

Aus der
Orthopädischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Großhadern
Direktor: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. V. Jansson

**Auswirkung der Applikation extrakorporaler Stoßwellen auf Knochen
und Muskulatur. Darstellung am Tiermodell Maus**

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

vorgelegt von
Kathrin Kapfer

aus
Augsburg

Jahr
2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. M. Maier

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. M. Shakibaei
Prof. Dr. med. Chr. K. Lackner
Prof. Dr. med. W. Pförringer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. J. Hausdorf

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2007

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|----------|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 2. | Physikalische Grundlagen extrakorporaler Stoßwellen | 3 |
| 2.1 | Definition | 3 |
| 2.2 | Prinzipien der Stoßwellenerzeugung | 4 |
| 2.3 | Stoßwellenfokus | 6 |
| 2.4 | Druckmessung extrakorporaler Stoßwellen | 6 |
| 2.5 | Direkte und indirekte Effekte extrakorporaler Stoßwellen im biologischen Gewebe | 8 |
| 3. | Material und Methoden | 9 |
| 3.1 | Verwendetes Tiermodell | 9 |
| 3.2 | Experimente | 9 |
| 3.2.1 | Anästhesie der Versuchstiere | 9 |
| 3.2.2 | Applikation extrakorporaler Stoßwellen | 9 |
| 3.2.3 | Tötung der Tiere | 11 |
| 3.3 | Untersuchungen | 11 |
| 3.3.1 | Präparation der unteren Extremität | 11 |
| 3.3.2 | Einbettung der Muskelpräparate | 12 |
| 3.3.3 | Einbettung der Knochenpräparate | 12 |
| 3.3.4 | Herstellung histologischer Schnittpräparate | 13 |
| 3.3.4.1 | Herstellung der Paraffinschnitte | 13 |
| 3.3.4.2 | Herstellung der MMA-Schnitte | 14 |
| 3.3.5 | Anfertigung der Mikroradiographien | 15 |
| 3.3.5.1 | Klassifikationskriterien der Mikroradiographien | 15 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.3.6 | Färbung der Paraffindünnschnitte | 17 |
| 3.3.6.1 | Färbung mit Hämatoxylin-Eosin | 17 |
| 3.3.6.2 | Färbung mit Berliner-Blau | 17 |
| 3.3.6.3 | Klassifikationskriterien der Paraffindünnschnitte | 18 |
| 3.4 | Statistische Analyse | 19 |
| 4. | Ergebnisse | 20 |
| 4.1 | Untersuchungen zur Wirkung extrakorporaler Stoßwellen auf den Tibiaschaft der Maus- Ergebnisse der mikroradiographischen Untersuchungen | 20 |
| 4.1.1 | Ergebnisse der einzelnen Klassifikationskriterien | 20 |
| 4.1.1.1 | Zusammenfassung | 20 |
| 4.1.1.2 | Ergebnisse der qualitativen Untersuchung | 22 |
| 4.1.1.3 | Ergebnisse der quantitativen Untersuchung | 22 |
| 4.1.1.4 | Ergebnisse der absoluten Knochendicke | 22 |
| 4.1.1.5 | Untersuchungsergebnisse der mikroradiographischen Merkmale | 23 |
| 4.2 | Untersuchungen zur Wirkung extrakorporaler Stoßwellen auf die Unterschenkelmuskulatur der Maus- Ergebnisse der histologischen Muskeluntersuchungen | 28 |
| 4.2.1 | Ergebnisse der einzelnen Klassifikationskriterien | 28 |
| 4.2.1.1 | Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse | 28 |
| 4.2.1.2 | Zeichen der Faserregeneration | 30 |
| 4.2.1.2.1 | Basophiles Sarkoplasma | 30 |
| 4.2.1.2.2 | Kernketten | 30 |
| 4.2.1.3 | Zeichen der Faserschädigung | 30 |
| 4.2.1.3.1 | Inflammatorische Reaktion | 30 |
| 4.2.1.3.2 | Nachweis von Eisenablagerungen | 31 |

| | | |
|------------|--|----|
| 5. | Diskussion | 36 |
| 5.1 | Wirkung extrakorporaler Stoßwellen auf das Knochengewebe | 36 |
| 5.2 | Wirkung extrakorporaler Stoßwellen auf das Muskelgewebe | 40 |
| 5.3 | Klinische Anwendung extrakorporaler Stoßwellen am Stütz-und Bewegungsapparat des Menschen | 42 |
| 6. | Zusammenfassung | 44 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 46 |
| 8. | Anhang | 55 |
| 8.1 | Tabellenanhang zu den Ergebnissen der statistischen Analyse der Mikroradiographischen und histologischen Untersuchungsergebnissen zur Wirkung extrakorporaler Stoßwellen auf den Tibiaschaft der Maus | 55 |
| 9. | Danksagung | 59 |
| 10. | Lebenslauf | 60 |

1. Einleitung

Extrakorporale Stoßwellen (ESW) gewannen in den letzten Jahren bei der Behandlung chronischer Erkrankungen des Weichteil- und Knochengewebes mehr und mehr an Bedeutung und sind Gegenstand zahlreicher klinischer und tierexperimenteller Untersuchungen geworden. Vor allem der osteogenetische Effekt wird klinisch bereits in der Therapie der aseptischen Pseudarthrose [76, 90, 92] eingesetzt. Außerdem wird bei Erkrankungen wie der Epicondylitis humeri radialis [5, 17, 72], der plantaren Fasziitis [8, 31, 32, 68, 71, 93, 103], der Tendinosis calcarea der Schulter [16, 29, 64] sowie der Insertionsenthesiopathie der Achillessehne [12, 27, 69] nach ESWT eine deutliche Symptomreduktion mit Schmerzlinderung festgestellt. Neben der klinischen Anwendung wurde der Einfluß der ESW auch an zahlreichen etablierten Tiermodellen untersucht. Hier konnte der osteogenetische Effekt von Stoßwellen demonstriert werden [20, 22, 30, 41, 49, 52, 85].

Nichtsdestotrotz sind die zellulären und molekularen Wirkmechanismen, welche die Osteoneogenese und die Analgesie vermitteln noch nicht abschließend geklärt. Erste aktuellere Hinweise auf die Komplexität der zugrundeliegenden Mechanismen ergaben Zellkulturanalysen, an denen gezeigt werden konnte, dass es unter dem Einfluß extrakorporaler Stoßwellen zu einer vermehrten Expression von Knochenmatrixproteinen sowie Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel des transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) kam. Zudem war eine deutliche Vermehrung der kultivierten Zellen auffällig [45, 46, 57, 58, 84]. Wang et al. [95, 96] konnten nach Anwendung von Stoßwellen eine Proliferation und Differenzierung mesenchymaler Zellen zu knochenbildenden Zellen durch Induktion und Vermehrung von TGF- β 1 nachweisen.

Maier et al. [49, 50] konnten des weiteren zeigen, dass nach ESWT der Neurotransmitter Substanz P (SP) aus dem Periost des Kanichenfemurs freigesetzt wird. Die Applikation von Stoßwellen ab $0,5 \text{ mJ/mm}^2$ führte zu einer signifikanten Erhöhung der relativen Konzentration von Substanz P im Periost bei gleichzeitiger Knochenneubildung. Somit konnte erstmalig ein molekularer Wirkmechanismus der Knochenneubildung dargestellt werden, da SP auch als Mediator der Osteoneogenese bekannt ist [1, 3, 40, 78, 79]. Anhand von *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass die Neurotransmitter SP und calcitonin gene-related peptide (CGRP) die Stammzellmitose, die Proliferation von Osteoprogenitorzellen sowie die Aktivität der Osteoblasten und somit das Knochenwachstum stimulieren und beeinflussen können [1, 3, 40, 77, 78]. Desweiteren

konnten in Osteoblasten Rezeptoren für SP und CGRP nachgewiesen werden [1, 40, 85]. Zur gezielten Untersuchung dieser Einflüsse sind „Knock-out-Mäuse“ von entscheidender Bedeutung. Momentan stehen die „PPT-A-knock-out-Maus“ (Prä-Protachykinin A) bzw. die „NK1-receptor-knock-out-Maus“ (Neurokinin 1) zur Verfügung [11, 18, 54]. Eine Voraussetzung, um die Bedeutung der Substanz P im knock-out-Maus Modell zu untersuchen ist jedoch, dass eine extrakorporale Stoßwellenapplikation an der unteren Extremität der Maus überhaupt durchführbar ist. Dies wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben. Im Rahmen der vorliegenden Studie sollte daher geklärt werden, ob, an der unteren Extremität der Maus (Balb-c-black 6, Wildtyp) eine extrakorporale Stoßwellenapplikation durchführbar ist, und ob im Stoßwellenfokus eine signifikante periostale Knochenneubildung stattfindet.

2. Physikalische Grundlagen extrakorporaler Stoßwellen

2.1 Definition

Extrakorporale Stoßwellen sind akustische Druckimpulse, die sich wellenförmig und dreidimensional im umgebenden Gewebe ausbreiten können.

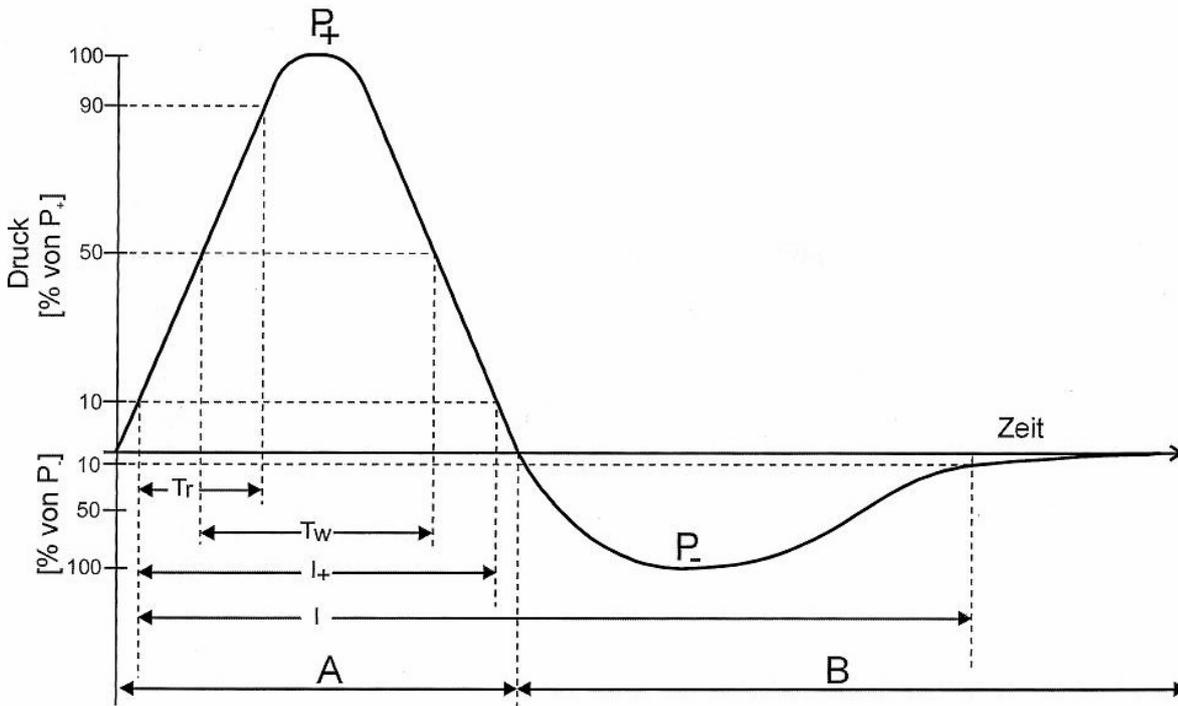


Abb 1. Graphische Darstellung einer standardisierten Stoßwelle. Der Stoßwellendruck ist als Funktion der Zeit aufgetragen. A: Anteil der Stoßwelle mit positivem Druck. B: Anteil der Stoßwelle mit negativem Druck. [28].

Kennzeichnend sind der zweiphasige Verlauf, welcher in Abb.1 verdeutlicht wird, mit folgenden charakteristischen Eigenschaften [28, 61, 98]: Innerhalb von kurzer Zeit steigt der Druck bis zu seinem Maximalwert (P_+) an und fällt dann exponentiell zum negativen Spitzendruck (P_-) ab. Der Maximalwert (P_+), auch positiver Spitzendruck genannt, ist definiert als die Differenz zwischen dem maximalen positiven Druck der Stoßwelle und dem Umgebungsdruck. P_+ erreicht Werte zwischen 5 und 120 MPa. Der Anstieg kann innerhalb von 1 - 500 ns erfolgen, wobei die Anstiegszeit (T) als das Intervall beschrieben wird, in dem der Druck von 10% von P_+ bis auf 90% von P_+ angestiegen ist. Nach Überschreiten des Druckmaximums kommt es zu einem exponentiellen Druckabfall bis zum atmosphärischen Umgebungsdruck.

Die Zeitdauer dieses positiven Anteils der Welle, auch Pulsbreite (T_w) genannt, beträgt zwischen 200 ns und 500 ns, und ist der definierte Abstand zwischen dem Zeitpunkt, bei

dem der Druck erstmalig 50% von P_+ übersteigt und dem Zeitpunkt, bei dem während des exponentiellen Abfalls der Druckwert unter 50% von P_+ absinkt. Die Dauer von T_w beeinflusst direkt die Energieflussdichte extrakorporaler Stoßwellen. An die positive Druckphase schließt sich eine negative Druckphase an. Diese zweite Phase ist im zeitlichen Verlauf länger als die erste. Der negative Spitzendruck (P_-) ist definiert als der in dieser Phase maximal erzeugte negative Druck. Seine Werte entsprechen 10-20% des positiven Spitzendrucks.

Die gesamten, eine Stoßwelle kennzeichnenden Werte hängen von der verwendeten Stoßwellenquelle ab.

2.2 Prinzipien der Stoßwellenerzeugung

Zur Zeit stehen mehrere Verfahren für die Stoßwellenerzeugung zur Verfügung, die sich in ihren physikalischen und technischen Grundprinzipien zwar unterscheiden, aber als gemeinsames Ziel die Erzeugung eines akustischen Druckimpulses haben. Die Unterschiede sind in Abb. 2 schematisch dargestellt [28, 44, 49i].

1. Elektrohydraulisches Prinzip (s. Abb. 2A)

Im Rahmen dieses Verfahrens erfolgt die Erzeugung des Druckimpulses durch Funkenentladung einer Elektrode, ähnlich einer Zündkerze. Hierbei kommt es zur Entstehung von Plasmablasen. Durch die Plasmablasen wird das die Elektrode umgebende Medium komprimiert, wodurch es zur Entstehung der Druckwellen kommt, die über einen elliptischen Spiegel gebündelt und im Brennpunkt fokussiert werden.

2. Elektromagnetisches Prinzip (s. Abb. 2B)

Die elektromagnetische Stoßwellenerzeugung beruht auf der elektrischen Aufladung einer Flachspule. Die im Rahmen der Strominduktion entstehende Lorentz - Kraft führt zu einer explosionsartigen Auslenkung bzw. Abstoßung der kupferhaltigen Membran. Spannungsproportional dazu wird die der Membran anliegende Wassersäule ausgelenkt und die so generierten Druckimpulse im Medium weitergeleitet. Die Fokussierung erfolgt durch eine akustische Linse.

3. Piezoelektrisches Prinzip (s. Abb. 2C)

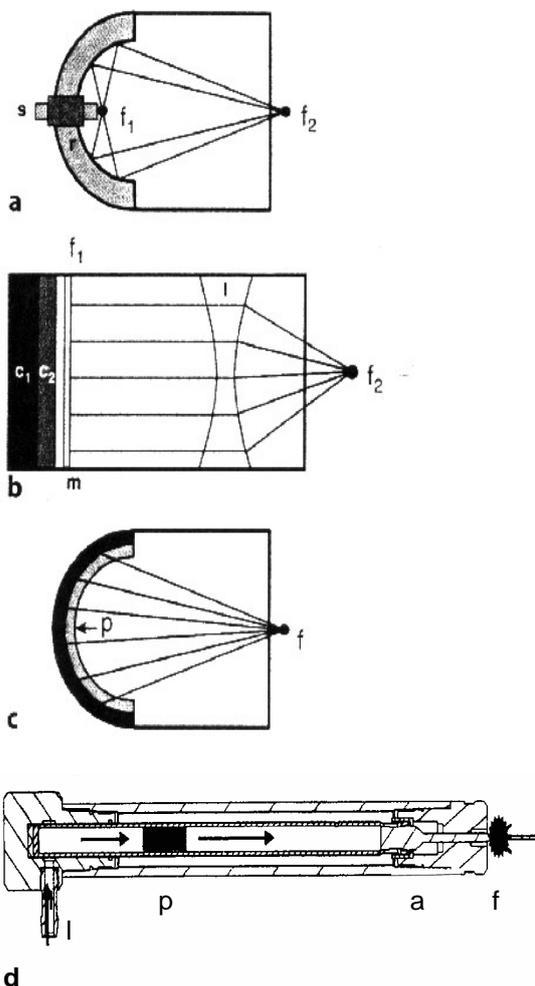
Bei der Erzeugung extrakorporaler Stoßwellen mittels piezoelektrischen Stoßwellenquellen werden durch pulsformige Bestromung die Oberflächenladungen der Piezokristalle (meist Quarzkristalle) verändert. Dadurch kommt es zur Emission kleiner Druckimpulse. Da die Kristalle in einer kugelförmigen Schale ausgelegt sind, lassen sich die Stoßwellen in einem Fokus bündeln.

4. Ballistisches Prinzip (s. Abb. 2D)

Bei diesem Verfahren wird ein sich in einem Lauf befindliches Projektil mittels Pressluft extrem beschleunigt. Vergleichbar einer Pistolenkugel trifft das Projektil auf einen Applikator, über den der Energieimpuls in das Gewebe fortgeleitet wird. Die Spitze des Applikators ist der Fokus, von dem aus sich die Druckwelle radiär ausbreitet. Hierbei erfolgt keine Fokussierung des Stoßwellenfeldes. Wegen der radiären Ausbreitung nehmen Druck und Energiedichte mit zunehmender Eindringtiefe in das Gewebe ab.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche erfolgten unter Verwendung einer elektrohydraulischen Stoßwellenquelle (Typ XL 1, Dornier Medizintechnik, Wessling, Deutschland). Die Erzeugung der Stoßwellen erfolgt hier durch Funkenentladung unter Wasser. Dafür wird die Stoßwellenquelle in ein mit deionisiertem Wasser ($T = 36^\circ \pm 1^\circ\text{C}$) gefülltes Becken abgesenkt. Die Einstellung der Zielregion wird mit Hilfe zweier, zueinander rechtwinklig angeordneter Laserstrahlen durchgeführt, welche über adjustierbare Spiegel gesteuert den zweiten Brennpunkt in der Zielregion markieren.

Abb. 2:



2.a:

Elektrohydraulische Stoßwellenquelle
(s Zündkerze, r Reflektor, f1 1. Fokuspunkt
f2 2. Fokuspunkt)

2.b:

Elektromagnetische Stoßwellenquelle
(c1 Kondensator, c2 Spule, m Membran
l Linse, f1 1. Fokuspunkt, f2 2. Fokuspunkt)

2.c:

Piezoelektrische Stoßwellenquelle
(p Piezokristalle, f Fokuspunkt)

2.d:

Ballistische Stoßwellenquelle
(l Druckluft, p Projektil, a Applikator, f Fokuspunkt)
[28]

2.3. Stoßwellenfokus

Durch die gezielte Fokussierung der Stoßwellen entsteht ein dreidimensionales Stoßwellenfeld. Ein wichtiger Parameter dieses Stoßwellenfeldes ist der Stoßwellenfokus, der charakteristischerweise die Form einer ellipsenförmigen Zigarre annimmt. Zwischen der Gestalt des Stoßwellenfokus und der physikalischen Parameter existieren komplexe Wechselbeziehungen [87, 98]. Die momentan verfügbaren Stoßwellenquellen bündeln die akustische Energie in kleinen Fokusarealen, um einerseits die Effekte innerhalb des Zielgebietes zu erhöhen und andererseits das umliegende Gewebe vor unerwünschten Nebenwirkungen zu schützen [49ii]

Ein weiterer entscheidender Parameter ist die Fokusenergie. Diese innerhalb einer Fläche von 1 mm² im Fokus gemessene Energie – aufsummiert über die gesamte Dauer der Stoßwelle - wird ausgedrückt mit dem Begriff der Energieflußdichte EFD [87, 98]. Die Einheit der Energieflußdichte ist Millijoule pro Quadratmillimeter (mJ / mm²). Wie in Gleichung (1) gezeigt erfolgt die Berechnung der Energieflußdichte als „Pulsintegritätsintegral“ (PII):

$$PII = (1 / Z) \times \int_T p^2 (t) dt \quad (1)$$

Z steht in dieser Gleichung für die akustische Impedanz eines Mediums, p für den akustischen Druck und t für einen bestimmten Zeitpunkt von T . T wird als das Zeitintervall beschrieben, über welchem der akustische Druck aufsummiert wird. Je nachdem ob T das in Abb. 1 gezeigte Zeitintervall I+ oder I umfasst, bezeichnet man die Energieflußdichte entweder als „ positive Energieflußdichte“ (ED +) oder als „ Gesamtenergieflußdichte“ (ED) [98].

2.4 Druckmessung extrakorporaler Stoßwellen

Zur Messung des akustischen Druckes extrakorporaler Stoßwellen werden heutzutage sogenannte Hydrophone verwendet. Damit ist es möglich kurzdauernde Druckschwankungen in Wasser zu messen. Der Druckimpuls wird proportional zur Intensität in ein elektrisches Signal umgesetzt. Generell sind vier unterschiedliche Methoden verfügbar den Druck extrakorporaler Stoßwellen messtechnisch zu erfassen [28,49ii]:

- Piezoelektrische Kristallhydrophone:

Diese Geräte bestehen aus piezoelektrischen Kristallen unterschiedlicher Größe. Da der Durchmesser des Druckaufnehmers größer ist als der des Stoßwellenfokus erlauben diese Sensoren keine reproduzierbaren Messungen in streng fokussierten Feldern. Aufgrund dieser Disproportion entstehen Ungenauigkeiten, weshalb piezoelektrische Kristallhydrophone heutzutage nur noch zur Konstanzprüfung des Stoßwellenfokus von Stoßwellenquellen in Gebrauch sind.

- Piezoelektrische Polymermembranen aus Polyvinylidinfluorid (PVDF) :

Diese Geräte zeichnen sich durch sehr kleine Druckaufnehmer aus [14, 77], die eine punktgenaue Messung innerhalb des akustischen Feldes ermöglichen. Nachteil dieser PVDF-Polymermembranen ist zum einen ihre kurze Haltbarkeit und die vergleichsweise hohen Kosten.

- PVDF Metallnadeldruckaufnehmer:

Bei diesen Geräten ist die Spitze einer scharfen Metallnadel mit einer dünnen Schicht PVDF als Druckaufnehmer überzogen. PVDF-Metallnadeldruckaufnehmer sind heute weit verbreitet, gerade auch weil sie gegenüber den reinen PVDF Polymermembranen eine längere Lebensdauer aufweisen und bezüglich der geringeren Kosten eine zusätzliche Verbesserung darstellen [20]. Der Nachteil dieser Geräte besteht darin, dass bedingt durch Wechselwirkungen zwischen den Stoßwellen und der Metallnadel der negative Spitzendruck nicht immer exakt gemessen werden kann. P- trägt jedoch nur 10-20% zur Gesamtenergieflußdichte bei [87].

- Fiberoptische Hydrophone (Glasfaserhydrophone):

Bei diesen Geräten kommt eine andere akustische Messtechnologie zum Einsatz [14]. Der lokale Druckaufnehmer ist in diesem Fall kein Piezokristall, sondern eine an eine Laserlichtquelle gekoppelte Glasfaser deren Spitze im akustischen Feld zu liegen kommt. Durch die Stoßwelle ändert sich die Dichte des umgebenden Mediums, was zur Folge hat, dass sich die Intensität des reflektierten Laserlichtes innerhalb der Glasfaser ebenfalls ändert. Diese Intensitätsschwankungen werden mit einer Fotodiode erfasst.

Systematisch vergleichende Studien zu Druckmessungen extrakorporaler Stoßwellen mit den genannten Geräten liegen in der Literatur nicht vor. Bei den in der vorliegenden Arbeit mit einer elektrohydraulischen Stoßwellenquelle (Typ XL1, Dornier Medizintechnik, Wessling, Deutschland) durchgeführten Untersuchungen wurden alle Druckmessungen mit PVDF Metallnadeldruckaufnehmern durchgeführt.

2.5 Direkte und indirekte Effekte extrakorporaler Stoßwellen im biologischen Gewebe

Extrakorporale Stoßwellen wirken in biologischen Geweben unabhängig von der Erzeugerquelle sowohl über direkte als auch über indirekte Effekte [19, 28, 38, 44, 102].

Ein entscheidender physikalischer Parameter für die direkten Effekte der Stoßwellen ist die akustische Impedanz (Schalleitungswiderstand). Dieser gewebeabhängige Widerstand ist der Schallausbreitung entgegengesetzt und bestimmt die Wirkung der Stoßwelle. Trifft eine Schallwelle auf die Grenzfläche zweier Medien unterschiedlicher Impedanz z.B. Muskel und Knochen auf, so kommt es zum einen zur Reflexion und Beugung der Stoßwelle, und zum anderen zu einer Transformation der akustischen Energie zu mechanischer Energie. Je größer der Impedanzunterschied zwischen zwei Geweben, desto mehr mechanische Energie wird an der Grenzfläche erzeugt [28, 44]. Desweiteren ist entscheidend auf welcher Seite die größere Impedanz liegt: Trifft eine Druckwelle auf ein Medium mit höherer Impedanz, z.B: Knochen, so wird der größte Teil an akustischer Energie in den Knochen fortgeleitet [87]. Folglich werden die Schallwellen an dieser Grenzfläche weniger reflektiert. Auf der abgewandten Seite des Knochens tritt der umgekehrte Fall ein, nämlich ein Übertritt aus einem Gewebe mit hoher Impedanz in ein Gewebe mit niedriger Impedanz (Muskel). Hier wird die akustische Energie zum größten Teil in den Knochen zurückreflektiert und kumuliert mit den späteren Anteilen der Welle. Dies hat zur Folge, dass der mechanische Effekt im Wesentlichen auf der der Schallquelle abgewandten Seite zu finden ist [28].

Indirekte Effekte extrakorporaler Stoßwellen werden durch Kavitation vermittelt [20]. Darunter versteht man das Auftreten gasgefüllter Blasen in Flüssigkeit unter dem Einfluss negativer Druckgradienten. Wie in Abb 1. des Abschnittes 2.1 ersichtlich schließt sich an die positive Druckphase der Stoßwelle eine negative Phase an. Der Unterdruck führt dazu, dass die Kohäsionskräfte der Flüssigkeit überwunden werden und gasgefüllte Blasen entstehen können. Am Ende dieses Zeitintervalls kommt es durch die Rückkehr des Druckes zum atmosphärischen Umgebungsdruck zum implosionsartigen Kollaps dieser Blasen. Die dabei entstehenden Druckpulse führen ebenso wie die damit verbundenen Wasserströmungen (Mikrojets) zur Freisetzung kinetischer Energie an Grenzflächen unterschiedlicher akustischer Impedanz [28, 87, 102].

3. Material und Methoden

3.1 Verwendetes Tiermodell

Untersucht wurden 13 weibliche Mäuse (Balb-C, Black 6) mit einem durchschnittlichen Alter von 11 Monaten (\pm 3Wochen) und einem mittleren Gewicht von 30 Gramm [min. 28 Gramm, max. 32 Gramm]. Durch Werfen einer Münze wurden sieben Tiere in die Behandlungsgruppe und sechs Tiere in die Kontrollgruppe eingeteilt.

Während der Versuche wurden die Tiere im zentralen Tierstall des Instituts für chirurgische Forschung der LMU München in einem 12 stündigen Tag – Nachtzyklus, bei einer Luftfeuchtigkeit von 50% und einer Temperatur von 20 - 22 °C, gehalten. In drei Käfigen [L: 35 cm, B: 25 cm, H: 22 cm] wurden jeweils drei Tiere, in einem Käfig 4 Tiere gehalten. Alle Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Nahrung (ssniff M® Alleindiät für Mäuse; Ssniff Spezialitäten GmbH, Soest / Westfalen, Deutschland).

3.2 Experimente

Alle Untersuchungen erfolgten unter Beachtung der Tierschutzbestimmungen der LMU Muenchen und wurden von der Regierung von Oberbayern mit Sitz in München genehmigt.

3.2.1 Anästhesie

Die Stoßwellenapplikation wurde in Narkose durchgeführt. Diese wurde mit Diethylether (C₂H₅-O-C₂H₅; Wassergehalt 0,014%) eingeleitet. Die Tiere wurden dazu für 7 Sekunden in einen verschließbaren Ethertopf (d:20 cm, h: 30 cm) gesetzt. Mit einer einmaligen intraperitonealen Injektion von 50 mg/kg Körpergewicht (23, 83) Pentobarbital-Natrium (Narcoren®; MERIAL, Halbergmoos, Deutschland) wurde die Narkose aufrechterhalten. Während der Betäubung atmeten die Tiere spontan. Nach einem Zeitraum von 90 Minuten (\pm 10 Minuten) bewegten sich die Tiere wieder aktiv im Käfig.

3.2.2 Applikation extrakorporaler Stoßwellen

Die Stoßwellenapplikation wurde bei allen Tieren mit einer experimentellen elektrohydraulischen Stoßwellenquelle (Experimental – Lithotrypter Typ XL1; Dornier

Medizintechnik, Wessling, Deutschland) durchgeführt. Die Positionierung der Tiere in der Stoßwellenquelle erfolgte unmittelbar nach der Narkose mittels eines dafür angefertigten Röhrensystems. Dieses bestand aus einer 30 cm langen Plexiglasröhre von 5 cm Durchmesser, welche im hinteren Drittel um 45° nach oben gebogen war.

Schemazeichnung:

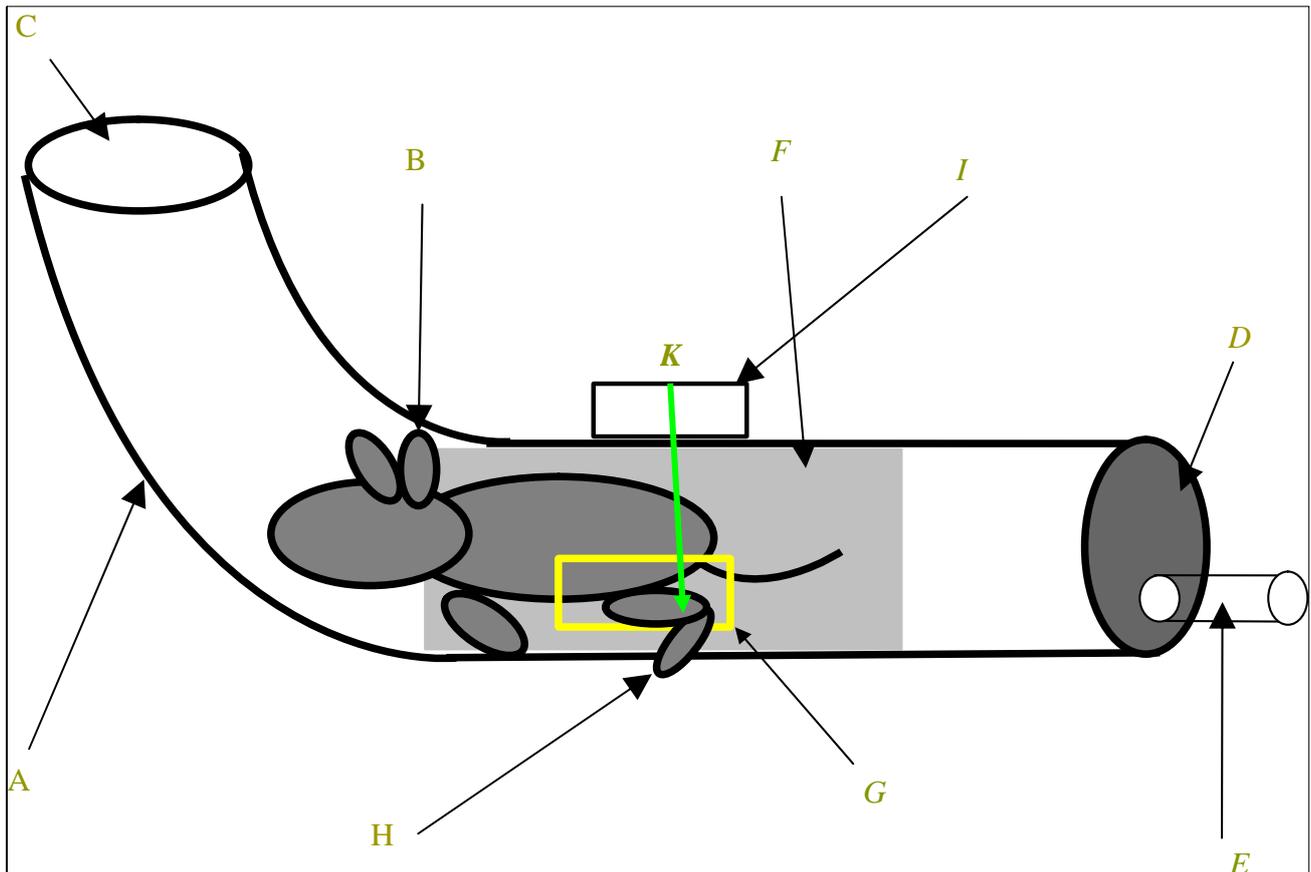


Abb. 3.1

A: Plexiglasröhre

B: Versuchstier

C: oberes offenes Ende

D: unteres verschlossenes Ende

E: Schlauch

F: Styroporhülle

G: seitliche Öffnung

H: untere Extremität

I: an der Außenseite befestigter Hacken

K: Nahtmaterial

In den unteren, horizontalen, Anteil wurde die Maus mit dem Kopf in Richtung des nach oben gebogenen Anteils eingebracht. Auf der ausgewählten Seite wurden nun, durch maximale Flexion im Kniegelenk, der distale Femur, das Knie und die proximale Tibia durch einen 3 cm langen seitlichen Längsspalt nach außen verlagert und in dieser Position mit chirurgischem Nahtmaterial (Supolene 3,5 metric 0 USP, Resorba, Nürnberg) an einem, an der Außenseite der Röhre befestigten, Hacken fixiert. Der untere Anteil der

Röhre war komplett mit Styropor zum Schutz des Thorax und der Bauchhöhle abgedichtet. Das obere Ende der Röhre war offen und diente der Luftzufuhr, das untere Ende wurde wasserdicht verschlossen. Dieses Röhrensystem wurde mittels einer Haltevorrichtung in das $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ warme Wasserbecken des Lithotrypters fixiert. Durch den Längsspalt in die Röhre eindringendes Wasser wurde über einen Schlauch abgesaugt, welcher am unteren Ende der Röhre im Verschuß angebracht war (siehe Abb. 3.1).

Fokussiert wurde der ventrale Tibiaschaft auf der randomisierten Seite. Dies erfolgte mit Hilfe zweier Laserpointer, die in 90° Stellung zueinander an der Stoßwellenquelle angebracht waren. Die punktförmige Schnittstelle der beiden Laserstrahlen markierte den Zielbereich.

Mit einer Energieflußdichte von $0,9 \text{ mJ/ mm}^2$ wurden allen Versuchstieren 1500 Stoßwellenimpulse mit einer Frequenz von 2 Hz appliziert.

3.2.3 Tötung der Tiere

10 Tage nach Applikation der extrakorporalen Stoßwellen wurden die Tiere mit einer Überdosis an Ether getötet.

3.3 Untersuchung

3.3.1 Präparation der unteren Extremität

Die Präparation erfolgte direkt nach der Tötung der Tiere.

Nach Ablösung des Fells beider unterer Extremitäten, erfolgte die Durchtrennung der Achillessehne ansatznah am Tuber calcanei. Die Muskelgruppe des M. triceps surae (a) wurde ursprungsnah im Bereich der Kniekehle abgelöst. Dabei wurde die Integrität des Knochens beachtet. Nach Abtrennung des Unterschenkelknochens (b) von Pfote (c) und Oberschenkel (d) im Bereich des oberen Sprunggelenkes bzw. im Kniegelenkspalt mittels Skalpell, erfolgte die Exartikulation des Oberschenkels im Hüftgelenk. Die Muskelgruppe des M. rectus femoris (e) wurde vom Knochen abgelöst. Jede der Proben (a, b, c, d, e) wurde einzeln in einen mit Formalin (4%) gefüllten Plastikbehälter gelegt. Alle Probenbehälter wurden bei 4°C aufbewahrt.

3.3.2. Einbettung der Muskeln

Alle Muskeln wurden in Paraffin eingebettet.

Dafür wurden Oberschenkel- und Unterschenkelmuskulatur jeder Seite separat in 35 x 25 mm große, mit Deckel verschließbare, Universal Einbettkassetten (KH u. Laborbedarf Fremdling, Furth/ Landshut, Deutschland) gelegt. Zur Identifikation des Präparats wurde zum einen eine Papierbeschriftung mit in die Form eingebettet, zum anderen wurde die Außenseite der Formen mit der Nummer der Probe, der Seite und der Muskelgruppe beschriftet.

Als nächstes wurden alle Proben 2,5 h unter fließendes Wasser gestellt. Anschließend erfolgte die automatische Entwässerung über 24 h. mit dem Entwässerungsautomat Processor 2 LE (Shandon, Runcorn, England). Hierbei lagen die Proben jeweils 2 Stunden in 50%, 70%, 70%, 80%, 90%, 100%, 100% Ethanol, dann jeweils 2 Stunden in 3 Fraktionen Xylol und zum Schluß 4 Stunden in flüssigem Paraffin bei 60°C.

24 Stunden später wurden die Proben in Paraffin ausgegossen.

Hierfür wurden die Proben zuerst in ein 62°C warmes Paraffinbecken gelegt. Als nächstes wurde mit einer Pinzette die Muskelprobe aus den Förmchen mittig in eine Silberschale gelegt, diese Schale wurde bis zum Oberrand mit Paraffin aufgefüllt und mit dem Boden des Förmchens abgedeckt. Damit der Paraffinblock gut mit dem Boden verklebt, wurde dieser zusätzlich mit Paraffin übergossen. Der ganze Komplex wurde nun zum Aushärten auf eine – 6°C kalte Platte gestellt. Nach Erkalten und Aushaerten wurde vorsichtig die Silberschale entfernt, und alle Proben bis zum Schneiden im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

3.3.3 Einbettung der Knochen.

10 Tage nach der Tötung der Tiere und der Präparation wurden die Knochen, nach Fixierung in Formalin (4%), in Methylmetacrylat (MMA) (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland) eingebettet. Dies erfolgte nach dem Münchner MMA – Einbettprotokoll [59]. Als erstes wurden die Knochen über einen Zeitraum von sieben Tagen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50% Ethanol aufsteigend bis 100% Ethanol, siebter Tag Aceton) fixiert. Am achten Tag erfolgte ein Wechsel des Acetons, welches am neunten Tag durch ein 1:1 Gemisch aus Aceton und 100% Methanol ersetzt wurde. Nach jeweils 2 tägiger Fixierung in 2 Fraktionen 100% Methanol wurden die Knochen am 15. Tag in reines MMA eingebettet. Hiefür wurden alle Knochenproben einzeln in verschließbare

Einbettkassetten (KH u. Laborbedarf Fremdling, Furth/Landsberg, Deutschland) umpositioniert. Diese wurden an der Außenseite beschriftet und in einem großen Glas, welches mit purem MMA aufgefüllt war, in den Exikator gestellt. Durch anlegen von Unterdruck wurde hier ein Vakuum erzeugt, in welchem die Proben 2 Tage lang belassen wurden. Dieser Vorgang wurde 2 mal wiederholt. Nach 3 Fraktionen MMA pur erfolgte der Wechsel zum vorläufigen MMA – Einbettgemisch.

Dieses polymerisationsfähige Gemisch, besteht aus dem Grundkunststoff Methylmetacrylat (i), dem Weichmacher Nonylphenylpolyethylenglycol acetat (ii)(Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland) und dem Katalysator Benzoylperoxid (getrocknet) (iii) (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland). Es wurde in einem Verhältnis von 1000ml (i) / 250 ml (ii) / 35g (iii) in einem Erlenmeyerkolben vermischt, und in das Glas mit den Knochenproben eingefüllt. Dieses wurde zunächst in den Exikator und nach einer Stunde im Vakuum, fest verschlossen in den Kühlschrank bei 4°C gestellt.

Vier Tage später erfolgte die entgültige Einbettung der Knochen.

Hierfür wurden Rollrandgläser verwendet, die bis zur Hälfte mit neu hergestelltem MMA – Einbettgemisch aufgefüllt wurden. Die Probe wurde zentriert und zusammen mit einer Papierbeschriftung in diese Einbettmischung positioniert. Nach einer Stunde im Vakuumzustand wurden die Gläser mit ausreichendem Abstand zueinander in mit Wasser gefüllte Petrischalen gestellt, und für die nächsten zehn Tage verschlossen in den Wärmeschrank bei 25°C zum Aushärten gestellt. Danach wurden die Proben für weitere sieben Tage in einen 37°C Wärmeschrank gestellt. Die Aushärtung dauerte jeweils 15 Tage.

3.3.4. Herstellung histologischer Schnittpräparate

3.3.4.1. Herstellung der Paraffinschnitte

Die Proben wurden zunächst mit einem Messer zugeschnitten, so dass eine achteckige Schnittfläche entstand. Da der Boden des Einbettförmchens, auf welchem die Paraffinprobe befestigt worden war, auf beiden Längsseiten schräg verlief und deshalb nicht für Längsschnitte im Mikrotom befestigt werden konnte, wurde die Probe auf ein rechteckiges Holzklötzchen umgelagert. Mit einem Skalpell wurde die Paraffinprobe vorsichtig vom Boden abgelöst. Ein Metallschaber wurde mit dem Bunsenbrenner erwärmt. Damit wurde die Unterfläche der Probe aufgeweicht und auf das Holzklötzchen aufgeklebt. Nach dem Einspannen in das Mikrotom (2050 Supercut, Reichert Jung,

Nußloch, Deutschland) erfolgte der Anschnitt bei 15 µm. Nach dem erstmaligen Anschneiden von Muskelgewebe wurde die Schnittdicke auf 9 µm reduziert. Die im folgenden hergestellten Schnitte wurden zuerst mit Pinzette und Nadel für wenige Sekunden in eine Schale mit kaltem destilliertem Wasser gelegt, danach mit Hilfe des Objektträgers (Superfrost) in eine Schale mit 50°C warmem destilliertem Wasser. Dort verblieben sie solange, bis das Paraffin um die Muskelprobe durchsichtig geworden war. Danach wurden, je nach Größe der Proben, vier Schnitte mit Hilfe einer Nadel auf den Objektträger aufgezogen. Das restliche Wasser, welches sich um die Schnitte angesammelt hatte, wurde abgesaugt. Zum Trocknen wurden die Objektträger zuerst auf eine 40°C vorgeheizte Wärmebank gelegt, dann in Mappen einsortiert und über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C gelagert.

Im Mittel wurden von allen Proben fünf Objektträger mit jeweils vier Schnitten angefertigt.

3.3.4.2. Herstellung der MMA – Schnitte (Kunstharzschnitte)

Nach kompletter Aushärtung im Wärmeschrank bei 37°C wurde zur Vorbereitung für das Schneiden das Rollrandglas von den MMA – Blöcken entfernt. Dazu wurden die Proben für eine Stunde in das Gefrierfach gestellt. Danach wurden sie in ein Handtuch gewickelt und das Glas mit dem Hammer abgeschlagen. Die Splitterreste wurden unter fließendem Wasser entfernt. Im nächsten Schritt wurden die Proben mit einer Diamantbandsäge (Amur- Maschinenbau, Mössingen, Deutschland) zugetrimmt, beschriftet und an der Unterseite abgeschliffen. Mit Sekundenkleber (Cyanolit adhesive) wurde diese Seite nun auf einen speziellen Metallteller geklebt.

Dieser Metallteller wurde in die Innenlochsäge (Sägemikrotom, Leica SP 1600, Bensheim, Deutschland) eingespannt, bis zur Messerkante vorgeschoben, und so festgeschraubt, daß der Block genau an die Unterkante des Messers stieß. Auf dieser Höhe wurde der MMA Block wieder zum Anschlag zurückgedreht. Nach Einstellung der Schnittdicke von 120 µm, wurde der Wasserstrahl angestellt und genau auf die Schnittkante des Messers gerichtet. Bei einer Motorgeschwindigkeit von 15 mm / min. wurden nun von jeder Knochenprobe planparallele Längsschnitte durchgeführt. Nach jedem Durchgang wurde vor Entnahme des Schnittes der Motor und das Wasser abgestellt, die Geschwindigkeit und die Schnittdicke auf 0 gestellt, und der Metallteller zur Ausgangsposition zurückgeschoben. Der Schnitt wurde entnommen, beschriftet und zum Trocknen zwischen zwei Glasplatten gelegt. Bei einer Messerdicke von 300 µm und einer Schnittdicke von 120 µm wurden von jedem Knochenpräparat drei Schnitte angefertigt.

3.3.5. Anfertigung von Mikroradiographien (MRG)

Zur Anfertigung der Mikroradiographien (MRG) wurden hochauflösende Photoplatten (Agfa Art. 596003 FL5 HD 10 x 10 cm, Belgien) verwendet. Die getrockneten und planen Knochenschnitte wurden zunächst bei Tageslicht auf eine Schablone, die in der Größe den Mikroradiographie - Platten entsprach, aufgelegt. Danach wurden sie sowohl untereinander, als auch mit der Schablone durch kleine transparente Klebestreifen befestigt. Auf jeder Platte konnten 15 Schnitte fixiert werden.

Im Fotolabor wurden die untereinander fixierten Schnitte auf die beschichtete Seite der Photoplatte aufgeklebt, ohne daß die Beschichtung mit den Fingern berührt wurde. Die Platte wurde dann in einen Papierumschlag eingelegt. Mittels des Feinfokusröntgengerätes (Faxitron – Mikrofocus X – Ray System / Hawlett Packard, Palo Alto, USA) wurde die Mikroradiographie durchgeführt. Dazu wurde die Platte mittig im Strahlengang des Gerätes ausgerichtet. Bei einer Stromstärke von 2 mA und einer elektrischen Spannung von 19 kV wurde die Platte 70 Minuten lang belichtet.

Nach Ablauf der Zeit wurde die Platte entnommen und entwickelt. Nach 10 Minuten bei 20°C in der Entwicklungslösung (1 Teil Agfa G 282c Entwickler; 4 Teile Leitungswasser) wurde die Platte für 10 Sekunden im Stopbad (destilliertes Wasser) geschwenkt um anschließend für weitere 10 Minuten in die Fixierlösung (1 Teil Agfa G 333c Fixierer; 4 Teile Leitungswasser) gelegt zu werden. Zum Abschluß wurde die Platte 20 Minuten fließend gewässert. Um das Auftreten von Wasserflecken zu verhindern wurde die Platte danach mit destilliertem Wasser abgespült. Anschließend wurde die beschichtete Seite beschriftet, und die Platte schräg in den Wärmeschrank zum Trocknen gestellt.

3.3.5.1. Klassifikationskriterien der Mikroradiographien

Die Auswertung der Mikroradiographien erfolgte mit einem Lichtmikroskop (Leitz–Dialux–20EB, Leitz Wetzlar, Deutschland). Die im folgenden aufgeführten Kriterien wurden jeweils getrennt für Kortikalisoberfläche des Tibiaschaftes der behandelten als auch der unbehandelten Seite untersucht.

Die Klassifikation erfolgte in Anlehnung an die Habilitationsschrift von Maier M (LMU München, 2001) [49 iii)].

1. Reaktionstyp der Knochenneubildung

Klasse 1: Keine bzw. nicht meßbare Knochenneubildung.

Klasse 2: deutliche, entlang der äußeren Kortikalisoberfläche meßbare – jedoch nicht vollständige – Knochenneubildung.

Klasse 3: deutliche, entlang der äußeren Kortikalisoberfläche meßbare – vollständige – Knochenneubildung.

2. Mittleres relatives Ausmaß der Knochenneubildung

Klasse 1: Knochenneubildung an weniger als 33% der periostalen Kortikalisoberfläche.

Klasse 2: Knochenneubildung an mehr als 33% aber weniger als 66% der periostalen Kortikalisoberfläche.

Klasse 3: Knochenneubildung an mehr als 66% der periostalen Kortikalisoberfläche nachweisbar.

3. Messung des größten Durchmessers des neugebildeten Knochens in μm .

Das Präparat wurde hierzu in seiner gesamten Länge und Breite im Kontron KS 400 Bildanalysesystem (Zeiss, Göttingen, Deutschland) erfaßt. Die Messung erfolgte von der Basis der Kortikalis bis zum Punkt der maximalsten Ausprägung der Knochenneubildung.

Bei der Auswertung der Präparate stellte sich heraus, dass die Ergebnisse von der Lage des jeweiligen Schnittes abhingen. Bedingt durch die Anschnittsgeometrie war das maximale Ausmaß der Knochenneubildung an den peripheren Schnitten größer als auf den zentralen Schnitten. Aufgrund dessen wurde die Analyse der Mikroradiographien auf die zentralsten Schnitte beschränkt, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

4. Mikroradiographische Merkmale

- *Periostale Ablösung*: osteoperiostale Ablösung des kortikalisseitig gelegenen Periosts mit fehlendem Kontakt
- *Periostaler Anbau*: periostseitig gelegene Knochenneubildung
- *Kortikale Frakturen*: sichtbare Kontinuitätsunterbrechungen

In Anlehnung an Klassifizierungen bei Backman et al. [2] und Rompe et al. [70] wurde die folgende semiquantitative Klassifizierung verwendet:

Klasse 0: keine Ausprägung aller genannten Merkmale

Klasse 1: geringe Ausprägung aller genannten Merkmale

Klasse 2: mittelgradige Ausprägung aller genannten Merkmale

Klasse 3: deutliche Ausprägung aller genannten Merkmale

3.3.6. Färbung der Paraffindünnschnitte

3.3.6.1. Färbung mit Hämatoxylin – Eosin (H.E. - Färbung)

Zur besseren Darstellung der Muskulatur, der Kerne und eventueller Blutungen wurden alle Muskelschnittpräparate mit Hämatoxylin - Eosin angefärbt.

Zur Vorbereitung wurden die Objektträger mit den Schnitten auf eine 60°C heiße Wärmebank gelegt bis das Paraffin geschmolzen war und glasig durchsichtig wurde.

Für den weiteren Verlauf wurden nun jeweils zehn Objektträger in einem Drahtgestell zusammen befestigt und *en bloc* gefärbt.

Im ersten Schritt erfolgte die Entparaffinierung in 2 mal fünf Minuten Xylol. Daraufhin wurden die Schnitte in eine absteigende Alkoholreihe (jeweils fünf Minuten in 100%, 100%, 96%, 80%, 70% Ethanol) eingeführt und gewässert. Nach kurzem Abspülen in destilliertem Wasser. wurden die Objektträger anschließend für zehn Minuten in den basischen Kernfarbstoff Hämalan gestellt. Als nächstes wurden die Schnitte für zehn Minuten unter Leitungswasser fließend gewässert, bevor sie für weitere 10 Minuten in 0,1% wässrige Eosinlösung eingelassen wurden. Mit destilliertem Wasser wurden die Farbüberreste abgespült. Zum Schluß wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils zwei Minuten in 80%, 96%, 2 Fraktionen 100% Ethanol) und in zwei Fraktionen Xylol (jeweils drei Minuten) entwaessert. Alle Objektträger wurden danach sofort mit Eukitt ueberschichtet und eingedeckt.

3.3.6.2. Färbung mit Berliner Blau

Zur exakteren Darstellung von Einblutungen, welche speziell während oder kurze Zeit nach der Stoßwellenapplikation auftreten koennen, wurde an ausgewählten Schnitten eine Berliner Blau - Färbung zum Nachweis von dreiwertigem Eisen (Fe^{3+}) durchgeführt [6, 9].

Es wurde von allen Versuchstieren jeweils ein Objektträger mit Schnitten von Unterschenkel und Oberschenkel der behandelten Seite bzw. der unbehandelten Kontrollseite angefärbt. Insgesamt wurden 26 Objektträger prozessiert.

Die Anfangsschritte dieser Färbung entsprechen denen, die ausführlich unter Punkt 3.6.1. aufgeführt wurden. Nach der Entparaffinierung und der Wässerung durch die absteigende Alkoholreihe wurden die Schnitte zuerst für fünf Minuten in eine 10%ige wässrige Lösung

von Kaliumferrozyanid gestellt. Danach wurden sie für weitere 30 Minuten in eine Mischung aus gleichen Teilen 20%iger Salzsäure und 10%iger Kaliumferrozyanidlösung eingelassen. Nach sorgfältigem Auswaschen in destilliertem Wasser erfolgte für fünf Minuten die Gegenfärbung mit Kernechtrot. Die Farbüberreste wurden mit destilliertem Wasser abgespült, bevor die Objektträger, wie unter Punkt 3.6.1. beschrieben, über eine aufsteigende Alkoholreihe in Xylol übergeführt wurden und mit Eukitt eingedeckelt wurden.

3.3.6.3. Klassifikationskriterien der Paraffindünnschnitte

Die Muskelschnitte wurden zum einen nach Zeichen der Faserschädigung und Nekrose durch die Stoßwellenapplikation und zum anderen nach Zeichen der nachfolgenden Regeneration untersucht. Das Vorhandensein von regenerierenden Fasern, in Abwesenheit nekrotischer Fasern, wurde als Indikator einer vorrausgegangenen Schädigung des Muskels angesehen [81]

ⓄFaserschädigung

- *Inflammatorische Reaktion* : Einwanderung von Granulozyten und Makrophagen in das Endomysium und Sarkoplasma [10, 73, 81, 82]
- *Frische / Alte Blutung* : Nachweis von Fe³⁺ mit Berliner Blau [6, 9]

ⓄFaserregeneration

- *Kernketten* [10, 81, 82]
- *Basophiles Sarkoplasma* [73, 81, 82]

Klasse 0: keine Ausprägung der genannten Merkmale

Klasse 1: geringe Ausprägung der genannten Merkmale

Klasse 2: mittelgradige Ausprägung der genannten Merkmale

Klasse 3: deutliche Ausprägung der genannten Merkmale

Die Einteilung und Auswertung der Kriterien erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Pathologischen Institut der LMU München.

3.4 Statistische Analyse

Für jede untersuchte Seite der Versuchstiere (behandelt; unbehandelt) sowie für die Kontrollgruppe wurden Mittelwert und Standardabweichung für alle untersuchten Variablen berechnet. Vergleiche innerhalb der Gruppen (z.B. zwischen behandelten und unbehandelten Tibiae der gleichen Tiere) wurden mit dem Wilcoxon – Test für verbundene Stichproben auf signifikante Unterschiede hin überprüft. Bei Vergleichen zwischen Versuchstier und Kontrolltier kam der Mann-Whitney U – Test für unverbundene Stichproben zur Anwendung. Die Untersuchungsergebnisse hinsichtlich der maximalen Dicke der Knochenneubildung wurden ebenfalls mit dem Wilcoxon – Test für verbundene Stichproben und dem Mann-Whitney U – Test für unverbundene Stichproben geprüft.

Das statistische Signifikanzniveau wurden bei $p < 0,05$ festgelegt. Alle Berechnungen wurden mit SPSS 12.0 Version für Windows (SPSS Inc, Chicago,IL) durchgeführt.

Die Daten der einzelnen Mittelwerte und Standardabweichungen, sowie die Daten der Signifikanzanalyse sind in Übersichtstabellen im Anhang 8.1.1 – 8.1.4 einzusehen.

P_w = p-Wert Wilcoxon Test. P_u = p-Wert Mann-Whitney Test

4 . Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Wirkung extrakorporaler Stoßwellen auf den Tibiaschaft der Maus

4.1.1. Ergebnisse der mikroradiographischen Untersuchungen anhand der einzelnen Klassifikationskriterien

4.1.1.1. Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse (Knochen)

Die mikroradiographisch hergestellten Knochenschnitte wurden nach den in Kapitel 3.3.5.1 beschriebenen Kriterien untersucht. Danach zeigten 10 Tage nach Applikation extrakorporaler Stoßwellen mit einer Energieflußdichte von $0,9 \text{ mJ/mm}^2$ fünf von sieben Versuchstieren (71%) eine deutliche Knochenneubildung auf der behandelten Seite. Bei zwei Tieren (29%) konnte nach diesem Zeitraum keine Knochenneubildung nachgewiesen werden. Weder auf der unbehandelten Seite der Versuchstiere noch bei den Kontrolltieren konnte nach diesem Zeitraum eine Knochenneubildung ausgemacht werden.

Eine zusammenfassende Tabelle der Ergebnisse für Versuchs- und Kontrolltiere mit Einteilung in die einzelnen Klassen ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Eine Zusammenfassung der statistischen Analyse unter Punkt 8.1.1 und 8.1.3.

P_w = p-Wert Wilcoxon Test. P_u = p-Wert Mann-Whitney Test.

| Probe | A | | | B | | | Dicke in μm | Periost Abl. | Kortikale Frak. |
|--------------|---|---|---|---|---|---|---------------------------|--------------|-----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | | | |
| 1 beh. Seite | | x | | | x | | 214,55 | x | x |
| 1 unb. Seite | x | | | x | | | - | x | x |
| 2 beh. Seite | x | | | x | | | - | x | xx |
| 2 unb. Seite | x | | | x | | | - | xx | xx |
| 3 beh. Seite | | x | | | | x | 207,35 | xx | xxx |
| 3 unb. Seite | x | | | x | | | - | xx | xx |
| 4 beh. Seite | | x | | | | x | 761,7 | xxx | xx |
| 4 unb. Seite | x | | | x | | | - | xx | xx |
| 5 beh. Seite | | | x | | | x | 480,38 | xx | x |
| 5 unb. Seite | x | | | x | | | - | x | xx |
| 6 beh. Seite | | x | | | x | | 240,86 | xx | xxx |
| 6 unb. Seite | x | | | x | | | - | x | x |
| 7 beh. Seite | x | | | x | | | - | xx | xxx |
| 7 unb. Seite | x | | | x | | | - | x | x |
| 8 Ktrl.tier | x | | | x | | | - | x | - |
| 9 Ktrl.tier | x | | | x | | | - | x | - |
| 10 Ktrl.tier | x | | | x | | | - | x | x |
| 11 Ktrl.tier | x | | | x | | | - | xx | xx |
| 12 Ktrl.tier | x | | | x | | | - | x | - |
| 13 Ktrl.tier | x | | | x | | | - | x | - |

Abbildung 4.1. Ergebnisse der mikroradiographischen Auswertung, entsprechend den im Punkt 3.3.5.1. aufgeführten Kriterien. Die Anzahl der x-Markierungen in den Spalten „periostale Ablösung„ und „kortikale Frakturen„ entsprechen dem Ausmaß der Variablen:
- : keine Merkmalsausprägung * : Geringe Merkmalsausprägung
** : Mittelgradige Merkmalsausprägung *** : Deutliche Merkmalsausprägung

4.1.1.2. Ergebnisse der qualitativen Untersuchung (A.: Reaktionstyp der Knochenneubildung)

In den Präparaten der behandelten Seite der Versuchstiere konnte eine zum Teil prominente Geflechtknochenbildung nachgewiesen werden (4.2 a, b, c). Der neugebildete Knochen lässt sich nicht scharf von der Kortikalis abgrenzen (4.2 c). In den Knochenschnitten der unbehandelten Seite der Versuchstiere sowie der Kontrollgruppe kann keine Knochenneubildung festgestellt werden (Abbildung 4.3 a,b,c). Der Vergleich zwischen behandeltem und unbehandeltem Tibiaschaft der Versuchstiere zeigte eine statistisch signifikante Knochenneubildung auf der behandelten Seite ($p_w=0,034$). Hierbei befanden sich 2 Tiere in der Klasse A 1, 4 Tiere in Klasse A 2 und 1 Tier in Klasse A 3. Die unbehandelte Seite der Versuchstiere zeigte keine Knochenreaktion und wurden in die Klasse A 1 eingeteilt (siehe auch Abbildung 4.4). Die sechs Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe zeigten keine Knochenneubildung und wurden in die Klasse A 1 eingeteilt. Der Vergleich zwischen Versuchs- und Kontrolltier ergab eine statistisch signifikante Knochenneubildung auf seiten der Versuchstiere ($p_u= 0,013$).

4.1.1.3. Ergebnisse der quantitativen Untersuchung (B.: Mittleres relatives Ausmaß der Knochenneubildung)

Drei Versuchstiere (43%) erfüllten die Kriterien für Klasse B3 und jeweils zwei Tiere (je 28%) für Klasse B2 und B1. Die unbehandelten Seiten der Versuchstiere sowie die Kontrollgruppe wurde in Klasse B1 eingeteilt (vgl. Abbildung 4.4). Abbildung 4.2 a-c und 4.3 a-c.

Es zeigte sich ebenfalls eine signifikante Knochenneubildung auf der behandelten Tibiaschaftseite des Versuchstieres ($p_w= 0,038$; $p_u= 0,014$).

4.1.1.4. Ergebnisse der absolute Knochendicke

Da weder auf der unbehandelten Seite der Versuchstiere noch bei den Kontrollgruppen eine Knochenneubildung nachzuweisen war, wurden hierfür nur die Schnitte der behandelten Seiten der sieben Versuchstiere herangezogen und ausgewertet. Bei drei der sieben behandelten Tieren (43%) lagen Werte in vergleichbarem Ausmaß zwischen $207\mu\text{m}$ (=min) und $241\mu\text{m}$ (=max) vor. Bei zwei Tieren (28%) waren die gemessenen Werte doppelt bzw. dreifach so hoch (min= $480\mu\text{m}$ und max= $762\mu\text{m}$). Bei den restlichen

zwei Versuchstieren (28%) konnte in den angefertigten Knochenschnitten keine messbare Knochenneubildung nachgewiesen werden.

Wie die statistische Analyse bestätigt zeigte sich an der behandelten Seite der Versuchstiere, im Vergleich zur unbehandelten Seite, eine signifikante Knochenneubildung ($p_w = 0,043$). Gleiches trifft auch auf den Vergleich zwischen Versuchstieren (behandelte Seite) und Kontrolltieren zu ($p_u = 0,015$).

Abbildung 4.1 und 4.4.

4.1.1.5. Untersuchungsergebnisse der mikroradiographischen Merkmale

Die Merkmale periostale Ablösung und kortikale Frakturen zeigten sich in unterschiedlichem Maße sowohl auf der behandelten wie auch auf der unbehandelten Seite desselben Versuchstieres. Ebenso wiesen auch die Schnitte der unbehandelten Kontrollgruppe diese Merkmale auf.

Für das Merkmal kortikale Frakturen (Abb. 4.2 e, f) konnte kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der behandelten Seite gegenüber der unbehandelten Seite der einzelnen Versuchstiere nachgewiesen werden ($p_w = 0,098$), jedoch war der Unterschied zur Kontrollgruppe deutlich signifikant ($p_u = 0,006$). In den Präparaten der Kontrollgruppe konnten nur bei zwei Tieren (28%) kortikale Frakturen nachgewiesen werden, wohingegen sämtliche Knochenschnitte der unbehandelten Seite der Versuchstiere diese Veränderungen aufwiesen.

Bei dem Merkmal periostale Ablösung (Abb. 4.2 d und 4.3 d) konnte weder zwischen der behandelten und der unbehandelten Seite der Versuchstiere ($p_w = 0,180$), noch gegenüber der Kontrollgruppe signifikante Unterschiede festgestellt werden ($p_u = 0,054$). Das Merkmal zeigte sich in unterschiedlichem Ausmaß in allen untersuchten Schnitten.

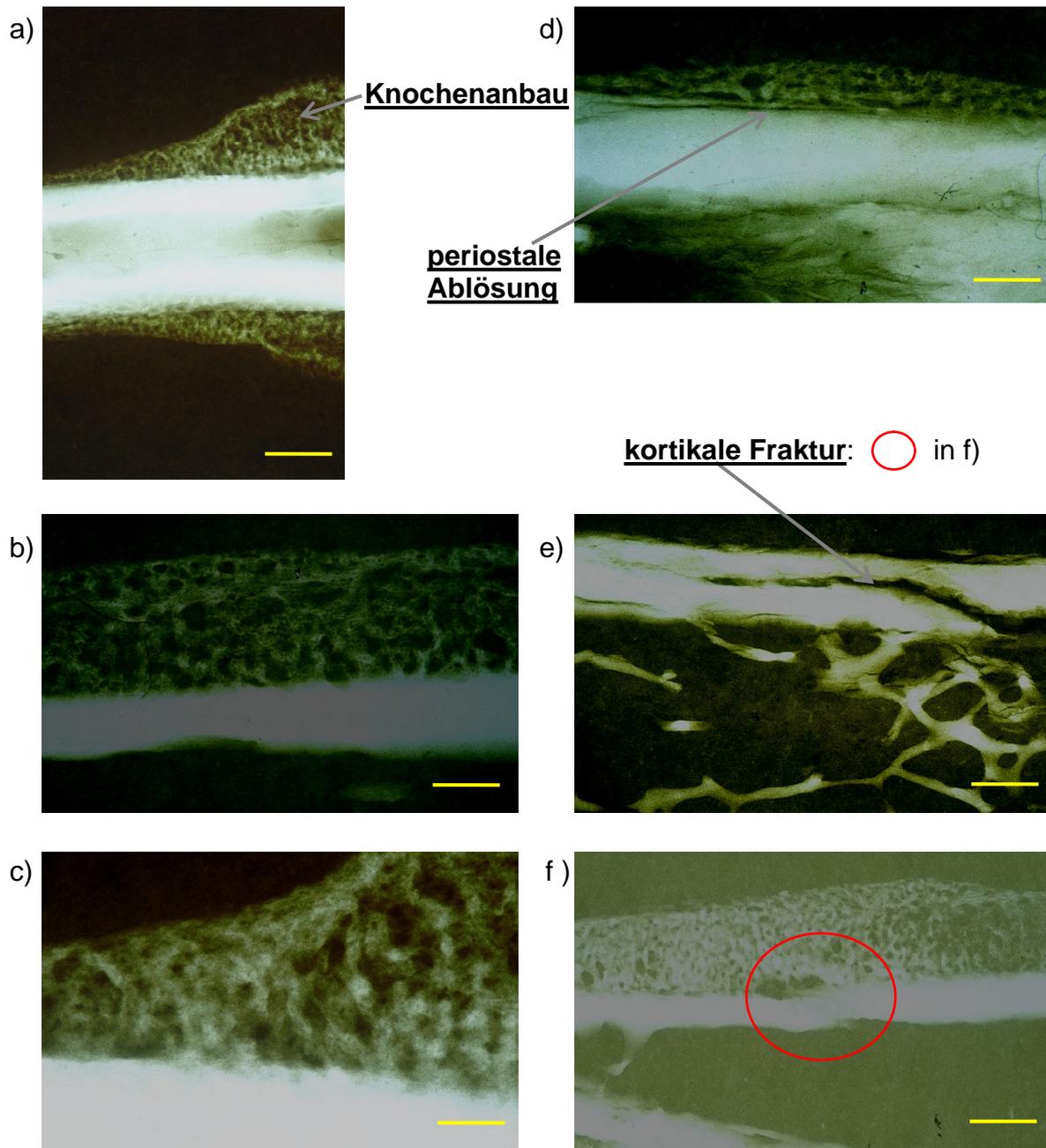
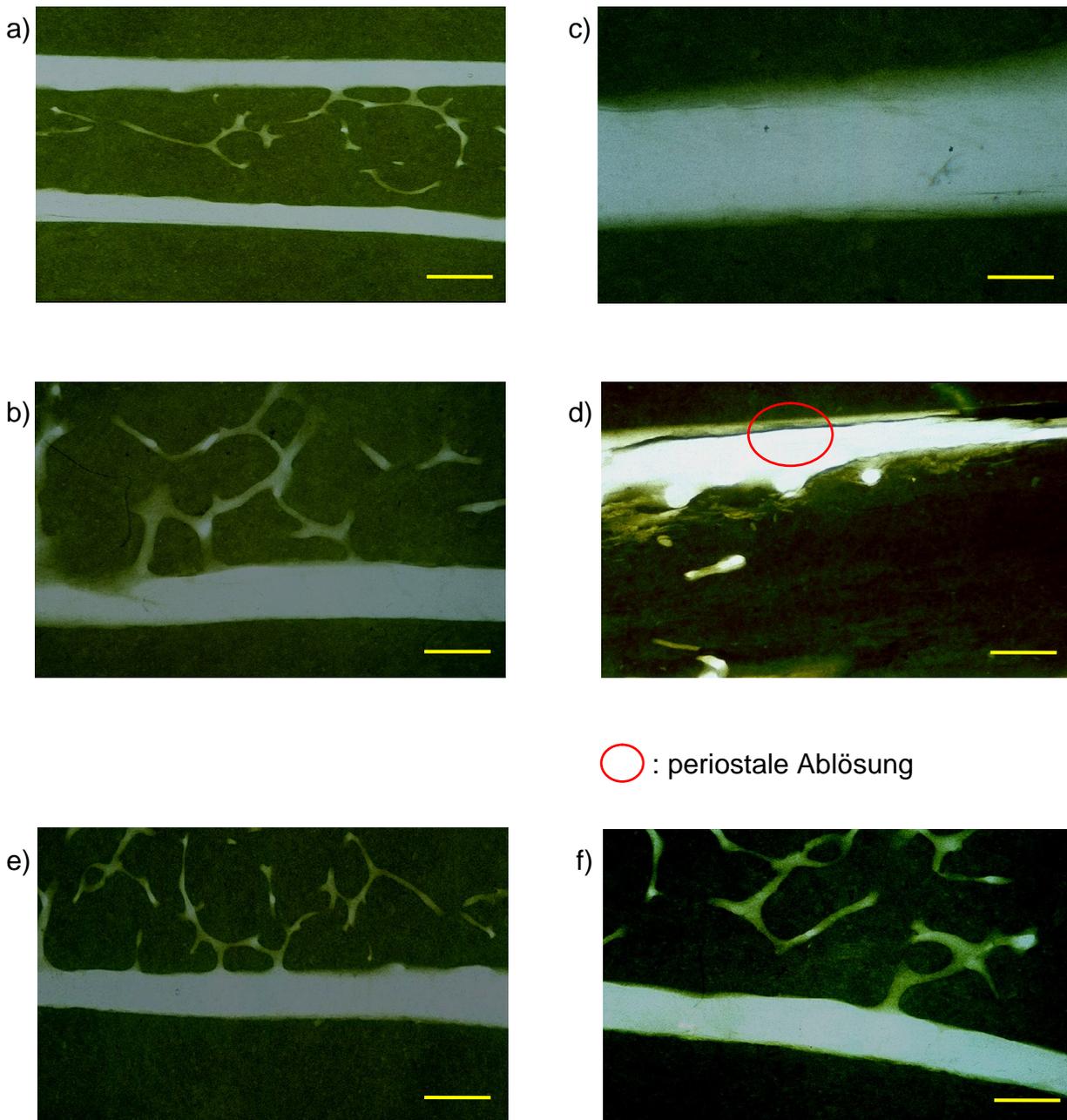


Abbildung 4.2

Mikroradiographischer Nachweis von Knochenneubildung und Knochenschädigung an der behandelten Tibia eines mit einer Energieflußdichte von $0,9\text{mJ/mm}^2$ behandelten Versuchstieres 10 Tage nach extrakorporaler Stoßwellenapplikation.

- Knochenneubildung: a, b, c, d, f
- periostale Ablösungen: d
- kortikale Frakturen: e, f

Balken in den einzelnen Abbildungen:
a,f) $460\mu\text{m}$ b,d,e) $230\mu\text{m}$ c) $115\mu\text{m}$



○ : periostale Ablösung

Abbildung 4.3

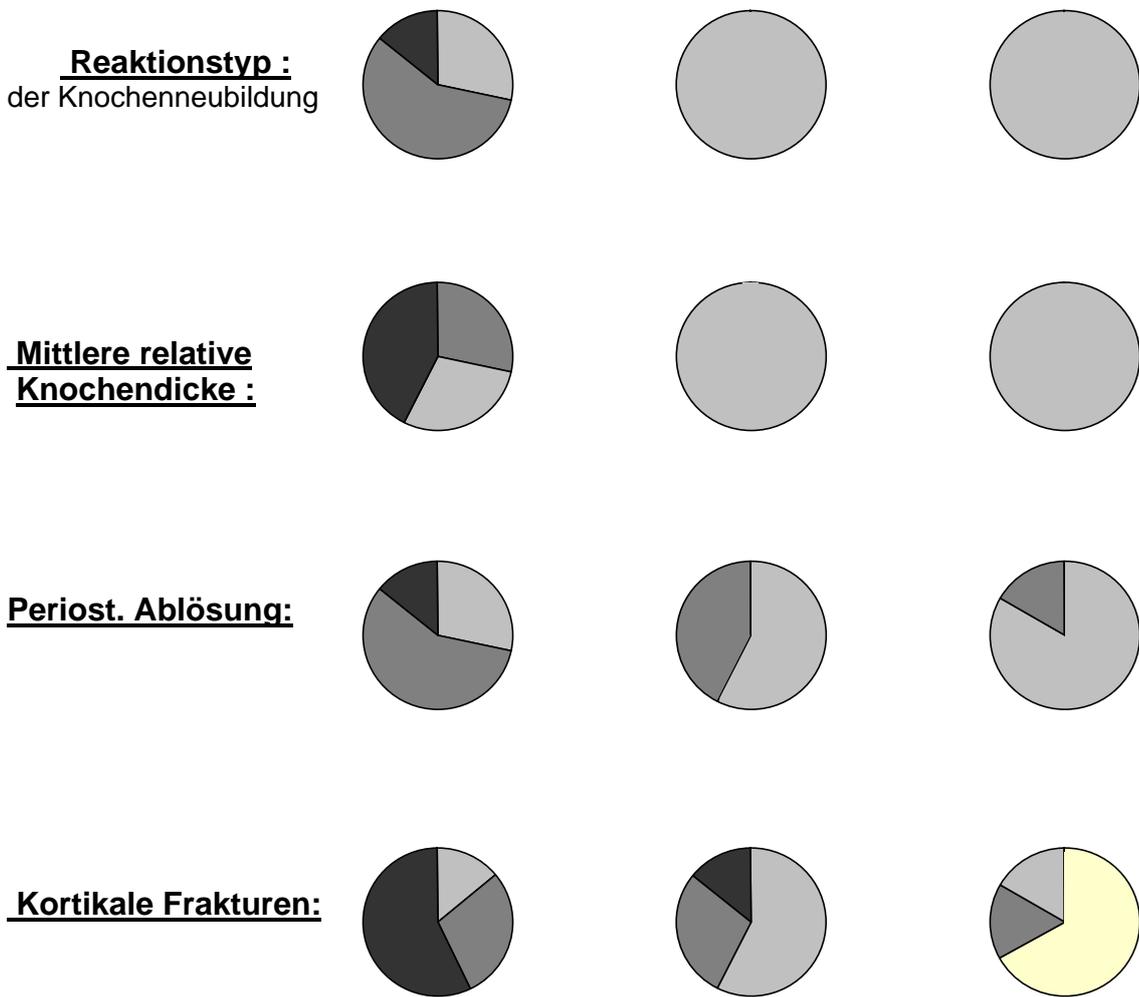
Mikroradiographische Darstellung der unbehandelten Seite eines mit einer Energieflußdichte von $0,9 \text{ mJ/mm}^2$ behandelten Versuchstieres 10 Tage nach extrakorporaler Stoßwellenapplikation, sowie Darstellung der unbehandelten Kontrollgruppe.

a – d: unbehandelte Seite zeigt keine Knochenneubildung aber periostale Ablösung erkennbar (roter Kreis in d)

e – f: Kontrollgruppe zeigt keine Merkmalsausprägung

Balken in den einzelnen Abbildungen:
a) $460 \mu\text{m}$ b,d,e,f) $230 \mu\text{m}$ c) $115 \mu\text{m}$

a) **Behandelte Seite** **Unbehandelte Seite** **Kontrollgruppe**



b) Maximales Ausmaß der absoluten Knochenneubildung:

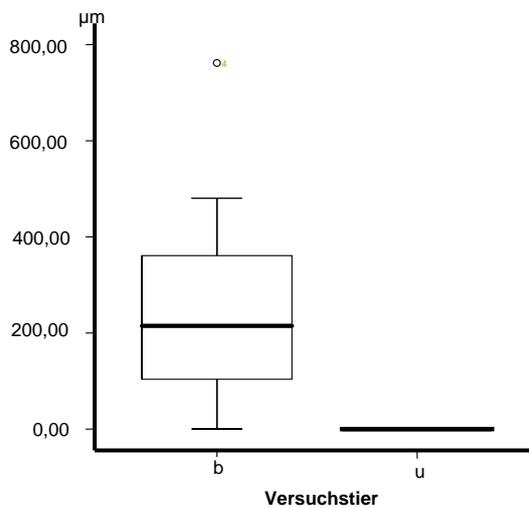


Abbildung 4.4 Legende siehe naechste Seite

Legende zu Abbildung 4.4

a) Relative und absolute Häufigkeiten der Tiere in den einzelnen Klassen der bei den mikroradiographischen Untersuchungen am Tibiaschaft der Maus nach extrakorporaler Stoßwellenapplikation erhobenen Daten. Bei der Darstellung der Kriterien für die Knochenneubildung (A: Reaktionstyp, B: mittleres relatives Ausmaß der Knochenneubildung) repräsentieren hellgraue Flächen (■) Klasse 1, graue Flächen (■) Klasse 2 und schwarze Flächen (■) Klasse 3.

In den Darstellungen der mikroradiographischen Merkmale (periostale Ablösung, kortikale Frakturen) repräsentiert die helle Fläche (□) zusätzlich die Klasse 0.

Die Ergebnisse wurden jeweils im Vergleich zwischen den behandelten und den unbehandelten Tibiae derselben Versuchstiere, sowie im Vergleich zu den Kontrolltieren aufgetragen.

b) Zur besseren Darstellung der absoluten Messwerte der Knochenneubildung wurden diese Daten in einen BOX-Plot eingetragen. Da innerhalb der Kontrollgruppe keine Knochenneubildung festgestellt werden konnte, konzentriert sich die Darstellung auf den Vergleich zwischen behandelter Seite (B) und unbehandelter Seite (U) der Versuchstiere (x-Achse). Die y-Achse gibt die absoluten Messwerte der Knochendicke in μm an.

Der kräftige schwarze Strich in der Box stellt den Medianwert dar mit den Standardabweichungen (Randbegrenzungen der Box). Der einzelne Punktwert am oberen Bildrand entspricht dem höchsten Wert.

Die Analyse mittels Wilcoxon Test (W) und Mann-Whitney U Test (U) ergab statistisch signifikante Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tibiae der Versuchstiere [W] sowie zwischen Versuchstier und Kontrollgruppe [U]:

- Reaktionstyp : $p = 0,034$ [W] ; $p = 0,013$ [U]
- Mittleres relatives Ausmaß der Knochenneubildung : $p = 0,038$ [W] ; $p = 0,014$ [U]
- Absolute Knochendicke in μm : $p = 0,043$ [W] ; $p = 0,015$ [U]
- Kortikale Frakturen : $p = 0,006$ [U]

Bei folgenden Merkmalen ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen:

- Periostale Ablösung : $p = 0,180$ [W] ; $p = 0,054$ [U]
- Kortikale Frakturen : $p = 0,098$ [W]

4.2 Untersuchungen zur Wirkung extrakorporaler Stoßwellen auf die Unterschenkelmuskulatur der Maus

4.2.1. Ergebnisse der histologischen Muskeluntersuchungen nach den einzelnen Klassifikationskriterien

4.2.1.1. Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse (Muskel).

Wie im Abschnitt 3.3.6.3. aufgeführt, wurden die einzelnen Muskel-Paraffindünnschnitte nach Zeichen der Faserschädigung und Nekrose und nach Zeichen der Regeneration untersucht. Es wurden für jede Sparte zwei Kriterien festgelegt. Die Auswertung ergab, dass die Anwendung extrakorporaler Stoßwellen mit einer statistisch signifikanten Schädigung des, den Knochen umgebenden Weichgewebes, einhergeht.

Eine zusammenfassende Tabelle der histologischen Ergebnisse ist in Abbildung 4.5 zu sehen. Eine tabellarische Zusammenfassung der statistischen Analyse ist unter Punkt 8.1.2 und 8.1.4 im Anhang zu finden.

P_w = p-Wert Wilcoxon Test. P_u = p-Wert Mann-Whitney Test.

| Gruppe | Basophile Struktur | Kernketten | Inflammatorische Reaktion | Fe (III) Ablagerung |
|----------------------|--------------------|------------|---------------------------|---------------------|
| 1 beh. Seite | - | - | * | - |
| 1 unb. Seite | - | - | - | - |
| 2 beh. Seite | *** | *** | ** | ** |
| 2 unb. Seite | - | - | * | - |
| 3 beh. Seite | ** | *** | ** | *** |
| 3 unb. Seite | - | - | * | - |
| 4 beh. Seite | *** | *** | *** | ** |
| 4 unb. Seite | - | - | * | - |
| 5 beh. Seite | ** | ** | *** | *** |
| 5 unb. Seite | - | - | * | - |
| 6 beh. Seite | *** | *** | *** | ** |
| 6 unb. Seite | - | - | - | - |
| 7 beh. Seite | * | * | *** | ** |
| 7 unb. Seite | - | - | - | - |
| 8 Ktrlgruppe | - | - | - | - |
| 9 Ktrlgruppe | - | - | * | - |
| 10 Ktrlgruppe | - | - | - | - |
| 11 Ktrlgruppe | - | - | * | - |
| 12 Ktrlgruppe | - | - | - | - |
| 13 Ktrlgruppe | - | - | * | - |

Abbildung 4.5 Ergebnisse der histologischen Untersuchung der, den Fokus umgebenden Muskulatur, entsprechend den aufgeführten Kriterien in Abschnitt 3.3.6.3.

In der oberen Hälfte sind die Versuchstiere getrennt nach behandelter und unbehandelter Seite aufgeführt. In der unteren Hälfte sind die Tiere der Kontrollgruppe (Ktrlgruppe) aufgelistet.

Die Anzahl der *-Markierungen entsprechen dem Ausmass der Variablen:

- : keine Ausprägung der Merkmale
- * : Geringgradige Ausprägung der Merkmale
- ** : Mittelgradige Ausprägung der Merkmale
- *** : Deutliche Ausprägung der Merkmale

4.2.1.2 Analyse der Faserregeneration:

4.2.1.2.1 Basophiles Sarkoplasma

In der Muskulatur der behandelten Seite der Versuchstiere konnte eine Ausprägung des Merkmals gefunden werden (Abb. 4.6 a, b). Weder in den Schnitten der unbehandelten Seite der Versuchstiere, noch in den Schnitten der Kontrolltiere fand sich eine entsprechende Ausprägung (Abb. 4.7 a-d).

Eine verstärkte Basophilie war auf der behandelten Seite der Versuchstiere bei drei von sieben Tieren (43%) deutlich erkennbar; bei zwei (28%) in mittlerem Ausmaß. Bei je einem Tier konnte nur eine geringe Ausprägung bzw. keine Ausprägung der Basophilie nachgewiesen werden (siehe Abb 4.8). Der statistische Vergleich zwischen behandelter und unbehandelter Seite der Versuchstiere zeigte ein signifikantes Ergebnis ($p_w = 0,026$), ebenso der Vergleich zwischen Versuchstier und Kontrollgruppe ($p_u = 0,005$).

4.2.1.2.2 Kernkettenbildung

Für diesen Klassifikationspunkt wurden die einzelnen Muskelschnitte daraufhin untersucht, ob eine zentrale Aneinanderreihung mehrerer Muskelfaserkerne vorliegt (Abb. 4.6 a-c). Der Nachweis von Kernketten als Zeichen der Muskelfaserregeneration ergab ein signifikantes Ergebnis auf der behandelten Seite der Versuchstiere ($p_w = 0,024$; $p_u = 0,004$). Bei diesem Kriterium zeigten vier der sieben Versuchstiere (57%) eine deutliche Merkmalsausprägung. Je ein Versuchstier (14%) zeigte eine mittelgradige bzw. geringe Ausprägung. Bei einem Versuchstier konnte in den angefertigten Muskelschnitten keine Kernkettenausbildung gefunden werden. In den Muskelschnitten der unbehandelten Seite der Versuchstiere wie auch der Kontrolltiere konnte keine Merkmalsausprägung nachgewiesen werden.

4.2.1.3 Analyse der Faserschädigung:

4.2.1.3.1 Inflammatorische Reaktion

Der Vergleich von Versuchs- und Kontrolltieren zeigte, dass sich die Entzündungsmerkmale (Einwanderung von Granulozyten und Makrophagen in das Endomysium und Sarkoplasma) bei allen Versuchstieren, aber nicht bei Kontrolltieren nachweisen ließen (Abb. 4.5 und 4.8). Auf der behandelten Seite zeigten vier der sieben Versuchstiere (57%) eine deutliche Entzündungsreaktion (Abb. 4.6 a, b), zwei Tiere (28%) wiesen eine mittelgradige und ein Tier (14%) eine geringgradige Merkmalsausprägung auf.

Im Unterschied zu den bereits erwähnten Muskelklassifikationsmerkmalen konnten jedoch bei vier Versuchstieren in einigen Schnitten der unbehandelten Seite ebenfalls minimale Anzeichen einer entzündlichen Reaktion gefunden werden. Ebenso konnte bei der Hälfte der Kontrolltiere eine geringgradige Merkmalsausprägung nachgewiesen werden.

Trotz dieser minimalen Reaktion konnte an der behandelten Seite von Versuchstieren, im Vergleich zur unbehandelten Seite ($p_w = 0,017$) und zu Kontrolltieren ($p_u = 0,004$) eine signifikant deutlichere Entzündungsreaktion beobachtet werden).

4.2.1.3.2 Nachweis von Eisenablagerungen

Der Austritt von Erythrozyten in die Muskelfaserzwischenräume im Rahmen einer Gefäßschädigung konnte anhand dieser Färbung blau dargestellt werden (Abb. 4.6 d).

Das Ergebnis zeigte eine signifikante Merkmalsausprägung auf der behandelten Seite der Versuchstiere ($p_w = 0,023$; $p_u = 0,004$). Zwei der sieben Tiere (28%) zeigten eine deutliche, vier (57%) eine mittelgradige Ausprägung. Bei einem Versuchstier (14%) konnte kein Hinweis auf eine Einblutung gefunden werden. Es konnte weder auf der unbehandelten Seite der Versuchstiere, noch auf Seiten der Kontrolltiere ein positiver Eisennachweis gefuehrt werden. Dieser negative Befund lässt den Schluß zu, dass auf der nicht behandelten Seite der Versuchstiere sowie bei den Kontrolltieren keine Einblutung in das Muskelgewebe stattgefunden hat.

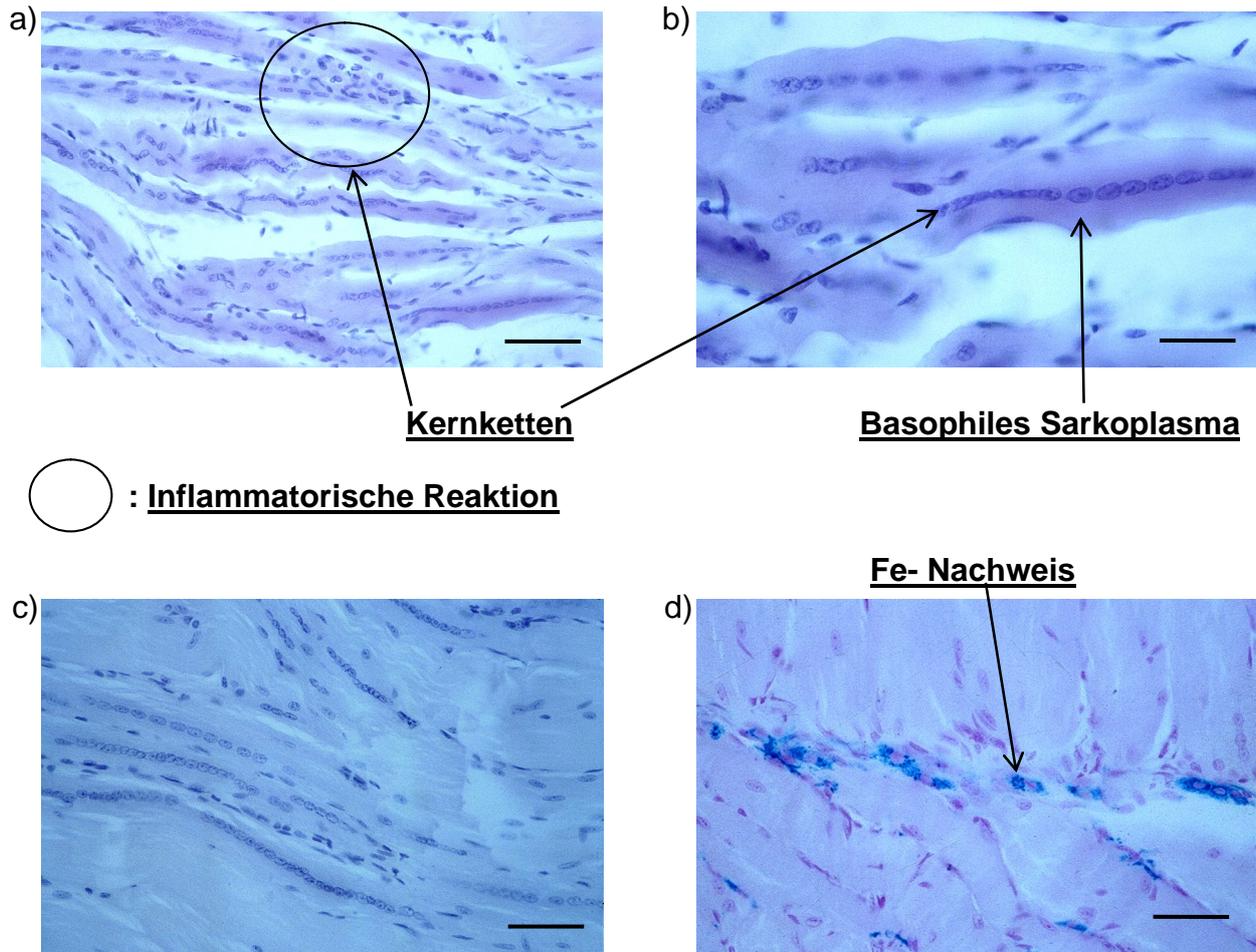


Abbildung 4.6

Histologische Darstellung muskulärer Veränderungen auf der behandelten Seite eines mit einer Energieflußdichte von $0,9\text{mJ/mm}^2$ behandelten Versuchstieres 10 Tage nach extrakorporaler Stoßwellenapplikation.

H.E Färbung in Abbildung a-c; Berliner Blau Färbung in Abbildung d.

Zeichen der Faserschädigung:

- Inflammatorische Reaktion: Bild a,b,c
- Eisenablagerungen: Bild d

Zeichen der Faserregeneration:

- Basophiles Sarkoplasma: Bild a,b
- Kernketten: Bild a,b,c

Balken in den Abbildungen:
a, b, d) $57\mu\text{m}$ c) $28\mu\text{m}$

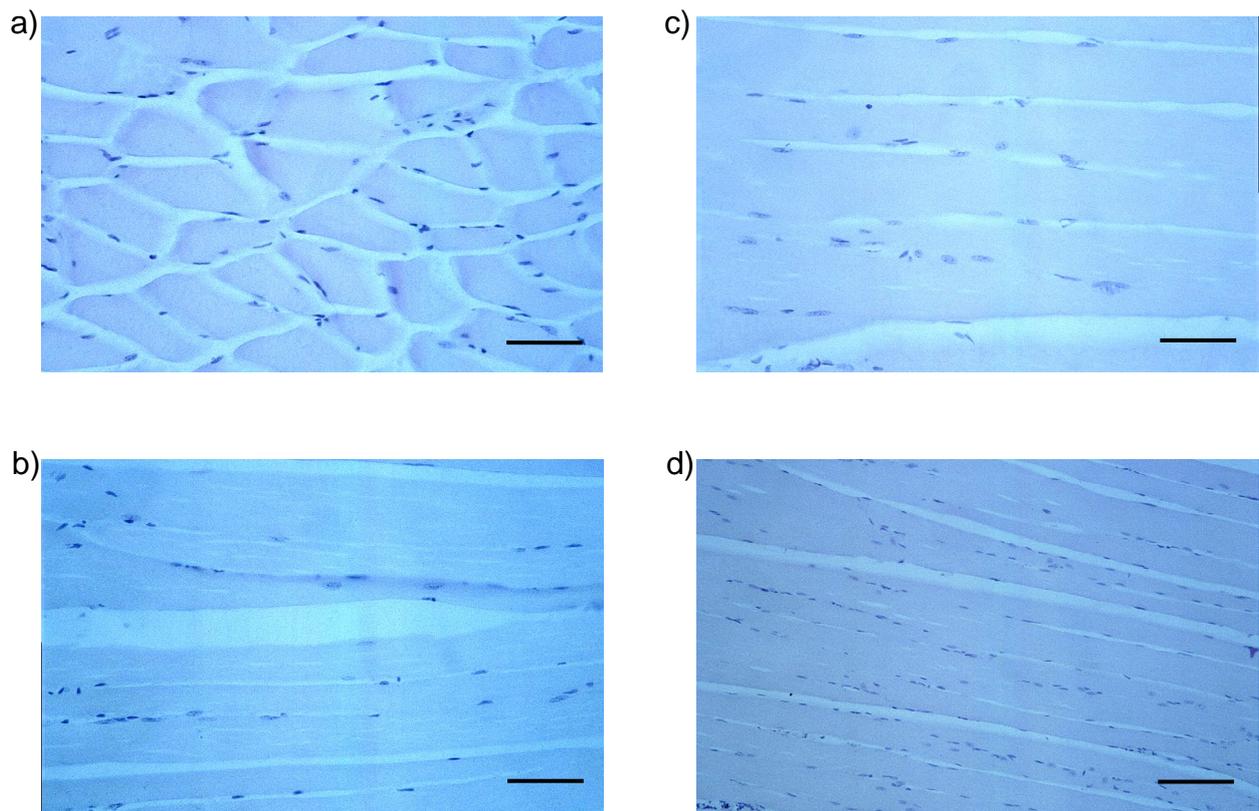


Abbildung 4.7

Histologische Darstellung der Muskulatur auf der unbehandelten Seite eines mit einer Energieflußdichte von $0,9\text{mJ/mm}^2$ behandelten Versuchstieres 10 Tage nach extrakorporaler Stoßwellenapplikation, sowie Darstellung der Muskulatur der unbehandelten Kontrolltiere.

- a) Muskelquerschnitt; unbehandelte Seite Versuchstier
- b) Muskellängsschnitt; unbehandelte Seite Versuchstier
- c,d) Muskellängsschnitt; Kontrolltier

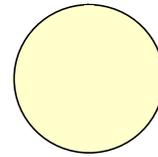
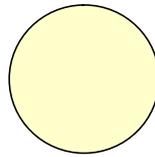
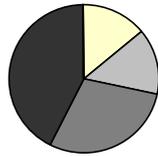
H.E Färbung in Abbildung a-d.

Es lassen sich weder in der Muskulatur der unbehandelten Seite noch in der der Kontrollgruppe Zeichen der Faserschädigung (Zellreichtum bei inflammatorischer Reaktion) als auch Anzeichen für eine Faserregeneration (basophiles Sarkoplasma und Kernketten) nachweisen.

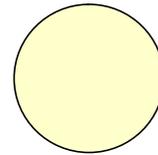
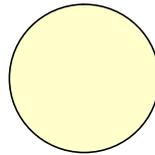
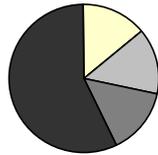
Balken in den Abbildungen:
a,b,c) $57\mu\text{m}$ d) $115\mu\text{m}$

Behandelte Seite Unbehandelte Seite Kontrollgruppe

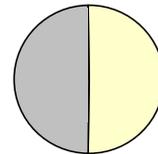
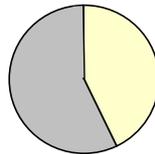
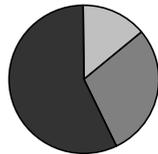
**Ausprägung
der Basophilie :**



**Vorhandensein
von Kernketten:**



**Ausprägung der
entzündl. Reaktion:**



**Ausprägung der
Eisenablagerung:**

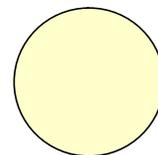
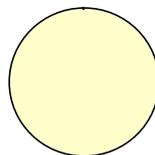


Abbildung 4.8. Legende siehe folgende Seite

Legende der Abbildung 4.4

Relative Häufigkeiten der Tiere in den einzelnen Klassen der bei den histologischen Untersuchungen an der Muskulatur der unteren Extremität der Maus nach extrakorporaler Stoßwellenapplikation erhobenen Daten. Einteilung siehe Punkt 3.3.6.3.

In der Darstellung repräsentieren die hellen Flächen (□) Klasse 0, hellgraue Flächen (▒) Klasse 1, graue Flächen (■) Klasse 2 und schwarze Flächen (■) Klasse 3.

Nach Applikation extrakorporaler Stoßwellen konnten isoliert auf der behandelten Seite der Versuchstiere Zeichen der Faserregeneration, wie die basophile Verfärbung des Sarkoplasmas und die Kernkettenausbildung, sowie Zeichen der Faserschädigung (Vorhandensein von Einblutungen) nachgewiesen werden. Diese Merkmale waren weder auf der unbehandelten Seite der Versuchstiere noch bei den Kontrolltieren auffällig.

Die verstärkte Zelleinwanderung in das Muskelgewebe als Zeichen der inflammatorischen Reaktion konnte auch in vereinzelt Muskelschnitten der unbehandelten Seite und der Kontrollgruppe gefunden werden.

Die Analyse mittels Wilcoxon Test (W) und Mann-Whitney U Test (U) ergab statistisch signifikante Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tibiae der Versuchstiere [W] sowie zwischen Versuchstier und Kontrollgruppe [U]:

- Nachweis und Ausprägung einer Basophilie: $p = 0,026$ [W]; $p = 0,005$ [U]
- Nachweis und Ausprägung von Kernketten: $p = 0,024$ [W] ; $p = 0,004$ [U]
- Nachweis und Ausprägung einer entzündl. Reaktion: $p = 0,017$ [W]; $p = 0,004$ [U]
- Nachweis und Ausprägung von Eisenablagerungen: $p = 0,023$ [W]; $p = 0,004$ [U]

5. Diskussion

5.1 Wirkung extrakorporaler Stoßwellen auf das Knochengewebe

Die Verwendung extrakorporaler Stoßwellen ist seit Jahrzehnten bei der Behandlung urologischer Erkrankungen wie Harnleiter- und Harnblasensteine eine häufig eingesetzte und etablierte Therapiemöglichkeit. In den letzten Jahren richtete sich das Hauptaugenmerk der extrakorporalen Stoßwellentherapie (ESWT) jedoch zunehmend auf die Behandlungen von chronischen Erkrankungen des Bewegungsapparates. So konnte unter anderem ein beschleunigter Ausheilungsprozeß der Tendinitis calcarea der Rotatorenmanschette [16, 29, 64, 94] ebenso nachgewiesen werden wie eine Symptomreduktion im Rahmen der Fasciitis plantaris [8, 31, 32, 68, 71, 103], der Insertionsenthesiopathie der Achillessehne [12, 69, 27] oder der Epicondylitis humeri radialis [5, 17, 72]. Vor allem der osteoneogenetische Effekt extrakorporaler Stoßwellen wurde Thema einer Vielzahl unterschiedlicher tierexperimenteller Untersuchungen, bei denen sowohl an intakten [20, 22, 30, 49, 52, 53, 74] wie auch an frakturierten [25, 34, 41, 60] Knochen eindrucksvoll Zonen neugebildeten Knochens nach ESWT nachgewiesen werden konnten. Diese tierexperimentellen Studien wurden bisher zu einem großen Anteil an größeren Säugetieren vornehmlich Kaninchen [20, 52, 53, 60, 74, 84], Hunden [21, 41, 91] und Schafen [22, 25] durchgeführt.

In der vorliegenden Studie wurde an der Maus, als Modell für ein kleines Säugetier, die Wirkung ESW auf den Knochen der unteren Extremität untersucht. In Übereinstimmung mit den vorausgegangenen Versuchsmodellen in der Literatur führte die Applikation von extrakorporalen Stoßwellen an der proximalen Tibia der Maus mit einer Energieflußdichte von $0,9 \text{ mJ/mm}^2$ zu einer periostalen Knochenneubildung isoliert auf der behandelten Seite der Versuchstiere. Die in unserer Studie verwendete Energieflußdichte von $0,9 \text{ mJ/mm}^2$ wurde bereits mehrfach in der Literatur zur Induktion von Knochenneubildung an unterschiedlichen Tiermodellen appliziert [22, 51, 52, 53, 85]. Die Verwendung der höherenergetischen Stoßwellen in der vorliegenden Arbeit liegt darin begründet, dass die Reaktion des Modellorganismus Maus sowie die Auswirkungen der Stoßwellenapplikation auf den Stütz- und Bewegungsapparat aufgrund fehlender Daten in der Literatur nicht eindeutig vorhersehbar waren. Die Tiere in unserer Studie wurden 10 Tage nach Applikation der ESW getötet. Innerhalb dieses Zeitraumes bildete sich ein mikroradiographisch deutlich nachweisbarer Geflechtknochen. Dies entspricht den

Erfahrungen vorausgegangener Studien in denen ebenfalls nach dieser kurzen Zeit nachweisbare Knochenveränderungen auftraten [52, 53,75, 85].

In den mikroradiographischen Untersuchungen der Knochen ließen sich ferner die in der Literatur [25, 20, 49, 52] nach Applikation hoher Energieflußdichten (in diesem Fall 0,9 mJ/mm²) bekannten und beschriebenen kortikalen Frakturen und periostalen Ablösungen nachweisen. In der vorliegenden Studie konnte allerdings sowohl bezüglich der periostalen Ablösung als auch der kortikalen Frakturen kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der behandelten und der unbehandelten Seite der Versuchstiere festgestellt werden. Da diese beiden genannten Merkmale zusätzlich auch in unterschiedlichem Ausmaß an den Knochen der Kontrolltiere nachzuweisen waren, muss in Betracht gezogen werden, dass ein Großteil der dokumentierten Veränderungen Artefakte waren und nicht stoßwellenbedingt entstanden sind. Eine mögliche Erklärung dafür könnte in der Anfertigung der einzelnen Mikroradiographieschnitte liegen. In der vorliegenden Studie wurde versucht mehrere (im Mittel drei) 120 µm dicke Schnitte bei einer Messerdicke des Osteotoms von 300 µm aus der Tibia der Maus anzufertigen. Hierbei waren immer wieder vereinzelte Schnitte nicht verwertbar, da entweder das Knochenmaterial aus der gehärteten MMA – Masse ausbrach oder während des Schneidevorganges in sich frakturierte. Daher liegt nahe, dass der angewandte Versuchsaufbau zur Anfertigung der Mikroradiographieschnitte für das Tiermodell Maus weniger geeignet ist. Eine Reduktion der Schnittanzahl auf einen zentralen Schnitt sowie eine Vergrößerung der Schnittdicke auf >150 µm könnten das Ergebnis in folgenden Studien verbessern. Jedoch könnte eine Vergrößerung der Schnittdicke zu einem weiteren Problem führen. In unserer Studie konnte bei zwei der sieben Versuchsmäuse keine Knochenneubildung in den vorliegenden drei Mikroradiographieschnitten nachgewiesen werden. Wenn man bedenkt, dass der maximale Durchmesser des Tibiaknochens der Maus bei ca. 2 mm liegt, wäre es möglich dass die Zonen der Knochenneubildung bei diesen Tieren gar nicht angeschnitten und erfasst wurden und deshalb ein negatives Ergebnis dokumentiert wurde.

Wenn man der in der Literatur lange Zeit favorisierten Hypothese folgt, dass SW induzierte Knochenneubildung die Generierung von Mikrofrakturen zur Voraussetzung hat [39, 89], werfen die Befunde der vorliegenden Studie bei der Maus die Frage auf, ob die hier beobachtete Knochenneubildung, in Anbetracht der nicht eindeutig durch SW bedingten kortikalen Frakturen, überhaupt SW induziert ist. Knochenneubildung ist allerdings nicht nur durch hochenergetische Stoßwellen mit einer Energieflußdichte $\geq 0,9$ mJ/mm² möglich. Bereits in zahlreichen Untersuchungen der letzten Jahre konnte eine verstärkte Knochenaktivität am intakten und auch frakturierten Knochen durch Applikation

niederenergetischer Stoßwellen mit einer Energieflußdichte $\leq 0,5\text{mJ/mm}^2$ gezeigt werden [25, 43, 60, 76, 85, 90]. Aus diesen Studien geht jedoch nicht hervor, ob niederenergetische SW neben einer Knochenneubildung auch kortikale Frakturen oder periostale Ablösungen hervorrufen können. Erstmals wurde 2001 [49] beschrieben, dass nach Applikation von niedrigerenergetischen extrakorporalen Stoßwellen ($0,5\text{ mJ/mm}^2$) klar erkennbare Zeichen der periostalen Knochenneubildung ohne Zeichen von kortikalen Frakturen und periostalen Ablösungen beobachtet werden konnten. Weiterführende Studien [52] bestätigten dieses Ergebnis. Damit konnte die langfavorisierte Hypothese [39, 89] widerlegt werden, dass die stoßwelleninduzierte Knochenneubildung die Generierung von Mikrofrakturen voraussetzt. Die Mechanismen, die diese stoßwelleninduzierte periostale Knochenneubildung ohne oben genannte Veränderungen vermitteln, sind jedoch noch weitestgehend unklar. Angesichts dieser Ergebnisse scheint es wiederum plausibel anzunehmen, dass das Knochenwachstum am Tibiaschaft der Maus in der vorliegenden Studie SW induziert ist.

Aus Grundlagenexperimenten ist bekannt, dass die Effekte der Stoßwellentherapie an den Übergängen zwischen Gewebe unterschiedlicher Impedanz nachzuweisen sind [28, 98]. Die verschiedenen Weichgewebe haben vergleichbar niedrige Impedanzen wogegen die Schalldichte von Knochen 5-fach höher ist [28, 98]. Deshalb sind die größten Effekte einer extrakorporalen Stoßwellentherapie im Periost des kortikalen Knochens zu erwarten. Das Periost spielt eine zentrale Rolle in der Frakturheilung sowie im Knochenstoffwechsel und in der Knochenneubildung [33, 62]. Es ist bekannt, dass sowohl sensorische Nervenfasern [4, 36], welche vornehmlich Substanz P und calcitonin gene-related peptide (CGRP) als Neurotransmitter freisetzen als auch zahlreiche Wachstumsfaktoren unter anderem der transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) und insulin-like growth factor-I (IGF-I) [24, 79] im Periost nachzuweisen sind. Das Vorhandensein von TGF- β 1 führt unter anderem zu einer Erhöhung von IGF-I, wodurch wiederum die Vermehrung von Osteoblasten sowie die Knochenmatrixsynthese stimuliert werden [98]. Desweiteren reguliert TGF- β 1 verschiedene Zelltypen welche eine direkte Rolle in der Knochenneubildung spielen, beispielsweise mesenchymale Stammzellen, Chondrozyten, Osteoblasten und Osteoclasten. Mesenchymale Stammzellen differenzieren sich dadurch zu Osteoprogenitorzellen, welche proliferieren und sich weiter zu knochenbildenden Osteoblasten entwickeln [37, 42, 100].

Der Einfluß extrakorporaler Stoßwellen unterschiedlicher Energie auf das biologische Verhalten von Periost- und Osteoblastenzellen wurde in zahlreichen *in vitro* Experimenten

untersucht. Dabei konnte ein dosisabhängiger Wirkmechanismus festgestellt werden. ESW hoher Energie [57, 58] gingen mit einem cytotoxischen Effekt einher, wohingegen niedrig energetische Stoßwellen zu einer vermehrten Zellproliferation und zur Expression von Knochenmatrixproteinen, wie Alkaline Phosphatase (ALP), Osteocalcin und Prokollagen Typ I, sowie Wachstumsfaktoren wie TGF- β 1 führten [46, 45, 84, 95, 96].

Zusätzlich zu der Hypothese, dass niedrig-energetische Stoßwellen, über Induktion verschiedenster Wachstumsfaktoren im Periost, eine Knochenneubildung auslösen können, wurde in den letzten Jahren vermehrt die Rolle der im Periost liegenden afferenten Nervenfasern und deren Neurotransmitterfreisetzung untersucht. Besonderes Augenmerk richtete sich hierbei auf die Wirkung von Substanz P (SP) und CGRP. Beide Neurotransmitter kommen ubiquitär im zentralen und peripheren Nervensystem vor [1, 78, 79]. Entsprechende afferente Nervenfasern wurden in Bändern, Muskeln, Periost [4,36] und im Knochenmark [66] nachgewiesen. Anhand von *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl SP als auch CGRP die Stammzellmitose, die Proliferation von Osteoprogenitorzellen und auch die Aktivität der Osteoblasten und somit das Knochenwachstum stimulieren und beeinflussen können [1, 3, 40, 78, 79]. Desweiteren konnten in Osteoblasten Rezeptoren für CGRP und SP nachgewiesen werden [1, 40, 86]. Die Zugabe von SP zu Knochenmark-Zellkulturen führte in diesen Studien zu einer Vermehrung der Kolonien und zu einer Proliferation derselben. Unter dem Einfluß extrakorporaler Stoßwellen kam es in weiteren Untersuchungen zu einem signifikanten Anstieg der Substanz P Freisetzung aus dem Periost des behandelnden Knochens in den ersten 24 h nach ESWT bei gleichzeitig nachgewiesener Knochenneubildung [52, 50].

Zusammenfassend ist es unter Betrachtung der aufgeführten Erkenntnisse und Ergebnisse der vorliegenden Studie durchaus möglich, dass Knochenneubildung durch ESWT weniger vom Vorhandensein kortikaler Frakturen und periostaler Ablösungen abhängig ist, sondern durch Induktion von im Periost lokalisierter Wachstumsfaktoren und Neurotransmitter bedingt ist. Diese Hypothesen müssen jedoch in funktionellen und klinischen Studien weiter getestet werden.

5.2 Wirkung extrakorporaler Stoßwellen auf das umgebende Weichteilgewebe

In der vorliegenden Studie wurde untersucht welche Auswirkung die applizierten Stoßwellen auf das, den Knochen umgebende Muskelgewebe haben. Die Kriterien für die Faserschädigung und Faserregeneration (siehe 3.3.6.3) nach denen die einzelnen histologischen Schnitte eingeteilt wurden, entsprechen den in der Literatur etablierten Standards [10, 73, 81, 82]. Wie unter 5.1 erwähnt, ist die Impedanz der Muskulatur im Vergleich zum Knochen verhältnismäßig niedrig, sodass der größte Anteil der Energie auf den Knochen übergeht. Nichtsdestotrotz zeigten die behandelten Seiten aller Versuchstiere im Vergleich zur nicht behandelten Seite signifikante Anzeichen einer entzündlichen Reaktion sowie einer Gewebeschädigung, unter anderem nachgewiesen in Hämosiderinablagerungen. In den histologischen Schnitten der Kontrolltiere konnten keine vergleichbaren Anzeichen einer Gewebeschädigung gefunden werden. Wohl aber waren vereinzelte entzündliche Reaktionen deren Ausmaß weit unter dem der Versuchstiere lag nachweisbar. Dies könnte damit erklärt werden, dass Muskelkontraktionen bei normaler Bewegung der Tiere im Käfig zu einer geringgradigen Einwanderung inflammatorischer Zellen führen kann [15]. In der Literatur liegen keine uns bekannten Ergebnisse histologischer Untersuchungen von Muskelveränderungen nach ESWT vor, jedoch wurden in tierexperimentellen Studien die entzündliche Reaktion von Sehnen, vornehmlich der Achillessehne und Quadricepssehne nach ESWT beschrieben [2, 12, 55, 56, 70]. In Übereinstimmung mit den in der vorliegenden Studie gefundenen Veränderungen wurde in diesen Untersuchungen eine verstärkte Infiltration des betroffenen Gewebeareals mit inflammatorischen Zellen nachgewiesen. Ebenso kam es aufgrund der erhöhten Gefäßpermeabilität zu einem verstärkten Austreten von Erythrozyten in das umliegende Gewebe. In mehreren klinischen Studien an Patienten fiel auf, dass sich im Stoßwellenfokus Rötungen, Petechien und Hämatome ausbilden können, zum Teil einhergehend mit einer Überwärmung der Haut [29, 31, 64, 71, 103]. Im Hinblick auf unsere Studienergebnisse liegt der Schluß nahe, dass es sich bei diesen Beobachtungen ebenfalls um entzündliche Gewebereaktionen und – schädigungen handelte.

In der Literatur sind noch eine Reihe weiterer unerwünschter Nebenwirkungen nach Anwendung von ESW aufgeführt. So beschrieben unter anderem Wang et al. [91] eine deutliche Schädigung der äußeren Gefäßwände der V. und A. femoralis sowie eine leichte Schwellung der Nervenfasern des N. femoralis, nachdem sie den Gefäß-Nervenstrang von

Hunden einer Energieflußdichte von $0,5\text{mJ/mm}^2$ aussetzten. Des weiteren sind vereinzelte Einblutungen in das Lungengewebe von Hunden, bei einem Stoßwellenfokus auf Höhe der Gallenblase beschrieben worden [21] sowie Lungenembolien aufgrund eingeschwemmter Knochenfragmenten nach Applikation von Stoßwellen auf die Knochen der unteren Extremität [51]. Andere Studien, vornehmlich aus dem Gebiet der Urologie, berichteten über signifikante stoßwellen-bedingte Schäden am Nierenparenchym [67,97], perinephritischen Abszessen [63] sowie Abszessbildungen im Psoasmuskel [65] und in der Bauchdeckenmuskulatur [88]. Als eine mögliche Ursache dieser unterschiedlichen Gewebeschädigungen wird der cytotoxische Effekt hochenergetischer Stoßwellen angesehen. Rompe et al. [70], Fuchs et al. [26] und Delius et al. [21] konnten in ihren Studien nachweisen, dass das Ausmaß der Weichteilschädigung und die Schwere entscheidend von der Höhe der verwendeten Energieflußdichte abhängt. Rompe et al. [70] behandelte die Achillessehnen von 42 Kaninchen mit aufsteigenden Energieflußdichten von $0,08\text{ mJ/mm}^2$ bis $0,6\text{ mJ/mm}^2$. Dabei wies die $0,6\text{ mJ/mm}^2$ Gruppe mit Abstand die stärksten histologischen Veränderungen (Infiltration von Entzündungszellen, Gewebnekrosen) auf. Die Muskelschäden in der vorliegenden Studie sind daher bei der verwendeten Energieflußdichte von $0,9\text{mJ/mm}^2$ nicht überraschend. Dieser Dosis - Wirkungs Effekt entspricht letztendlich den Erfahrungen, die man im Rahmen der ossären Stoßwellenbehandlung *in vivo* und *in vitro* gemacht hat. Unter Berücksichtigung der beiden in 5.1 aufgeführten Hypothesen zur Knochenneubildung stellt sich die Frage in wieweit die in diesem Abschnitt beschriebenen, in den meisten Fällen entzündlichen, Gewebeveränderungen die Stoßwellenwirkung am Knochen positiv unterstützen. Der Grund für diese positive Wirkung ist höchstwahrscheinlich in unterschiedlichen Mediatoren und Cytokinen zu finden welche durch entzündlich verändertes Muskelgewebe in großer Zahl freigesetzt werden. Hierunter zählen unter anderem das bereits erwähnte TGF- β 1 sowie PDGF (platelet derived growth factor) und VEGF (vascular endothelial growth factor) [15, 48,75]. All dies Proteine tragen nachweislich entscheidend zur Osteoblastenstimulation und Knochenneubildung bei [7, 99, 37]. Desweiteren ist bekannt, dass Substanz P und CGRP freisetzende afferente Nervenfasern nicht nur im Periost und Knochenmark vorkommen, sondern auch in Sehnen, Bändern sowie in der Muskulatur nachzuweisen sind [36,78, 4]. Zudem kann Substanz P sogenannte „neurogene Entzündungen“ verursachen welche vornehmlich durch noxische Reize hervorgerufen werden(47, 100). Diese noxischen Reize erregen die afferente Nervenfasern und führen so zu einer Freisetzung vasoaktiver Neuropeptide wie Substanz P und CGRP [100], deren positive Wirkung auf das Knochenwachstum im Abschnitt 5.1 bereits erwähnt wurden.

5.3 Klinische Anwendung extrakorporaler Stoßwellen am Stütz- und Bewegungsapparat des Menschen

Die vorherrschende Domäne der klinischen Anwendung extrakorporaler Stoßwellen am muskuloskelettalen System lag in der letzten Jahrzehnten vor allem in der Behandlung der chronischen plantaren Fasciitis [8, 31, 32, 68, 71, 93, 103], der Tendinosis calcarea der Rotatorenmanschette [16, 29, 63, 93], der Insertionsenthesiopathie der Achillessehne [12, 27, 69] und der Epicondylitis humeri radialis [5, 17, 72]. Neben der Förderung des Ausheilungsprozesses steht bei diesen chronischen Sehnenerkrankungen vor allem die Schmerzreduktion im Vordergrund. In der Literatur ist bekannt, dass Patienten oft initial eine Hyperalgesie mit Rötung und Überwärmung im Bereich des Stoßwellenfokus angeben, welche nach einigen Tagen verschwindet und mit einer langanhaltenden Hypoalgesie einhergeht. In einigen, allerdings bisher nur tierexperimentellen Studien [35, 52, 50] konnte nachgewiesen werden, dass es initial, in den ersten 24h, zu einer verstärkten Freisetzung von Substanz P nach ESWT kommt. Diese erhöhte Konzentration war in den folgenden 6 Wochen nach der Behandlung nicht mehr nachweisbar. Aktuell ist nicht bekannt, ob auch beim Menschen nach Stoßwellenapplikation ein derartiger Verlauf der Transmitterfreisetzung vorliegt. Substanz P kommt multifokal sowohl in der Muskulatur als auch im Periost vor und kann als Reaktion auf noxische Reize, unter anderem durch ESW, von afferenten Nervenfasern freigesetzt werden und eine neurogene Entzündung verursachen [100]. Ob und wie SP beim Menschen die Ausheilung sowie die Schmerzfreiheit chronischer Sehnenerkrankungen beeinflusst wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Allerdings geben klinische Studien bereits erste deutliche Hinweise, dass die Verwendung von Lokalanästhetika sich negativ auf den Heilungsprozess auswirkten [27, 71]. Lokalanästhetika blockieren reversibel die Entstehung und Fortleitung des Aktionspotentials über Nervenfasern und verhindern dadurch die Freisetzung der Neurotransmitter an den Synapsen [27, 71]. Hieraus lässt sich wiederum eine zentrale Bedeutung der Neurotransmitter, im Speziellen SP für stoßwellenvermittelte Gewebereaktionen vermuten.

Aufgrund des osteoneogenetischen Effektes der ESW richtete sich das Hauptaugenmerk in den letzten Jahren verstärkt auf die Behandlung von schlecht heilenden Frakturen und Pseudoarthrosen. In einer aktuelleren Untersuchung [90] von 72 Pseudoarthrosen konnte festgestellt werden, dass vor allem bei hypertrophen Pseudoarthrosen ein fast 80% Erfolg nach einem Jahr festzustellen war, wohingegen die Erfolgsquote bei atrophen

Pseudoarthrosen weit niedriger lag (27%). In einer erst kürzlich von Wang et al. [92] veröffentlichten Studie wurden der fördernde Effekt der ESWT im Rahmen der Frakturheilung sowie die Reduktion des Pseudoarthrosrisikos hervorgehoben. Sowohl die Studien von Wang et al. [90, 92] als auch von Schaden et al. [76] berichteten über hohe Konsolidierungsraten (75-80%) von Pseudoarthrosen an verschiedenen Knochen bei Behandlung mit Energieflussdichten unter $0,5 \text{ mJ/mm}^2$. Zahlreiche tierexperimentelle Untersuchungen [25, 43, 60, 76, 85, 90] bestätigten, dass eine Knochenneubildung auch bei Verwendung niedrig energetischer Stoßwellen mit einer Energieflussdichte $\leq 0,5 \text{ mJ/mm}^2$ möglich ist. Allerdings wurden die meisten tierexperimentellen Studien an intakten Knochen durchgeführt und entsprechen daher nicht dem pathologisch veränderten Gewebe im Rahmen der klinischen Anwendung. Die Verwendung von Energieflussdichten $\geq 0,9 \text{ mJ/mm}^2$, wie in der vorliegenden Studie verwendet, scheint trotz allem in der klinischen Anwendung nicht notwendig, vor allem unter Berücksichtigung der unerwünschten Nebenwirkungen auf das umgebende Weichteil – und Knochengewebe wie unter 5.1 und 5.2 beschrieben.

Im Vergleich zu dem hier vorgestellten Tiermodell der Maus ist der Stoßwellenfokus beim Menschen viel genauer einstell- und begrenztbar, womit sich die Streueffekte auf das umliegende Gewebe bereits deutlich reduzieren lassen, jedoch ist die weitere Reduktion der verwendeten Energieflussdichte auf ein maximal notwendiges Maß in zukünftigen klinischen Studien und Anwendungen von entscheidender Bedeutung.

6. Zusammenfassung

In der Vergangenheit wurde die ESWT zur Behandlung verschiedener, meist chronischer Erkrankungen am muskuloskelettalen System eingesetzt. Speziell der Einfluß der ESWT auf das Knochengewebe wurde anhand zahlreicher etablierter Tiermodelle untersucht. In diesen Studien konnte der osteoneogenetische Effekt von Stoßwellen demonstriert werden. Nichtsdestotrotz sind die, diesen Beobachtungen zugrunde liegenden, zellulären und molekularen Wirkmechanismen noch weitgehend ungeklärt. Neuere Studien diskutierten die Möglichkeit einer stoßwellenvermittelten Induktion von Neurotransmittern als einen möglichen Wirkmechanismus der Knochenneubildung. Ein besonderes Augenmerk lag hier in den Veränderungen der Konzentration von Substanz P am Periost, wobei noch kein direkter kausaler Zusammenhang zwischen einer erhöhten Substanz P Konzentration und der gesteigerten Knochenneubildung hergestellt werden konnte. Zur gezielten Untersuchung dieses Einflusses sind „Knock-out-Mäuse“, von entscheidender Bedeutung. Die Maus ist jedoch bislang als Modellorganismus zur Untersuchung stoßwelleninduzierten periostalen Knochenwachstums wenig etabliert.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es in erster Linie zu überprüfen, ob durch extrakorporale Stoßwellen auch bei kleinen Säugetieren wie der Maus eine signifikante periostale Knochenneubildung induzierbar ist. Weiterhin sollte geklärt werden, welche Auswirkung die Stoßwellen auf das, unmittelbar im Fokusbereich liegende, Muskelgewebe haben.

Insgesamt 13 Mäuse (Balb-C, Black 6) wurden 2 Gruppen zugeteilt. Sieben Tiere kamen in die Behandlungsgruppe, sechs Tiere in die Kontrollgruppe. Einer der Hinterläufe der Mäuse der Versuchsgruppe wurde durch extrakorporale Stoßwellen mit einer Energieflussdichte von $0,9 \text{ mJ/mm}^2$ behandelt. Die Tiere der Kontrollgruppe wurden nicht behandelt. Nach einem Zeitintervall von 10 Tagen wurden die Tiere getötet und die unteren Extremitäten samt der Muskulatur für die *in vitro* Analysen aufgearbeitet. Dabei kamen verschiedene histopathologische Techniken zum Einsatz. Mittels Mikroradiographie wurde zum Einen das Ausmaß der stoßwelleninduzierten Knochenneubildung, aber auch das Ausmaß der hierdurch erfolgten Knochenschädigung untersucht. Die angefertigten Muskelschnitte wurden nach Durchführung verschiedener Färbungen auf Veränderungen der Struktur, im Besonderen auf Zeichen der Faserschädigung und Faserregeneration untersucht.

Es konnte festgestellt werden, dass die untersuchten Merkmale bei Versuchstieren, im

Vergleich zur Kontrollgruppe, deutlich signifikante Unterschiede aufwiesen. Innerhalb der Versuchstiere zeigten die behandelten Hinterläufe eine eindeutige Knochenneubildung, wohingegen an der unbehandelten Seite keine Veränderungen nachzuweisen waren. Zeichen der Knochenschädigung waren auf der behandelten Seite zwar häufiger, wurden jedoch in geringem Ausmaß auch auf der unbehandelten Seite und bei den Kontrolltieren festgestellt. Die histologischen Untersuchungen der Muskulatur zeigten eine auffallend stärkere Faserschädigung an den Hinterläufen der behandelten Tiere, welche auf die Stoßwellenapplikation zurückzuführen war, da sowohl auf der unbehandelten Seite der Versuchstiere als auch bei den Kontrolltieren kein derartiges Ausmaß der Schädigung nachzuweisen war. Diese Befunde entsprechen den Daten in der Literatur, wo vornehmlich an den Achillessehnen von Kaninchen und Ratten nach Applikation extrakorporaler Stoßwellen entsprechende Veränderungen gefunden wurden.

Diese Ergebnisse bestätigen unsere Arbeitshypothese, dass auch bei kleinen Säugetieren wie der Maus mittels extrakorporaler Stoßwellen eine signifikante Knochenneubildung induziert werden kann.

In weiterführenden klinischen und tierexperimentellen Studien ist es nun wichtig folgende Punkte vertieft zu überprüfen. Zum einen muss geklärt werden inwieweit die verwendete Energie reduziert werden kann, um Nebenwirkungen vor allem an der, den Fokus umgebenden, Muskulatur zu minimieren, und den eigentlich erwünschten Effekt (Induktion der Knochenneubildung, Analgesie) zu maximieren.

Zum anderen können nun unter Zuhilfenahme von „knock-out“ Mäusen die Einflüsse der sowohl im Periost als auch in der Muskulatur vorkommenden und freigesetzten, Neurotransmitter Substanz P und Calcitonin gene-related peptide (CRGP) sowie unterschiedlicher Wachstumsfaktoren auf die Knochenneubildung und Analgesie nach Stoßwellenapplikation genauer und expliziter untersucht werden.

7. Literaturangaben

1. Adamus MA, Dabrowski ZJ.
Effect of the neuropeptide substance P on the rat bone marrow-derived Osteogenic Cells in vitro. J Cell Biochem 2001; 81(3):499-506.
2. Backman C, Boquist L, Friden J, Lorentzon R, Toolanen G.J
Chronic achilles paratenonitis with tendinosis: an experimental model in the rabbit. Orthop Res 1990 Jul; 8(4):541-7.
3. Bernard GW, Shih C.
The osteogenic stimulating effect of neuroactive calcitonin gene-related peptide. Peptides 1990 Jul-Aug; 11(4):625-32
4. Bjurholm A, Kreicbergs A, Brodin E, Schultzberg M
Substance P- and CGRP-immunoreactive nerves in bone. Peptides 1988 Jan-Feb; 9(1):165-71
5. Boddeker I, Haake M.
Extracorporeal shockwave therapy in treatment of epicondylitis humeri radialis. A current overview. Orthopäde 2000 May; 29(5):463-9
6. Böck P (Hrsg.)
Romeis Mikroskopische Technik; Urban & Schwarzenberg Verlag 17. Auflage S. 400
7. Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Steinbrech DS, Mehrara BJ, Longaker MT.
Factors in the fracture microenvironment induce primary osteoblast angiogenic cytokine production. Plast Reconstr Surg 2002 Jul; 110(1):139-48.
8. Buch M, Knorr U, Fleming L, Theodore G, Amendola A, Bachmann C, Zingas C, Siebert W.
Extracorporale Stoßwellentherapie beim symptomatischen Fersensporn – multizentrische prospektive randomisierte doppelblinde placebokontrollierte Studie. Orthopäde 2002; 31:637-644
9. Burck HC
Histologische Technik. 5. Auflage Stuttgart; Thieme 1982: S.145
10. Cabric M, Appell HJ, Resic A.
Effects of electrical stimulation of different frequencies on the myonuclei and fiber size in human muscle. Int J Sports Med 1987 Oct; 8(5):323-6.
11. Cao YQ, Mantyh PW, Carlson EJ, Gillespie AM, Epstein CJ, Basbaum AI
Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. Nature 1998; 392: 390-394

12. Chen YJ, Wang CJ, Yang KD, Kuo YR, Huang HC, Huang YT, Sun YC, et al.
Extracorporeal shock waves promote healing of collagenase-induced Achilles tendinitis and increase TGF-beta1 and IGF-I expression. *J Orthop Res* 2004 Jul; 22(4):854-61.
13. Chung B, Wiley JP
Extracorporeal shockwave therapy: a review. *Sports Med* 2002; 32(13):851-65.
14. Coleman AJ, Draguioi E, Tiptaf R, Shotri N, Saunders JE
Acoustic performance and clinical use of a fiberoptic hydrophone. *Ultrasound Med Biol* 1998; 24: 143-151
15. Czarkowska-Paczek B, Bartlomiejczyk I, Przybylski J
The serum levels of growth factors: PDGF, TGF-beta and VEGF are increased after strenuous physical exercise. *J Physiol Pharmacol* 2006 Jun; 57(2):189-97.
16. Daecke W, Kusnierczak D, Loew M
Langzeitergebnisse und Stellenwert der extrakorporalen Stoßwellentherapie bei der Tendinosis Calcarea der Rotatorenmanschette. *Orthopäde* 2002; 31: 645-651
17. Decker T, Kuhne B, Göbel F
ESWT bei Epicondylitis humeri radialis- kurz- und mittelfristige Ergebnisse. *Orthopäde* 2002; 31:633-636
18. De Felipe C, Herrero JF, O'Brien JA, Palmer JA, Doyle CA, Smith AJ, et al.
Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. *Nature* 1998; 392:394-397
19. Delacretaz G, Rink K, Pittomvils G, Lafaut JP, Vandeursen H, Boving R
Importance of the implosion of ESWL-induced cavitation bubbles. *Ultrasound Med Biol* 1995; 21:97-103
20. Delius M, Draenert K, Al Diek Y, Draenert Y
Biological Effects of Shock Waves: In Vivo Effect of High Energy Pulses on Rabbit Bone. *Ultrasound in Med & Biol* 1995; 21:1219-1225
21. Delius M, Enders G, Heine G, Stark J, Remberger K, Brendel W.
Biological effects of shock waves: lung hemorrhage by shock waves in dogs-- pressure dependence. *Med Biol* 1987 Feb; 13(2):61-7
22. Ekkernkamp A, Bosse A, Haupt G, Pommer A
Der Einfluß der extrakorporalen Stoßwellen auf die standardisierte Tibiafraktur am Schaf. *Aktuelle Aspekte der Osteologie*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg N.Y. 1992 : S. 307-310
23. Erhardt W, Hebestedt A, Aschenbrenner G, Pichotka B, Blümel G
A Comparative Study with Various Anesthetics in Mice (Pentobarbitone, Ketamine-Xylazine, Carfentanyl-Etomidate). *Res Exp Med* 1984; 184:159-69

24. Flanders KC, Thompson NL, Cissel DS, Van Obberghen-Schilling E, et al.
Transforming growth factor-beta 1: histochemical localization with antibodies to different epitopes. *J Cell Biol* 1989 Feb; 108(2):653-60.
25. Forriol F, Solchaga L, Moreno JL, Canadell J.
The effect of shockwaves on mature and healing cortical bone.
Int Orthop 1994 Oct; 18(5):325-9.
26. Fuchs GJ, David RD, Fuchs AM.
Complications of extracorporeal shock wave lithotripsy. *Archivos Espanoles de Urologia* 1989; 42 (Supp I): 83-9
27. Furia JP.
High-energy extracorporeal shock wave therapy as a treatment for insertional Achilles tendinopathy. *Am J Sports Med* 2006 May; 34(5):733-40.
28. Gerdesmeyer L, Maier M, Haake M, Schmitz C
Physikalisch- technische Grundlagen der extrakorporalen Stoßwellentherapie (ESWT). *Orthopäde* 2002; 31:610-617
29. Gerdesmeyer L, Wagenpfeil S, Haake M, Maier M, Loew M, Wortler K, Lampe R, Seil R, Handle G, Gassel S, Rompe JD.
Extracorporeal shock wave therapy for the treatment of chronic calcifying tendonitis of the rotator cuff: a randomized controlled trial.
JAMA 2003 Nov 19; 290(19):2573-80.
30. Graff J, Pastor J, Richter K.D.
Effect of High-Energy Shock-Waves on Bony Tissue. *J Urolog Res* 1988 16: S.252
31. Haake M, Buch M, Schoellner C, Goebel F, Vogel M, Mueller I, Hausdorf J, Zamzow K, Schade-Brittinger C, Mueller HH.
Extracorporeal shock wave therapy for plantar fasciitis: randomised controlled multicentre trial. *BMJ* 2003 Jul 12; 327(7406):75
32. Hammer DS, Adam F, Kreutz A, Rupp S, Kohn D, Seil R.
Ultrasonographic evaluation at 6-month follow-up of plantar fasciitis after extracorporeal shock wave therapy.
Arch Orthop Trauma Surg 2005 Feb; 125(1):6-9.
33. Hanada K, Solchaga LA, Caplan AI, Hering TM, Goldberg VM, Yoo JU, et al.
BMP-2 induction and TGF-beta 1 modulation of rat periosteal cell chondrogenesis. *Cell Biochem* 2001 Mar 26; 81(2):284-94.
34. Haupt G, Haupt A, Ekkernkamp A, Gerety B, Chvapil M
Influence of Shock Waves on Fracture Healing. *Urology* 1992; 39(6): 529-532
35. Hausdorf J, Schmitz C, Averbek B, Maier M
Molecular basis for pain mediating properties of extracorporeal shock waves.
Schmerz 2004 Dec; 18(6):492-7.

36. Hill EL, Elde R
Distribution of CGRP-, VIP-, D beta H-, SP-, and NPY-immunoreactive nerves in the periosteum of the rat. *Cell Tissue Res* 1991 Jun; 264(3):469-80.
37. Hock JM, Canalis E, Centrella M.
Transforming growth factor-beta stimulates bone matrix apposition and bone cell replication in cultured fetal rat calvariae. *Endocrinology* 1990 Jan; 126(1):421-6
38. Howard D, Sturtevant B
In vitro study of the mechanical effects of shock-wave lithotripsy. *Ultrasound Med Biol* 1997; 23:1107-1122
39. Ikeda K, Tomita K, Tokayama K.
Application of extracorporeal shock wave on Bone; preliminary report. *J Trauma* 1999; 47:946-950
40. Imai S, Matsusue Y.
Neuronal regulation of bone metabolism and anabolism: calcitonin gene-related peptide-, substance P-, and tyrosine hydroxylase-containing nerves and the bone. *Microsc Res Tech* 2002 Jul 15; 58(2):61-9
41. Johannes E.J, Kaulesar Sukul D.M, Matura E
High-energy shock waves for the treatment of nonunions: an experiment on dogs. *J Surg Res* 1994; 57:246-252
42. Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME.
Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol* 1990 Jun; 110(6):2195-207
43. Kaulesar Sukul DM, Johannes EJ, Pierik EG, van Eijck GJ, Kristelijn MJ.J
The effect of high energy shock waves focused on cortical bone: an in vitro study . *Surg Res* 1993 Jan; 54(1):46-51.
44. Krause H (1997)
Physik und Technik medizinischer Stoßwellensysteme. In: Rompe JD (ed)
Extrakorporale Stoßwellentherapie. Chapman & Hall, Weinheim, S 15 – 34
45. Kusnierczak D, Brocai DR, Vettel U, Loew M
Effect of extracorporeal shockwave administration on biological behavior of bone cells in vitro. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 2000 Jan-Feb; 138(1):29-33.
46. Leung KS, Cheung WH, Zhang C, Lee KM, Lo HK.
Low intensity pulsed ultrasound stimulates osteogenic activity of human periosteal cells. *Clin Orthop Relat Res* 2004 Jan; (418):253-9.
47. Levine JD, Clark R, Devor M, helms C, Moskowitz MA, Basbaum AI
Intraneuronal substance P contributes to the severity of treated arthritis. *Science* 1984; 226:547-549

48. Lundberg I, Ulfgren AK, Nyberg P, Andersson U, Klareskog L
Cytokine production in muscle tissue of patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Rheum* 1997 May; 40(5):865-74.
49. Maier M
Untersuchungen zur Applikation extrakorporaler Stoßwellen am Knochen des Kaninchens. Habilitationsschrift, LMU München 2001
i) S. 13-14 ; ii) S. 15-17; iii) S. 25-27; iv) S. 31-48; v) S. 49 - 55
50. Maier M, Averbek 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 Jan; (406):237-45.
51. Maier M, Freed JA, Milz S, Pellengahr C, Schmitz C.
Detection of bone fragments in pulmonary vessels following extracorporeal shock wave application to the distal femur in an in-vivo animal model
Z Orthop Ihre Grenzgeb 2003 Mar-Apr; 141(2):223-6.
52. Maier M, Hausdorf J, Tischer T, Milz S, Weiler C, Refior HJ, Schmitz C.
New bone formation by extracorporeal shock waves. Dependence of induction on energy flux density. *Orthopäde* 2004 Dec; 33(12):1401-10.
53. Maier M, Milz S, Tischer T, Munzing W, Manthey N, Stabler A, Holzknicht N, Weiler C, Nerlich A, Refior HJ, Schmitz C.
Influence of extracorporeal shock-wave application on normal bone in an animal model in vivo. Scintigraphy, MRI and histopathology. *J Bone Joint Surg Br* 2002 May; 84(4):592-9.
54. Maier M, Milz S, Wirtz DC, Rompe JD, Schmitz C.
Grundlagenforschung zur Applikation extrakorporaler Stoßwellen am Stütz- und Bewegungsapparat. Eine Standortbestimmung. *Orthopäde* 2002; 31: 667- 677
55. Maier M, Tischer T, Milz S, Weiler C, Nerlich A, Pellengahr C, Schmitz C, Refior HJ.
Dose-related effects of extracorporeal shock waves on rabbit quadriceps tendon integrity. *Arch Orthop Trauma Surg* 2002 Nov; 122(8):436-41
56. Maier M, Saisu T, Beckmann J, Delius M, Grimm F, Hupertz V, Milz S, et al.
Impaired tensile strength after shock-wave application in an animal model of tendon calcification. *Ultrasound Med Biol* 2001 May; 27(5):665-71.
57. Martini L, Giavaresi G, Fini M, Borsari V, Torricelli P, Giardino R.
Early effects of extracorporeal shock wave treatment on osteoblast-like cells: a comparative study between electromagnetic and electrohydraulic devices. *J Trauma* 2006 Nov; 61(5):1198-206.
58. Martini L, Giavaresi G, Fini M, Torricelli P, de Pretto M, Schaden W, et al.
Effect of extracorporeal shock wave therapy on osteoblastlike cells. *Clin Orthop Relat Res* 2003 Aug; (413):269-80.
59. Milz S, Putz R.
Quantitative morphology of the subchondral plate of the tibial plateau. *J Anat* 1994; 185:103-110

60. Narasaki K, Shimizu H, Beppu M, Aoki H, Takagi M, Takashi M.
Effect of extracorporeal shock waves on callus formation during bone lengthening. *J Orthop Sci* 2003; 8(4):474-81.
61. Ogden JA, Toth-Kischkat A, Schultheiss R
Principles of shock wave therapy. *Clin Orthop* 2001; 387:8-17
62. Ozaki A, Tsunoda M, Kinoshita S, Saura R..
Role of fracture hematoma and periosteum during fracture healing in rats: interaction of fracture hematoma and the periosteum in the initial step of the healing process. *J Orthop Sci* 2000; 5(1):64-70
63. Peiser J, Kaneti J, Lissmer L, Klain J, Blank C, Hertzanu Y
Perinephric inflammatory process following extracorporeal shock wave lithotripsy. *Int Urol Nephrol* 1991; 23(2):107-11.
64. Peters J, Luboldt W, Schwarz W, Jacobi V, Herzog C, Vogl TJ.
Extracorporeal shock wave therapy in calcific tendinitis of the shoulder. *Skeletal Radiol* 2004 Dec; 33(12):712-8.
65. Qureshi F, Thompson PM
Psoas abscess following extracorporeal shock wave lithotripsy. *Scand J Urol Nephrol* 1998 May; 32(3):237-8.
66. Rameshwar P, Ganea D, Gascon P.
In vitro stimulatory effect of substance P on hematopoiesis. *Blood* 1993 Jan 15; 81(2):391-8
67. Rigatti P, Colombo R, Centemero A, et al.
Histological & ultrastructural evaluation of extracorporeal shock wave lithotripsy-induced acute renal lesions: preliminary report. *Eur Urol* 1989; 16(3):207-11
68. Rompe JD.
Repetitive low-energy shock wave treatment is effective for chronic symptomatic plantar fasciitis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2007 Jan;15(1):107.
69. Rompe JD.
Shock wave therapy for chronic Achilles tendon pain: a randomized placebo-controlled trial. *Clin Orthop Relat Res* 2006 Apr; 445:276-7
70. Rompe JD, Kirkpatrick CJ, Kullmer K, Schwitalle M, Krischek O
Dose-related effects of shock waves on rabbit tendo Achillis. A sonographic and histological study. *Bone Joint Surg Br* 1998 May; 80(3):546-52.
71. Rompe JD, Meurer A, Nafe B, Hofmann A, Gerdsmeyer L.
Repetitive low-energy shock wave application without local anesthesia is more efficient than repetitive low-energy shock wave application with local anesthesia in the treatment of chronic plantar fasciitis. *J Orthop Res* 2005 Jul; 23(4):931-41.

72. Rompe JD, Theis C, Maffulli N.
Shock wave treatment for tennis elbow. *Orthopade* 2005 Jun; 34(6):567-70.
73. Rosai J. *Ackerman's Surgical Pathology*. Mosby, 8. Edition 1996 :2402-2403
74. Saisu T, Takahashi K, Kamegaya M, Mitsuhashi S, Wada Y, Moriya H.
Effects of extracorporeal shock waves on immature rabbit femurs. *J Pediatr Orthop B* 2004 May;13(3):176-83.
75. Salomonsson S, Lundberg IE..
Cytokines in idiopathic inflammatory myopathies. *Autoimmunity* 2006 May; 39(3):177-90
76. Schaden W, Fischer A, Sailler A.
Extracorporeal shock wave therapy of nonunion or delayed osseous union
Clin Orthop Relat Res 2001 Jun; (387):90-4.
77. Schafer ME
Cost-effective shock wave hydrophones. *J Stone Dis* 1993; 5: 73-76
78. Shih C, Bernard GW.
Neurogenic substance P stimulates osteogenesis in vitro. *Peptides* 1997; 18(2):323-6
79. Shih C, Bernard GW.
Calcitonin gene related peptide enhances bone colony development in vitro.
Clin Orthop Relat Res 1997 Jan; (334):335-44.
80. Steinbrech DS, Mehrara BJ, Rowe NM, Dudziak ME, Luchs JS, et al.
Gene expression of TGF-beta, TGF-beta receptor, and extracellular matrix proteins during membranous bone healing in rats.
Plast Reconstr Surg 2000 May; 105(6):2028-38.
81. Sternberg S. S. (Hrsg)
Diagnostic Surgical Pathology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Third Edition 1999 Vol. 1:112-115
82. Sternberg S. S. (Hrsg)
Histology for Pathologists (1992) Raven Press, New York: S. 91-92
83. Taber R, Irwin S (1969) Anesthesia in the mouse. *Fed Proc* 28 :1528-1532
84. Tam KF, Cheung WH, Lee KM, Qin L, Leung KS.
Delayed stimulatory effect of low-intensity shockwaves on human periosteal cells. *Clin Orthop Relat Res* 2005 Sep; 438:260-5.
85. Tischer T, Milz S, Anetzberger H, Müller P.E, Wirtz D.C, Schmitz C, Ueberle F, Maier M.
Extrakorporale Stoßwellen induzieren ventral-periostale Knochenneubildung außerhalb der Fokuszone- Ergebnisse einer In-vivo-Untersuchung am Tiermodell. *Z Orthop* 2002, 140:281-285

86. Togari A, Arai M, Mizutani S, Mizutani S, Koshihara Y, Nagatsu T.
Expression of mRNAs for neuropeptide receptors and beta-adrenergic receptors in human osteoblasts and human osteogenic sarcoma cells. *Neurosci Lett* 1997 Sep; 233(2-3):125-8.
87. Ueberle F (1997)
Shock wave technology. In Siebert W, Buch M (Hrsg) *Extracorporeal shock waves in orthopaedics*. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokio: S 59-87
88. Unal B, Kara S, Bilgili Y, Basar H, Yilmaz E, Batislam E.
Giant abdominal wall abscess dissecting into thorax as a complication of ESWL. *Urology* 2005 Feb; 65(2):389.
89. Valchanov VD, Michailov P
High energy shock waves in treatment of delayed and nonunion of fractures. *Int Orthop* 1991; 15:181-184
90. Wang CJ, Chen HS, Chen CE, Yang KD.
Treatment of nonunions of long bone fractures with shock waves. *Clin Orthop Relat Res* 2001 Jun; (387):95-101.
91. Wang CJ, Huang HY, Yang K, Wang FS, Wong M.
Pathomechanism of shock wave injuries on femoral artery, vein and nerve. An experimental study in dogs. *Injury* 2002 Jun; 33(5):439-46
92. Wang CJ, Liu HC, Fu TH. [Epub ahead of print]
The effects of extracorporeal shockwave on acute high-energy long bone fractures of the lower extremity. *Arch Orthop Trauma Surg* 2006 Oct 13
93. Wang CJ, Wang FS, Yang KD, Weng LH, Ko JY
Long-term results of extracorporeal shockwave treatment for plantar fasciitis. *Am J Sports Med* 2006 Apr; 34(4):592-6.
94. Wang CJ, Yang KD, Wang FS, Chen HH, Wang JW
Shock wave therapy for calcific tendinitis of the shoulder: a prospective clinical study with two-year follow-up. *Am J Sports Med* 2003 May-Jun; 31(3):425-30.
95. Wang F.S, Wang C.J, Huang H.J, Chung H, Chen R.F, Yang K.D
Physical shock wave mediates membrane hyperpolarization and ras activation for osteogenesis in human bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287: 648-655
96. 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* 2002 Apr; 84(3):457-61.
97. Weber C, Moran ME, Braun EJ, Drach GW
Injury of rat renal vessels following extracorporeal shock wave treatment. *J Urol* 1992 147(2) 476-81

98. Wess O, Ueberle F, Dührssen RN, Hilcken D, Krauss W, Reuner T, et al.
Working group technical developments – consensus report. In : Chaussy C, Eisenberger F, Jocham D, Wilbert D. (Hrsg.) High energy shock waves in medicine. Thieme, Stuttgart, New York, 1997: S. 59-71
99. Wildemann B, Schmidmaier G, Brenner N, Huning M, Stange R, et al.
Quantification, localization, and expression of IGF-I and TGF-beta1 during growth factor-stimulated fracture healing. *Calcif Tissue Int* 2004 Apr; 74(4):388-97.
100. White DM
Release of substance P from peripheral sensory nerve terminals.
J Peripher Nerv Syst 1997; 2:191-201
101. Zimmermann G, Henle P, Kusswetter M, Moghaddam A, Wentzensen A, et al.
TGF-beta1 as a marker of delayed fracture healing. *Bone* 2005 May; 36(5):779-85.
102. Zhong P, Cioanta I, Cocks FH, Preminger GM
Inertial cavitation and associated acoustic emission produced during electrohydraulic shock wave lithotripsy. *J Acoust SocAm* 1997; 101:2940- 2950
103. Zhu F, Johnson JE, Hirose CB, Bae KT.
Chronic plantar fasciitis: acute changes in the heel after extracorporeal high-energy shock wave therapy-observations at MR imaging. *Radiology* 2005 Jan; 234(1):206-10

8. Anhang

8.1 Tabellenanhang zur statistischen Analyse der mikroradiographischen und histologischen Untersuchungsergebnisse der Wirkung extrakorporaler Stoßwellen auf den Tibiaschaft der Maus

| | A | | | B | | | C | | | D | | | E | | |
|----------|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| | b | u | k | b | u | k | b | u | k | b | u | k | b | u | k |
| X | 1,9 | 1 | 1 | 2,1 | 1 | 1 | 272 | / | / | 1,9 | 1,4 | 1,2 | 2,4 | 1,6 | 0,5 |
| s | 0,7 | 0 | 0 | 0,9 | 0 | 0 | 270 | / | / | 0,7 | 0,5 | 0,4 | 0,8 | 0,8 | 0,83 |

Tabelle 8.1.1

Untersuchungen zur Wirkung extrakorporaler Stoßwellen auf den Tibiaschaft der Maus- Ergebnisse der mikroradiographischen Untersuchung.

Die Tabelle zeigt für jede untersuchte Variable A bis E die Mittelwerte (X) sowie die Standardabweichung (s) der in den Abbildungen 4.1 sowie 4.4 gezeigten Klassifizierung getrennt nach behandelten (b) und unbehandelten (u) Tibiae der Versuchstiere sowie die der Kontrollgruppe (k) .

A: Reaktionstyp der Knochenneubildung. **B:** mittleres relatives Ausmaß der Knochenneubildung. **C:** absolute Knochendicke in μm . **D:** periostale Ablösungen. **E:** kortikale Frakturen.

In der Spalte der Gruppe C wurden keine Mittelwerte und Standardabweichungen für die unbehandelte Seite sowie für die Kontrollgruppe errechnet, da in beiden Fällen keine messbare Knochenneubildung nachzuweisen war.

(zur Definition der Klassen siehe Punkt 3.3.5.1)

| | F | | | G | | | H | | | I | | |
|----------|-----|---|---|-----|---|---|-----|-----|-----|---|---|---|
| | b | u | k | b | u | k | b | u | k | b | u | k |
| X | 2 | / | / | 2,1 | / | / | 2,4 | 0,6 | 0,5 | 2 | / | / |
| s | 1,2 | / | / | 1,2 | / | / | 0,8 | 0,5 | 0,5 | 1 | / | / |

Tabelle 8.1.2

Untersuchungen zur Wirkung extrakorporaler Stoßwellen auf den Tibiaschaft der Maus-
Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Unterschenkelmuskulatur.

Die Tabelle zeigt für jede untersuchte Variable F bis I die Mittelwerte (X) sowie die Standardabweichung (s) der in den Abbildungen 4.5 sowie 4.8 gezeigten Klassifizierung getrennt nach behandelter (b) und unbehandelter (u) Seite der Versuchstiere sowie die der Kontrollgruppe (k).

F: Nachweis und Ausprägung der Basophilie. **G:** Nachweis und Ausprägung von Kernketten. **H:** Nachweis und Ausprägung einer inflammatorischen Reaktion. **I:** Nachweis und Ausprägung von Eisenablagerungen.

In den Spalten der Gruppe F,G und I wurden keine Mittelwerte und Standardabweichungen für die unbehandelte Seite sowie für die Kontrollgruppe errechnet, da in diesen Fällen die Einteilung in die Klasse 0 erfolgte und keine der Variablen nachgewiesen werden konnte

(zur Definition der Klassen siehe Punkt 3.3.6.3.)

| | A | a | B | b | C | c | D | d | E | e |
|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| p | <i>0,034</i> | <i>0,013</i> | <i>0,038</i> | <i>0,014</i> | <i>0,043</i> | <i>0,015</i> | <i>0,18</i> | <i>0,054</i> | <i>0,098</i> | <i>0,006</i> |
| Zw | -2,12 | | -2,07 | | -2,02 | | -1,34 | | -1,66 | |
| Zu | | -2,49 | | -2,47 | | -2,44 | | -1,93 | | -2,74 |

Tabelle 8.1.3

Untersuchungen zur Wirkung extrakorporaler Stoßwellen auf die proximale Tibia der Maus- Ergebnisse der mikroradiographischen Untersuchung.

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der statistischen Analyse der in den Abbildungen 4.1 und 4.4 gezeigten Daten (zur Definition der Klassen siehe Punkt 3.3.5.1) der sieben Versuchstiere sowie der sechs Kontrolltiere bezüglich der Frage, ob sich die behandelten von den unbehandelten Tibiae der Versuchstiere sowie die Versuchstiere selbst von den Kontrolltieren unterscheiden.

Analyse mittels Wilcoxon Test für verbundene Stichproben und Mann-Whitney Test für unverbundene Stichproben.

A: Reaktionstyp der Knochenneubildung. **B:** mittleres relatives Ausmaß der Knochenneubildung. **C:** absolute Knochendicke. **D:** periostale Ablösungen. **E:** kortikale Frakturen.

Die Großbuchstaben repräsentieren den Vergleich zwischen behandelter und unbehandelter Seite eines Versuchstieres.

Die Kleinbuchstaben spiegeln den Vergleich zwischen behandelter Seite des Versuchstier und Kontrolltier wider.

P: p-Wert. p-Werte < 0,05 sind durch Kursivdruck hervorgehoben.

Zw: Testgröße beim Wilcoxon Test. **Zu:** Testgröße beim Mann-Whitney Test.

| | F f | G g | H h | I i |
|-----------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| p | <i>0,026</i> <i>0,005</i> | <i>0,024</i> <i>0,004</i> | <i>0,17</i> <i>0,004</i> | <i>0,023</i> <i>0,004</i> |
| Zw | -2,23 | -2,26 | -2,39 | -2,27 |
| Zu | -2,82 | -2,84 | -2,89 | -2,85 |

Tabelle 8.1.4

Untersuchungen zur Wirkung extrakorporaler Stoßwellen auf die proximale Tibia der Maus- Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Muskulatur der unteren Extremität.

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der statistischen Analyse der in den Abbildungen 4.5 und 4.8 gezeigten Daten (zur Definition der Klassen siehe Punkt 3.3.6.3) der sieben Versuchstiere sowie der sechs Kontrolltiere bezüglich der Frage, ob sich die behandelte von den unbehandelte Seite der Versuchstiere sowie die Versuchstiere selbst von den Kontrolltieren unterscheiden.

Analyse mittels Wilcoxon Test für verbundene Stichproben und Mann-Whitney Test für unverbundene Stichproben.

F: Nachweis und Ausprägung der Basophilie. **G:** Nachweis und Ausprägung von Kernketten. **H:** Nachweis und Ausprägung einer inflammatorischen Reaktion. **I:** Nachweis und Ausprägung von Eisenablagerungen.

Die Großbuchstaben repräsentieren den Vergleich zwischen behandelter und unbehandelter Seite eines Versuchstieres.

Die Kleinbuchstaben spiegeln den Vergleich zwischen behandelter Seite des Versuchstier und Kontrolltier wieder.

P: p-Wert. p-Werte < 0,05 sind durch Kursivdruck hervorgehoben.

Zw: Testgröße beim Wilcoxon Test. **Zu:** Testgröße beim Mann-Whitney Test.

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Markus Maier, der die vorliegende Arbeit nicht nur grundsätzlich ermöglicht und das interessante Thema vorgeschlagen hat, sondern die Entwicklung der Arbeit mit hilfreichen Gesprächen und fruchtbaren Anregungen stets konstruktiv begleitet hat.

Herr Dr. med. Jörg Hausdorf danke ich für die Hilfe bei der Konzeption und Durchführung der Arbeit sowie bei der Erstellung der Dissertationsschrift.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Chirurgischen Forschung des Universitätsklinikums Großhadern für die Bereitstellung der technischen Grundlagen dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. hc Reinhard Putz und seinen Mitarbeitern der Anatomischen Anstalt der LMU München, insbesondere Herrn Priv.-Doz. Dr. Stefan Milz danke ich für die hervorragende Kooperation und die Bereitstellung der Räumlichkeiten zur Versuchsauswertung. Hierbei möchte ich Frau Claudia Dinter erwähnen, deren unermüdliche Unterstützung und Hilfe im Rahmen der komplizierten Laborlogistik mein Vorankommen spürbar erleichterte.

Herr Dr. med Christoph Weiler vom pathologischen Institut der LMU München danke ich für die Anfertigung der Diabilder sowie für die zahlreichen Ratschläge bezüglich der Datenauswertung.

Ganz besonderen Dank gebührt meinem Bruder Christoph für die Korrekturlesung. Schließlich möchte ich mich bei allen Familienmitgliedern und Freunden für die entgegengebrachte Ermunterung und Unterstützung bedanken, ohne die diese Arbeit niemals zustanden gekommen wäre.

10. Curriculum Vitae

Name: Kapfer
Vorname: Kathrin
Geburtsort: Augsburg
Geburtsdatum: 17.03.1979
Konfession: römisch-katholisch

Schulbildung

| | |
|--------------------------------------|-------------|
| Goethe Grundschule Gersthofen | 1985 - 1989 |
| Paul-Klee-Gymnasium Gersthofen | 1989 - 1998 |
| Abschluss: allgemeine Hochschulreife | |

Hochschulbildung

| | |
|---|-------------|
| Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians Universität München | 1998 - 2004 |
| Ärztliche Vorprüfung, Note 2,0 | 08.09.2000 |
| 1. Staatsexamen, Note 2,0 | 28.08.2001 |
| 2. Staatsexamen, Note 2,0 | 15.09.2003 |
| 3. Staatsexamen, Note 2,0 | 19.11.2004 |

Assistenzarztzeit

| | |
|---|-------------------|
| Chefarzt Dr. Balz Isler, Abteilung für chirurgische Orthopädie, Kantonsspital Winterthur | 12.2004 - 11.2005 |
| Chefarzt Prof. Dr. Peter Kirschner, Abteilung für Unfallchirurgie Katholisches Klinikum Mainz; St. Vincenz und Elisabeth Hospital | 11.2005 - |

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.