biomineralisierung in der Schale von Zebramuscheln induziert werden?**

Dass durch Stoßwellentherapie eine Biomineralisierung in der Schale von Zebramuscheln verursacht werden kann, wurde bereits für fESWs gezeigt (Sternecker et al., 2018). Über die Wirkung von rESWs auf die Schale von Zebramuscheln gibt es bisher noch keine entsprechenden Arbeiten, die diesen Aspekt untersucht haben. Mit dieser Arbeit soll nun überprüft werden, ob auch mit rESWs Biomineralisierung in der Muschelschale ausgelöst werden kann. Der Vergleich von behandelten Muschelgruppen mit einer Vergleichsgruppe, welche keinen rESWs ausgesetzt war, soll darüber Aufschluss geben.

**2. Besteht ein Zusammenhang zwischen der verwendeten Intensität der rESWs und dem Ansprechen darauf?**

Bezogen auf die Wirkung von Stoßwellentherapie zur Schmerzreduktion wurde bereits in Übersichtsarbeiten gezeigt, dass höhere Intensitäten zu größeren Ansprechraten führen (Liao et al., 2019; Zhang et al., 2023). In dieser Arbeit sollen nun Gruppen von Versuchstieren mit unterschiedlichen Intensitäten behandelt werden. Dies soll dazu dienen, Zusammenhänge zwischen Ansprechraten und der verwendeten EFD zu untersuchen und einen möglichen Schwellenwert der Intensität, ab dem es zu einer Wirkung kommt, zu identifizieren.

**3. Findet die induzierte Biomineralisierung generalisiert in der gesamten Schale oder nur lokal begrenzt statt?**

Um eine induzierte Biomineralisierung fluoreszenzmikroskopisch nachzuweisen, wurden pro Versuchstier beide Schalenhälften an jeweils 4 Messstellen untersucht. Bei der Verwendung von fESWs konnte bereits gezeigt werden, dass die Wirkung der Stoßwellen nicht nur auf die unmittelbare Fokuszone begrenzt ist (Sternecker et al., 2018).

## Methoden

Im März 2018 wurden von Frau Dr. Katharina Sternecker (promovierte Mitbetreuerin der vorliegenden Arbeit und Expertin auf dem Gebiet der aquatischen Systembiologie) in einem Fluss in Bayern (Götzinger Aache; Abfluss aus dem Tachinger und Waginger See; Landkreis Traunstein) 60 Zebramuscheln gesammelt. Die Nummern dieser Tiere sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

*Tabelle 2: Nummern der Tiere, die in der vorliegenden Arbeit behandelt, aufgearbeitet und ausgewertet wurden. Die Gruppeneinteilung entspricht der Exposition mit rESWs mit verschiedenen Intensitäten (Details in Abschnitt "Versuchsablauf").*

0 bar	2 bar	2,5 bar	3 bar	3,5 bar	4 bar
2674	2634	2644	2654	2664	2684
2675	2635	2645	2655	2665	2685
2676	2636	2646	2656	2666	2686
2677	2637	2647	2657	2667	2687
2678	2638	2648	2658	2668	2688
2679	2639	2649	2659	2669	2689
2680	2640	2650	2660	2670	2690
2681	2641	2651	2661	2671	2691
2682	2642	2652	2662	2672	2692
2683	2643	2653	2663	2673	2693

Die Tiere wurden im Frühjahr und somit vor der Fortpflanzungsperiode, sowie vor der saisonal stärksten Wachstumsphase, gesammelt (Jantz & Neumann, 1998). Das Sammeln der Tiere erfolgte ca. drei Wochen vor der geplanten Exposition mit rESWs. Die Tiere wurden umgehend in Eimern, gefüllt mit Seewasser, in die Anatomische Anstalt der LMU transportiert. Dort wurden sie im Keller des Laborgebäudes in Aquarien gehalten. Die Akklimatisierung erfolgte dabei gemäß den Richtlinien für Untersuchungen an Süßwassermuscheln in Laboren, ASTM E2455-06 (Ingersoll et al., 2006). Hierbei erfolgte eine schrittweise Abkühlung des Wassers.

Zunächst wurden die Tiere in zwei Aquarien gegeben, zwischen denen mehrmals große Teile des Wassers ausgetauscht wurden, um für möglichst gleiche Bedingungen zu sorgen. Die Wassertemperatur in den Aquarien betrug im Zeitraum, in dem die Tiere gehalten wurden,  $17,1^{\circ}\text{C} \pm 1,1^{\circ}\text{C}$  (alle angegebenen Streumaße sind Standardabweichungen). Die niedrige Wassertemperatur war insofern wichtig, da bei Temperaturen über  $20^{\circ}$  der metabolische Bedarf der Muscheln steigt und letztlich die Aufnahmekapazitäten der Muscheln von Nahrung überschritten wird. Dies führt zu Stress für die Tiere und einem Gewebeverlust durch eine negative Kalorienbilanz. Die Tiere sind jedoch in der Lage, zumindest über einige Stunden auch höhere Temperaturen zu tolerieren (MaMahon & Ussary, 1995).

Die Fütterung der Tiere während des Experiments erfolgte mit Shellfish diet 1800° (Reed Mariculture, Campbell, CA, USA). Davon wurden 10ml in 2l Leitungswasser gelöst, was zweimal pro Woche frisch angesetzt und zugeführt wurde.

Die Tiere wurden vor der Stoßwellenexposition vermessen. Dabei ergaben sich folgende Durchschnittsmaße: Länge  $23 \pm 2,2\text{mm}$ , Breite  $12 \pm 1,5\text{ mm}$ , Höhe  $11 \pm 1,2\text{ mm}$ .

## Versuchsablauf

Am Tag der Exposition wurden die Tiere randomisiert in Gruppen zu je 10 Tieren aufgeteilt (vgl. Tabelle 2). Es wurde darauf geachtet, dass sich in den Gruppen jeweils sowohl größere als auch kleinere Tiere befanden, um eine vergleichbare Durchschnittsgröße zwischen den Gruppen zu erreichen und zu vermeiden, dass sich in einzelnen Gruppen übermäßig viele kleine oder übermäßig viele große Tiere befanden. Danach wurden die Tiere mit einem analogen Röntgengerät (Faxitron 3; Hologic, Martborough, MA, USA) geröntgt, um sicherzugehen, dass die Schalen vor der Stoßwellenapplikation keine Risse oder Beschädigungen aufwiesen (beim Röntgen verwendete Einstellungen: Voltage Tube 38 Belichtung 30''). Die Bilder wurden mit Structurix D4DW Röntgenfilm (Agfa, Mortsel, Belgien) angefertigt. Die anschließende Untersuchung der Röntgenbilder erfolgte auf einem Leuchtkasten (Rex Messinstrumentenbau GmbH Erlangen, Deutschland) und mit einer Lupe (Leitz, Wetzlar, Deutschland). Dabei zeigten sich bei keinem der Tiere Beschädigungen der Schale.

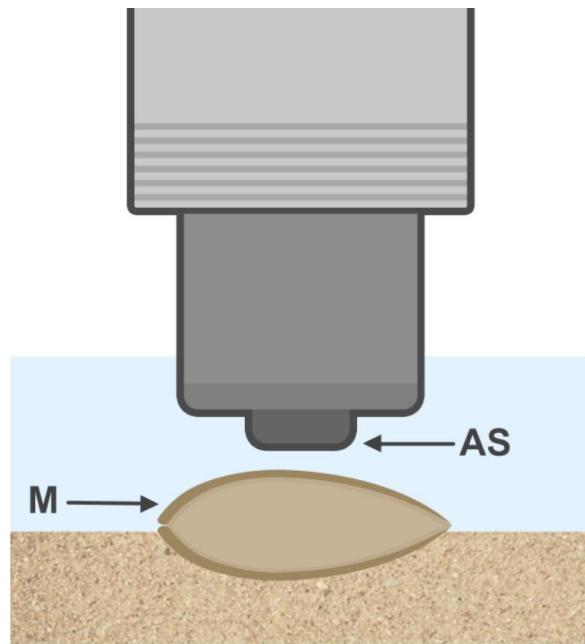
Die Gruppen wurden anschließend in kleine Glasgefäße gegeben und dann entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit mit 2, 2.5, 3.0, 3.5 und 4.0 Bar oder (als Vergleichsgruppe) mit einer Scheinexposition behandelt. Bei den behandelten Gruppen erfolgte die Applikation von 1000 rESWs mit einer Frequenz von 8Hz an der linken Schalenhälfte.

## Versuchsaufbau

Alle Versuche fanden im Labor des Lehrstuhls II der Anatomischen Anstalt der LMU München statt. Ziel des Aufbaus war es, die Muscheln möglichst sicher und unter gleichbleibenden Bedingungen mit rESWs zu exponieren. Die Abbildungen 4 und 5 zeigen den Versuchsaufbau. Bei allen Tieren wurde die linke Muschelschale mit rESWs exponiert.



**Abbildung 4:** Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit. Abkürzungen: G, radiales extrakorporales Stoßwellengerät (Swiss DolorClast Classic; Electro Medical Systems, Nyon Schweiz); H, Handstück; B, Bohrständler; W, Wasserbad, S, Sand. Das gezeigte Foto wurde auch in der Publikation Wu W,...Meindlhummer L, Sternecker K,...Schmitz C. J Orthop Surg Res 2021a;16(1):707 verwendet.



**Abbildung 5:** Schematische Detailansicht des Versuchsaufbaus dieser Arbeit. Abkürzungen: H, Handstück des verwendeten rESWT-Geräts (Swiss DolorClast Classic; Electro Medical Systems); AS, Applikatorspitze; M, Muschel; S, Sand; W, Wasser.

Zur Stabilisierung der Muscheln während der Applikation von rESWs wurde Substrat aus der Aquaristik (Reef Ground, Dupla Marin 2-3mm, Dohse Aquaristik, Grafschaft Gelsdorf, Deutschland; „Sand“ in Abbildungen 4 und 5) verwendet. Das Substrat wurde initial mehrmals mit Leitungswasser gespült, um vorhandene Trübstoffe herauszuwaschen. Das Ziel des Aufbaus war zum einen die kontinuierliche Stabilisierung der Muschel während der Stoßwellenapplikation, sowie das Sicherstellen einer möglichst guten optischen Kontrolle über die Position der Muschel während der Applikation. Sollte es zu einem etwaigen Verrutschen des Tieres kommen, konnte dies sofort erkannt und die Applikation dann gegebenenfalls schnellstmöglich unterbrochen werden. Ziel war es, einen direkten Kontakt und somit die potenzielle Gefahr einer mechanischen Beschädigung der Muschel durch die metallische Applikatorspitze zu vermeiden. Zusätzlich sollte durch den gleichbleibenden Abstand auch eine gleichbleibende EFD an der Schale gewährleistet werden. Im Falle eines Verrutschens wurde die Behandlung unterbrochen und nach einer erneuten Positionierung fortgesetzt. Insgesamt herrschten jedoch äußerst stabile Lageverhältnisse. Dadurch konnte eine gleichbleibende Verteilung der Energie und Minimierung von Reflexionsphänomenen sichergestellt werden.

Das Substrat befand sich in einem flachen Kunststoffbehältnis, das mit Leitungswasser gefüllt wurde. Im Substrat wurde dann ein kleiner Hügel geformt, in dessen Mitte die Muscheln in einer Mulde eingebettet wurden. Die Muscheln waren während der Behandlung vollständig mit Wasser bedeckt. Die Applikation der Stoßwellen erfolgte mit einem Abstand von 2,5 bis 3,2mm zwischen linker Schalenhälfte und Applikatorspitze, welche selbst auch zum Zwecke der Kopplung in das Wasser getaucht war. Der Abstand wurde mittels einer Einwegpipette aus Kunststoff kontrolliert, welche einen Durchmesser von etwa 2,5mm aufwies und zwischen der Schale und der Applikatorspitze durchbewegt wurde.

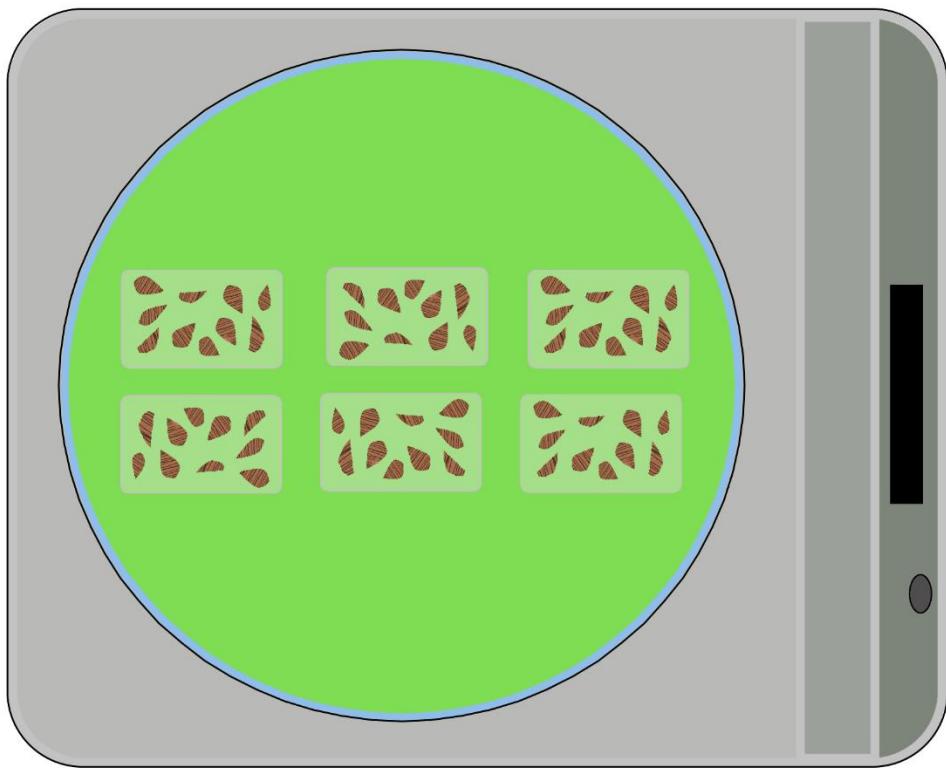
Die EFD, welche bei 3,0 bzw. 4.0 Bar auf die Muschelschale wirkt, beträgt etwa 0,08 bis 0,11 mJ/mm<sup>2</sup> (Csaszar et al., 2015). Das Handstück wurde, wie in Abbildung 4 gezeigt, mit einem Bohrständer fixiert. Verwendet wurde ein Swiss DolorClast Classic rESWT-Gerät (Electro Medical Systems, Nyon, Schweiz) mit „Radial“ Handstück und 6mm Applikator

Für die anschließende Auswertung wurden lediglich äußerlich unbeschädigte Tiere verwendet.

## Weiterer Versuchsablauf

Nach der Behandlung und optischen Überprüfung auf Beschädigungen wurden die Tiere wieder in eigene kleine Glasbehältnisse, entsprechend der Versuchsgruppen, gegeben. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Dauer der Exposition mit Luft so gering wie möglich gehalten wurde.

Unmittelbar nach der Exposition mit rESWs wurden die Tiere in kleinen, siebartigen Gefäßen (10 x 15 x 15 cm<sup>3</sup>) in eine Glasschale eingebracht, die mit 6 Litern Calcein-Grün-Lösung (C<sub>30</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub>; 10mg/l, Produktnummer C0875-5G; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) gefüllt war, und in der Calcein-Grün-Lösung für 24h inkubiert. Die Position innerhalb der Glasschale wurde dabei randomisiert festgelegt. Während der Inkubation befand sich die Glasschale auf einem Rüttler (Typ Unimax 2010 Heidolph, Schwabach, Deutschland), um eine gleichmäßige Inkubation mit der Calcein-Grün-Lösung zu gewährleisten (Abbildung 6).



*Abbildung 3: Schemazeichnung einer Glasschale mit Calcein-Grün-Lösung zur Inkubation auf einem Rüttler.*

Calcein-Grün ist ein fluoreszierender Farbstoff mit Ähnlichkeiten zur Antibiotikaklasse der Tetracycline. Beide können unter anderem mit Calciumionen Komplexe ausbilden, um Ablagerungen und Knochenbildung beziehungsweise Schalenbildung nachweisen zu können. Dies konnte sowohl bei Wirbeltieren als auch bei Wirbellosen und rezent auch bei der Zebramuschel gezeigt werden (Stuart & Smith, 1992; Kaehler & McQuaid, 1999; Sternecker et al., 2018). Calcein-Grün wird zum Beispiel in Calcium-Carbonat-Strukturen im Rahmen von Wachstums- oder Umbauprozessen eingebaut (van Gaalen et al., 2010; Spires et al., 2022). Calcein zählt zu den Fluorochromen und weist ein Exzitationsmaximum von 495nm und ein Emissionsmaximum von 517nm Wellenlänge auf (Horobin & Kiernan, 2020).

Anschließend wurden die Tiere für weitere 24h in Leitungswasser und danach zurück in die Aquarien gegeben. Dort wurden Sie für weitere 14 Tage belassen. Es fanden täglich Vitalitätskontrollen der Tiere statt, wobei keine Verluste an Tieren verzeichnet wurden. Zur nochmaligen Kontrolle auf mechanische Schäden an der Schale wurden gruppenweise analoge Röntgenbilder (wie oben beschrieben) angefertigt (Abbildung 7).



**Abbildung 4:** Exemplarisches analoges Röntgenbild von Muscheln zur Detektion von Schäden an der Schale. Die Beschriftung entspricht der internen Registrierung der Tiere im Labor des Lehrstuhls II der Anatomischen Anstalt der LMU München.

Danach wurde mit der Aufarbeitung der Muscheln begonnen. Zunächst wurden die Tiere in einer 70%igen Ethanollösung euthanasiert, die beiden Schalenhälften getrennt und der Weichkörper entfernt. Von hier an wurden die einzelnen Schalenhälften vollständig unabhängig voneinander in einzelnen Behältnissen eingebettet und danach aufgearbeitet und ausgewertet.

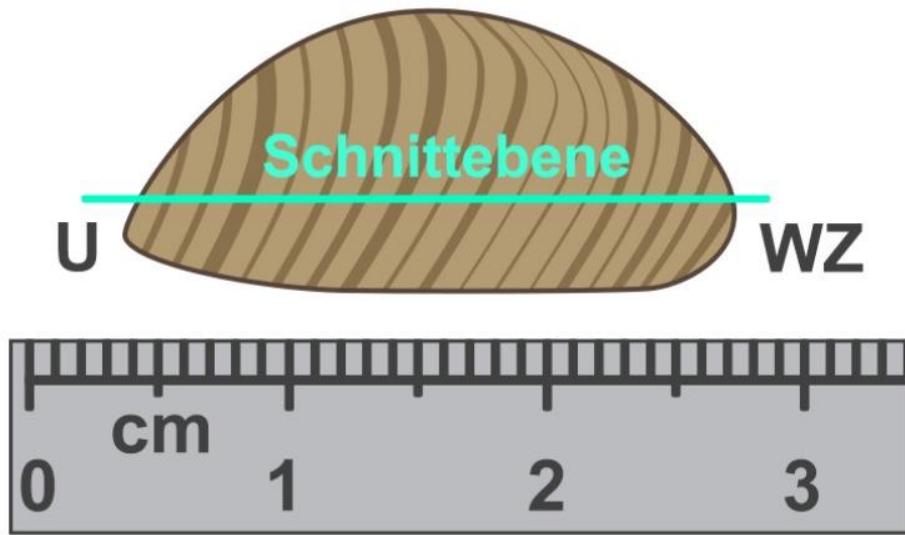
Zunächst erfolgte eine Dehydrierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (Merck, Darmstadt, Deutschland):

- 70%: 6 Tage, dann Wechsel des Mediums (W), dann weitere 2 Tage
- 80%: 4 Tage / W / 3 Tage
- 90%: 2 Tage / W / 4 Tage / W / 3 Tage
- 100%: 3 Tage / W / 3 Tage / W / 5 Tage / W / 3 Tage

Danach erfolgte eine Entfettung in Xylol (VWR, Radnor, PY, USA) für 3 und – nach Wechsel des Mediums – für weitere 4 Tage. Daran anschließend erfolgte eine Einbettung in Methanol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 4, 3 und nochmals 4 Tage, bevor die Muschelschalen schlussendlich für insgesamt 17 Tage in pures Methylmetacrylat (MMA; Produktnummer 800590; Merck) gegeben wurden. Zuletzt erfolgte eine Umbettung in MMA-Gemisch. Dieses wurde zunächst für 4 Tage im Kühlschrank bei 4°C belassen; danach erfolgte ein Umgießen in frisches MMA-Gemisch, welches dann bis zur finalen Polymerisierung in einem Wärmeschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) verwahrt wurde. Dies dauerte im Durchschnitt etwa 14 Tage. Das MMA-Gemisch wurde aus 1000ml Methylmetacrylat (Merck), 250 ml Nonylphenyl-Polethylenglycol-Acetat (Produktnummer 74332; Merck) und 35g Benzylperoxid (Produktnummer 801642; Merck) angesetzt. Das beschriebene Einbettungsprotokoll kam bereits bei anderen Studien zum Einbetten von Knochen oder Muschelschalen zum Einsatz (Schenk, 1965; Milz & Putz, 1994; Sternecker et al., 2018).

Während all diesen Schritten befanden sich die Schalenhälften jeweils einzeln in kleinen Rollrandgläschchen. Nach der Aushärtung des MMAs wurden die einzelnen Präparate aus dem Glas geschlagen, Glasreste wurden fein säuberlich entfernt, weiche Reste mit einem handelsüblichen Skalpell abgeschnitten und die MMA-Blöckchen an einem Trennschleifgerät (cut Grinder, patho-Service GmbH, Oststeinbek, Deutschland) zurecht gesägt. Anschließend wurden die MMA-Blöckchen mit einkomponentigem Klebstoff (Cyanolit 201, Panacol, Steinbach/Taunus, Deutschland) auf Metallbolzen geklebt, sodass die Muschelunterseite nach unten zeigte und die Sagittale der Muscheln in einem rechten Winkel zur Klebefläche stand. Nach einer Trocknungszeit von mindestens 5 Minuten wurde mit dem Schneideprozess begonnen. Dabei wurde Schnitte von  $458 \pm 132 \mu\text{m}$  Dicke an einem Ringsäge-Mikrotom unter Wasserkühlung mit 600 Umdrehungen pro Minute mit einem Innenlochsägeblatt mit Diamantkornbeschichtung und einer Dicke von 280  $\mu\text{m}$  bei einem Vorschub von 10mm/min horizontal angefertigt (SP1600; Leica, Wetzlar, Deutschland). Die Schnitte wurden anschließend zwischen beschwerten Glasplatten für mindestens eine Woche getrocknet, um eine Wölbung im Rahmen des Trocknungsprozesses der Schnitte zu vermeiden. Diese wurden danach an einer Mikroschleifmaschine geschliffen und poliert (Exakt Advanced Technologies, Norderstedt, Deutschland). Die finalen Schnitte wiesen nach diesen Vorgängen eine Dicke von etwa 250  $\mu\text{m}$  auf. Die Vermessung erfolgte mit einem digitalen Mikrometer (Mitutoyo,

Kawasaki, Japan). Die Lage der angefertigten Schnitte der Muschelschalen wird in Abbildung 8 veranschaulicht.



*Abbildung 5: Lage des Schnitts innerhalb einer Schalenhälfte; Perspektive auf die Schalenhälfte von der Seite. Abkürzungen: U = Umbo, WZ = Wachstumszone, cm= Zentimeter.*

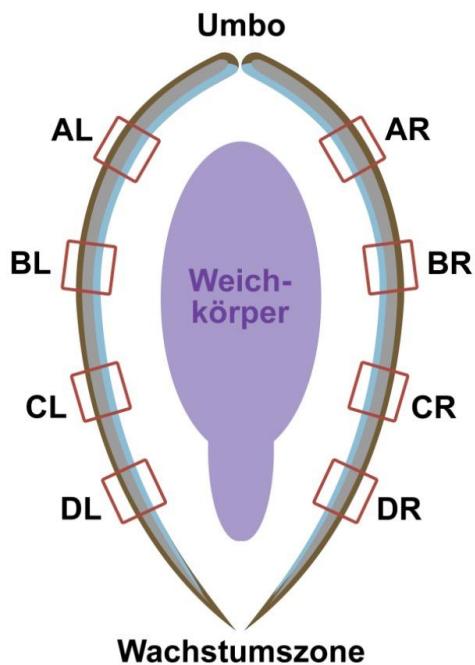
Im Anschluss erfolgte das Aufbringen der Schnitte, wiederum mittels oben genannten Klebstoffs, auf Objektträger. Diese wurden danach zwischen 2 Teflonplatten sowie 2 Metallplatten in einen Schraubstock eingespannt. Dort wurden sie für eine Dauer von jeweils ca. 5 Minuten belassen, um eine ausreichende Aushärtung des Klebstoffs zu gewährleisten. Danach wurde die Dicke der Schnitte plus Objektträger und Klebstoff unter Zuhilfenahme der digitalen Schublehre ermittelt.

Im nächsten Schritt wurden die Schnitte auf den Objektträgern initial mit grobem Silicium-Carbid Schleifpapier mit einer Körnung von p800 (Hermes Schleifmittel, Hamburg, Deutschland) auf die gewünschte Dicke abgeschliffen. Ein Zielwert von ca. 200 µm wurde auf einem Mikroschleifgerät (Exakt Advanced Technologies, Norderstedt) angestrebt. Anschließend erfolgte ein erneutes Vermessen. Die dabei gemessene Dicke der Schnitte abzüglich Objektträger und Klebstoff betrug  $208 \pm 40$  µm. Danach erfolgte noch ein Feinschliff mit p1200 Schleifpapier an der gleichen Maschine für eine durchschnittliche Dauer von 5 Minuten, um etwaige Rillen auf der Oberfläche der Schnitte zu minimieren und optische

Effekte bei der späteren mikroskopischen Auswertung zu verhindern. Dabei kam es zu keiner nennenswerten weiteren Abnahme der Schnittdicke.

### Fluoreszenzmikroskopische Messungen

Pro Schalenhälfte erfolgten fluoreszenzmikroskopische Messungen in jeweils 4 Regionen (vgl. Abbildung 9). Region A befand sich an der Schale nahe des Umbos (dem Gelenk, das die beiden Schalenhälften *in vivo* verbindet), und Region D am anderen Ende, nahe der Wachstumsschicht. Die Regionen B und C befanden sich gleichmäßig dazwischen. Es wurde darauf geachtet, die Messungen exakt in den dargestellten Regionen durchzuführen. Falls an einer Stelle Artefakte, zum Beispiel durch den vorangehenden Schneide- oder Schleifprozess oder durch mechanische Manipulation im Rahmen des Aufbringens der Schnitte auf die Objektträger, vorhanden waren, wurde nicht genau an den Stellen der Artefakte gemessen, sondern so nahe wie möglich direkt daneben. Dabei kam es jedoch nicht zu übermäßigen Abweichungen von den Messregionen, was vergleichbare Messungen gewährleistete.

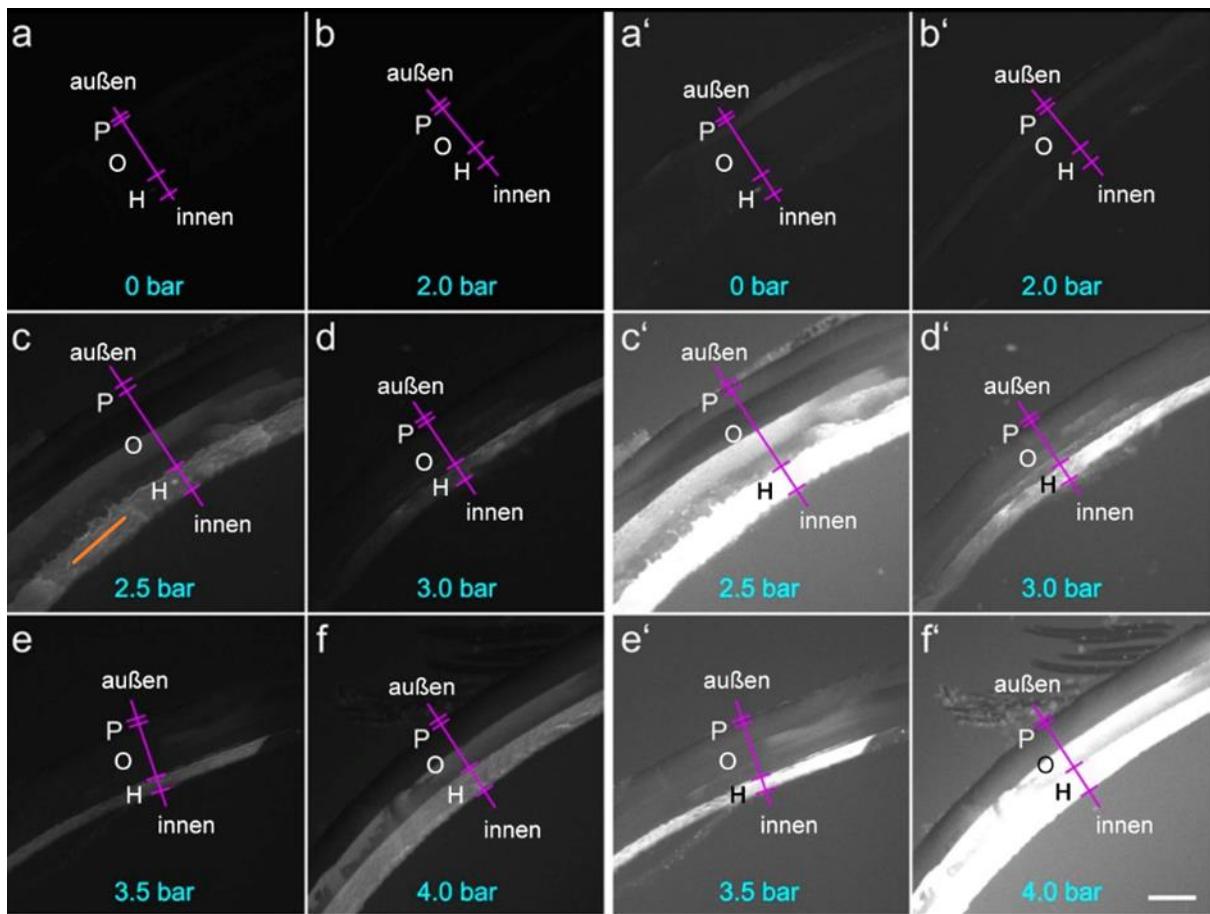


*Abbildung 6:* Schematische Darstellung der Messregionen an einer Muschelschale (jeweils A-D mit der zugehörigen Seite (L = links, R = rechts)). Die Exposition mit rESWs erfolgte immer auf der linken Seite.

Fluoreszenzmikroskopische Bilder wurden mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Olympus

BX51WI; Olympus, Tokyo, Japan) mit einem 4-fach UPlanSApo Objektiv (numerische Apertur 0.16; Olympus) sowie einem Alexa Fluor 488 Filter (49011; Chroma, Bellows Falls, VT, USA), einer Graustufen EM CCD-Kamera (Model C9100-02; 1000x1000 Pixel; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) und SOLA LED Lampe (Lumencor, Beaverton, OR, USA) aufgenommen. Alle Bilder wurden dann mittels der Software Stereo Investigator (64 Bit, Version 11.07; MBF Bioscience, Williston, VT, USA) angefertigt und als 8 Bit Dateien (Grauwerte von 0 bis 255) digital gespeichert. Durch die Verwendung von Pilotmessungen wurde die Kamera so adjustiert, dass eine Überbelichtung vermieden wurde. Alle Grauwerte waren kleiner als 255. Die verwendeten Kameraeinstellungen waren wie folgt: Belichtungszeit 24 ms, Sensitivität 80; Gamma 1.0.

Wie auch schon in einer vorangegangenen Studie (Sternecker et al., 2018) wurde in der vorliegenden Arbeit das stärkste Fluoreszenzsignal im Hypostrakum gefunden. Nach Auswertung der Ergebnisse aus der Scheinexpositionsgruppe zeigte sich, dass die gemessene Fluoreszenz tatsächlich durch die applizierten rESWs induziert wurde (Abbildung 10).



**Abbildung 7:** (a-f) Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von linken Muschelschalen-Hälften nach Exposition mit rESWs mit unterschiedlicher Energie (bzw. unterschiedlicher Einstellung des verwendeten rESWT-Geräts). Die einzelnen Schichten der Schalen sind violett gekennzeichnet ( $P$  = Periostrakum,  $O$  = Ostrakum,  $H$  = Hypostrakum); die orangefarbene Linie in Bild c zeigt die Stelle einer Fluoreszenzmessung im Hypostrakum. (a'-f') Zur eindeutigen Identifizierung der einzelnen Schichten der Muschelschalen wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen derselben Regionen zusätzlich mit geänderten Kameraeinstellungen aufgenommen, was ab 2,5 bar zur Überbelichtung führte (c'). An diesen Aufnahmen wurden jedoch keine Messungen vorgenommen. Der Messbalken in f' entspricht 300  $\mu\text{m}$  in allen Teilbildern.

Die Auswertung der angefertigten Bilder erfolgte in den jeweils vier in Abbildung 9 gezeigten Regionen mit der Linear Pixel Plot Funktion der Software Stereo Investigator (MBF Bioscience). Dadurch konnte den Grauwerten der Bilder ein numerischer Wert zugeordnet werden, wobei ein starkes Signal, im Sinne einer starken Helligkeit, einem hohen Wert entsprach.

Am Umbo selber wurden keine Messungen durchgeführt, da dort starke Autofluoreszenz gefunden wurde (wie auch schon in Sternecker et al. (2018) beschrieben).

## Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Daten wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Fluoreszenzsignale der unterschiedlichen Gruppen (0 Bar, 2,0 Bar, 2,5 Bar, 3,0 Bar, 3,5 Bar und 4,0 Bar Arbeitsdruck) ermittelt. Hierbei erfolgte der Vergleich der einzelnen Messregionen (A-D in Abbildung 9) sowie der Seiten (linke Schalenhälfte: exponiert; rechte Schalenhälfte: nicht exponiert). Ungewöhnlich hohe Messwerte (Ausreißer, bedingt durch Reflexionsphänomene oder mechanische Beschädigungen an den Schalenschnitten) wurden mit der Methode nach Tukey (1977) identifiziert; die entsprechenden Berechnungen erfolgten mit der Software GraphPad Prism (Version 10.4.0; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Die Ausreißer wurden bei der Berechnung von Mittelwerten, Standardabweichungen und den nachfolgenden statistischen Tests nicht berücksichtigt.

Unterschiede in den mittleren Fluoreszenzsignalen wurden mithilfe einer allgemeinen linearen Modellanalyse („univariate general linear model“) untersucht, wobei die Intensität der rESWs, die Schalenhälfte und die Messregion (Regionen A–D in Abbildung 9) als feste Faktoren und die ermittelten Fluoreszenzsignale (je ein Wert pro Muschel, Schalenhälfte und Messregion) als abhängiger Faktor dienten. Post-hoc-Analysen (Intensität der rESWs, Messregion) wurden mithilfe des Bonferroni-Mehrfachvergleichstests durchgeführt. Diese Berechnungen erfolgten mit der Software SPSS (Version 26.0.0.0; IBM, Armonk, NY, USA).

P-Werte, die kleiner als 0,05 waren, wurden als statistisch signifikant angesehen.

## Ergebnisse

Tabelle 3 fasst die ermittelten Fluoreszenzsignale (Rohdaten) aller in der vorliegenden Arbeit untersuchten 60 Tiere zusammen, geordnet nach Intensitätsgruppen, Schalenhälften und Messregionen (gemäß Abbildung 9). Ungewöhnlich hohe Messwerte (Ausreißer, bedingt durch Reflexionsphänomene oder mechanische Beschädigungen an den Schalenschnitten) sind durch Fettdruck markiert.

*Tabelle 3: Ermittelte Fluoreszenzsignale (Rohdaten) aller in der vorliegenden Arbeit untersuchten 60 Tiere, geordnet nach Intensitätsgruppen ("Bar"), Schalenhälften und Messregionen (die Abkürzungen "AL" bis "DR" sind in Abbildung 9 illustriert). Der rote Rahmen fasst exemplarisch die Rohdaten an Messregion B der rechten Schalenhälfte derjenigen 10 Tiere zusammen, die mit rESWs, die mit 2 Bar Arbeitsdruck generiert wurden, exponiert wurden. Der Wert 210,85 von Tier 2638 wurde mit der Methode nach Tukey (1977) als Ausreißer identifiziert (alle Ausreißer sind durch Fettdruck markiert). Diese Werte wurden bei den nachfolgenden statistischen Tests nicht berücksichtigt.*

Bar	Nr.	AL	BL	CL	DL	AR	BR	CR	DR
0 Bar	2674	10,26	16,53	11,39	9,72	12,76	10,21	14,50	9,12
0 Bar	2675	9,70	9,42	12,56	10,71	9,34	9,24	11,06	9,86
0 Bar	2676	9,34	8,52	10,56	9,08	9,17	10,08	10,41	9,77
0 Bar	2677	10,24	12,07	10,97	10,76	12,73	10,98	12,02	10,71
0 Bar	2678	11,75	10,50	9,73	9,29	10,10	11,48	9,75	10,98
0 Bar	2679	9,56	9,99	10,53	9,83	10,40	10,38	9,82	9,60
0 Bar	2680	10,95	12,47	11,02	10,07	10,44	9,62	10,86	11,37
0 Bar	2681	<b>14,09</b>	13,33	11,97	10,89	12,22	<b>14,15</b>	12,04	10,72
0 Bar	2682	10,86	10,32	12,54	10,23	11,16	10,24	10,39	10,08
0 Bar	2683	9,64	11,59	9,82	10,16	9,05	<b>9,56</b>	9,66	9,24
2 Bar	2634	12,11	12,02	10,93	8,75	16,51	<b>10,96</b>	13,08	12,19
2 Bar	2635	10,35	10,15	10,66	9,47	13,85	<b>11,54</b>	11,05	10,92
2 Bar	2636	11,18	9,51	12,83	9,12	<b>39,31</b>	<b>11,78</b>	12,42	11,01
2 Bar	2637	10,12	11,93	10,41	11,71	9,78	12,24	11,01	10,68
2 Bar	2638	9,45	10,47	10,47	10,63	<b>92,51</b>	<b>210,85</b>	<b>210,85</b>	<b>23,50</b>

Bar	Nr.	AL	BL	CL	DL	AR	BR	CR	DR
2 Bar	2639	11,43	9,77	10,33	10,65	11,22	15,03	11,13	10,11
2 Bar	2640	10,09	9,61	10,89	11,98	12,98	10,85	12,40	11,19
2 Bar	2641	9,60	12,36	<b>16,85</b>	11,32	11,68	11,15	10,22	10,55
2 Bar	2642	11,85	10,43	11,68	10,59	10,80	10,75	11,62	14,11
2 Bar	2643	11,08	11,21	11,28	<b>35,08</b>	11,72	<b>11,27</b>	14,14	10,80
2,5 Bar	2644	11,53	12,39	11,70	9,41	9,25	9,80	11,13	10,12
2,5 Bar	2645	11,94	11,50	10,73	11,80	10,17	10,65	11,37	13,17
2,5 Bar	2646	10,44	10,54	9,34	11,03	9,88	10,56	11,43	12,87
2,5 Bar	2647	10,92	15,45	14,66	11,85	11,79	11,59	13,13	12,80
2,5 Bar	2648	9,15	10,69	13,36	9,43	10,02	12,80	14,48	8,67
2,5 Bar	2649	<b>64,45</b>	13,38	12,71	11,91	18,47	27,62	<b>59,99</b>	10,43
2,5 Bar	2650	<b>180,53</b>	16,89	<b>57,02</b>	15,32	14,77	25,61	18,70	12,00
2,5 Bar	2651	20,16	<b>35,66</b>	<b>85,19</b>	<b>30,06</b>	10,94	9,98	11,61	11,69
2,5 Bar	2652	13,77	15,82	13,60	14,38	13,29	16,13	16,62	9,92
2,5 Bar	2653	9,72	10,86	10,93	10,27	13,31	16,84	13,41	12,24
3 Bar	2654	13,57	9,86	10,76	10,72	26,07	13,76	16,21	10,56
3 Bar	2655	46,15	20,64	21,45	10,79	9,68	10,65	14,33	<b>19,34</b>
3 Bar	2656	10,16	10,48	13,87	10,88	14,94	14,25	10,33	10,84
3 Bar	2657	27,16	30,15	35,63	13,43	32,53	<b>43,14</b>	<b>39,26</b>	9,63
3 Bar	2658	9,05	14,35	11,15	10,30	9,39	9,30	9,61	9,83
3 Bar	2659	10,24	10,28	13,47	10,47	44,37	<b>37,74</b>	<b>46,76</b>	9,75
3 Bar	2660	14,14	9,90	11,14	9,96	10,87	13,90	10,74	10,38
3 Bar	2661	8,80	10,69	9,59	9,24	10,54	12,28	13,47	16,23
3 Bar	2662	10,21	14,77	10,52	11,94	9,89	10,15	10,94	10,74
3 Bar	2663	26,03	28,92	28,61	<b>15,69</b>	13,10	9,94	14,54	11,90
3,5 Bar	2664	17,60	<b>27,56</b>	11,75	9,39	8,72	9,09	10,13	9,72
3,5 Bar	2665	11,73	10,34	11,10	9,90	8,97	20,41	10,25	10,16
3,5 Bar	2666	9,21	12,30	9,47	12,13	8,91	9,34	9,96	10,68
3,5 Bar	2667	9,43	10,73	10,78	11,73	9,21	15,23	14,43	<b>14,43</b>
3,5 Bar	2668	8,62	11,96	9,58	9,93	8,91	10,65	13,09	9,90
3,5 Bar	2669	<b>44,27</b>	<b>29,57</b>	<b>243,43</b>	10,55	<b>21,65</b>	9,19	10,17	9,41
3,5 Bar	2670	8,52	8,81	9,34	9,05	11,21	11,04	13,23	10,57

Bar	Nr.	AL	BL	CL	DL	AR	BR	CR	DR
3,5 Bar	2671	9,05	9,13	9,51	11,32	10,85	9,82	10,13	9,39
3,5 Bar	2672	8,47	9,46	10,89	9,01	8,81	10,22	8,55	10,36
3,5 Bar	2673	9,01	9,18	9,86	9,54	8,99	14,10	10,10	9,47
4 Bar	2684	9,54	9,47	10,14	<b>15,81</b>	9,95	19,36	11,06	11,36
4 Bar	2685	9,45	10,25	10,82	10,56	10,26	11,96	11,11	11,52
4 Bar	2686	<b>35,25</b>	<b>146,37</b>	<b>118,45</b>	10,38	11,43	13,49	12,28	11,46
4 Bar	2687	10,38	16,00	10,88	11,26	9,73	<b>23,37</b>	10,29	10,23
4 Bar	2688	11,40	15,15	12,78	10,64	10,93	11,46	12,16	9,67
4 Bar	2689	22,17	38,30	16,53	<b>18,42</b>	<b>97,66</b>	9,99	10,43	10,41
4 Bar	2690	12,69	11,87	10,10	10,40	9,48	8,83	10,48	10,12
4 Bar	2691	17,08	14,22	34,04	10,94	9,75	9,28	11,20	11,67
4 Bar	2692	10,59	11,10	12,37	10,18	17,35	10,00	10,18	9,82
4 Bar	2693	9,58	10,11	11,95	11,11	14,93	11,58	<b>15,59</b>	9,35

36 der insgesamt 480 (7,5%) Messwerte wurden mit der Methode nach Tukey (1977) als Ausreißer identifiziert. Die maximale Anzahl von Ausreißern pro Gruppe (Exposition mit rESWs gleicher Energie, gleiche Schalenhälfte und gleiche Messregion) betrug 2; es fand sich keine Häufung von Ausreißern bei zunehmender Energie der verwendeten rESWs. Somit mussten diese Artefakte bei der Aufarbeitung der Muschelschalen im Labor verursacht worden sein.

Tabelle 4 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der in Tabelle 3 gelisteten Fluoreszenzsignale für die einzelnen Intensitätsgruppen, Schalenhälften und Messregionen. Tabelle 5 fasst die Ergebnisse der statistischen Analyse dieser Daten zusammen.

**Tabelle 4:** Mittelwerte ("M") und Standardabweichungen (standard deviation; "SD") der in Tabelle 3 zusammengefassten Fluoreszenzsignale für die einzelnen Intensitätsgruppen ("Bar"), Schalenhälften und Messregionen (die Abkürzungen "AL" bis "DR" sind in Abbildung 9 illustriert).

Bar	AL		BL		CL		DL		AR		BR		CR		DR	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
0	10,3	0,8	10,9	1,6	11,1	1,0	10,1	0,6	10,7	1,4	10,2	0,7	10,2	0,9	10,2	0,8
2	10,7	0,9	10,8	1,1	11,1	0,8	10,5	1,1	12,3	2,1	11,3	0,5	11,3	1,2	11,3	1,2
2,5	18,0	17,7	13,1	2,4	12,1	1,8	13,6	6,1	12,2	2,8	13,8	5,1	13,8	2,6	13,8	1,5
3	17,6	12,1	16,0	7,9	16,6	9,0	10,9	1,2	18,1	12,1	11,8	2,0	11,8	2,4	11,8	0,7
3,5	13,6	11,1	13,9	7,8	10,3	0,9	10,3	1,1	10,6	4,0	11,9	3,6	11,9	1,9	11,9	1,5
4	14,8	8,3	15,2	9,0	14,4	7,6	12,0	2,8	20,2	27,4	10,8	1,6	10,8	0,8	10,8	0,9

**Tabelle 5:** Ergebnisse der statistischen Auswertung der in Tabelle 4 gezeigten Ergebnisse. P-Werte <0,05 sind fettgedruckt dargestellt.

Ergebnisse der linearen Modellanalyse		P						
Intensität der rESWs		<b>&lt;0,001</b>						
Schalenhälfte		0,429						
Messregion		<b>0,005</b>						
Intensität der rESWS x Schalenhälfte		0,095						
Intensität der rESWs x Messregion		0,062						
Schalenhälfte x Messregion		0,771						
Intensität der rESWs x Schalenhälfte x Messregion		0,847						
Ergebnisse der post-hoc Bonferroni-Tests zwischen den einzelnen Messregionen A-D untereinander								
Messregion A		Messregion B		Messregion C				
verglichen mit	P	verglichen mit	P	verglichen mit	P			
Messregion B	1,000							
Messregion C	1,000	Messregion C	1,000					
Messregion D	<b>0,014</b>	Messregion D	<b>0,007</b>	Messregion D	<b>0,035</b>			
Ergebnisse der post-hoc Bonferroni-Tests der unterschiedlichen Intensitäten der rESWs untereinander								
4 Bar		3,5 bar		3,0 bar		2,5 bar		2,0 bar
verglichen mit	P	verglichen mit	P	verglichen mit	P	verglichen mit	P	P
0 bar	0,298	0 bar	1,000	0 bar	<b>&lt;0,001</b>	0 bar	<b>0,033</b>	0 bar
2,0 bar	1,000	2,0 bar	1,000	2 bar	<b>&lt;0,001</b>	2 bar	0,502	
2,5 bar	1,000	2,5 bar	<b>0,013</b>	2,5 bar	0,106			
3,0 bar	<b>0,010</b>	3 bar	<b>&lt;0,001</b>					
3,5 bar	0,137							

## Diskussion

Die Ergebnisse der statistischen Analyse der in Tabelle 4 gezeigten Daten kann wie folgt zusammengefasst werden:

1. Bei den Haupteffekten gab es einen statistisch hochsignifikanten Effekt des festen Faktors "Intensität der rESWs" ( $p < 0,001$ ) sowie einen ebenfalls statistisch hochsignifikanten Effekt des festen Faktors "Messregion" ( $p = 0,005$ ) auf die mittleren Fluoreszenzsignale. Dagegen hatte der feste Faktor "Schalenhälfte" keinen statistisch signifikanten Effekt auf die mittleren Fluoreszenzsignale ( $p = 0,429$ ).
2. Bei den Interaktionen zeigten sich Trends für die Kombinationen der festen Faktoren "Intensität der rESWs" und "Schalenhälfte" ( $p = 0,095$ ) sowie "Intensität der rESWs" und "Messregion" ( $p = 0,062$ ), die bei größerem Stichprobenumfang eventuell relevant sein könnten.
3. Insgesamt war der feste Faktor "Intensität der rESWs" der einzige Haupteffekt mit robusten, statistisch signifikanten Einflüssen auf die mittleren Fluoreszenzsignale. Dabei unterschieden sich insbesondere die mittleren bis hohen Intensitäten der rESWs statistisch signifikant von den niedrigeren Intensitäten der rESWs.
4. Auch der feste Faktor "Messregion" zeigte signifikante Effekte (vgl. Tabelle 5), was auf eine anatomisch unterschiedliche Reaktion der Muscheln auf die Exposition mit rESWs hinweist.

Im März 2019 wurden von Frau Dr. Katharina Sternecker in einem anderen Fluss in Bayern (Schinderbach; Zufluss des Waginger Sees; Landkreis Traunstein) weitere 30 Zebramuscheln gesammelt. Diese Tiere wurden von einem anderen Doktoranden am Lehrstuhl für Anatomie II der Anatomischen Anstalt der Universität München (Herr Wenkai Wu) mit rESWs exponiert, weiter behandelt, histologisch aufgearbeitet und ausgewertet, und zwar auf identische Art und Weise wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben. Anschließend wurden die Rohdaten der vorliegenden Arbeit mit den Rohdaten von Herrn Wu gepoolt und gemeinsam statistisch ausgewertet, und zwar wiederum auf identische Art und Weise wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben. Die Ergebnisse der Analyse der gepoolten Rohdaten wurde gemeinsam in der Publikation Wu W,...Meindlhummer L, Sternecker K,...Schmitz C. J Orthop Surg Res 2021a;16(1):707 publiziert. Dabei wurde in der Publikation explizit erwähnt, dass sie Daten der vorliegenden Arbeit enthält ("This paper contains data from the Ph.D. thesis of Wenkai Wu as

*well as the M.D. thesis of Lukas Meindlhummer.").* Zwei Drittel der in der Publikation Wu et al. (2021a) analysierten Rohdaten stammte somit aus der vorliegenden Arbeit.

Eine Neuanalyse der Ausreißer in den gepoolten Rohdaten mit der Methode nach Tukey (1977) ergab folgendes Ergebnis (diese Analyse ist nicht in der Publikation Wu et al. (2021a) enthalten):

1. 58 der insgesamt 720 (8,0%) Messwerte (davon 420 Messwerte aus der vorliegenden Arbeit; vgl. Tabelle 3) wurden als Ausreißer identifiziert. Die maximale Anzahl von Ausreißern pro Gruppe von 15 Tieren (Exposition mit rESWs gleicher Energie, gleiche Schalenhälfte und gleiche Messregion) betrug 3; es fand sich keine Häufung von Ausreißern bei zunehmender Energie der verwendeten rESWs. Somit mussten auch die von Herrn Wu registrierten Artefakte bei der Aufarbeitung der Muschelschalen im Labor verursacht worden sein.
2. Die relative Anzahl von Ausreißern bei der Analyse der gepoolten Rohdaten lag für die Daten der vorliegenden Arbeit bei 6,5% (31 Ausreißer bei 480 Messwerten), und für die Daten von Herrn Wu bei 11,1% (27 Ausreißer bei 240 Messwerten). Darüber hinaus wiesen bei der gepoolten Analyse der 48 Gruppen von Tieren jeweils 24 / 17 / 7 / 0 Gruppen von Tieren genau 0 / 1 / 2 / 3 Ausreißer in den Daten der vorliegenden Arbeit auf, und jeweils 30 / 11 / 5 / 2 Gruppen von Tieren genau 0 / 1 / 2 / 3 Ausreißer in den Daten von Herrn Wu. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant (Fisher's exact Test;  $p = 0,241$ ; berechnet mit der Software GraphPad Prism, Version 10.4.0; GraphPad Software). Somit konnten die Daten der vorliegenden Arbeit und die Daten von Herrn Wu für eine gemeinsame statistische Analyse gepoolt werden.

Tabelle 6 zeigt (in Analogie zu Tabelle 4 im Ergebnisteil) für die gepoolten Rohdaten die Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Fluoreszenzsignale für die einzelnen Intensitätsgruppen, Schalenhälften und Messregionen. Tabelle 7 fasst (in Analogie zu Tabelle 5 im Ergebnisteil) die Ergebnisse der statistischen Analyse der in Tabelle 6 gezeigten Daten zusammen. Die Tabellen 6 und 7 finden sich in ähnlicher Form und mit denselben Daten auch in der Publikation Wu et al. (2021a; dort Tabelle 1 und Tabelle 2).

**Tabelle 6:** Mittelwerte ("M") und Standardabweichungen (standard deviation; "SD") der gepoolten Fluoreszenzsignale (berücksichtigt sind alle Rohdaten der vorliegenden Arbeit sowie der zusätzlich von Herrn Wu erhobenen Daten) für die einzelnen Intensitätsgruppen ("Bar"), Schalenhälften und Messregionen (die Abkürzungen "AL" bis "DR" sind in Abbildung 9 illustriert). Die in dieser Tabelle gezeigten Daten finden sich auch in Tabelle 1 in der Publikation Wu et al. (2021a).

Bar	AL		BL		CL		DL		AR		BR		CR		DR	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
0	9,9	0,8	10,8	2,1	10,7	1	9,9	0,6	10,4	1,3	10,1	0,8	10,5	0,9	10	0,7
2	10,8	0,9	10,3	1,1	10,6	0,9	10,1	1	11,3	2,1	10,7	0,9	11,5	1,2	10,9	1,3
2,5	25,7	22,6	12,6	2,2	12,4	2,4	15,5	7,3	12,2	3,2	13	4,3	12,2	2,7	11	1,4
3	18,9	12,8	17,7	10	16,7	8	10,4	1,2	18,3	12	11,7	1,7	12,4	2,8	10,3	0,7
3,5	18,3	15,7	13,2	6,7	11,1	2,2	10,8	1,9	10,9	3,6	11,5	3,3	11,5	3,1	11,3	2,9
4	32,8	32,6	30,9	30,7	22,4	19,1	12,7	3,5	45,5	51,3	10,7	1,3	10,9	0,9	10,7	0,9

**Tabelle 7:** Ergebnisse der statistischen Auswertung der in Tabelle 6 gezeigten Ergebnisse. P-Werte <0,05 sind fettgedruckt dargestellt. Die in dieser Tabelle gezeigten Daten finden sich auch in Tabelle 2 in der Publikation Wu et al. (2021a).

Ergebnisse der linearen Modellanalyse			p						
Intensität der rESWs			<b>&lt;0,001</b>						
Schalenhälfte			<b>0,018</b>						
Messregion			<b>&lt;0,001</b>						
Intensität der rESWs x Schalenhälfte			0,426						
Intensität der rESWs x Messregion			<b>&lt;0,001</b>						
Schalenhälfte x Messregion			0,509						
Intensität der rESWs x Schalenhälfte x Messregion			<b>0,005</b>						
Ergebnisse der post-hoc Bonferroni-Tests zwischen den einzelnen Messregionen A-D untereinander									
Messregion A		Messregion B		Messregion C					
verglichen mit	p	verglichen mit	p	verglichen mit	p				
Messregion B	<b>&lt;0,001</b>								
Messregion C	<b>&lt;0,001</b>	Messregion C	1,000						
Messregion D	<b>&lt;0,001</b>	Messregion D	0,399	Messregion D	1,000				
Ergebnisse der post-hoc Bonferroni-Tests der unterschiedlichen Intensitäten der rESWs untereinander									
4 Bar		3,5 bar		3,0 bar		2,5 bar		2,0 bar	
verglichen mit	p	verglichen mit	p	verglichen mit	p	verglichen mit	p	verglichen mit	p
0 bar	<b>&lt;0,001</b>	0 bar	1,000	0 bar	0,100	0 bar	0,185	0 bar	1,000
2,0 bar	<b>&lt;0,001</b>	2,0 bar	1,000	2 bar	0,278	2 bar	0,478		
2,5 bar	<b>&lt;0,001</b>	2,5 bar	1,000	2,5 bar	1,000				
3,0 bar	<b>&lt;0,001</b>	3 bar	1,000						
3,5 bar	<b>&lt;0,001</b>								

Die in Tabelle 4 (vorliegende Arbeit) und Tabelle 6 (gepoolte Rohdaten; Publikation Wu et al. (2021a) für die scheinbehandelten Tiere (0 Bar) ermittelten mittleren Fluoreszenzsignale unterschieden sich nur minimal, was darauf hindeutet, dass die Analysen der vorliegenden Arbeit und die Analysen von Herrn Wu tatsächlich miteinander vergleichbar sind.

Bei höheren Intensitäten der verwendeten rESWs zeigten sich dann allerdings teilweise deutliche Unterschiede; so waren die Mittelwerte der Fluoreszenzsignale der Messregionen

AL, BL, CL und AR bei der gepoolten Analyse etwa doppelt so groß wie in der vorliegenden Arbeit. Diese Unterschiede hatten auch Auswirkungen auf die Ergebnisse der statistischen Auswertung der mittleren Fluoreszenzsignale (Tabellen 5 und 7).

Eine vergleichende Analyse der Ergebnisse der statistischen Auswertung der mittleren Fluoreszenzsignale (Tabellen 5 und 7) ergab die folgenden Befunde:

1. Die Effekte für die festen Faktoren "Intensität der rESWs" und "Messregion" blieben trotz zusätzlicher Daten bei der gepoolten Analyse statistisch signifikant oder waren sogar noch ausgeprägter. Dies spricht für eine hohe Replizierbarkeit der Haupteffekte über unterschiedliche Tiergruppen hinweg (Tiere 1-10 (Daten der vorliegenden Arbeit) aus dem Fluss Götzinger Aache; Tiere 11-15 (Daten von Herrn Wu) aus dem Fluss Schinderbach).
2. Bei der gepoolten Analyse zeigte sich ein statistisch signifikanter Effekt für den festen Faktor "Schalenhälfte" ( $p = 0,018$ ), der in der vorliegenden Arbeit nicht gefunden wurde. Auf den ersten Blick könnte dies dafür sprechen, dass Herr Wu eine systematische Seitenpräferenz hatte (z. B. kleine Unterschiede im Handling oder der Bildauswertung links vs. rechts). Dagegen sprechen aber die Ergebnisse der scheinbehandelten Tiere sowie die Tatsache, dass die Analysen der Fluoreszenzsignale mit einer Methode durchgeführt wurden, die praktisch unabhängig vom Untersucher ist. Viel wahrscheinlicher ist, dass Herr Wu Tiere mit anderen anatomischen Feinheiten untersucht hat. Da sowohl in der vorliegenden Arbeit wie auch von Herrn Wu Zebramuscheln untersucht wurden, die von Frau Dr. Sternecker gesammelt worden waren, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass Unterschiede in den aquatischen Umgebungen im Abfluss des Waginger Sees (Fluss Götzinger Aache; Daten der vorliegenden Arbeit) und im Zufluss des Waginger Sees (Fluss Schinderbach; Daten von Herrn Wu) zu den hier berichteten Unterschieden in der Reaktion der Tiere auf die Exposition mit rESWs geführt haben. Dieser Befund ist deswegen wichtig, weil es sich bei den in der vorliegenden Arbeit bzw. den von Herrn Wu untersuchten Zebramuscheln nicht um Labortiere handelte, die über mehrere Generationen unter sehr ähnlichen bzw. identischen Bedingungen gehalten wurden. Eine Überprüfung dieser Hypothese würde eine vollständige Wiederholung der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche, histologischen Aufarbeitungen und Analysen durch dieselbe Untersucherin bzw. denselben Untersucher an Zebramuscheln aus verschiedenen aquatischen Umgebungen erfordern. Für die aquatische Systembiologie mag dies evtl. von Relevanz sein; für die Humanmedizin erscheint die Überprüfung dieser Hypothese vor dem

Hintergrund des erforderlichen Aufwands, dem zu erwartenden Erkenntnisgewinn und insbesondere der Vergleichbarkeit der grundlegenden Schlussfolgerungen der vorliegenden Arbeit und der Publikation Wu et al. (2021a) jedoch nicht gerechtfertigt.

3. Beim paarweisen Vergleich fanden sich in der vorliegenden Arbeit statistisch signifikante Unterschiede in den mittleren Fluoreszenzsignalen zwischen den Intensitäten 0 Bar und 2,5 Bar bzw. 0 Bar und 3 Bar (Tabelle 5), die bei der gepoolten Analyse nicht gefunden wurden (Tabelle 7). Dies war aller Wahrscheinlichkeit nach auf die größere Standardabweichung der Daten in der gepoolten Analyse zurückzuführen.

Zusammenfassend zeigten sich bei der gepoolten Analyse im Vergleich zur vorliegenden Arbeit die folgenden Effekte:

- Stabilität von Haupteffekten: Die Haupteffekte (Intensität der rESWs, Messregion) waren reproduzierbar, was für eine starke biologische Basis der erhobenen Daten spricht.
- Neuer Schalenhälften-Effekt: Dieser Effekt war höchstwahrscheinlich auf echte biologische Streuung (Unterschiede in den aquatischen Umgebungen im Abfluss und Zufluss des Waginger Sees) zurückzuführen.
- Abgeschwächte post-hoc Signifikanzen: Dies war ein Hinweis auf zunehmende Varianz der erhobenen Fluoreszenzsignale, bedingt durch Unterschiede in den aquatischen Umgebungen.
- Statistischer "Lerneffekt": Die Kombination aus wiederholter Struktur und größerer Heterogenität erlaubt robustere Aussagen über einen Gesamteffekt, kann aber Feinauflösungen zwischen benachbarten Gruppen reduzieren.

In der Zusammenschau der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie der Publikation Wu et al. (2021a) konnte ein Zusammenhang zwischen der Intensität der rESWs, der stimulierten Region der Muschelschale und der Biomineralisierung gezeigt werden. Dies entspricht auch Ergebnissen von Zhang et al. (2021), die bei der Behandlung von Patienten mit Kniegelenksarthrose eine bessere Wirkung von rESWT mit höherer Intensität bezogen auf die Abnahme der Beschwerden in der Kontrolluntersuchung nach 4 Wochen berichteten. Eine andere Studie an Ratten wiederum zeigte, dass rESWT einen positiven Einfluss auf die Knochenheilung hat. Diese kamen jedoch zu dem Ergebnis, dass die verwendete Intensität dafür nicht entscheidend sei (Inoue et al., 2021). Dabei wurden Intensitäten zwischen 1,0 und

4,0 Bar, ähnlich wie in dieser Studie, verwendet. Nachteilig wurde in der Studie von Inoue et al. (2021) jedoch angemerkt, dass es bei Verwendung höherer Intensitäten zu einer verstärkten Kallusbildung kam, welche auch über den Beobachtungszeitraum von fünf Wochen hinaus persistierte. In der Kontrollgruppe zeigte sich dies wieder regredient. Ob dieses Phänomen so auch beim Menschen auftritt, ist nicht bekannt.

Bezogen auf die Verwendung von rESWT stellen die Ergebnisse dieser Studie ein Novum dar. Die einzige bisherige Studie über die Wirkung von ESWT an Muscheln wurde mit fokussierter ESWT durchgeführt (Sternecker et al., 2018).

Andere Studien, welche ebenfalls mit Muscheln und Stoßwellen arbeiteten, verwendeten letztgenannte beispielsweise, um Muschelpopulationen zu reduzieren, in dem die Tiere durch die hohen Energien getötet oder zumindest von dem zuvor besiedelten Objekt gelöst wurden. Dabei wurde Energien zwischen 162 und 1,458 kJ verwendet (Ge et al., 2019), die aber mit den in der vorliegenden Studie verwendeten Energien nicht vergleichbar sind. Dadurch wurden bis zu ca. 75% der Tiere mit der höchsten Intensitätsstufe getötet. Andere Studien, die auch eine Tötung der Tiere als Ziel hatte, arbeiteten ebenso mit viel höheren Intensitäten, beispielsweise 5,8J/m<sup>2</sup> (Schaefer et al., 2010).

Im Vergleich zu den genannten Studien betrug die Energie in der vorliegenden Arbeit, welche die Muschelschale erreichte, in etwa 0,11mJ/mm<sup>2</sup> in der 4 Bar Gruppe (Cszaszar et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass die verwendeten, geringen Intensitäten zu keiner gesteigerten Mortalität der Versuchstiere über alle Gruppen hinweg führten, was abermals die Sicherheit der rEWST unterstreicht.

Das entstandene erhöhte Fluoreszenzsignal in der Muschelschale nach Applikation der Stoßwellen konnte im Hypostrakum nachgewiesen werden, jener Schicht, die auch auf mechanische Traumata mit einer gesteigerten Biominalisierung reagiert (Beedham, 1965; Mount et al., 2004). Zum gleichen Ergebnis kamen auch Sternecker et al. (2018), die die Wirkung fokussierter Stoßwellen auf Muscheln untersuchten.

Wie in der vorliegenden Arbeit auch fanden Sternecker et al. (2018) das durch die Exposition mit Stoßwellen verursachte Fluoreszenzsignal nicht über die gesamte Schalenlänge konstant verteilt, sondern vom Umbo (in der Nähe von Messstelle A) in Richtung der Wachstumszone (nahe Messstelle D) abnehmend. Dies entspricht auch dem bekannten physiologischen Prozess der Mineralisierung von Muschelschalen (Ramón & Richardson, 1992; Addadi et al., 2006).

Bezüglich der klinischen Wirksamkeit der ESWT scheint es im Outcome der hier vorliegenden Studie sowie der Studie von Sternecker et al. (2018) keine pauschale Klarheit darüber zu geben, welche Art der Stoßwelle (fESWT oder rESWT) effektiver ist. Für die klinische Anwendung der ESWT bei der Behandlung von Pseudarthrosen fanden Kertzman et al. (2017) eine mittlerere Erfolgsrate von ca. 75%, die in etwa der mittleren Erfolgsrate bei der Behandlung von Pseudarthrosen mit fESWT entspricht (Kertzman et al., 2017).

Für die Auswahl des Therapieverfahrens bei der Behandlung von Pseudarthrosen (fESWT oder rESWT) ergeben die hier diskutierten Studien (vorliegende Studie und Sternecker et al., 2018) insgesamt keine pauschale Empfehlung. Vielmehr muss insbesondere die Lage des betroffenen Knochens im Körper berücksichtigt werden. Liegt das zu behandelnde Ziel tiefer im Gewebe, zeigt sich fESWT überlegen, bei oberflächlicher gelegenen Zielregionen und größeren zu behandelnden Strukturen oder Flächen scheint rESWT besser geeignet.

## Limitierungen

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, an einem Tiermodell (Zebramuscheln) neue Erkenntnisse über die Wirkung radialer Stoßwellen zu gewinnen, welche dann möglicherweise in der klinischen Anwendung am Menschen genutzt werden können. In Anbetracht dessen ergeben sich zweifellos einige Limitierungen.

Es muss der offensichtliche Umstand erwähnt werden, dass die Versuche an einem wirbellosen Modellorganismus (Zebramuscheln) erfolgten. Diese weisen wie bereits erwähnt zwar generelle Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Biomineralisierung mit Wirbeltieren (und somit dem Menschen) auf, zeigen jedoch auch erhebliche Unterschiede im Vergleich zu menschlichen Knochen. Somit wird versucht, Erkenntnisse für die Behandlung von (unter anderem) knöchernen Verletzungen am Menschen an einem wirbellosen Tiermodell zu gewinnen. Ein gewisser Übertrag sollte jedoch aufgrund der Ähnlichkeiten möglich sein (vgl. auch Sternecker et al., 2018).

Ergebnisse zu den Effekten von rESWT variieren jedoch. So postulierte beispielsweise eine frühere Studie (Notarnicola et al., 2012), dass radiale Stoßwellentherapie nicht geeignet sei, um eine erhöhte Osteoblastenaktivität zu induzieren. In dieser Studie wurden Osteoblasten in Zellkulturen nach Exposition mit rESWs untersucht, wobei mit  $0.05 \text{ mJ/mm}^2$  nur eine sehr geringe EFD zur Anwendung kam (Notarnicola et al., 2012). Mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten rESWT-Gerät wird diese EFD bei ca. 1,8 Bar Arbeitsdruck erzielt (Csaszar et al.,

2015). Andere Studien wiederum zeigten sehr wohl ein gesteigertes Knochenwachstum oder eine Knochenbildung nach Exposition von Versuchstieren mit rESWs (Gollwitzer et al., 2013; Ramesh et al., 2020). Gollwitzer et al. (2013) konnten in ihrer Studie eine gesteigerte Knochenneubildung bei Kaninchen nach Exposition mit rESWs nachweisen, wobei dasselbe rESWT-Gerät wie in der vorliegenden Arbeit und ein Arbeitsdruck von 4 Bar verwendet wurden. Ramesh et al. (2020) untersuchten die Auswirkung der Exposition von kultivierten, fetalen Rattenknochen mit rESWs auf das Knochenwachstum. Dabei zeigte sich sowohl eine Zunahme des Knochenwachstums als auch eine Steigerung der Chondrogenese.

Außerdem wurden in der vorliegenden Arbeit nur die Auswirkungen einer einmaligen Applikation von rESWs untersucht, was nicht der klinischen Realität entspricht (vgl. 3-4 Behandlungen mit rESWT bei Pseudarthrosen in einer Studie von Kertzman et al. (2017) mit demselben rESWT-Gerät wie in der vorliegenden Arbeit verwendet). Eine Aussage auf den weiteren Verlauf der Biomineralisierung durch wiederholte Exposition von Zebramuscheln mit rESWs konnte daher nicht getroffen werden.

Ferner ist anzumerken, dass die vorliegende Arbeit nicht zu einem besseren Verständnis der molekularen und zellulären Mechanismen bei der Induktion von Biomineralisierung durch rESWs beiträgt. Stattdessen wurden ausschließlich die Folgen dieser molekularen und zellulären Vorgänge untersucht. Dies ist jedoch als wichtiger erster Schritt zu werten, da im Fall eines Negativ-Ergebnisses der vorliegenden Arbeit eine Untersuchung dieser molekularen und zellulären Vorgänge überflüssig wäre. Dies ist jedoch nicht der Fall.

Da mit Ausnahme der erwähnten Studie von Sternecker et al. (2018) alle bisherigen Studien zu molekularen und zellulären Mechanismen bei der Induktion von Biomineralisierung mittels extrakorporalen Stoßwellen ausschließlich an Zellkulturen oder Vertebraten durchgeführt wurden (u.a. Tischer et al., 2008; Gollwitzer et al., 2013), stellt die Exposition einer wirbellosen Spezies mit rESWs in der vorliegenden Arbeit ein Novum dar.

## Fazit

Zusammenfassend lässt sich mit Hilfe der vorliegenden Arbeit feststellen, dass durch die Applikation von rESWs der Prozess der Biomineralisierung am Tiermodell der Zebramuschel induziert werden kann.

Somit kann die vorliegende Arbeit insbesondere dazu beitragen, zu verstehen, warum eine höhere EFD der applizierten Stoßwellen nicht zwangsläufig zu einer stärkeren Antwort des Organismus oder gesteigerten Erfolgsraten bei der Anwendung von rESWT bei der Behandlung von Pseudarthrosen (Kertzman et al., 2017) führt, sofern ein bestimmter Schwellenwert zumindest erreicht wurde. Es ist denkbar, dass jenseits dieses Schwellenwerts zumindest für die Induktion von Biomineralisierung keine weitere Steigerung mehr möglich ist. Dafür würde auch sprechen, dass bei der Behandlung von Pseudarthrosen mit fESWs mit  $EFD = 0.7 \text{ mJ/mm}^2$  gegenüber fESWs mit  $EFD = 0.4 \text{ mJ/mm}^2$  kein besseres Ergebnis erzielt wurde (Cacchio et al., 2009).

Darüber hinaus bietet sich das in der vorliegenden Arbeit verwendete Tiermodell an, um in weiteren Studien zu untersuchen, ob eine wiederholte Exposition mit rESWs im Vergleich zu einer einmaligen Exposition zu einer weiter gesteigerten Induktion der Biomineralisierung führt.

Schließlich zeigte die vorliegende Arbeit ebenfalls (wie auch schon bei Sternecker et al. (2018) gezeigt), dass die physiologische Antwort auf den externen Reiz nicht nur auf die unmittelbar exponierten Abschnitte der Schale beschränkt war, sondern auch zu Biomineralisierung in nicht direkt exponiertem mineralisiertem Gewebe führte. Auch dies ist ein für die klinische Anwendung außerordentlich wichtiger Befund, da bei der Behandlung von Pseudarthrosen mit rESWT nicht exakt auf die Stelle der Pseudarthrose gezielt werden muss, was ohne Bildgebung gar nicht möglich wäre. Es erscheint ausreichend, dass Zielgebiet ungefähr eingrenzen zu können und dann entsprechend mit rESWs ohne Bildgebung zu behandeln.

## Literaturverzeichnis

- Ackermann PW, Finn A, Ahmed M. Sensory neuropeptidergic pattern in tendon, ligament and joint capsule. A study in the rat. *Neuroreport* 1999;10(10):2055-2060.
- Adams G, Soukas PA, Mehrle A, Bertolet B, Armstrong EJ. Intravascular lithotripsy for treatment of calcified infrapopliteal lesions: results from the disrupt PAD III observational study. *J Endovasc Ther* 2022;29(1):76-83.
- Addadi L, Joester D, Nudelman F, Weiner S. Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chemistry* 2006;12(4):980-987.
- Ajubi NE, Klein-Nulend J, Nijweide PJ, Vrijheid-Lammers T, Alblas MJ, Burger EH. Pulsating fluid flow increases prostaglandin production by cultured chicken osteocytes--a cytoskeleton-dependent process. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;225(1):62-68.
- Alavi SNR, Neishaboori AM, Yousefifard M. Extracorporeal shockwave therapy in spinal cord injury, early to advance to clinical trials? A systematic review and meta-analysis on animal studies. *Neuroradiol J* 2021;34(6):552-561.
- Anderson HC. Matrix vesicles and calcification. *Curr Rheumatol Rep* 2003;5(3):222-226.
- Atlan G, Balmain N, Berland S, Vidal B, Lopez E. Reconstruction of human maxillary defects with nacre powder: histological evidence for bone regeneration. *C R Acad Sci III* 1997;320(3):253-258.
- Bachmann C E, Gruber G, Konermann W, Arnold A, Gruber G, Ueberle F. Pseudarthrose. In: Bachmann C E, Gruber G, Konermann W, Arnold A, Gruber G, Ueberle F (eds): *ESWT und Sonographie der Stütz- und Bewegungsorgane*. Springer, Berlin, 1999, pp.115-117.
- Backman LJ, Fong G, Andersson G, Scott A, Danielson P. Substance P is a mechanoresponsive, autocrine regulator of human tenocyte proliferation. *PLoS One* 2011;6(11):e27209.
- Beedham G. Observations on the non-calcareous component of the shell of the Lamellibranchia. *J Cell Sci* 1958;3(47):341-358.
- Beedham GH. Repair of the shell in species of Anodonta. *Proc Zool Soc London* 1965;145(1):107-123.
- Beggel S, Cerwenka A, Brandner J, Geist J. Shell morphological versus genetic identification of quagga mussel (*Dreissena bugensis*) and zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquat Invas* 2015;10:93-99.
- Bers AV, D'Souza F, Kijnstra JW, Willemsen PR, Wahl M. Chemical defence in mussels: antifouling effect of crude extracts of the periostracum of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Biofouling* 2006;22(3-4):251-259.
- Bias R, Karbe L. Bioaccumulation and partitioning of cadmium within the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* Pallas. *Int Rev Hydrobiol Hydrograph* 1985;70(1):113-125.
- Böhmer HJ, Heger T, Trepl L. Fallstudien zu gebietsfremden Arten in Deutschland. Texte des Umweltbundesamtes, Dessau, 2001.
- Booy O, Cornwell L, Parrott D, Sutton-Croft M, Williams F. Impact of biological invasions on infrastructure. In: Vilà M, Hulme PE (eds.): *Impact of Biological Invasions on Ecosystem Services*. Springer, Berlin; 2017, pp. 235-247.

Brinton TJ, Ali ZA, Hill JM, Meredith IT, Maehara A, Illindala U, Lansky A, Götberg M, Van Mieghem NM, Whitbourn R, Fajadet J, Di Mario C. Feasibility of shockwave coronary intravascular lithotripsy for the treatment of calcified coronary stenoses. *Circulation* 2019;139(6):834-836.

Brümmer F, Schill R O, Shegeftard N, Tersteegen J, Vetter W. Zur Biologie und Ökologie der Dreikantmuscheln *Dreissena polymorpha* (Zebra-Muschel) und *Dreissena rostriformis bugensis* (Quagga-Muschel)(Bivalvia: Dreissenidae) sowie zu deren Verbreitung in Baden-Württemberg. *Jahreshefte der Gesellschaft für Naturkunde in Württemberg* 2021;176:319-390.

Bruzzaniti A, Baron R. Molecular regulation of osteoclast activity. *Rev Endocr Metab Disord* 2006;7(1-2):123-139.

Burger EH, Klein-Nulend J. Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *FASEB J* 1999;13 Suppl:S101-S112.

Busch M, Chourbaji S, Dammann P, Finger-Baier K, Gerold S, Haemisch A, Jirkof P, Osterkamp A, Ott S, Peters S, Spekl K. Tiergerechte Haltung von Laborratten. [https://www.gv-solas.de/wp-content/uploads/2017/10/Tiergerechte-Haltung-Ratten\\_2017.pdf](https://www.gv-solas.de/wp-content/uploads/2017/10/Tiergerechte-Haltung-Ratten_2017.pdf)

Cacchio A, Giordano L, Colafarina O, Rompe JD, Tavernese E, Ioppolo F, Flamini S, Spacca G, Santilli V. Extracorporeal shock-wave therapy compared with surgery for hypertrophic long-bone nonunions. *J Bone Joint Surg Am* 2009;91(11):2589-2597.

Calori GM, Phillips M, Jeetle S, Tagliabue L, Giannoudis PV. Classification of non-union: need for a new scoring system? *Injury* 2008;39 Suppl 2:S59-S63.

Camusso M, Balestrini R, Binelli A. Use of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) to assess trace metal contamination in the largest Italian subalpine lakes. *Chemosphere* 2001;44(2):263-270.

Caraco NF, Cole JJ, Raymond PA, Strayer DL, Pace ML, Findlay SE, Fischer DT. Zebra mussel invasion in a large, turbid river: phytoplankton response to increased grazing. *Ecology* 1997;78(2):588-602.

Carlsson O, Schizas N, Li J, Ackermann PW. Substance P injections enhance tissue proliferation and regulate sensory nerve ingrowth in rat tendon repair. *Scand J Med Sci Sports* 2011;21(4):562-569.

Carter JG, Clark GR. Classification and phylogenetic significance of molluscan shell microstructure. *Notes Short Course Studies Geology* 1985;13:50-71.

Cartledge JJ, Cross WR, Lloyd SN, Joyce AD. The efficacy of a range of contact media as coupling agents in extracorporeal shockwave lithotripsy. *BJU Int* 2001;88(4):321-324.

Chambers TJ. The pathobiology of the osteoclast. *J Clin Pathol* 1985;38(3):241-252.

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

Chen G, Deng C, Li YP. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci* 2012;8(2):272-288.

Chen YJ, Wurtz T, Wang CJ, Kuo YR, Yang KD, Huang HC, Wang FS. 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* 2004;22(3):526-534.

Cheng JH, Wang CJ. Biological mechanism of shockwave in bone. *Int J Surg* 2015;24(Pt B):143-146.

Chitnis PV, Cleveland RO. Quantitative measurements of acoustic emissions from cavitation at the surface of a stone in response to a lithotripter shock wave. *J Acoust Soc Am* 2006;119(4):1929-1932.

Cho SM, Jeong WG. Prismatic shell repairs by hemocytes in the extrapallial fluid of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Kor J Malacol* 2011;27(3):223-228.

Claes L, Grass R, Schmickal T, Kisse B, Eggers C, Gerngross H, Mutschler W, Arand M, Wintermeyer T, Wentzzenen A. Monitoring and healing analysis of 100 tibial shaft fractures. *Langenbecks Arch Surg* 2002;387(3-4):146-152.

Cleveland RO, Chitnis PV, McClure SR. Acoustic field of a ballistic shock wave therapy device. *Ultrasound Med Biol* 2007;33(8):1327-1335.

Cowin SC. Mechanical modeling of the stress adaptation process in bone. *Calcif Tissue Int* 1984;36 Suppl 1:S98-S103.

Crane RL, Diaz Reyes JL, Denny MW. Bivalves rapidly repair shells damaged by fatigue and bolster strength. *J Exp Biol* 2021;224(19):jeb242681.

Császár NB, Angstman NB, Milz S, Sprecher CM, Kobel P, Farhat M, Furia JP, Schmitz C. Radial shock wave devices generate cavitation. *PLoS One* 2015;10(10):e0140541.

Dauphin Y, Marin F. The compositional analysis of recent cephalopod shell carbohydrates by Fourier transform infrared spectrometry and high performance anion exchange-pulsed amperometric detection. *Experientia* 1995;51(3):278-283.

Debus J, Peschke P, Hahn EW, Lorenz WJ, Lorenz A, Ifflaender H, Zabel HJ, Van Kaick G, Pfeiler M. Treatment of the Dunning prostate rat tumor R3327-AT1 with pulsed high energy ultrasound shock waves (PHEUS): growth delay and histomorphologic changes. *J Urol* 1991;146(4):1143-1146.

Delacrétaz G, Rink K, Pittomvils G, Lafaut JP, Vandeursen H, Boving R. Importance of the implosion of ESWL-induced cavitation bubbles. *Ultrasound Med Biol* 1995;21(1):97-103.

Desai J, Huyghe E, Maffulli GD, Nussbaum C, Tittelmeier J, Schmitz C. Extracorporeal shock wave therapy for erectile dysfunction: rethinking study design, implementation, and analysis. 2024 medRxiv <https://doi.org/10.1101/2024.12.10.24318762>

Dickson GR, Geddis C, Fazzalari N, Marsh D, Parkinson I. Microcomputed tomography imaging in a rat model of delayed union/non-union fracture. *J Orthop Res* 2008;26(5):729-736.

Dillaman R, Ford S. Measurement of calcium carbonate deposition in molluscs by controlled etching of radioactively labeled shells. *Marine Biol* 1982;66(2):133-143.

Dolibog P, Franek A, Brzezińska-Wcisło L, Dolibog P, Wróbel B, Arasiewicz H, Chmielewska D. Shockwave therapy in selected soft tissue diseases: a literature review. *J Wound Care* 2018;27(9):573-583.

Duan TT, Xu XY, Qu FZ, Guo Y, Yan SQ, Wang LL, Ruan GG, Wang JH, Xin PX, Huang YS. Research on multiscale structure, component and property of meretrix lusoria shell. *J Phys Conf Ser* 2023;2460 012086.

Effler SW, Matthews DA, Brooks-Matthews CM, Perkins MG, Siegfried CA, Hassett JM. Water quality impacts and indicators of metabolic activity of the zebra mussel invasion of the seneca river 1. *JAWRA* 2004;40(3):737-754.

Eid J. Consensus statement on ESWT indications and contraindications. <https://shockwavetherapy.org/wp-content/uploads/2023/11/ISMST-consensus-statement-on-indications-and-contraindications-20161012-final.pdf>

Essl F, Bacher S, Genovesi P, Hulme PE, Jeschke JM, Katsanevakis S, Kowarik I, Kühn I, Pyšek P, Rabitsch W, Schindler S, van Kleunen M, Vilà M, Wilson JR, Richardson DM. Which taxa are alien? Criteria, applications, and uncertainties. *BioScience* 2018;68(7):496-509.

Everest FA, Pohlmann KC. Master Handbook of Acoustics, 7<sup>th</sup> ed. McGraw Hill TAB, New York, 2021.

Fedorczyk JM, Barr AE, Rani S, Gao HG, Amin M, Amin S, Litvin J, Barbe MF. Exposure-dependent increases in IL-1beta, substance P, CTGF, and tendinosis in flexor digitorum tendons with upper extremity repetitive strain injury. *J Orthop Res* 2010;28(3):298-307.

Felix R, Cecchini MG, Fleisch H. Macrophage colony stimulating factor restores in vivo bone resorption in the op/op osteopetrosis mouse. *Endocrinology* 1990;127(5):2592-2594.

Fleury C, Marin F, Marie B, Luquet G, Thomas J, Josse C, Serpentini A, Lebel JM. Shell repair process in the green ormer *Haliotis tuberculata*: a histological and microstructural study. *Tissue Cell* 2008;40(3):207-218.

Folberth W, Köhler G, Rohwedder A, Matura E. Pressure distribution and energy flow in the focal region of two different electromagnetic shock wave sources. *J Stone Dis* 1992;4(1):1-7.

Fournié J, Chétail M. Accumulation calcique au niveau cellulaire chez les mollusques. *Malacologia* 1982;22:265-284.

Franzén H, Nilsson LT, Strömquist B, Johnsson R, Herrlin K. Secondary total hip replacement after fractures of the femoral neck. *J Bone Joint Surg Br* 1990;72(5):784-787.

Fuente M, Auersperg V, Dietz-Laursonn K, Ginter S, Dorfmüller C, Khaled W, Ueberle F, Fournier M, Pecha R, Vallon P, Schwarze W, Reitmajer R. Recommendation statement of the Conjoint Physics Working Group of ISMST and DIGEST on ESWT study design and publication. <https://shockwavetherapy.org/ismst-recommendations/>

Garton DW, Johnson LE. Variation in growth rates of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, within Lake Wawasee. *Freshwater Biol* 2008;45(4):443-451.

Ge H, Wang H, Gao Z. Control of mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck fouling in water-cooling systems using plasma discharge. *Water Sci Technol* 2019;80(6):1125-1133.

Gerber R, Studer UE, Danuser H. Is newer always better? A comparative study of 3 lithotriptor generations. *J Urol* 2005;173(6):2013-2016.

Gerdesmeyer L, Maier M, Haake M, Schmitz C. Physikalisch-technische Grundlagen der extrakorporalen Stosswellentherapie (ESWT) [Physical-technical principles of extracorporeal shockwave therapy (ESWT)]. *Orthopade* 2002;31(7):610-617. German.

Goggin PM, Zygalakis KC, Oreffo RO, Schneider P. High-resolution 3D imaging of osteocytes and computational modelling in mechanobiology: insights on bone development, ageing, health and disease. *Eur Cell Mater* 2016;31:264-295.

Gollwitzer H, Gloeck T, Roessner M, Langer R, Horn C, Gerdesmeyer L, Diehl P. Radial extracorporeal shock wave therapy (rESWT) induces new bone formation in vivo: results of an animal study in rabbits. *Ultrasound Med Biol* 2013;39(1):126-133.

Granz B, Köhler G. What makes a shock wave efficient in lithotripsy? *J Stone Dis* 1992;4(2):123-128.

Guo J, Hai H, Ma Y. Application of extracorporeal shock wave therapy in nervous system diseases: A review. *Front Neurol* 2022;13:963849.

Haake M, Böddeker IR, Decker T, Buch M, Vogel M, Labek G, Maier M, Loew M, Maier-Boerries O, Fischer J, Betthäuser A, Rehack HC, Kanovsky W, Müller I, Gerdesmeyer L, Rompe JD. Side-effects of extracorporeal shock wave therapy (ESWT) in the treatment of tennis elbow. *Arch Orthop Trauma Surg* 2002;122(4):222-228.

Haupt G. Use of extracorporeal shock waves in the treatment of pseudarthrosis, tendinopathy and other orthopedic diseases. *J Urol* 1997;158(1):4-11.

Hausdorf J, Lemmens MA, Heck KD, Grolms N, Korr H, Kertschanska S, Steinbusch HW, Schmitz C, Maier M. Selective loss of unmyelinated nerve fibers after extracorporeal shockwave application to the musculoskeletal system. *Neuroscience* 2008;155(1):138-144.

Hofmann A, Ritz U, Hessmann MH, Alini M, Rommens PM, Rompe JD. Extracorporeal shock wave-mediated changes in proliferation, differentiation, and gene expression of human osteoblasts. *J Trauma* 2008;65(6):1402-1410.

Horobin R, Kiernan J. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine. Taylor & Francis, London, 2020.

Howard D, Sturtevant B. In vitro study of the mechanical effects of shock-wave lithotripsy. *Ultrasound Med Biol* 1997;23(7):1107-1122.

Huang W, Yang S, Shao J, Li YP. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci* 2007;12:3068-3092.

Huiskes R, Ruimerman R, van Lenthe GH, Janssen JD. Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone. *Nature* 2000;405(6787):704-706.

Immel F, Broussard C, Catherinet B, Plasseraud L, Alcaraz G, Bundeleva I, Marin F. The shell of the invasive bivalve species *dreissena polymorpha*: biochemical, elemental and textural investigations. *PLoS One* 2016;11(5):e0154264.

Ingersoll CG, Augspurger TP, Barnhart C, Bidwell J, Bishop C, Black M, Cope G, Bringolf RB, Dwyer FJ, Greer IE, Keller A, Linder G, Neves RJ, Newton TJ, Pepino R, Roberts A, Roberts C, Salazar M, Samuel A, Stephan CD, Van Hassel JH, Wang N. Standard guide for conducting laboratory toxicity tests with freshwater mussels. Special Technical Report ASTM E2455-06, 2006. <https://doi.org/10.1520/E2455-06R13>.

Inoue S, Hatakeyama J, Aoki H, Kuroki H, Niikura T, Oe K, Fukui T, Kuroda R, Akisue T, Moriyama H. Effects of ultrasound, radial extracorporeal shock waves, and electrical stimulation on rat bone defect healing. *Ann N Y Acad Sci* 2021;1497(1):3-14.

Isaji S. Formation of organic sheets in the inner shell layer of *Geloina* (Bivalvia: Corbiculidae): an adaptive response to shell dissolution. *The Veliger* 1993;36(2):166-173.

ISMST. Physical principles of ESWT. <https://shockwavetherapy.org/physical-principles-of-eswt/>

Jackson AP, Vincent JFV, Turner RM Comparison of nacre with other ceramic composites. *J Mat Sci*, 1990;25(7):3173-3178.

Jantz B, Neumann D. Growth and reproductive cycle of the zebra mussel in the River Rhine as studied in a river bypass. *Oecologia* 1998;114(2):213-225.

Jenne J. Kavitation in biologischem Gewebe [Cavitations in biological tissues]. *Ultraschall Med* 2001;22(5):200-7. German.

Jia G, Ma J, Wang S, Wu D, Tan B, Yin Y, Jia L, Cheng L. Long-term effects of extracorporeal shock wave therapy on poststroke spasticity: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2020;29(3):104591.

Jocham D, Chaussy C, Schmiedt E. Extracorporeal shock wave lithotripsy. *Urol Int* 1986;41(5):357-368.

Jokinen LLJ, Wuerfel T, Schmitz C. Opinion: Application of extracorporeal shock wave therapy in nervous system diseases. *Front Neurol* 2023;14:1281684.

Jolly C, Berland S, Milet C, Borzeix S, Lopez E, Doumenc D. Zona localization of shell matrix proteins in mantle of *Haliotis tuberculata* (Mollusca, Gastropoda). *Mar Biotechnol* 2004;6(6):541-551.

Kaehler S, McQuaid C. Use of the fluorochrome calcein as an in situ growth marker in the brown mussel *Perna perna*. *Marine Biol* 1999;133(3):455-460.

Kearney CJ, Prevost T, Socrate S, Cleveland RO, Spector M. Pressure-time profiles of a focused and a radial shockwave device: Measurements in tissue, ex vivo, and in a water bath. *J Acoust Soc Am* 2010;128(4):2364.

Kenmoku T, Ochiai N, Ohtori S, Saisu T, Sasho T, Nakagawa K, Iwakura N, Miyagi M, Ishikawa T, Tatsuoka H, Inoue G, Nakamura J, Kishida S, Saito A, Takahashi K. Degeneration and recovery of the neuromuscular junction after application of extracorporeal shock wave therapy. *J Orthop Res* 2012;30(10):1660-1665.

Kenmoku T, Iwakura N, Ochiai N, Saisu T, Ohtori S, Takahashi K, Nakazawa T, Fukuda M, Takaso M. Influence of different energy patterns on efficacy of radial shock wave therapy. *J Orthop Sci* 2021;26(4):698-703.

Kertzman P, Császár NBM, Furia JP, Schmitz C. Radial extracorporeal shock wave therapy is efficient and safe in the treatment of fracture nonunions of superficial bones: a retrospective case series. *J Orthop Surg Res* 2017;12(1):164.

Kim HY, Yoon JY, Yun JH, Cho KW, Lee SH, Rhee YM, Jung HS, Lim HJ, Lee H, Choi J, Heo JN, Lee W, No KT, Min D, Choi KY. CXXC5 is a negative-feedback regulator of the Wnt/β-catenin pathway involved in osteoblast differentiation. *Cell Death Differ* 2015;22(6):912-920.

Kishimoto T, Yamamoto K, Sugimoto T, Yoshihara H, Maekawa M. Side effects of extracorporeal shock-wave exposure in patients treated by extracorporeal shock-wave lithotripsy for upper urinary tract stone. *Eur Urol* 1986;12(5):308-313.

Klein-Nulend J, van der Plas A, Semeins CM, Ajubi NE, Frangos JA, Nijweide PJ, Burger EH. Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. *FASEB J* 1995;9(5):441-445.

Klein-Nulend J, Bakker AD, Bacabac RG, Vatsa A, Weinbaum S. Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bone* 2013;54(2):182-190.

Klonschinski T, Ament SJ, Schlereth T, Rompe JD, Birklein F. Application of local anesthesia inhibits effects of low-energy extracorporeal shock wave treatment (ESWT) on nociceptors. *Pain Med* 2011;12(10):1532-1537.

Knothe Tate ML, Falls TD, McBride SH, Atit R, Knothe UR. Mechanical modulation of osteochondroprogenitor cell fate. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(12):2720-2738.

Ko NY, Chang CN, Cheng CH, Yu HK, Hu GC. Comparative effectiveness of focused extracorporeal versus radial extracorporeal shockwave therapy for knee osteoarthritis-randomized controlled study. *Int J Environ Res Public Health* 2022;19(15):9001.

Krause H. Physik und Technik medizinischer Stosswellensysteme. In: Rompe JD (ed). *Extrakorporale Stosswellentherapie. Grundlagen, Indikation, Anwendung*. Chapman and Hall, London, 1997, pp. 15-34.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93(2):165-176.

Li S, Liu Y, Liu C, Huang J, Zheng G, Xie L, Zhang R. Hemocytes participate in calcium carbonate crystal formation, transportation and shell regeneration in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish Shellfish Immunol* 2016;51:263-270.

Liao CD, Tsauo JY, Liou TH, Chen HC, Huang SW. Clinical efficacy of extracorporeal shockwave therapy for knee osteoarthritis: a systematic review and meta-regression of randomized controlled trials. *Clin Rehabil* 2019;33(9):1419-1430.

Link KA, Koenig JB, Silveira A, Plattner BL, Lillie BN. Effect of unfocused extracorporeal shock wave therapy on growth factor gene expression in wounds and intact skin of horses. *Am J Vet Res* 2013;74(2):324-332.

Loew M, Jurgowski W, Thomsen M. Die Wirkung extrakorporaler Stosswellen auf die Tendinosis calcarea der Schulter. Ein vorläufiger Bericht [Effect of extracorporeal shockwave therapy on tendinosis calcarea of the shoulder. A preliminary report]. *Urologe A* 1995;34(1):49-53. German.

Lokhandwalla M, Sturtevant B. Fracture mechanics model of stone comminution in ESWL and implications for tissue damage. *Phys Med Biol* 2000;45(7):1923-1940.

Lopes-Lima M, Ribeiro I, Pinto RA, Machado J. Isolation, purification and characterization of glycosaminoglycans in the fluids of the mollusc *Anodonta cygnea*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2005;141(3):319-326.

Lopes-Lima M, Bleher R, Forg T, Hafner M, Machado J. Studies on a PMCA-like protein in the outer mantle epithelium of *Anodonta cygnea*: insights on calcium transcellular dynamics. *J Comp Physiol B* 2008;178(1):17-25.

Lopez E, Vidal B, Berland S, Camprasse S, Camprasse G, Silve C. Demonstration of the capacity of nacre to induce bone formation by human osteoblasts maintained in vitro. *Tissue Cell* 1992;24(5):667-679.

Lorz A, Metzger E. *Tierschutzgesetz*. C.H. Beck, München, 2019.

Lowenstam HA, Weiner S. On biomineralization. Oxford University Press, Oxford, 1989.

Machado J, Coimbra J, Sá C, Cardoso I. Shell thickening in *Anodonta cygnea* by induced acidosis. *Comp Biochem Physiol Part A Physiol* 1988;91(4):645-651.

Mackenzie CL, Ormondroyd GA, Curling SF, Ball RJ, Whiteley NM, Malham SK. Ocean warming, more than acidification, reduces shell strength in a commercial shellfish species during food limitation. *PLoS One* 2014;9(1):e86764.

Mahamid J, Sharir A, Gur D, Zelzer E, Addadi L, Weiner S. Bone mineralization proceeds through intracellular calcium phosphate loaded vesicles: a cryo-electron microscopy study. *J Struct Biol* 2011;174(3):527-535.

Maier M, Milz S, Wirtz DC, Rompe JD, Schmitz C. Grundlagenforschung zur Applikation extrakorporaler Stosswellen am Stütz- und Bewegungsapparat. Eine Standortbestimmung [Basic research of applying extracorporeal shockwaves on the musculoskeletal system. An assessment of current status]. *Orthopade* 2002;31(7):667-677. German.

Maier M, Averbeck B, Milz S, Refior HJ, Schmitz C. Substance P and prostaglandin E2 release after shock wave application to the rabbit femur. *Clin Orthop Relat Res* 2003;(406):237-245.

MaMahon RF, Ussary TA. Thermal tolerance of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) relative to rate of temperature increase and acclimation temperature. US Army Corps of Engineers Technical Report EL-95-10 1995. <https://apps.dtic.mil/sti/tr/pdf/ADA293154.pdf>

Marie B, Joubert C, Tayalé A, Zanella-Cléon I, Belliard C, Piquemal D, Cochennec-Laureau N, Marin F, Gueguen Y, Montagnani C. Different secretory repertoires control the biomineralization processes of prism and nacre deposition of the pearl oyster shell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(51):20986-20991.

Marin F, Le Roy N, Marie B. The formation and mineralization of mollusk shell. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2012;4(3):1099-1125.

Matin SF, Yost A, Streem SB. Extracorporeal shock-wave lithotripsy: a comparative study of electrohydraulic and electromagnetic units. *J Urol* 2001;166(6):2053-2056.

Meiners J, Gerlach U, Mägerlein S, Jürgens C, Faschingbauer M. Pseudarthrosen [Pseudo-arthroses]. *Chirurg* 2009;80(10):979-86. German.

Mills L, Tsang J, Hopper G, Keenan G, Simpson AH. The multifactorial aetiology of fracture nonunion and the importance of searching for latent infection. *Bone Joint Res* 2016;5(10):512-519.

Milz S, Putz R. Quantitative morphology of the subchondral plate of the tibial plateau. *J Anat* 1994;185(Pt 1):103-110.

Misogianes MJ, Chasteen ND. A chemical and spectral characterization of the extrapallial fluid of *Mytilus edulis*. *Anal Biochem* 1979;100(2):324-334.

Mittermayr R, Hartinger J, Antonic V, Meini A, Pfeifer S, Stojadinovic A, Schaden W, Redl H. Extracorporeal shock wave therapy (ESWT) minimizes ischemic tissue necrosis irrespective of application time and promotes tissue revascularization by stimulating angiogenesis. *Ann Surg* 2011;253(5):1024-1032.

Mount AS, Wheeler AP, Paradkar RP, Snider D. Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster. *Science* 2004;304(5668):297-300.

Moya D, Ramón S, Schaden W, Wang CJ, Guiloff L, Cheng JH. The role of extracorporeal shockwave treatment in musculoskeletal disorders. *J Bone Joint Surg Am* 2018;100(3):251-263.

Notarnicola A, Tammaro R, Moretti L, Fiore A, Vicenti G, Zallone A, Moretti B. Effects of radial shock waves therapy on osteoblasts activities. *Musculoskelet Surg* 2012;96(3):183-189.

Novak P. Physics: F-SW and R-SW. Basic information on radial shock waves physics. In: Lohrer H, Gerdesmeyer L: Multidisciplinary Medical Application. Level 10 Buchverlag, Heilbronn, 2014, pp. 28-49.

Osborn GR. Pulmonary concussion ("Blast"). *Br Med J* 1941;1:506-510.

Pang S, Goldsmith W. A model of a pneumatic jackhammer system. *Rock Mech Rock Engin* 1992;25(1):49-61.

Paoletta M, Moretti A, Liguori S, Toro G, Gimigliano F, Iolascon G. Efficacy and effectiveness of extracorporeal shockwave therapy in patients with myofascial pain or fibromyalgia: a scoping review. *Medicina* 2022;58(8):1014.

Parfitt AM. The cellular basis of bone turnover and bone loss: a rebuttal of the osteocytic resorption--bone flow theory. *Clin Orthop Relat Res* 1977;(127):236-247.

Perez C, Chen H, Matula TJ, Karzova M, Khokhlova VA. Acoustic field characterization of the Duolith: measurements and modeling of a clinical shock wave therapy device. *J Acoust Soc Am* 2013;134(2):1663-1674.

Pishchalnikov YA, Neucks JS, VonDerHaar RJ, Pishchalnikova IV, Williams JC Jr, McAtee JA. Air pockets trapped during routine coupling in dry head lithotripsy can significantly decrease the delivery of shock wave energy. *J Urol* 2006;176(6 Pt 1):2706-2710.

Qu G, von Schroeder HP. The osteogenic potential of pseudoarthrosis tissue and bone from human scaphoid non-unions. *J Hand Surg Eur Vol* 2008;33(4):449-456.

Ramesh S, Zaman F, Madhuri V, Sävendahl L. Radial Extracorporeal Shock Wave Treatment Promotes Bone Growth and Chondrogenesis in Cultured Fetal Rat Metatarsal Bones. *Clin Orthop Relat Res* 2020;478(3):668-678.

Ramón M, Richardson C. Age determination and shell growth of Chamelea gallina (Bivalvia: Veneridae) in the western Mediterranean. *Marine Ecol Prog Se* 1992;89:15-23.

Reeders HH, Bij De Vaate A. Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): a new perspective for water quality management. In: Gulati RD, Lammens EHRR, Meijer ML, Donk E (eds): Biomanipulation Tool for Water Management. Springer, Berlin, 1989, pp. 437-450.

Reinhardt N, Wegener J, de la Fuente M. Influence of the pulse repetition rate on the acoustic output of ballistic pressure wave devices. *Sci Rep* 2022;12(1):18060.

Richardson DM, Pyšek P, Rejmanek M, Barbour MG, Panetta FD, West CJ. Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Div Distribut* 2000;6(2):93-107.

Riedlinger R, Kopper B, Wurster H. Extracorporeal piezoelectric lithotripsy (EPL)—generation and application of short high-power sound pulses. In: Jacobi GH, Rübben H, Harzmann R (eds) *Invest Urol 2*. Springer, Berlin, 1987, pp. 197-205.

Roinel N, Morel F, Istin M. Etude des granules calcifiés du manteau des lamelibranches à l'aide de la microsonde électronique [Calcified granules of lamellibranch mantle studied by scanning electron probe]. *Calcif Tissue Res* 1973;11(2):163-170. French.

Rousseau M, Pereira-Mouriès L, Almeida MJ, Milet C, Lopez E. The water-soluble matrix fraction from the nacre of *Pinctada maxima* produces earlier mineralization of MC3T3-E1 mouse pre-osteoblasts. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2003;135(1):1-7.

Sanders R, Jersinovich I, Anglen J, DiPasquale T, Herscovici D Jr. The treatment of open tibial shaft fractures using an interlocked intramedullary nail without reaming. *J Orthop Trauma* 1994;8(6):504-510.

Sasaki T, Garant PR. Structure and organization of odontoblasts. *Anat Rec* 1996;245(2):235-249.

Schaefer R, Claudi R, Grapperhaus M. Control of zebra mussels using sparker pressure pulses. *J AWWA* 2010;102(4):113-122.

Schelling G, Delius M, Gschwender M, Grafe P, Gambihler S. Extracorporeal shock waves stimulate frog sciatic nerves indirectly via a cavitation-mediated mechanism. *Biophys J* 1994;66(1):133-140.

Schenk R. Zur histologischen Verarbeitung von unentkalkten Knochen [On the histological processing of undecalcified bone]. *Acta Anat* 1965;60:3-19. German.

Schmitz C, Császár NB, Rompe JD, Chaves H, Furia JP. Treatment of chronic plantar fasciopathy with extracorporeal shock waves (review). *J Orthop Surg Res* 2013;8:31.

Schmitz C, Császár NB, Milz S, Schieker M, Maffulli N, Rompe JD, Furia JP. Efficacy and safety of extracorporeal shock wave therapy for orthopedic conditions: a systematic review on studies listed in the PEDro database. *Br Med Bull* 2015;116(1):115-138.

Shi L, Gao F, Sun W, Wang B, Guo W, Cheng L, Li Z, Wang W. Short-term effects of extracorporeal shock wave therapy on bone mineral density in postmenopausal osteoporotic patients. *Osteoporos Int* 2017;28(10):2945-2953.

Simkiss K, Wilbur KM. Biomineralization: Cell Biology and Mineral Deposition. Elsevier, Amsterdam, 1989.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89(2):309-319.

Soares-da-Silva IM, Almeida MJ, Serrao PM, Coelho MA, Machado J. L-3, 4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) in Anodonta cygnea: variation with acidosis. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integrat Physiol* 1998;120(3):463-468.

Sommerfeld M, Müller HM. Experimental and numerical studies of shock wave focusing in water. *Exp Fluids* 1988;6:209-216.

Spires JE, Dungan CF, North EW. Marking the shells of pediveliger eastern oysters *Crassostrea virginica*, with a calcein fluorochrome dye. *J Shellfish Res* 2022;40(3):479-487.

Stańczykowska A. Ecology of *Dreissena polymorpha* (Pall.) (Bivalvia) in lakes. *Pol Arch Hydrobiol* 1977;24:461–530.

Staudenraus J. In vivo Stoßwellenmessung. In: Chaussy C, Eisenberger F, Jocham D, Wilbert D (eds): Die Stoßwelle. Forschung und Klinik. Attempto Verlag, Tübingen, 1995, pp. 21-26.

Sternecker K, Geist J, Beggel S, Dietz-Laursonn K, de la Fuente M, Frank HG, Furia JP, Milz S, Schmitz C. Exposure of zebra mussels to extracorporeal shock waves demonstrates formation of new mineralized tissue inside and outside the focus zone. *Biol Open* 2018;7(7):bio033258.

Strayer DL. Twenty years of zebra mussels: lessons from the mollusk that made headlines. *Frontiers Ecol Environ* 2009;7(3):135-141.

Stuart AJ, Smith DA. Use of the fluorochromes xylenol orange, calcein green, and tetracycline to document bone deposition and remodeling in healing fractures in chickens. *Avian Dis* 1992;36(2):447-449.

Suhr D, Brümmer F, Hülser DF. Cavitation-generated free radicals during shock wave exposure: investigations with cell-free solutions and suspended cells. *Ultrasound Med Biol* 1991;17(8):761-768.

Sun D, Junger WG, Yuan C, Zhang W, Bao Y, Qin D, Wang C, Tan L, Qi B, Zhu D, Zhang X, Yu T. Shockwaves induce osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through ATP release and activation of P2X7 receptors. *Stem Cells* 2013;31(6):1170-1180.

Tabsh I, Waddell JP, Morton J. Total hip arthroplasty for complications of proximal femoral fractures. *J Orthop Trauma* 1997;11(3):166-169.

Takahashi N, Wada Y, Ohtori S, Saisu T, Moriya H. Application of shock waves to rat skin decreases calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in dorsal root ganglion neurons. *Auton Neurosci* 2003;107(2):81-84.

Takakuwa Y, Sarai M, Kawai H, Yamada A, Shiino K, Takada K, Nagahara Y, Miyagi M, Motoyama S, Toyama H, Ozaki Y. Extracorporeal Shock wave therapy for coronary artery disease: relationship of symptom amelioration and ischemia improvement. *Asia Ocean J Nucl Med Biol* 2018 Winter;6(1):1-9.

Takata S, Yasui N. Disuse osteoporosis. *J Med Invest* 2001;48(3-4):147-156.

Takeuchi T, Endo K. Biphasic and dually coordinated expression of the genes encoding major shell matrix proteins in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Mar Biotechnol (NY)* 2006;8(1):52-61.

Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Tamura T, Akatsu T, Stanley ER, Kurokawa T, Suda T. Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest* 1993;91(1):257-263.

Tavakkoli J, Birer A, Arefiev A, Prat F, Chapelon JY, Cathignol D. A piezocomposite shock wave generator with electronic focusing capability: application for producing cavitation-induced lesions in rabbit liver. *Ultrasound Med Biol* 1997;23(1):107-115.

Taylor JD, Layman M. The mechanical properties of bivalve (Mollusca) shell structures. *Palaeontology* 1972;15(1):73-87.

Tischer T, Milz S, Weiler C, Pautke C, Hausdorf J, Schmitz C, Maier M. Dose-dependent new bone formation by extracorporeal shock wave application on the intact femur of rabbits. *Eur Surg Res* 2008;41(1):44-53.

Tripodo C, Sangaletti S, Piccaluga PP, Prakash S, Franco G, Borrello I, Orazi A, Colombo MP, Pileri SA. The bone marrow stroma in hematological neoplasms--a guilty bystander. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8(8):456-466.

Tscherne H. Pseudarthrosen [Pseudarthrosis]. *Orthopade* 1996;25(5):385. German.

Tukey JW. Exploratory Data Analysis. Pearson, London, 1977.

Tunholi-Alves VM, Tunholi VM, Garcia JS, Costa-Neto SF, Maldonado A, Santos MA, Thiengo SC, Pinheiro J. Changes in the calcium metabolism of Biomphalaria glabrata experimentally infected with Angiostrongylus cantonensis. *J Helminthol* 2014;88(2):160-165.

Ueberle F. Shock wave technology. In: Siebert W, Buch M (eds). Extracorporeal Shock Waves In Orthopaedics. Springer, Berlin, 1998, pp. 59-87.

van der Jagt OP, van der Linden JC, Schaden W, van Schie HT, Piscaer TM, Verhaar JA, Weinans H, Waarsing JH. Unfocused extracorporeal shock wave therapy as potential treatment for osteoporosis. *J Orthop Res* 2009;27(11):1528-1533.

van Gaalen SM, Kruyt MC, Geuze RE, de Brujin JD, Alblas J, Dhert WJ. Use of fluorochrome labels in in vivo bone tissue engineering research. *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16(2):209-217.

Veis A. Materials science. A window on biomineralization. *Science* 2005;307(5714):1419-1420.

Vernon HM. The respiratory exchange of the lower marine invertebrates. *J Physiol* 1895;19(1-2):18-70.

Vidal X, Morral A, Costa L, Tur M. Radial extracorporeal shock wave therapy (rESWT) in the treatment of spasticity in cerebral palsy: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *NeuroRehabilitation* 2011;29(4):413-419.

Vidal X, Martí-Fàbregas J, Canet O, Roqué M, Morral A, Tur M, Schmitz C, Sitjà-Rabert M. Efficacy of radial extracorporeal shock wave therapy compared with botulinum toxin type A injection in treatment of lower extremity spasticity in subjects with cerebral palsy: A randomized, controlled, cross-over study. *J Rehabil Med* 2020;52(6):jrm00076.

Waite J. Quinone-tanned scleroproteins. In: Hochachka P (ed.): Metabolic Biochemistry and Molecular Biomechanics. Elsevier, Amsterdam, 1983, pp. 467-504.

Wang FS, Wang CJ, Huang HJ, Chung H, Chen RF, Yang KD. Physical shock wave mediates membrane hyperpolarization and Ras activation for osteogenesis in human bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;287(3):648-655.

Wang FS, Yang KD, Chen RF, Wang CJ, Sheen-Chen SM. Extracorporeal shock wave promotes growth and differentiation of bone-marrow stromal cells towards osteoprogenitors associated with induction of TGF-beta1. *J Bone Joint Surg Br* 2002a;84(3):457-461.

Wang FS, Wang CJ, Sheen-Chen SM, Kuo YR, Chen RF, Yang KD. Superoxide mediates shock wave induction of ERK-dependent osteogenic transcription factor (CBFA1) and mesenchymal cell differentiation toward osteoprogenitors. *J Biol Chem* 2002b;277(13):10931-10937.

Wang FS, Yang KD, Kuo YR, Wang CJ, Sheen-Chen SM, Huang HC, Chen YJ. Temporal and spatial expression of bone morphogenetic proteins in extracorporeal shock wave-promoted healing of segmental defect. *Bone* 2003;32(4):387-396.

Wang CJ, Yang KD, Wang FS, Hsu CC, Chen HH. Shock wave treatment shows dose-dependent enhancement of bone mass and bone strength after fracture of the femur. *Bone* 2004;34(1):225-230.

Wang T, Du L, Shan L, Dong H, Feng J, Kiessling MC, Angstman NB, Schmitz C, Jia F. A prospective case-control study of radial extracorporeal shock wave therapy for spastic plantar flexor muscles in very young children with cerebral palsy. *Medicine* 2016;95(19):e3649.

Weber BG, Cech O. *Pseudarthrosen. Pathophysiologie, Biomechanik, Therapie, Ergebnisse*. Verlag Hans Huber, Bern, 1973.

Weiner S, Wagner HD. The material bone: structure-mechanical function relations. *Annu Rev Mat Sci* 1998;28(1):271-298.

Weiner S, Addadi L. Crystallization pathways in biomimetic mineralization. *Annu Rev Mat Res* 2011;41:21-40.

Westbroek P, Marin F. A marriage of bone and nacre. *Nature* 1998;392(6679):861-862.

Wilbert DM, Reichenberger H, Hutschenreiter G, Riedmiller H, Alken P, Hohenfellner R. Second generation shock wave lithotripsy: experience with the Lithostar. *World J Urol* 1987;5:225-228.

Wilson-Sanders SE. Invertebrate models for biomedical research, testing, and education. *ILAR J* 2011;52(2):126-152.

Wolff J. Das Gesetz der Transformation der Knochen. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 1893;19(47):1222-1224.

Wu W, Maffulli N, Furia JP, Meindlhummer L, Sternecker K, Milz S, Schmitz C. Exposure of zebra mussels to radial extracorporeal shock waves: implications for treatment of fracture nonunions. *J Orthop Surg Res* 2021;16(1):707.

Wu XQ, Wang D, Liu Y, Zhou JL. Development of a tibial experimental non-union model in rats. *J Orthop Surg Res* 2021b;16(1):261.

Yin Y, Huang J, Paine ML, Reinhold VN, Chasteen ND. Structural characterization of the major extrapallial fluid protein of the mollusc *Mytilus edulis*: implications for function. *Biochemistry* 2005;44(31):10720-10731.

Yoshiko Y, Candelier GA, Maeda N, Aubin JE. Osteoblast autonomous Pi regulation via Pit1 plays a role in bone mineralization. *Mol Cell Biol* 2007;27(12):4465-4474.

Zanetti G, Ostini F, Montanari E, Russo R, Elena A, Trinchieri A, Pisani E. Cardiac dysrhythmias induced by extracorporeal shockwave lithotripsy. *J Endourol* 1999;13(6):409-412.

Zhang B, Li Y, Yu Y, Zhao J, Ou Y, Chao Y, Yang B, Yu X. MicroRNA-378 promotes osteogenesis-angiogenesis coupling in BMMSCs for potential bone regeneration. *Anal Cell Pathol* 2018;2018:8402390.

Zhang YF, Liu Y, Chou SW, Weng H. Dose-related effects of radial extracorporeal shock wave therapy for knee osteoarthritis: A randomized controlled trial. *J Rehabil Med* 2021;53(1):jrm00144.

Zhang X, Ma Y. Global trends in research on extracorporeal shock wave therapy (ESWT) from 2000 to 2021. *BMC Musculoskelet Disord* 2023;24(1):312.

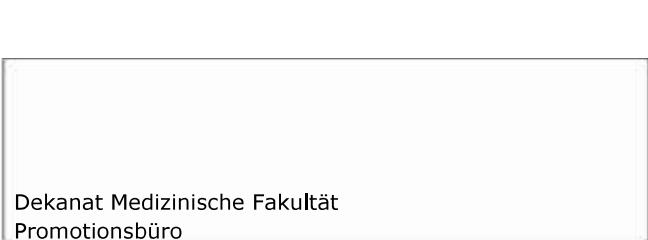
Zuckerman S. Blast injury to lung. *Br Med J* 1941;1:645.

Zura R, Xiong Z, Einhorn T, Watson JT, Ostrum RF, Prayson MJ, Della Rocca GJ, Mehta S, McKinley T, Wang Z, Steen RG. Epidemiology of fracture nonunion in 18 human bones. JAMA Surg 2016;151(11):e162775.

Zuykov M, Pelletier E, Harper DA. Bivalve mollusks in metal pollution studies: from bioaccumulation to biomonitoring. Chemosphere 2013;93(2):201-208.

## Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Schmitz für das Ermöglichen dieser Doktorarbeit und bei Frau Dr. Sternecker für die Unterstützung währenddessen bedanken. Außerdem möchte ich mit bei Frau Harbauer, Frau Haderer und Frau Aschauer für die Zusammenarbeit während der Experimente bedanken.



## Eidesstattliche Versicherung

Meindlhumer, Lukas

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Induktion von Biomineralisierung durch radiale Stoßwellentherapie am Tiermodell  
(Dreissena polymorpha)**

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

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

Wels, 5.12.2025

Lukas Meindlhumer

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Lukas Meindlhumer

**Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation  
mit der elektronischen Fassung**

Meindlhumer, Lukas

---

Name, Vorname

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

**Induktion von Biomineralisierung durch radiale Stoßwellentherapie am Tiermodell (*Dreissena polymorpha*)**

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

Wels, 5.12.2025

Lukas Meindlhumer

---

Ort, Datum

Unterschrift Lukas Meindlhumer