

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

und dem
Institut für Chirurgische Forschung
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Komm. Vorstand: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

EXTRAKORPORALE STOSSWELLENTHERAPIE BEI ATROPHER PSEUDARTHROSE – EIN IN-VIVO MODELL AM KANINCHEN

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Christina Dorothea Baron
aus München

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität zu München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Markus Maier

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. O. Reich
Prof. Dr. S. Keßler

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Jörg Hausdorf

Dekan: Prof. Dr. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2007

Für meine Eltern und Großeltern,
welchen ich alles verdanke.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	X
1 Einleitung	1
2 Zielsetzung	6
3 Grundlagen	7
3.1 Knochenbruchheilung und Pseudarthrosen	7
3.2 Behandlungsstrategien von Pseudarthrosen.....	12
3.3 Biophysikalische Grundlagen extrakorporaler Stosswellen.....	13
3.3.1 Physikalische Grundlagen extrakorporaler Stosswellen	13
3.3.2 Technische Erzeugung extrakorporaler Stosswellen.....	15
3.3.3 Akustische Felder extrakorporaler Stosswellen.....	19
3.3.4 Verfahren zur Druckmessung extrakorporaler Stosswellen.....	22
3.3.4 Ausbreitung extrakorporaler Stosswellen	24
3.3.5 Biologische Wirkung extrakorporaler Stosswellen in Geweben.....	27
3.3.6 Stosswellenvermittelte Osteoneogenese.....	29
4 Material und Methodik	30
4.1 Versuchsaufbau	30
4.1.1 Zeitlicher Ablauf.....	30
4.1.2 Versuchstiere.....	31
4.1.3 Tiermodell zur Erzeugung einer aseptisch-atropen Pseudarthrose	32
4.1.4 Stosswellenapplikation	35
4.2 Messparameter	37
4.2.1 Klinische Evaluation	37

4.2.2	Radiologische Untersuchung.....	38
4.2.3	Histopathologische Untersuchungen.....	39
4.2.3.1	Aufbereitung der Präparate	39
4.2.3.2	Schneiden der Präparate.....	40
4.2.3.3	Paragon-Färbung	41
4.2.3.4	Mikroradiografien.....	43
4.3	Statistische Verfahren	46
5	Ergebnisse.....	47
5.1	Klinische Evaluation	47
5.2	Radiologische Untersuchung	48
5.3	Histopathologische Untersuchungen.....	50
5.3.1	Paragon-Färbung	50
5.3.2	Mikroradiografien.....	52
6	Diskussion.....	59
6.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	59
6.2	Validität der Methoden	59
6.3	Diskussion der Ergebnisse.....	63
7	Zusammenfassung.....	76
	Literaturverzeichnis	XI
	Anhang	XXV
	Danksagung	XLIV
	Lebenslauf.....	XLV

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Klassifikation der Pseudarthrosen nach Weber und Czech (Original in Publikation 1973)
- Abb. 2: Algorithmus der Pseudarthrosetherapie
- Abb. 3: Graphische Darstellung einer standardisierten Stosswelle (aus Gerdesmeyer et al. 2002)
- Abb. 4: Elektrohydraulisches Prinzip – Schemazeichnung (aus Wess 2004)
- Abb. 5: Schematische Darstellung der verschiedenen technischen Typen von Stosswellenquellen (aus Gerdesmeyer et al. 2002)
- Abb. 6: Ballistisches Prinzip (aus Gerdesmeyer et al. 2002)
- Abb. 7: Dreidimensionale elliptische Fokusgestalt, so genannte „-6 dB-Isobare“
- Abb. 8: Darstellung der räumlichen Ausbreitung (f_x , f_y) des -6 dB Fokus (dunkelgrauer Kreis), des 5 mm Fokus (mittelgrauer Kreis) und des 5 MPa Fokus (hellgrauer Kreis) bei hohen Energieflussdichten (aus Wess et al. 2002).
- Abb. 9: Darstellung der räumlichen Ausbreitung (f_x , f_y) des -6 dB Fokus (dunkelgrauer Kreis), des 5 mm Fokus (mittelgrauer Kreis) und des 5 MPa Fokus (hellgrauer Kreis) bei niedrigen Energieflussdichten (aus Wess et al. 2002).
- Abb. 10: Reflexion und Transmission von Stosswellen an Grenzschichten mit einer unterschiedlichen akustischer Impedanz (Z_1 , Z_2 und Z_3)
- Abb. 11: Entstehung von „Mikro-Jets“ (aus Wess 2004)
- Abb. 12: Ablaufplan des Untersuchungsvorhabens
- Abb. 13: Einbringen der Schanz-Schrauben
- Abb. 14: Durchführung der Querosteotomie der Tibia mittels oszillierender Säge
- Abb. 15: Devastieren von dem verbliebenen Periost und Knochenmark (je 1 cm)
- Abb. 16: Postoperatives Bild des eingebrachten Mini-Fixateurs mit Einstellung der 4 mm großen Knochenlücke

- Abb. 17: Kaninchen unter Narkose, positioniert für die Stosswellenapplikation
- Abb. 18: Schemazeichnung zur Positionierung des Tieres in der Stosswellenquelle XL1
- Abb. 19: Exakte proximale Fokussierung der ESWT mit Hilfe zweier sich treffender, orthograder Laserpointer
- Abb. 20: Drei zugetrimmte MMA-Blöcke
- Abb. 21: Innenlochsäge (Leitz SP 1600, Nussloch, Deutschland) mit Kaltwasserdüse, Diamantsägeblatt und Justiervorrichtung als Stellschraube für die Schnittdicke
- Abb. 22: Berechnete Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte beider Tiergruppen für die Variable „Klinische Evaluation“
- Abb. 23: Darstellung einer „instabilen“ Pseudarthrose der Klasse 1 (Kaninchen 2371 aus der Kontrollgruppe)
- Abb. 24: Berechnete Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte beider Tiergruppen für die Variable „Radiologische Untersuchung“
- Abb. 25: Röntgenbilder (ap) der Klasse 1 (Kaninchen 2371 aus der Kontrollgruppe) **A** Postoperativ **B** Nach acht Wochen **C** Nach zwölf Wochen
- Abb. 26: Berechnete Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte beider Tiergruppen für die Variable „Bindegewebsbildung“
- Abb. 27: Paragongefärbter Tibiadünnschnitt der Klasse 3 (Kaninchen 358 aus der Kontrollgruppe)
- Abb. 28: Paragongefärbter Tibiadünnschnitt der Klasse 1 (Kaninchen 1331 aus der Behandlungsgruppe)
- Abb. 29: Berechnete Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte beider Tiergruppen für die Variable „Reaktionstyp der Kallusbildung“
- Abb. 30: Berechnete Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte beider Tiergruppen für die Variable „Mittleres relatives Ausmaß der Knochenneubildung – periostal“

- Abb. 31: Berechnete Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte beider Tiergruppen für die Variable „Mittleres relatives Ausmaß der Knochenneubildung – endostal“
- Abb. 32: Beispiel für die feine und exakte Strukturdarstellung der Knochenbälkchen in der Mikroradiografie (Kaninchen 1331 aus der Behandlungsgruppe)
- Abb. 33: Beispiel für die endostale und periostale Osteoinduktion (Kaninchen 3258 aus der Behandlungsgruppe)
- Abb. 34: Berechnete Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte beider Tiergruppen für die Variable „Bruchspaltdurchbauung“
- Abb. 35: Mikroradiografie der Klasse 1 in allen Variablen der mikroradiografischen Analyse. (Kaninchen 4334 aus der Kontrollgruppe)
- Abb. 36: Mikroradiografie der Klasse 3 in allen Variablen der mikroradiografischen Analyse. (Kaninchen 1331 aus der Behandlungsgruppe)
- Abb. 37: Berechnete Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte beider Tiergruppen für die Variable „Quantitative Erfassung der Knochenneubildung“
- Abb. 38: Häufigkeiten der Tiere in den einzelnen Klassen für die Variable „Klinische Evaluation“
- Abb. 39: Häufigkeiten der Tiere in den einzelnen Klassen für die Variable „Radiologische Untersuchung“
- Abb. 40: Häufigkeiten der Tiere in den einzelnen Klassen für die Variable „Bindegewebsbildung“
- Abb. 41: Häufigkeiten der Tiere in den einzelnen Klassen für die Variable „Reaktionstyp der Kallusbildung“
- Abb. 42: Häufigkeiten der Tiere in den einzelnen Klassen für die Variable „Mittleres relatives Ausmaß der Knochenneubildung – periostal“
- Abb. 43: Häufigkeiten der Tiere in den einzelnen Klassen für die Variable „Mittleres relatives Ausmaß der Knochenneubildung – endostal“

Abb. 44: Häufigkeiten der Tiere in den einzelnen Klassen für die Variable „Bruchspaltdurchbauung“

Abb. 45: Arithmetische Mittelwerte der Variable „Quantitativen Flächenmessung der Knochenneubildung“ der einzelnen Tiere

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Schalleitungsgeschwindigkeit und akustische Impedanz verschiedener Stoffe und Gewebe (nach Krause 1997)
- Tab. 2: Versuchsschema
- Tab. 3: Validierung der Publikationen
- Tab. 4: Gesamtauswertung des Untersuchungskollektivs
- Tab. 5: Studien zur Wirkung extrakorporaler Stosswellen auf Knochengewebe
- Tab. 6: Klinische Studien zur Wirkung extrakorporaler Stosswellen auf pathologisch verändertes Knochengewebe

1 Einleitung

Die Störung der physiologischen Frakturheilung stellt eine typische Komplikation bei der Versorgung von Knochenbrüchen dar. Bleibt die knöchernen Durchbauung über einen Zeitraum von vier bis sechs Monaten nach dem ursächlichen Trauma aus, so spricht man von einer verzögerten Frakturheilung (engl.: delayed union) (Rosen 1979). Dagegen handelt es sich um eine **Pseudarthrose** (engl.: non-union), wenn die knöchernen Konsolidierung einer Fraktur oder Osteotomie über mehr als sechs Monate ausbleibt (Weber und Czech 1973, Rosen 1979, Wirth 1992). In diesem Fall besteht kaum noch Potenzial zu einer Ausheilung des Knochendefektes ohne zusätzliche Therapie (Brashear 1965, Beickert und Smieja 2001).

Prinzipiell gilt es zwei große Ursachengruppen einer Pseudarthrose zu unterscheiden: hierbei sind die mechanischen und biologischen Faktoren sowie die zusätzliche Störung der Knochenheilung durch Infektion (Rüter und Mayr 1999, Runkel und Rommels 2000) zu nennen. Häufig ergibt sich auch ein Mischbild dieser sich gegenseitig beeinflussenden Faktoren.

Zu den mechanischen Faktoren zählen zum einen ein fehlender Fragmentkontakt und zum anderen eine Instabilität in der kritischen Phase der Frakturheilung (Kuner et al. 1996, Runkel und Rommels 2000), welche zumeist eine hypertrophe Pseudarthrose zur Folge haben (Brandner und Späth 2001). Als biologische Ursache ist hauptsächlich die mangelnde lokale Durchblutung in Folge von Störungen der periostalen oder medullären Gefäßversorgung zu nennen (Rahmanzadeh und Meißner 1992, Rüter und Mayr 1999). Entsprechend kann eine Vaskularisationsstörung in Kombination mit weiteren Störfaktoren das Entstehen einer atrophischen Pseudarthrose bedingen (Brandner und Späth 2001).

Im Allgemeinen lassen sich vitale von avitalen Pseudarthrosen abgrenzen. Im klinischen Alltag wird die Pseudarthrose vereinfacht entsprechend der Art ihrer Kallusreaktion eingeteilt. Ist in der Frakturzone radiologisch eine überschießende Knochenneubildung ohne Konsolidierung des Fraktur- respektive des Osteotomiespaltes zu erkennen, so handelt es sich um eine hypertrophe Pseudarthrose. In diesem Fall besteht biologische Aktivität, das heißt die Pseudarthrose ist vital (Schwartzman et al. 1990). Bei mangelndem oder insuffizientem Nachweis einer Knochenneubildung hin-

gegen, spricht man von einer **atropen Pseudarthrose**. Sie ist durch ihre fehlende Vitalität und damit durch ihre biologische Inaktivität gekennzeichnet (Weber und Czech 1973). Findet sich eine Infektion, wird von einer septischen Pseudarthrose gesprochen. Liegt dagegen keine Infektion vor, handelt es sich um eine aseptische Pseudarthrose.

Die Pseudarthrose stellt mit einer Entstehungswahrscheinlichkeit von 5 – 15% in der Orthopädie und Unfallchirurgie ein Problem mit hoher klinischer Relevanz dar (Besch et al. 1994, Kuner et al. 1996, Rompe et al. 1997(a), Richter et al. 2000, Bischoff und Kinzl 2001). Speziell die atrophe Pseudarthrose, welche im Vergleich zu den anderen beschriebenen Arten deutlich häufiger auftritt, ist hinsichtlich ihrer Heilungstendenz äußerst kritisch anzusehen. Ihre Entwicklung ist vor allem nach komplizierten Trümmerfrakturen, devastierten Knochen und bei zusätzlich begleitenden Systemerkrankungen begünstigt (Runkel und Rommels 2000).

Zum heutigen Zeitpunkt besteht die **Standardtherapie der aseptisch-atropen Pseudarthrose** im operativen Vorgehen. Behandlungsprinzip ist dabei das Anfrischen der beiden Knochenenden, die Spongiosaanlagerung sowie die osteosynthetische Stabilisierung (Rüter und Mayr 1999, Runkel und Rommels 2000). Kuner et al. (1996) empfehlen zusätzlich eine „Dekortikation über 5 – 6 cm am proximalen und distalen Hauptfragment sowie um die halbe Zirkumferenz herum“.

Die besondere sozio-ökonomische Problematik der aseptisch-atropen Pseudarthrose liegt in der aufwändigen Therapie, der äußerst langen Behandlungszeit sowie dem trotzdem ziemlich eingeschränkten Therapieerfolg begründet.

Rompe et al. (1997(a)) geben in ihrer Publikation die Heilungsraten nach chirurgischer Therapie zwischen 85% und 93% (Wu und Shih 1992, Cattaneo et al. 1993, Wiss und Stetson 1994) an, wobei die operativen Eingriffe häufig mehrfach (1. Revision: 99%, 2. Revision: 45%, 3. Revision und Mehrfachrevisionen: 18%) wiederholt werden müssen. Der mittlere Behandlungszeitraum umfasst demnach in etwa 24 Monate (Richter et al. 2000). Die beschriebene Therapiestrategie erklärt auch die hohe Morbidität der Patienten. Hinsichtlich der Transplantation autogenen Knochenmaterials beschreiben Younger und Chapman (1989) die Rate an größeren Komplikationen wie Infektion, verlängerte Wunddrainage, starker Schmerz, Revisionen und Sensibilitätsverlust mit 8,6%. Kleinere Schwierigkeiten im postoperativen Verlauf tre-

ten mit einer Häufigkeit von 20,6% auf. Abgesehen von der erhöhten Komplikationsrate, die Mehrfachoperationen generell nach sich ziehen, muss der Patient selbst äußerst vielen psychischen und physischen Belastungen Stand halten. Neben den erheblichen volkswirtschaftlichen Einbußen, kommt es nicht selten durch lange Krankenhausaufenthalte, chronische Schmerzentwicklung und längere Arbeitsunfähigkeiten zur sozialen Isolation und zum Verlust beruflicher Kontakte (Beutler et al. 1997).

Bislang konnte weder mit Hilfe verbesserter Operationstechniken noch mittels neu entwickelter minimal invasiver Implantate eine zufrieden stellende Lösung dieses Problems gefunden werden. Seit Beginn der 90er Jahre wurde nun vermehrt die **extrakorporale Stosswellentherapie (ESWT)** als weitere Therapiemöglichkeit propagiert. In der Literatur werden Erfolgsquoten von bis zu 91% beschrieben und die ESWT als Alternative zur Operation empfohlen (Haupt et al. 1997, Russo et al. 1997, Heller et al. 1998, Beutler et al. 1999, Schaden et al. 2001, Wang et al. 2001(a), Maier et al. 2002(a), Tischer et al. 2002). Diese nicht invasive und vergleichsweise sehr kostengünstige Methode war zuvor nur aus der Urologie als etabliertes Mittel zur Desintegration von Nierensteinen bekannt (Eisenberger und Chaussy 1978, Chaussy et al. 1980, Chaussy et al. 1982, Brendel 1986). Es wurden, im Rahmen von tierexperimentellen Studien zur Evaluierung möglicher unerwünschter Nebenwirkungen der extrakorporalen Stosswellenlithotripsie (ESWL), interessante Effekte im Sinne einer Osteoinduktion gefunden (Graff et al. 1988, Brümmer et al. 1990). Daraufhin hat sich eine Vielzahl von Arbeitsgruppen diesem Thema gewidmet, um nach einer möglichen Osteoneogenese durch die extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWT) zu forschen.

Erste Berichte über die Anwendung von Stosswellen in der Orthopädie wurden in den frühen 90ern von Valchanou und Michailov (1991), Haist et al. (1992), Schleberger und Senge (1992), Kaulesar Sukul et al. (1993) und Delius et al. (1995) veröffentlicht. Auf der Basis der zuvor genannten Beobachtungen untersuchte man zunächst hauptsächlich die Wirksamkeit der ESWT auf den gesunden Knochen und Frakturen.

Die Autoren konnten neben kleineren Hämatomen, subperiostalen Blutungen und intraossären Mikrofrakturen ebenfalls lokale Dekortikationen (Ikeda et al. 1999) am Knochen nachweisen. Durch das Aufbrechen knöcherner Sklerosezonen soll, laut

Valchanou und Michailov (1991), ein direkter Stimulus für die Osteogenese gesetzt werden. Einer anderen Theorie zufolge entstehen durch die Beschallung Mikrotraumata, welche die inflammatorische Phase induzieren respektive verlängern (Wang et al. 2002). Dadurch soll es im Rahmen der Neovaskularisation zu einer gesteigerten Knochenkallusbildung kommen. Dieser desorganisierende Effekt wird als indirekt osteogenetische Wirkung bezeichnet (Uslu et al. 1999). In einer anderen Studie wurde explizit nach Veränderungen der Membranpotentiale verschiedener Zellen durch ESWT geforscht. Wang et al. (2001(c)) sprechen dem physikalischen Effekt der Hypo-/Hyperpolarisation, verursacht durch extrakorporale Stosswellen, eine entscheidende Bedeutung zu. Die Verfasser gehen davon aus, dass auf diesem Wege ein direkter Einfluss auf die Knochenneubildung ausgeübt wird.

Im Rahmen der Grundlagenforschung zu einer beschleunigten knöchernen Durchbauung von Frakturen durch ESWT wurden die ersten **tierexperimentellen Untersuchungen** durchgeführt. Sie zeigten viel versprechende, die Hypothesen bestätigende Ergebnisse (Graff 1989, Ekkernkamp et al. 1991, Ekkernkamp et al. 1992, Haupt et al. 1992, Johannes et al. 1996, Ikeda et al. 1999, Wang et al. 2001(b)). Neben der Beobachtung, dass eine schnellere Heilung der defekten Knochen erzielt werden konnte, wurde sogar ein Anstieg der mechanischen Stabilität festgestellt (Haupt et al. 1992). Diese Erfolge konnten jedoch nicht von allen Autoren bestätigt werden (Seemann et al. 1992, Perren et al. 1993, Forriol et al. 1994, Augat et al. 1995). In Erscheinung getreten seien die negativen Auswirkungen der extrakorporalen Stosswellen mit einer Verschlechterung der mechanischen Stabilität sowie mit einer Verzögerung der Frakturheilung.

Trotz dieser inhomogenen und unbefriedigenden Datenlage wurden bereits einige **klinische Studien** durchgeführt und dieselben mit ausnahmslos positiven Resultaten (72% – 91%) publiziert (Haist 1995, Schleberger 1995, Wirsching et al. 1998, Wirsching und Lang (1999), Schaden et al. 2001, Wang et al. 2001(a), Schoellner et al. 2002). Bei Schaden et al. (2001) erfolgte in 75,7% ein knöcherner Durchbau, begleitet von einer schnellen Schmerzlinderung. Die extrakorporalen Stosswellen werden als extrem nebenwirkungsarm und als sehr wirkungsvoll beschrieben. Demgegenüber stehen kritische Stimmen, die der ESWT keinerlei Nutzen zusprechen.

Sie unterstellen den Verfassern der klinischen Studien, die eine beschleunigte Knochenheilung beschreiben, eine Missinterpretation natürlicher Frakturheilung (Biedermann et al. 2003).

Der Vergleich und die Interpretation der bisher veröffentlichten Daten erweisen sich als äußerst schwierig. Die Studien unterscheiden sich deutlich in gewichtigen Punkten (Ein- und Ausschlusskriterien, Körperregion, Impulszahl, Energieflussdichte, Nachbehandlung etc.). Diese starke Inhomogenität erklärt die großen Differenzen der Ergebnisse und macht eine exakte Wertung dieser Therapiemethode unmöglich. Im Sinne der evidenced-based-medicine kann die extrakorporale Stosswellentherapie somit nicht als Therapie der ersten Wahl empfohlen werden (Rompe et al. 1997(a), Birnbaum et al. 2002). Rompe et al. (1997(b)) kritisierten diese lückenhafte Datenlage und verlangten nach standardisierten Geräten, eindeutigen Indikationen und klaren medizinischen Behandlungsvorgaben.

In diesem am Kaninchenknochen durchgeführten Versuch soll nun am standardisierten Modell herausgefunden werden, ob mittel- bis hochenergetische Stosswellen am pathologisch veränderten Knochen (speziell an der atrophen Pseudarthrose) zu einer Steigerung der Knochenneubildung führen können. Untersucht wird eine mit extrakorporalen Stosswellen behandelte Gruppe (n = 6) versus einer unbehandelten Gruppe (n = 8). Die statistische Auswertung erfolgt sowohl klinisch und radiologisch als auch histologisch vier Wochen nach der Stosswellentherapie durch zwei voneinander unabhängige Untersucher.

Die Pseudarthrose wird nach dem Tiermodell für aseptisch-atrophe Pseudarthrosen von Brownlow und Simpson (2000) herbeigeführt. Die Versuche haben Modellcharakter für den Menschen. Es kann davon ausgegangen werden, dass die hier erlangten Erkenntnisse auf den Menschen übertragen werden können. Eine Einschränkung ergibt sich lediglich durch die höheren Energieflussdichten, welche bei der ESWT zur Osteoinduktion am kranken, menschlichen Knochen zu erwarten sind.

2 Zielsetzung

Die bisher publizierten Studien zur Wirkung der ESWT haben äußerst divergente Ergebnisse geliefert. Die fehlende Homogenität stellt hinsichtlich der Vergleichbarkeit der verschiedenen Untersuchungen ein großes Problem dar. Trotz der vielen positiven Resultate, die sowohl bei den klinischen Studien als auch bei den experimentellen (in-vivo und in-vitro) Versuchen beschrieben worden sind, können keine eindeutigen Therapieempfehlungen im Sinne der evidenced-based-medicine gegeben werden. Demnach wäre eine randomisierte, prospektive, klinische Studie mit Kontrollgruppe eine berechtigte Forderung, um die Indikation für extrakorporale Stosswellentherapie enger zu stecken und genau zu definieren. Ferner wären klare therapeutische Richtlinien wie z.B. festgelegte Energieflussdichten (EFD), bestimmte Impulsangaben etc. (Birnbaum et al. 2002, Biedermann et al. 2003) wünschenswert.

Auf der Basis der aktuell verfügbaren klinischen Daten erscheint es jedoch gegenwärtig wissenschaftlich unmöglich und vor allem ethisch nicht vertretbar geblindete, placebo-kontrollierte, randomisierte Multicenter-Studien zum Einsatz extrakorporaler Stosswellen bei der Therapie aseptisch-atropher Pseudarthrosen durchzuführen. Ein potentieller Nachteil wäre den Patienten, ohne weitere experimentelle Untersuchungen, nicht zumutbar. Dementsprechend scheint es dringend notwendig, das Grundlagenwissen diesbezüglich zu erweitern vor allem hinsichtlich der zugrunde liegenden zellulären und molekularen Wirkmechanismen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich am etablierten Modell des Kaninchens mit experimentellen Untersuchungen zur Applikation extrakorporaler Stosswellen am pathologisch veränderten Knochen. Nach Ausführung der Studie und Auswertung der Ergebnisse werden weitere Erkenntnisse über die Wirkung extrakorporaler Stosswellen auf pathologisches Knochengewebe erwartet.

Folgende **Hypothese** gilt es zu beweisen:

Die fokussierte extrakorporale Stosswellentherapie (EFD bei 0,5 mJ/mm²) führt beim pathologischen, im Sinne einer Pseudarthrose veränderten Knochen zu einer deutlich beschleunigten knöchernen Ausheilung.

3 Grundlagen

3.1 Knochenbruchheilung und Pseudarthrosen

„Die erfolgreiche Behandlung von Pseudarthrosen basiert auf dem Verständnis der Pathophysiologie dieser Heilungsstörung“ (Rüter und Mayr 1999).

Die Knochenbruchheilung ist ein komplexer Prozess, bei der es auf den unterschiedlichsten Ebenen sowie durch die verschiedensten Ursachen zu einer Störung derselben kommen kann. Eine wichtige Voraussetzung für das Erkennen und Verstehen der jeweiligen Störfaktoren ist eine genaue Kenntnis der pathophysiologischen Zusammenhänge. Daher scheint es sinnvoll, zunächst kurz auf die pathophysiologischen Vorgänge einzugehen, die nach einer Fraktur phasenweise durchlaufen werden.

Zum Zeitpunkt der **Fraktur** kommt es zur Verletzung der Kortikalis, des Periosts, des Knochenmarks und des beteiligten Bindegewebes sowie der benachbarten Weichteile. Folge ist die Blutung aus den hierbei zerstörten Gefäßen.

Die sich an das Trauma direkt anschließende **Entzündungsphase** leitet die erste Stufe der **indirekten/sekundären** Frakturheilung (von Perren et al. (1969) als „**spontane**“ Bruchheilung bezeichnet) ein und ist durch Kapillaraussprossung und Zellproliferation gekennzeichnet. Sowohl periostal beginnend als auch vom Endost ausgehend, entwickeln sich unterschiedliche Ossifikationswege und tragen gemeinsam zur Knochenbrucheinheilung bei. Daher ist es nicht verwunderlich, dass im Frakturspalt ein Mischbild desmalen und enchondralen Ossifikation sichtbar wird. Die sich im Periost befindlichen osteogenen Vorläuferzellen mesenchymaler Herkunft, so genannte Osteoprogenitorzellen (Rüter und Mayr 1999), proliferieren und bilden zunächst Knorpel.

In der **Granulationsphase** kommt es nun zur flächenhaften Resorption der geschädigten Zellen und des Hämatoms (Stürmer 1987). Das inzwischen schon durch Kollagenfasern und Fibrin organisierte Blutgerinnsel wird durch Granulationsgewebe ersetzt. Es entsteht auf diese Weise eine weiche, aus Bindegewebe und hyalinem Knorpel bestehende Überbrückung des Bruchspaltes. Man bezeichnet diese Subs-

tanz, die sich im weiteren Verlauf zu stabilem Knochen umwandeln wird, als Kallus (Rüter und Mayr 1999). Aus der Markhöhle hervortretend füllt der so genannte medulläre Kallus die Bruchspalten.

Als nächster Schritt im Verlauf der **indirekten** Bruchheilung erfolgt die Mineralisation in der Phase der **Kallushärtung**. Im Sinne der enchondralen Ossifikation wird der neu gebildete Knorpel abgebaut und durch Geflechtknochen ersetzt.

Weiterhin erhält der Knochen dann in der **Modelling/Remodellingsphase** seine Stabilität. Entsprechend seinen mechanischen Anforderungen wird dieser in lamellären Knochen umgebaut. Diese Art der Bruchheilung basiert auf einer inneren Unruhe im Bruchspalt (Perren 1979) und kann im Rahmen folgender Therapieverfahren beobachtet werden: konservatives Vorgehen, Marknagelosteosynthese, Fixateur-externe-Osteosynthese und elastische („biologische“) Plattenosteosynthese (Stürmer 1996).

Etwas anders verläuft hingegen die **direkte/primäre** Frakturheilung. Sie kann nur unter sehr früher osteosynthetischer Versorgung stattfinden und benötigt absolute Stabilität. Diese wird beispielsweise gewährleistet durch absolut stabile Zugschraubenosteosynthesen, Plattenosteosynthesen und Fixateur-externe-Systemen mit interfragmentärer Zugschraube (Stürmer 1996). Dabei kommt es zu einer blockartigen Überbrückung des Frakturspaltens durch die Havers-Kanäle, die ohne weitere Umbauvorgänge direkt neuen Knochen bilden (Perren et al. 1969). Das heißt, die Resorptionsvorgänge und die Kallusbildung werden vollkommen umgangen. Dementsprechend wird auf die sich schrittweise entwickelnde Stabilität verzichtet.

Wird dieser Regelkreis, bestehend aus Osteovaskularisation, Osteoregeneration und Osteostabilisation, durch mechanische oder biologische Ursachen – auf die im Folgenden näher eingegangen wird – unterbrochen, so kann es zur Entstehung einer so genannten **Pseudarthrose** kommen (Schweiberer et al. 1999). Diese ist durch einen über mindestens sechs Monate persistierenden Bruchspalt definiert (Wirth 1992). Es handelt sich somit um das Ausbleiben der knöchernen Heilung, gefolgt von der Ausbildung eines Falschgelenks; diese Namensgebung ist zurückzuführen auf histomorphologische Befunde. Denn die Pseudarthrose besitzt, ähnlich einem echten

Gelenk, eine umgebende Kapsel sowie, den Fragmentenden anhaftende, Knorpelinseln (Kuner et al. 1996, Runkel und Rommels 2000).

Nach Weber und Czech (1973) werden die erworbenen Pseudarthrosen wie folgt eingeteilt (Abb. 1):

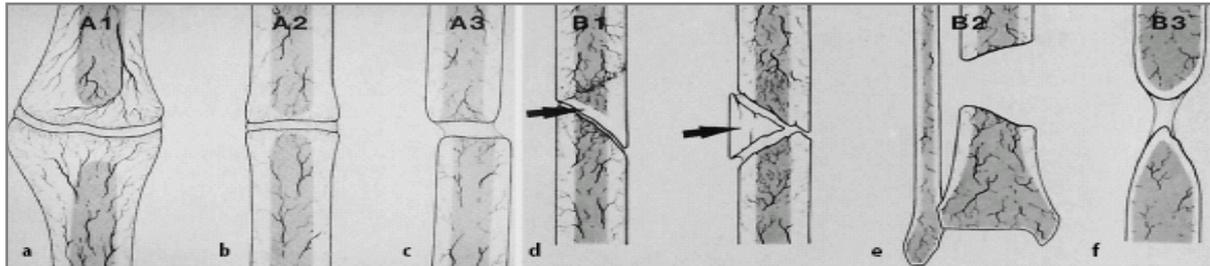


Abb. 1: Klassifikation der Pseudarthrosen nach Weber und Czech (Original in Publikation 1973)
A1 Hypertrophe, kallusreiche Pseudarthrose („Elefantenfuß“); A2 Kallusarme Pseudarthrose („Pferdefuß“); A3 Oligotrophe, kalluslose Pseudarthrose; B1 Avitale Drehkeilpseudarthrose; B2 Defektpseudarthrose; B3 Atrophe Pseudarthrose

Es können erworbene von angeborenen sowie vitale von avitalen Pseudarthrosen unterschieden werden. Meist erfolgt die Einteilung in den jeweiligen biologischen Aktivitätstyp schon während der klinisch-röntgenologischen Diagnostik. Bei Unklarheiten und in speziellen Fällen können die Aktivitätsverhältnisse mittels einer Technetium-Szintigraphie sicher beurteilt werden (Segmüller et al. 1969). Zu den stark nuklid-anreichernden vitalen Pseudarthrosen zählen die Elefantenfuß-, Pferdefuß- und die oligotrophe kalluslose Pseudarthrose (Abb. 1: A1 – A3). Demgegenüber kann man die biologisch inaktiven Formen (Abb. 1: B1 – B3) zusammenfassen: die Drehkeil- (dystrophisch) und die Defektpseudarthrose (die Enden sind vaskularisiert, die Defektzone ist osteologisch inaktiv) sowie die atrophe Pseudarthrose (narbiges Bindegewebe).

Ist ein Pseudarthrose infiziert, wird von einer septischen Pseudarthrose gesprochen. Findet sich dagegen keine Infektion, ist es eine aseptische Pseudarthrose.

Die Ätiologie der ursächlichen Pathogenese einer Pseudarthrose ist von starker Bedeutung für den weiteren Krankheitsverlauf und den Therapieentscheid. Folgende pathomechanische und pathologische Faktoren, die eine verzögerte Frakturheilung auslösen können, gilt es zu unterscheiden:

- Ein **fehlender Fragmentkontakt** kann mechanisch durch Interposition von Weichteilen, durch Distraction oder postoperativ, nach fehlerhaft durchgeführter statischer Osteosynthese entstehen. In diesem Fall fällt der Triggerreiz der interfragmentären Bewegung auf nicht reaktionsfähiges Gewebe (Kuner et al. 1996, Runkel und Rommels 2000).
- Eine **Instabilität in der vulnerablen Phase** der Kallusüberbrückung führt zu einem Übermaß an Beweglichkeit. Durch mangelnde Ruhigstellung zum falschen Zeitpunkt kommt es beim neu gebildeten Faserknochen zur Überlastung der Elastizitätsreserve und die feinen Knochenbälkchen brechen wieder (Stürmer 1996). Weiterhin werden Resorptionsvorgänge sowie eine überschüssige Kallusbildung im Bereich des Frakturspaltes – entsprechend dem Bild einer hypertrophen Pseudarthrose – angestoßen (Rüter und Mayr 1999, Runkel und Rommels 2000). Im Gegenzug führt eine Kompression der Fragmente zu einer erhöhten Stabilität, nicht aber zu einer Beschleunigung der physiologischen Vorgänge.
- Die **Störung der periostalen oder medullären Gefäßversorgung** in den Phasen der Entzündung und Granulation (Ekkernkamp et al. 1996, Rüter und Mayr 1999) ist die entscheidende biologische Ursache von Pseudarthrosen. Sie führt unmittelbar zur Knochennekrose. Ein begleitender Weichteilschaden korreliert eng mit dem Ausmaß der Vaskularisationsstörung. Unabhängig, ob dieser durch das Trauma selbst oder iatrogen durch eine Operation bedingt ist. Mikroskopisch gesehen kommt es schon bei der ursächlichen Fraktur zur Knochennekrose in der Frakturzone selbst (Stürmer 1996, Runkel und Rommels 2000). Oft führen Frakturen mit starker Dislokation oder mit größerem Weichteilschaden sowie Abscherfrakturen einzelner Knochenstücke zusätzlich zur ausgedehnten Zerstörung des Periosts. Dadurch fallen Triggerreize der Verletzung und der interfragmentären Bewegung auf avitales Gewebe (Stürmer 1996, Schweiberer et al. 1999), was die Entstehung einer atrophnen Pseudarthrose durch verminderte Kallusproduktion begünstigt.
- **Infektionen** treten häufig postoperativ oder bei offenen Verletzungen auf. Sie verschlimmern die Situation im Sinne einer Ausbildung von Knochennekrosen und Osteolysen. Auf dieser Basis kann es zur Implantatauslockerung und als

Konsequenz zu einer Instabilität im Frakturbereich kommen (Kuner et al. 1996, Runkel und Rommels 2000)

- **Systemische Faktoren** wie vorbestehende Durchblutungsstörungen, Rauchen, Neoplasien sowie Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus oder Medikamenteneinnahme (insbesondere NSAR) beeinflussen den Heilungsprozess zusätzlich negativ (Weber und Czech 1973, Rahmzadeh und Meißner 1992, Rüter und Mayr 1999, Giannoudis et al. 2000).

Darüber hinaus können operativ bedingte Gefäßverletzungen, hervorgerufen durch ausgedehntes Debridement, exzessive Denudierung oder osteosynthetische Maßnahmen, die Situation verschlechtern. In dieser Hinsicht sind das operative Geschick und die Erfahrung des Operateurs sowie die Wahl des einzubringenden Kraftträgers ein maßgeblicher Faktor (Kuner et al. 1996, Schweiberer et al. 1999). „Technische Fehler bei der Osteosynthese spielen in der Pseudarthroseentstehung eine wesentliche Rolle“ (Rehn und Lies 1981, Bergmann et al. 1998). Problematisch sind vor allem die klassischen Plattenosteosynthesen, denn sie können periostal devascularisierend wirken (Stürmer und Scholten 1989). Oftmals haben sie atrophe Pseudarthrosen zur Folge (Richter et al. 2000). Ebenso kritisch zu überdenken ist der Einsatz des aufgebohrten Marknagels, da es durch die intramedulläre Druckerhöhung zur Thrombosierung intrakortikaler Gefäße kommen kann, die eine avaskuläre Nekrose der inneren 2/3 der Kortikalis zur Folge hat (Richter et al. 2000, Runkel und Rommels 2000). Kuner et al. (1996) begründen die Nekrose mit anschließenden Zirkulationsschaden durch die zu starke Erhitzung im Rahmen des Aufbohrens.

3.2 Behandlungsstrategien von Pseudarthrosen

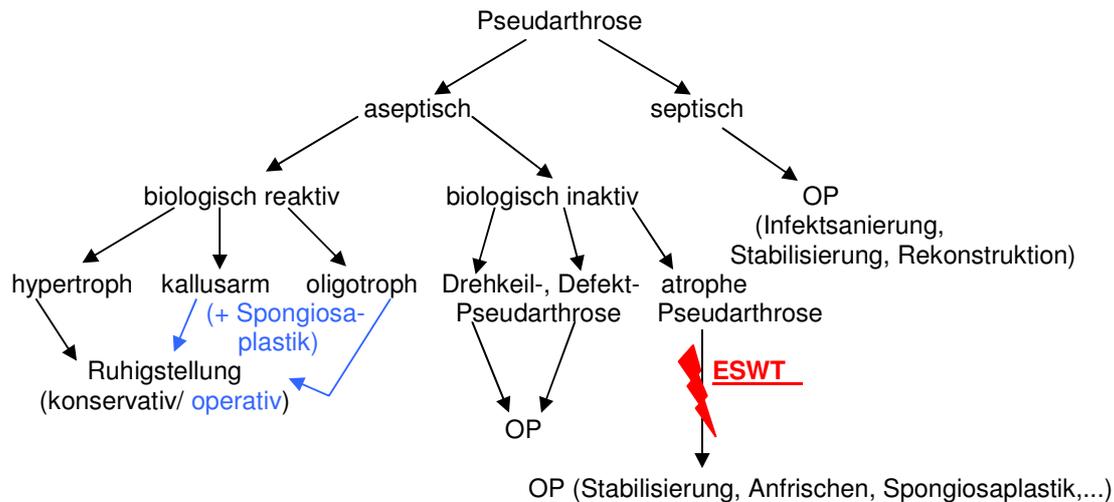


Abb. 2: Algorithmus der Pseudarthrosetherapie

Im abgebildeten Schema (Abb. 2) sind die möglichen Behandlungsstrategien der verschiedenen Pseudarthrosen vereinfacht dargestellt.

Klinisch stellt sich die Pseudarthrose zu Beginn möglicherweise vollkommen inapparent dar. Das macht eine frühzeitige Diagnose sehr schwierig. Beim Auftreten von Beschwerden stehen schmerzbedingte Minderbelastbarkeit und Instabilität im Vordergrund. Anamnese, klinischer Befund (zusätzlich können Deformierungen, übermäßige Beweglichkeit und Weichteilschäden auftreten) und Röntgenaufnahmen in zwei Ebenen ergeben gemeinsam die Diagnose einer Pseudarthrose. Bei unklaren Ergebnissen oder speziellen Fragestellungen werden weitere bildgebende Verfahren, wie CT, MRT oder Szintigraphie durchgeführt (Kuner et al. 1996). Nach der Diagnosestellung bedarf es einer zügigen Intervention, denn je früher einer Pseudarthrose die richtige Therapie zugeführt wird, desto besser sind ihre Heilungschancen (Kuner et al. 1996). Entscheidend für die korrekte Einschätzung der Lage und die Wahl des richtigen Therapieregimes ist die Beantwortung folgender Fragen:

- Findet sich eine Infektion?
- Sind die Achsen- und Rotationsstellung korrekt?
- Ist die Pseudarthrose vaskularisiert oder liegt ein avaskulärer Typ vor?
- In welchem Zustand befindet sich das Weichteilgewebe?

3.3 Biophysikalische Grundlagen extrakorporaler Stosswellen

3.3.1 Physikalische Grundlagen extrakorporaler Stosswellen

Stosswellen sind einzelne akustische Druckpulse, die sich in Medien wie Gas, Flüssigkeit und Festkörpern dreidimensional ausbreiten. Charakteristischerweise kommt es in einer sehr kurzen Zeit zu einem deutlichen Anstieg des Druckes. Die überwiegende Zahl der medizinisch verwendeten Geräte erreicht ihr Druckmaximum innerhalb weniger Nanosekunden (ns) (Gerdesmeyer et al. 2002).

Die Stosswellen sind durch ihren spezifischen Verlauf gekennzeichnet, der sich in zwei unterschiedliche Phasen aufgliedern lässt. Dem steilen positiven Druckanstieg zu Beginn der ersten Phase folgt ein exponentieller Abfall der Kurve hin zum atmosphärischen Umgebungsdruck. In der sich anschließenden zweiten Phase entsteht ein negativer Druckwellenanteil, der am Ende wieder den Umgebungsdruck der Atmosphäre erreicht (Wess et al. 1997, Ueberle 1998, Ogden et al. 2001). Eine vollständige Stosswelle hat einen zeitlichen Umfang von nur wenigen Mikrosekunden (μs) (Folberth et al. 1992).

Stosswellen sind durch verschiedene physikalische Eigenschaften charakterisiert (Abb. 3) (Maier et al. 1998):

- **Positiver Spitzendruck (P_+):** P_+ definiert sich als die Differenz zwischen dem Umgebungsdruck und dem maximalen positiven Spitzendruck der Stosswelle. P_+ kann Werte zwischen 5 und 120 Megapascal (MPa) erreichen.
- **Negativer Spitzendruck (P_-):** P_- ist definiert als der maximale negative Spitzendruck während der zweiten Phase der Stosswelle und erreicht Werte zwischen 10% und 20% von P_+ .
- **Anstiegszeit (T_r):** T_r ist definiert als das Zeitintervall, während dessen der Druck von 10% von P_+ auf 90% von P_+ ansteigt. T_r kann Werte von unter 1 ns – 500 ns annehmen.
- **Pulsbreite (T_w):** Die Definition von T_w beinhaltet das Intervall zwischen dem Zeitpunkt, bei dem der Druck das erste Mal 50% von P_+ übersteigt und dem Zeitpunkt, bei dem der Druck (während des exponentiellen Druckabfalls in der ersten

Phase des Stosswelle) weniger als 50% von P_+ beträgt. Alternativ wird T_w auch als „full-width-half-maximum“ (FWHM) bezeichnet. Die Dauer von T_w liegt zwischen 200 ns und 500 ns und beeinflusst direkt die Energieflussdichte extrakorporaler Stosswellen.

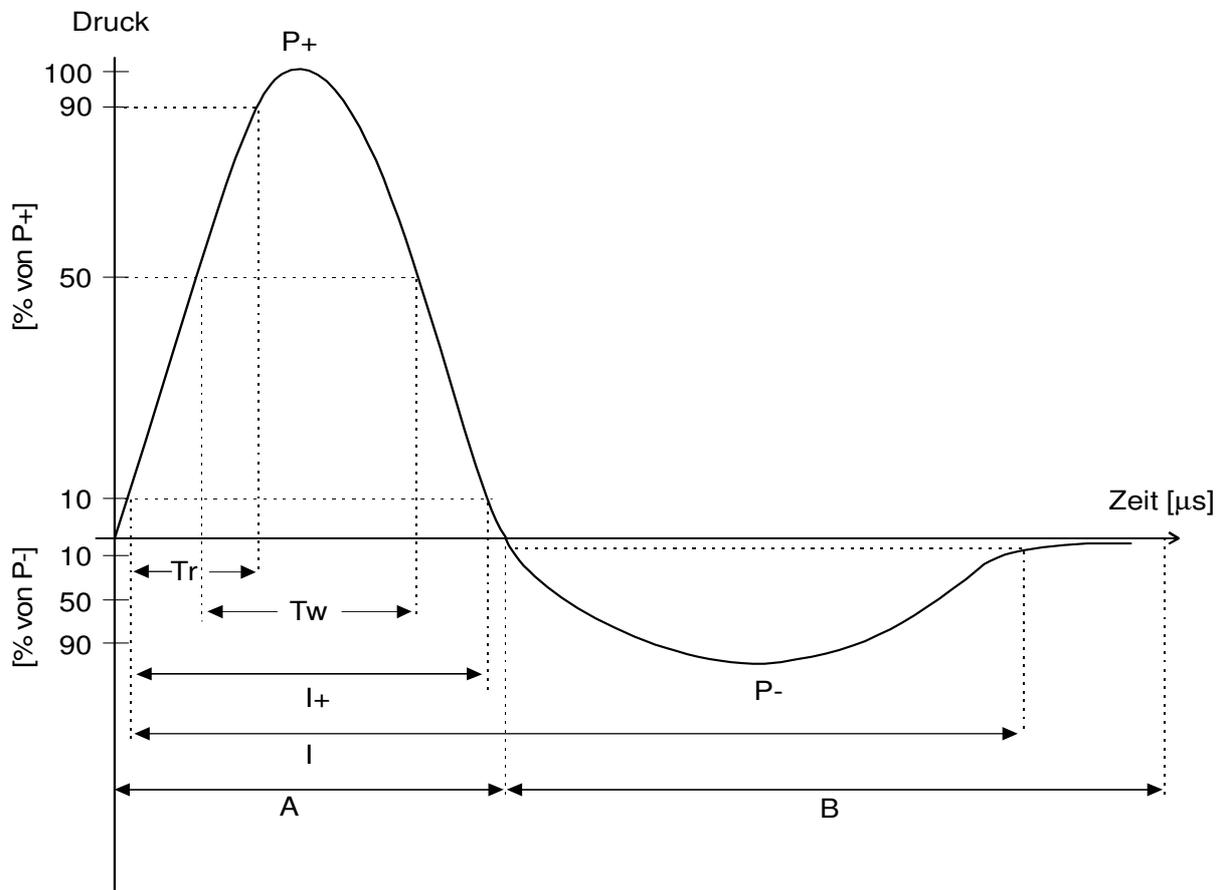


Abb. 3: Graphische Darstellung einer standardisierten Stosswelle (aus Gerdsmeyer et al. 2002). Der Stosswellendruck ist als Funktion der Zeit aufgetragen. A 1. Anteil der Stosswelle mit positivem Druck; B 2. Anteil der Stosswelle mit negativem Druck; P_+ positiver Spitzendruck; P_- negativer Spitzendruck; T_r Anstiegszeit; T_w Pulsbreite; I_+ Standardzeitintervall zur Berechnung der sog. „positiven Energie“ der Stosswelle; I Standardzeitintervall zur Berechnung der sog. „totalen Energie“ der Stosswelle. Die einzelnen Komponenten werden ausführlich im Text beschrieben.

Die Werte von P_+ , P_- , T_r und T_w einer Stosswelle hängen von der verwendeten Stosswellenquelle und Geräteeinstellung ab (Krause 1997). Der Teil der Stosswelle, bei dem ein negativer Druck herrscht, wird auch als „Zuganteil“ bezeichnet. Dieser ist im zeitlichen Verlauf deutlich länger als der positive Druckanteil der Stosswelle. Dagegen ist der Betrag von P_- immer deutlich geringer als der Wert von P_+ ; zudem ist P_- aufgrund physikalischer Gesetzmäßigkeiten in seiner Amplitude limitiert. Bei Über-

schreiten der Kohäsionskräfte des umgebenden Mediums durch Einwirkung größerer Zugkräfte können gasgefüllte Unterdruckblasen (sog. Kavitationsblasen) entstehen (Huber et al. 1998).

3.3.2 Technische Erzeugung extrakorporaler Stosswellen

Die Erzeugung extrakorporaler Stosswellen zur klinischen Anwendung kann durch verschiedene physikalisch-technische Verfahren erfolgen (Krause 1997, Maier et al. 1998, Ogden et al. 2001). Die Gemeinsamkeit aller Verfahren besteht darin, dass ein außerhalb des Körpers generierter Druckimpuls fokussiert und über Koppelmedien in den Körper geleitet wird. Das Therapiegebiet ist mittels der Fokussierung lokal zu begrenzen; diese Tatsache erklärt die weitgehend gering gehaltenen Nebenwirkungen der fokussierten Stosswellenerzeugung (Wess 2004).

Die Grundprinzipien der aktuell gebräuchlichen Methoden zur Erzeugung extrakorporaler Stosswellen (Krause 1997) werden im Folgenden kurz erläutert (Abb. 4 und Abb. 5):

- **Elektrohydraulisches Prinzip:** Die Generierung extrakorporaler Stosswellen mit einer elektrohydraulischen Stosswellenquelle erfolgt durch die Funkenentladung einer Elektrode. Durch diesen Vorgang entsteht eine Plasmablase, welche das umgebende Medium schlagartig verdrängt. Dabei entstehen Druckwellen (Stosswellen). Die sich sphärisch ausbreitenden Druckwellen werden über einen elliptischen Spiegel gebündelt und im Brennpunkt fokussiert (Abb. 4 und Abb. 5: A). Nachteil des Verfahrens ist der Verschleiß der Zündkerze, die nach einer bestimmten Anzahl von Entladungen ausgewechselt werden muss. Hinzu kommt, dass die elektrohydraulisch erzeugten Stosswellen hinsichtlich Energie und Form geringfügig schwanken können (Bailey et al. 1999). Dies scheint allerdings keine klinische Relevanz zu haben. Ein weiterer negativer Aspekt ist, dass die elektrohydraulisch erzeugten Stosswellen speziell in den niedrigeren Druckbereichen weniger gut dosierbar sind und von den Patienten zum Teil als sehr laut und schmerzhaft empfunden werden.

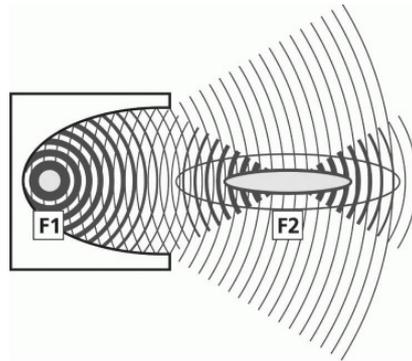


Abb. 4: Elektrohydraulisches Prinzip – Schemazeichnung (aus Wess 2004)

- Elektromagnetisches Prinzip:** Bei diesem Verfahren induziert man mittels einer Flachspule Wirbelströme in einer dünnen Kupferfolie, die ihrerseits mit einem Magnetfeld verknüpft sind. Es kommt zu explosionsartigen Auslenkungen der Metallmembran durch den Effekt der Lorentz-Kraft auf bewegte Ladungen. Dadurch lenkt sich auch die, der Folie anliegenden, Wassersäule aus und der Impuls wird in das Übertragungsmedium eingekoppelt und als ebene Pulswelle weitergeleitet. Erst durch Fokussierung mit einer akustischen Linse entsteht eine konvergente Pulswelle (Abb. 5: B). Nachteilig ist die technische Begrenztheit der akustischen Linse, die nur eingeschränkte Stosswellenquellen und Öffnungswinkel zulässt. Somit sind Schmerzen bei der Applikation nicht völlig zu vermeiden. Alternativ dazu wird eine zylindrische Membran so angeregt, dass sie zylindrisch divergente Pulswellen erzeugt. Durch einen parabolischen Reflektor werden diese, unter Verzicht einer Linse und den damit verbundenen Nachteilen, fokussiert (Köhrmann et al. 1992).
- Piezoelektrisches Prinzip:** Bei der piezoelektrischen Methode der Stosswellen-erzeugung wird im Mittelpunkt einer mit Piezokristallen ausgelegten Kugelschale durch pulsformige Bestromung der einzelnen Kristalle eine Vielzahl kleiner Druckimpulse emittiert (Abb. 5: C). Die einzelnen Druckwellen lassen sich, aufgrund der Anordnung der Kristalle, problemlos in einem Fokus bündeln (Tavakkoli et al. 1997). Vorteil der piezoelektrischen Systeme sind eine gute Wiederholgenauigkeit und eine gute Dosierbarkeit – auch in Bereichen niedriger Energien (Wess 2004).

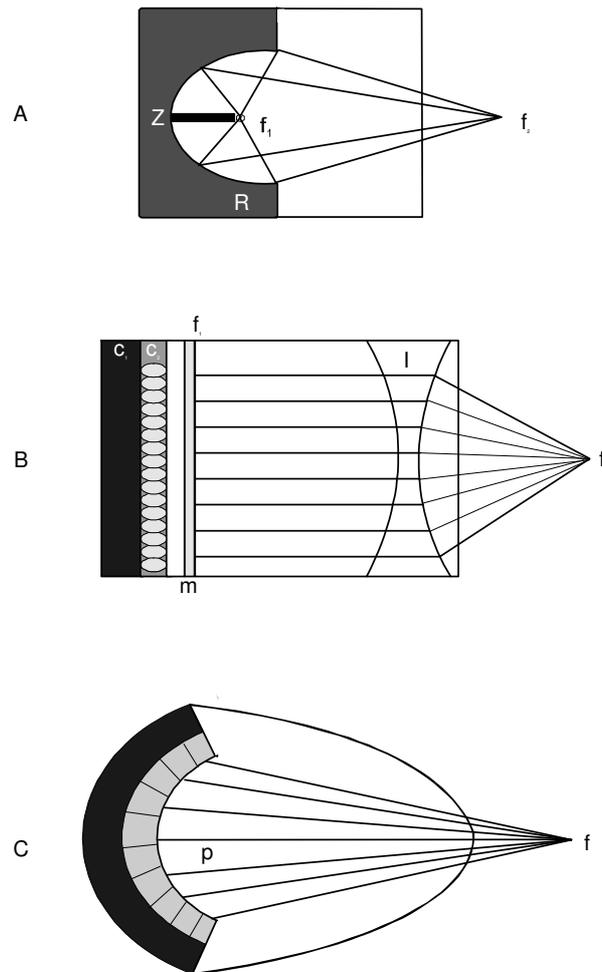


Abb. 5: Schematische Darstellung der verschiedenen technischen Typen von Stosswellenquellen (aus Gerdsmeyer et al. 2002). Generierung von extrakorporalen Stosswellen durch:
A Elektrohydraulisches Prinzip (s: Zündkerze; r: Reflektor; f_1 : 1. Fokuspunkt; f_2 : 2. Fokuspunkt); B Elektromagnetisches Prinzip (c_1 : Kondensator; c_2 : Spule; l: Linse; f_1 : 1. Fokuspunkt; f_2 : 2. Fokuspunkt); C Piezoelektrisches Prinzip (p: Piezokristalle; f: Fokuspunkt)

Um Reflexionsverluste beim Übergang der Stosswellen in den Körper des Patienten gering zu halten, muss die Stosswelle in einem Medium mit ähnlicher akustischer Impedanz wie jener des menschlichen Gewebes gebildet werden. Dementsprechend werden alle Druckimpulse, unabhängig von ihrer Erzeugung, mittels eines Koppelmediums (Wasser, Ultraschallgel) in den Körper des Patienten eingebracht (Wess 2004). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt wird davon ausgegangen, dass sich die – mit den zuvor beschriebenen physikalisch-technischen Verfahren generierten – extrakorporalen Stosswellen hinsichtlich ihrer biomedizinischen Wirksamkeit nicht oder nur unwesentlich voneinander unterscheiden (Haake et al. 2002).

- **Ballistisches Prinzip:** Bei diesem Verfahren zur Erzeugung von Stosswellen wird ein, sich in einem Lauf befindliches, Projektil mittels Pressluft in kurzer Zeit stark beschleunigt und auf einen Applikator geleitet. Von dort wird der Energieimpuls in das Gewebe eingekoppelt und fortgeleitet. Die Spitze des Applikators ist der Fokus, von dem aus sich die Druckwelle radiär in das Gewebe ausbreitet (Abb. 6). Nachteil dieser Methodik ist allerdings, dass der Applikator selbst den Fokus darstellt und somit keine Fokussierung des Stosswellenfeldes im Gewebe möglich ist. Durch die radiäre Ausbreitung nehmen Druck und Energiedichte der ballistisch generierten Stosswellen mit der dritten Potenz der Eindringtiefe in das Gewebe ab. Diese Modalität lässt die Therapie mit der sich radiär ausbreitenden Stosswelle für die klassischen Indikationen wie die Tendinosis calcarea der Schulter oder die aseptische Pseudarthrose – also in tieferen Gewebsschichten liegende Krankheitsbilder – als unbrauchbar erscheinen (Wess 2001). Jedoch eignen sich oberflächennah gelegene Indikationen für eine Therapie mit radiären Stosswellen.

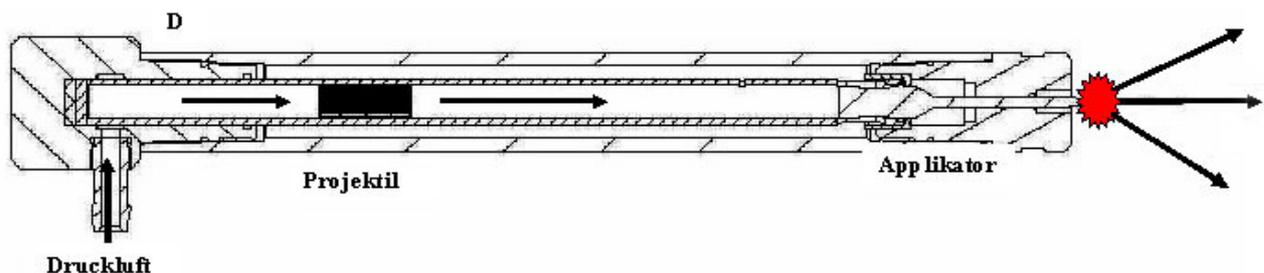


Abb. 6: Ballistisches Prinzip (aus Gerdsmeyer et al. 2002)

In der vorliegenden Arbeit wurden die Stosswellen mittels einer elektrohydraulischen Stosswellenquelle erzeugt, deren technischer Aufbau detailliert von Graff (1989) und Delius et al. (1995) beschrieben wurde.

3.3.3 Akustische Felder extrakorporaler Stosswellen

Durch die Fokussierung extrakorporaler Stosswellen entsteht ein dreidimensionales Stosswellenfeld, welches eine komplexe räumliche und zeitliche Verteilung des positiven und negativen Druckes aufweist (Abb. 7 – 9). Ein wichtiger Parameter dieses Stosswellenfeldes ist sein Fokus. Durch ein Zusammenwirken aller Wellenanteile entsteht in der Fokusregion ein Bereich mit sehr hohen Druckspitzen, der dreidimensional betrachtet eine zigarrenähnliche Gestalt (Abb. 7) besitzt.

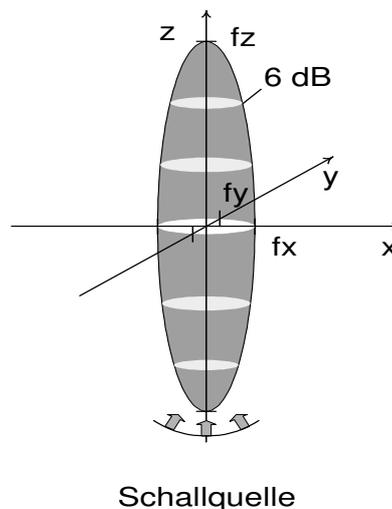


Abb. 7: Dreidimensionale elliptische Fokusgestalt, so genannte „-6 dB-Isobare“

Zwischen dem Fokusbereich und den physikalischen Parametern (P_- , P_+ , EFD = Energieflussdichte) der erzeugten Stosswellen bestehen Wechselwirkungen (Ueberle 1997, Wess et al. 1997). In der gegenwärtigen klinischen Anwendung finden sich hauptsächlich Stosswellenquellen, die die akustische Energie in kleinen Arealen fokussieren, um einerseits die Wirkung im Zielgebiet zu erhöhen und andererseits das angrenzende Gewebe so gut wie möglich zu schonen (Haake et al. 2001).

Es können, abhängig von der räumlichen Druckverteilung im Gewebe, mehrere Fokuszonen definiert werden (Abb. 7 – 9):

- Der Stosswellenfokus wird als derjenige Raum bestimmt, innerhalb dessen mindestens 50% des positiven Spitzendruckes (P_+) erreicht werden (sog. „-6 dB-Fokus“, f_{-6dB}). Seine elliptische Form gleicht einer Zigarre (Abb. 7) und kann

durch seine drei Halbachsen (f_x , f_y und f_z) beschrieben werden (Wess et al. 1997).

- Zusätzlich kann auch die „5 MPa-Isobare“ bestimmt werden. Diese ist als „5 MPa-Fokus“ ($f_{5\text{MPa}}$) definiert. Im Gegensatz zur „-6 dB-Isobare“, deren Messung auf relativen Druckwerten beruht, bezieht sich die „5 MPa-Isobare“ auf absolute, also kalibrierte Messungen.
- In der klinischen Anwendung wird schließlich noch der „5 mm-Fokus“ bestimmt, der den Stosswellenfokus als räumliche Ausdehnung in Bezug auf seine Längsachse beschreibt. Er wird unabhängig von der Stosswelle auf fünf Millimeter begrenzt (Wess et al. 1997).

Um die applizierte Stosswellenenergie zu quantifizieren, wird in der Mehrzahl der aktuellen Studien als physikalische Einheit die **Energieflussdichte** (EFD) in Millijoule pro Quadratmillimeter [mJ/mm^2] verwendet. Die EFD ist definiert als derjenige Betrag der Stosswellenenergie, der innerhalb von einem Quadratmillimeter der Fokuszzone eines akustischen Feldes gemessen werden kann (Ueberle 1997, Wess et al. 1997, Maier et al. 1998). Berechnet wird die EFD als Pulsintegritätsintegral mit folgender Formel (I):

$$EFD = \frac{1}{Z} \int_T p^2 dt \quad (I)$$

Dabei steht das Z für die akustische Impedanz des Mediums, p für den akustischen Druck der Stosswelle und t für den Zeitpunkt in dem untersuchten Zeitintervall T , über welchem der akustische Druck aufsummiert wird. Je nachdem, ob man für t das in Abb. 3 dargestellte Zeitintervall I_+ oder aber I heranzieht, wird die EFD entweder als „positive Energieflussdichte“ (ED_+) oder als Gesamtenergieflussdichte (ED) angegeben. Das Intervall I_+ beginnt zu dem Zeitpunkt, an dem der Druck der Stosswellen 10% von P_+ übersteigt und endet an dem Punkt, an dem der Druck 10% von P_+ am Ende der positiven Amplitude unterschreitet. Das Zeitintervall I beginnt zeitgleich mit I_+ und endet, wenn der negative Druck nach Erreichen des negativen Druckmaximums erstmalig 10% des negativen Spitzendrucks überschreitet. Die positiven Energien (ED_+) sind etwa um 20% niedriger als die totalen Energien (ED).

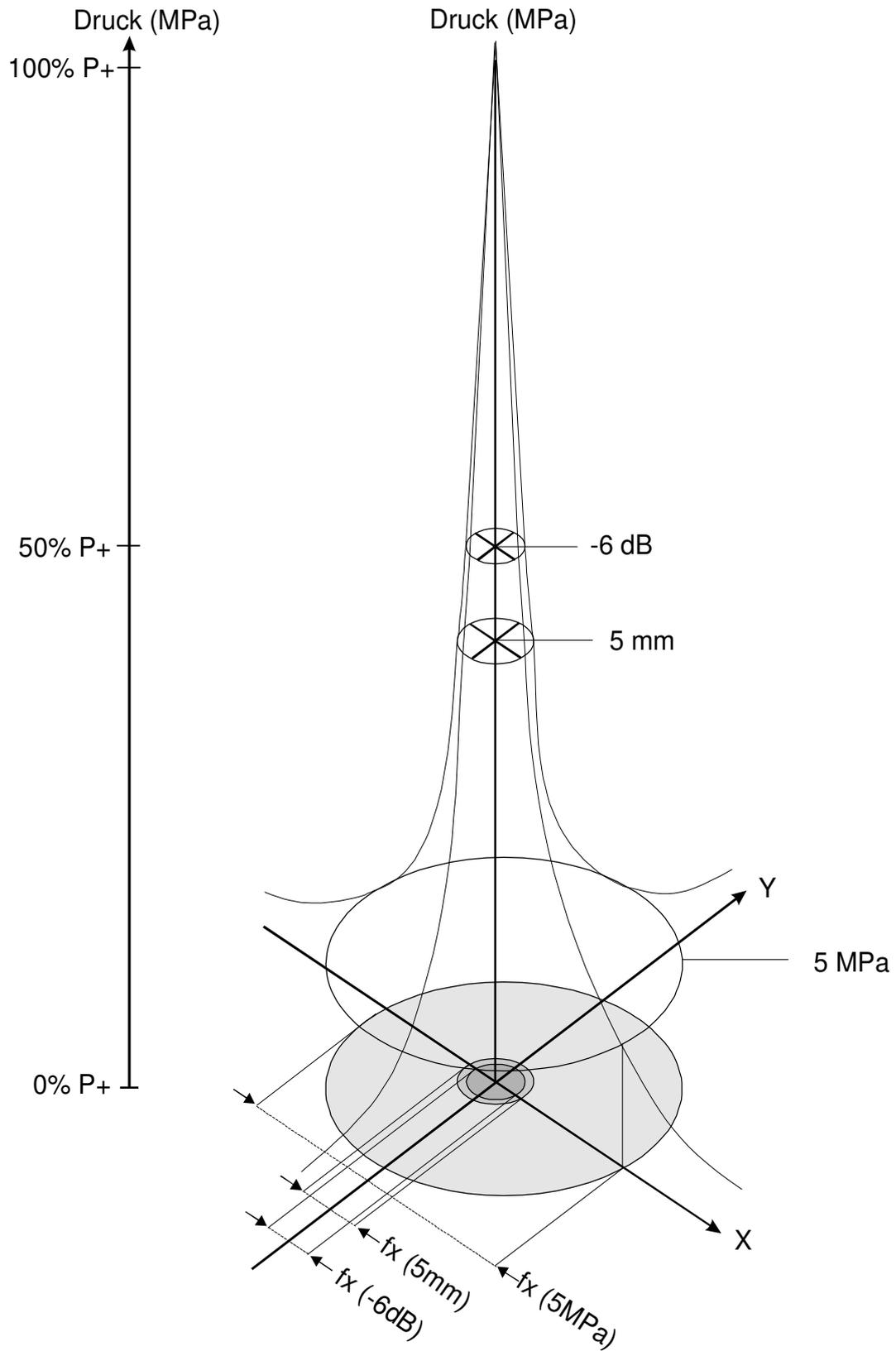


Abb. 8: Darstellung der räumlichen Ausbreitung (f_x , f_y) des -6 dB Fokus (dunkelgrauer Kreis), des 5 mm Fokus (mittelgrauer Kreis) und des 5 MPa Fokus (hellgrauer Kreis) bei hohen Energiedichten (aus Wess et al. 1997).

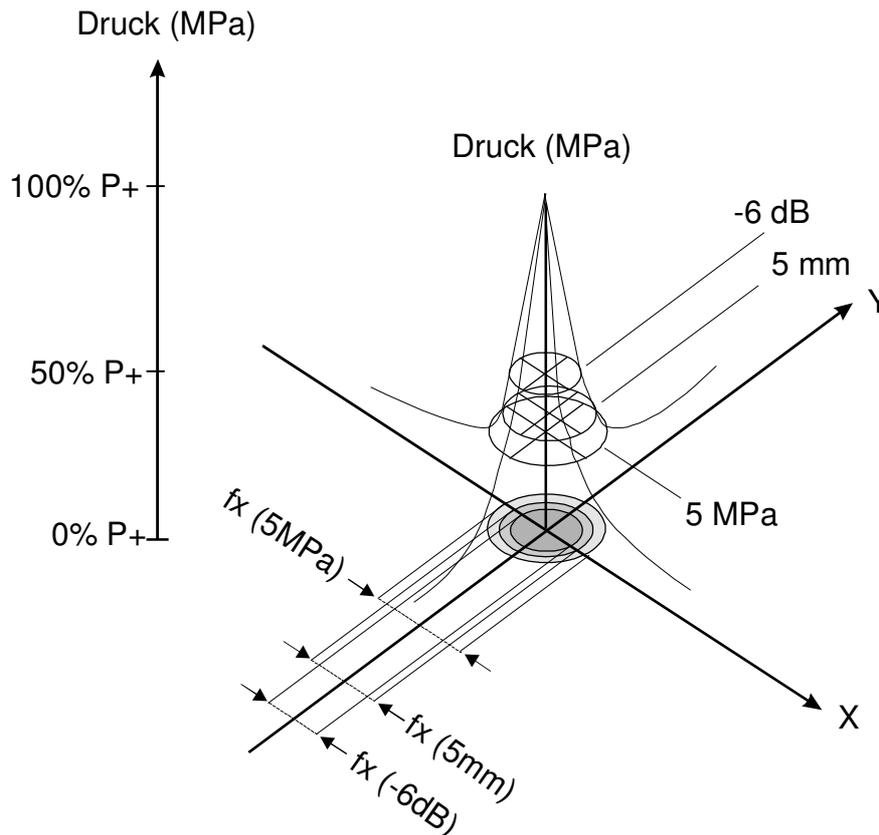


Abb. 9: Darstellung der räumlichen Ausbreitung (f_x , f_y) des -6 dB Fokus (dunkelgrauer Kreis), des 5 mm Fokus (mittelgrauer Kreis) und des 5 MPa Fokus (hellgrauer Kreis) bei niedrigen Energieflussdichten (aus Wess et al. 1997).

Im klinischen Alltag werden aufgrund unterschiedlicher Behandlungsindikationen extrakorporaler Stosswellen verschiedene Energieflussdichten gewählt. Die Einteilung in **niederenergetische** (EFD im Fokus bei weniger als $0,08 \text{ mJ/mm}^2$), **mittlere-energetische** (EFD im Fokus bei etwa $0,28 \text{ mJ/mm}^2$) und **hochenergetische** (EFD im Fokus bei mehr als $0,60 \text{ mJ/mm}^2$) Stosswellen wurde dabei willkürlich festgelegt (Rompe et al. 1997(b)).

3.3.4 Verfahren zur Druckmessung extrakorporaler Stosswellen

Es sind vier unterschiedliche Methoden bekannt, wie der Druck extrakorporaler Stosswellen erfasst werden kann.

- **Piezoelektrische Kristallhydrophone:** Diese Geräte stellen die ursprüngliche Form der Druckaufnehmer akustischer Felder dar. Die Sensoren, bestehend aus piezoelektrischen Kristallen unterschiedlicher Größe, erlauben jedoch keine reproduzierbaren Messungen in streng fokussierten Feldern. Der Grund dafür ist der Umstand, dass der Durchmesser des Druckaufnehmers größer ist als der des Stosswellenfokus. Dementsprechend entstehen Ungenauigkeiten, die auf Interferenzen und Reflexionen der eintreffenden Stosswellen mit dem Druckaufnehmer beruhen. Piezoelektrische Kristallhydrophone sind heutzutage lediglich zur Konstanzprüfung des Stosswellendruckes in Gebrauch.
- **Piezoelektrische Polymermembranen aus Polyvinylidinfluorid (PVDF):** Der Druckaufnehmer dieser Druckmessgeräte ist vergleichsweise klein und eignet sich somit für punktgenaue Messungen innerhalb eines akustischen Feldes (Schäfer 1993, Coleman et al. 1998). Der Einsatz von PVD-Polymermembranen ist durch die kurze Halbwertszeit und ihre vergleichsweise hohen Kosten begrenzt.
- **PVDF Metallnadeldruckaufnehmer:** Als Druckaufnehmer fungiert hier die Spitze einer scharfen Metallnadel, welche mit einer dünnen Schicht PVDF überzogen ist. Hinsichtlich der deutlich verlängerten Lebensdauer und der geringeren Kosten stellen diese im Vergleich zu den PVDF Polymermembranen eine Verbesserung dar und finden weit verbreiteten Einsatz (Müller 1990, Folberth et al. 1992, Delius et al. 1994). Einziger Nachteil besteht darin, dass der negative Druckanteil – bedingt durch eine komplexe Wechselwirkung zwischen Stosswelle und Metallnadel – nicht immer exakt gemessen werden kann. P. trägt allerdings nur 10% bis 20% zur gesamten Energieflussdichte bei (Ueberle 1997, Ueberle 1998).
- **Fiberoptische Hydrophone (Glasfaserhydrophone):** Bei diesem Verfahren kommt eine ganz andere akustische Messtechnologie zum Einsatz (Staudenraus und Eisenmenger 1993, Coleman et al. 1998). Glasfaserhydrophone bestehen aus einer Laserlichtquelle, die an eine Glasfaser gekoppelt ist. Die Spitze der Glasfaser wird in das akustische Feld eingebracht. Die auftreffende Stosswelle verändert die Dichte des umliegenden Mediums, was zu Änderungen der Intensität des reflektierten Laserlichts innerhalb der Glasfaser führt und mittels Fotodioden erfasst wird. Mit ihrer Messgenauigkeit und langen Lebensdauer repräsentieren die fiberoptischen Hydrophone den derzeitigen Stand der Messtechnik.

3.3.4 Ausbreitung extrakorporaler Stosswellen

Die Ausbreitung einer Stosswelle im Gewebe ist durch das so genannte Phänomen der „**Aufsteilung**“ gekennzeichnet. Diese beschreibt den typischen steilen und kurzen Anstieg bis zum Erreichen des Druckmaximums und ist einerseits die Folge einer asymmetrischen Dämpfung einzelner Anteile der Stosswellenfront. Andererseits ist sie bedingt durch unterschiedliche Schallleitungsgeschwindigkeiten innerhalb einer Stosswellenfront. Die Schallgeschwindigkeit entwickelt sich proportional zur Dichte des durchschallten Mediums und ist zusätzlich abhängig von dessen Temperatur. Frühere Anteile der Schalldruckfront verdichten und erwärmen das Gewebe. Das bedeutet in der Anwendung, dass die nachfolgenden Anteile beschleunigt laufen und die früheren Anteile der Stosswelle einholen. Diese unterschiedliche Dämpfung einzelner Stosswellenanteile, die zusätzlich von einer lokalen Phasengeschwindigkeit abhängt, führt zu einer zunehmenden asymmetrischen Verformung und weiteren Aufsteilung des Druckimpulses (Staudenraus 1995). Im akustischen Fokus bildet sich dann die typische Wellenkonfiguration mit steiler Anstiegsflanke und flacherer Druckabstiegsflanke der Stosswelle aus. Hinter dem Fokus setzt die so genannte **Defokussierung** ein, d.h. dass die einzelnen Druckpulsanteile unterschiedlicher Frequenz und Intensität wieder auseinander laufen.

Der Schallausbreitung gegenüber steht die akustische Schallkennimpedanz, kurz **Impedanz** genannt. Als Schallleitungswiderstand ist die Impedanz ein gewebetypischer physikalischer Parameter und entscheidend für die Wirkung der Stosswelle. Extrakorporale Stosswellen werden beim Durchqueren von Medien an deren Grenzschichten gebrochen und reflektiert. Biologische Gewebe sind durch eine spezifische Dichte (ρ) und die Schallleitungsgeschwindigkeit (v) gekennzeichnet. Ein Maß für das Brechungsverhalten an Grenzschichten beschreibt die akustische Impedanz (Z) eines Gewebes. Sie kann mit folgender Formel (II) berechnet werden (Park et al. 1991, Ogden et al. 2001):

$$Z = v \times \rho \quad (II)$$

Die Einheit der Impedanz ist in Newton pro Sekunde pro Kubikmeter [Ns/m^3] anzugeben. Trifft eine Schallwelle auf die Trennfläche zwischen zwei Ausbreitungsmedien, zum Beispiel Luft und Wasser oder Muskel und Knochen, so findet dort eine

Beeinflussung statt, die zu der Größe des Impedanzsprunges proportional ist. Beispiele für akustische Impedanzen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Medium	Schallgeschwindigkeit [m/s]	Impedanz [x 10 ³ Ns/m ³]
Luft	343	429
Fett	1450	1380
Wasser	1483	1480
Stahl	5790	45700
Muskel	1545-1630	1650-1740
Knochen	2700-4100	3200-7400

Tab. 1: Schalleitungsgeschwindigkeit und akustische Impedanz verschiedener Stoffe und Gewebe (nach Krause 1997)

Diese Reflexionen und die daraus resultierenden Energieverluste, die an Stellen mit einem großen akustischen Impedanzsprung erfolgen, können mittels folgender Formel (III) mathematisch erfasst werden (Park et al.1991, Ogden et al. 2001):

$$R = \frac{(Z_1 - Z_2)^2}{(Z_1 + Z_2)^2} \quad (\text{III})$$

R steht für den Anteil der reflektierten Energie. Z_1 charakterisiert die akustische Impedanz des ersten Gewebes. Z_2 stellt die Impedanz des zweiten durchlaufenen Gewebes dar. Somit wird ein Teil der Stosswellenenergie je nach Auftreffwinkel und Art des Impedanzsprunges im Sinne einer Transformation von akustischer zu mechanischer Energie umgewandelt (Granz und Kohler 1992, Loew et al. 1995) (Abb. 10). Angenommen eine Druckwelle läuft durch einen Muskel und trifft auf ein Medium höherer akustischer Impedanz wie beispielsweise einen Knochen, so wird der größte Teil akustischer Energie in den Knochen fortgeleitet. Dagegen geschieht beim Übertritt aus einem Gewebe hoher Impedanz (z.B. Knochen) in ein Medium niedrigerer Impedanz (z.B. Fett) das Gegenteil. Hierbei wird ein großer Teil der akustischen Energie in den Knochen reflektiert, erhält eine Phasenumkehr und kumuliert mit den nachfolgenden späten Anteilen der Stosswelle (Ueberle 1998). Aus diesem Grund lassen sich die meisten der stosswelleninduzierten Wirkungen auf der stoss-

wellenabgewandten Seite finden. Ein weiterer synergistischer Effekt stellt das Phänomen der Schallbeugung dar. Es bewirkt, dass Schallwellen, die an einem Medium höherer Impedanz vorbeilaufen, zu demselben Gewebe hin gebeugt und auf dessen Rückseite fokussiert werden (Staudenraus 1995).

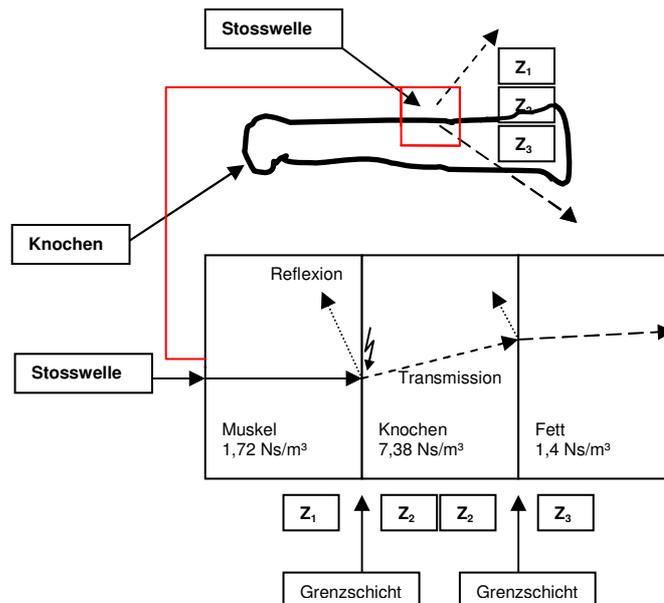


Abb. 10: Reflexion und Transmission von Stosswellen an Grenzschichten mit einer unterschiedlichen akustischer Impedanz (Z_1 , Z_2 und Z_3)

Des Weiteren kommt es beim Durchlaufen der Stosswellen durch ein Medium zum Verlust von Energie (I) durch Absorption. Die Größe der Absorption ist abhängig vom materialspezifischen Absorptionskoeffizienten (α) sowie der Dicke (D) der durchlaufenen Schicht (Park et al. 1991). Beispielsweise sind die Absorptionskoeffizienten der Knochen höher als diejenigen der Weichgewebe (Park et al. 1991), was die größere Energieabgabe beim Durchqueren von Knochen erklärt. I_0 beschreibt die ursprüngliche Energie bei einer angenommenen Dicke des Gewebes von $D = 0$. Folgende Formel (IV) gibt Aufschluss über den Energieverlust:

$$I = I_0 \times e^{-2\alpha D} \quad (\text{IV})$$

3.3.5 Biologische Wirkung extrakorporaler Stosswellen in Geweben

Die biologische Wirkung extrakorporaler Stosswellen beruht auf direkten und indirekten Mechanismen (Delacretaz et al. 1995, Delius 1995, Howard und Sturtevant 1997, Zhong et al. 1997). Abgesehen von den thermischen und chemischen Effekten, die hierbei eine eher untergeordnete Rolle spielen, wirken extrakorporale Stosswellen hauptsächlich **mechanisch**.

- **Direkte Mechanismen:** Die direkten Wirkungen extrakorporaler Stosswellen treten an den Grenzflächen von Medien verschiedener akustischer **Impedanz** auf (Krause 1997, Ogden 2001). Durch **Reflexion**, **Brechung** und **Beugung** kommt es zur Freisetzung kinetischer Energie an den Grenzschichten. Für die Applikation von extrakorporalen Stosswellen am Stütz- und Bewegungsapparat hat das eine zentrale Bedeutung, da zwischen Knochen und Weichteilgewebe ein erheblicher Impedanzunterschied besteht (Tab. 1).
- **Indirekte Mechanismen:** Ein wichtiger indirekter Wirkmechanismus ist die Induktion von **Kavitation**. Definiert wird die Kavitation als das Auftreten gasgefüllter Blasen in Flüssigkeit (Delius et al 1995, Delius et al. 1998, Bailey et al. 1999). Unter dem Einfluss negativer Druckgradienten werden die Kohäsionskräfte überwunden, und es entstehen Hohlblasen. Das Gas aus der umgebenden Flüssigkeit diffundiert in die so genannten Kavitationsblasen hinein. Diese dehnen sich im Verlauf der Stosswelle bis auf das Zehnfache ihrer ursprünglichen Größe aus. Am Ende dieses Zeitintervalls kommt es durch die Rückkehr des Druckes innerhalb der Stosswelle zum Umgebungsdruck zum **implosionsartigen Kollaps** der Kavitationsblasen. Zusätzlich zu den Druckpulsen entstehen kleinste Hochgeschwindigkeitsflüssigkeitsströme, sog. „**Jetstreams**“ mit Geschwindigkeiten bis zu 800 m/s (Zhong et al. 1997). Diese „**Mikro-Jets**“ entstehen speziell in der Nähe von Grenzflächen zu anderen Medien (Abb. 11). Sie haben durch ihre große Energie beim nächsten Impedanzsprung, zusätzlich zur Stosswelle selbst, eine lokal zerstörende Wirkung. Von deutlichem klinischem Interesse ist diesbezüglich die Frequenz der Stosswellenapplikation. Bei einer erhöhten Applikationsfrequenz fallen die Effekte deutlich stärker und entsprechend lokal destrukturierender aus (Huber et al. 1998, Greenstein und Matzkin 1999).

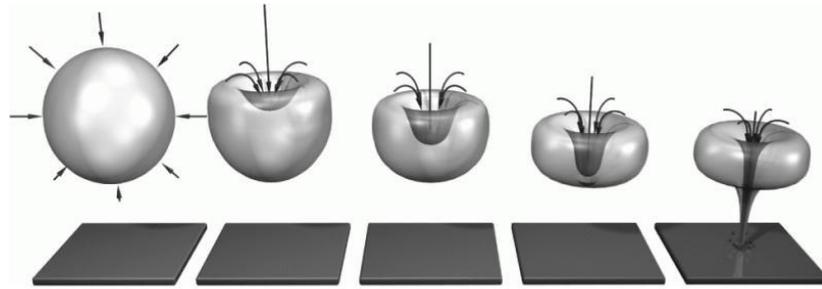


Abb. 11: Entstehung von „Mikro-Jets“:

Bei Kavitationsblasen in der Nähe von Hindernissen kann der Kollaps nicht kugelsymmetrisch erfolgen, da das Nachströmen der Flüssigkeit durch das Hindernis beeinträchtigt wird. Als Folge davon bilden sich „Mikro-Jets“ aus, die mit einigen Hundert Metern pro Sekunde auf die Grenzfläche stoßen und dort zu Erosionen führen (aus Wess 2004).

In der Kavitation findet sich ein weiterer biologisch wirksamer Mechanismus, mit welchem die Stosswelle gezielt in lokalisierten Bereichen, auch in tieferen Gewebeschichten, eingesetzt werden kann. Die physikalisch eingebrachte Energie kann über verschiedene Wirkmechanismen biologische Reaktionen hervorrufen, die zunächst zu einer verbesserten Durchblutung führen und danach den Beginn von Reparaturmechanismen einleiten (Wess 2004).

3.3.6 Stosswellenvermittelte Osteoneogenese

Im Rahmen der Forschung über unerwünschte Nebenwirkungen der extrakorporalen Stosswellen im urologischen Anwendungsbereich konnten neu entdeckte osteoneogenetische Effekte aufgezeigt werden (Graff et al. 1988, Brümmer et al. 1990). Diese Beobachtung war von bedeutend hoher klinischer Relevanz, insbesondere für das orthopädische Fachgebiet. Es zeigte sich bald, dass neben einer Knochenneubildung am intakten Knochen (Graff 1989, Maier 2001) auch eine stosswelleninduzierte Osteoneogenese im Pseudarthrose-, Knochendefekt- oder Frakturmodell nachweisbar war (Mc Cormack et al. 1996, Uslu et al. 1999, Wang et al. 2001(a), Wang et al. 2001(b)). Dieser Knochenneubildung folgte allerdings nicht in allen Arbeiten eine beschleunigte Ausheilung der pathologischen Situation (Haupt et al. 1992, Johannes et al. 1994, Wang et al. 2001(b)). Teilweise kam es auch zu einer verzögerten Knochenheilung (Forriol et al. 1994, Mc Cormack et al. 1996). Die diesbezüglichen Wirkmechanismen sind bislang noch ungeklärt. Es bestehen allerdings einige Vermutungen der unterschiedlichen Arbeitsgruppen hinsichtlich dieses Themas. Neben kleineren Hämatomen, intraossären Mikrofrakturen und subperiostalen Blutungen wurden ebenfalls lokale Dekortikationen (Ikeda et al. 1999) am Knochen nachgewiesen. Durch das Aufbrechen knöcherner Sklerosezonen soll ein direkter Stimulus für die Osteogenese gesetzt werden (Valchanou und Michailov 1991). Diese Theorie wurde jedoch von Maier (2001) erstmals widerlegt. Demzufolge sind die Mikrofrakturen nicht Voraussetzung für die Knochenneubildung. In seiner Habilitationsschrift schreibt Maier dem Substanz P eine potentielle Bedeutung im Sinne einer positiven Beeinflussung der Knochenneubildung zu. Einer anderen Theorie zufolge entstehen durch die Beschallung Mikrotraumata, welche die inflammatorische Phase verlängern (Wang et al. 2002). Dadurch soll es im Rahmen der Neovaskularisation zu einer gesteigerten Knochenkallusbildung kommen. Dieser desorganisierende Effekt wird als indirekt osteogenetische Wirkung bezeichnet (Uslu et al. 1999). In einer anderen Studie wurde explizit nach Veränderungen der Membranpotentiale verschiedener Zellen durch ESWT geforscht. Wang et al. (2001(c)) sprechen dem physikalischen Effekt der Hypo-/Hyperpolarisation, verursacht durch ESWT, eine entscheidende Bedeutung zu. Die Arbeitsgruppe um Wang geht davon aus, dass auf diesem Wege ein direkter Einfluss auf die Knochenneubildung ausgeübt wird.

4 Material und Methodik

4.1 Versuchsaufbau

4.1.1 Zeitlicher Ablauf

Insgesamt wurden 14 Tiere in den Versuch aufgenommen. Durch Werfen einer Münze wurde festgelegt, ob der Versuch an der rechten oder der linken Tibia durchgeführt werden sollte. Grundvoraussetzung für die Behandlung der Tiere war zunächst die standardisierte Erzeugung einer aseptisch-atropen Pseudarthrose. Dafür wurde ein Tiermodell für aseptisch-atrophe Pseudarthrosen verwendet, das in der Literatur reproduzierbar zur Pseudarthrose führte (Brownlow und Simpson 2000).

Acht Wochen postoperativ erfolgte entweder die Stosswellentherapie (ESWT) oder die Scheinbehandlung der Kaninchen. Die Einteilung in Behandlungsgruppe (A) oder Kontrollgruppe (B) entsprach dem bereits beschriebenen Randomisierungsverfahren. Weitere 28 Tage nach der ESWT wurde der Versuch beendet und die Tiere durch eine intravenös verabreichte Überdosis (50 mg/kg KG) an Barbiturat (Phenobarbital, Luminal Injektionslösung, Desitin Arzneimittel GmbH, Hamburg, Deutschland) getötet (Romeis 1989(a)). Direkt nach der Tötung erfolgte die Präparation der behandelten Tibiae aller Tiere. Hierzu wurde jede Tibia im Knie- und oberen Sprunggelenk exartikuliert. Weiterhin folgten die histopathologische Aufarbeitung sowie später die Analyse der Schnitte unter dem Mikroskop.

Eine Übersicht über den experimentellen Ablauf und die exakte Zeit- und Versuchsgruppeneinteilung findet sich in Abbildung 12 und Tabelle 2.

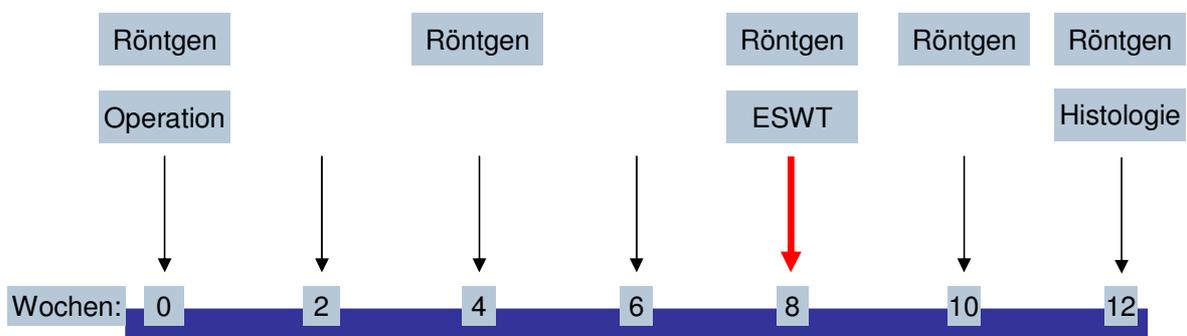


Abb. 12: Ablaufplan des Untersuchungsvorhabens

<p>Versuchstiere:</p> <p>New Zealand White Rabbits (n=14) in zwei Versuchsgruppen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gruppe A: Energieflussdichte: 0.5 mJ/mm² (n=6) • Gruppe B: Scheinbehandlung, EFD: 0,0 mJ/mm² (n=8) • Energiequelle: Dornier XL1, 1500 Impulse, 1Hz
<p>Operation:</p> <ul style="list-style-type: none"> • nach dem Tiermodell für atrophe Pseudarthrosen (Brownlow und Simpson 2000), Einbringen des MinifixEx, Osteotomie, Devastieren von Periost + Knochenmark (je 1cm), 4 mm Distanz
<p>Untersuchte Parameter:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Röntgenkontrolle nach 0/4/8/10/12 Wochen mit radiologischer Klassifikation nach 12 Wochen • Klinische Evaluation nach 12 Wochen • Histologie nach 12 Wochen
<p>Histologieparameter:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Paragonfärbung: Nachweis der Bindegewebsbildung • Mikroradiographie: Klassifikation der Knochenneubildung nach Art, Lokalisation und Menge • Flächenmessung des neu gebildeten Kallus
<p>Zielsetzung:</p> <p>Die fokussierte extrakorporale Stosswellentherapie (EFD: 0,5 mJ/mm²) führt beim pathologischen, im Sinne einer Pseudarthrose veränderten Knochen zu einer deutlich beschleunigten knöchernen Ausheilung.</p>

Tab. 2: Versuchsschema

4.1.2 Versuchstiere

Zur Untersuchung wurden ausgewachsene weibliche New Zealand White Rabbits, so genannte „Ex-Breeder“, mit einem Körpergewicht zwischen 3500 und 4500 g verwendet. Die Kaninchen wurden von der Firma Charles River (Standort: Kisslegg, Deutschland) bezogen. Für die Dauer der Versuche wurden die Tiere im Institut für chirurgische Forschung (ICF) der LMU bei einem zwölfstündigen Zyklus von Licht und Dunkelheit gehalten. Zu jeder Zeit der Untersuchungen konnten sich die Kaninchen in Bodenhaltung frei bewegen und es bestand zusätzlich die Möglichkeit zum Auslauf in einem Freigehege. Der Tierstall hatte eine relative Luftfeuchtigkeit von 50% und eine Temperatur von etwa 20° C. Die Kaninchen hatten uneingeschränkten Zugang zu Futter und Wasser. Die Nahrung bestand aus einer Kaninchen Standard Diät (Rabbit diet, Ssniff, Joest, Deutschland).

Alle Untersuchungen unterstanden der Genehmigung der Regierung von Oberbayern, München und es wurden sämtliche Tierschutzbestimmungen erfüllt.

4.1.3 Tiermodell zur Erzeugung einer aseptisch-atrophen Pseudarthrose

Zur Erzeugung einer aseptisch-atrophen Pseudarthrose wurde das Modell von Brownlow und Simpson (2000) verwendet. Zunächst wurde in einer Operation ein externer Minifixateur (EBI Medical Systems, Parsipanny, NJ, USA) mittels 3 x 2 Schanz'schen Schrauben (Kortikalis Minischraube, 40/15 mm L., 2,5 /2.0 mm Kegel, Trokar mit Spitze, EBI Medical Systems, Parsipanny, NJ, USA) in die Kaninchentibia eingebracht. Danach wurde eine Osteotomie im distalen Drittel der Tibia vorgenommen, die auf einen vier Millimeter breiten Abstand durch sofortige Distraction fixiert wurde. Alle Operationen erfolgten in Allgemeinnarkose und unter streng aseptischen Bedingungen.

Anästhesie

Die Anästhesie erfolgte zu Beginn durch intramuskuläre Injektion von Ketamin (Ketanest Injektionslösung, Pfizer Pharma, Karlsruhe, Deutschland) in einer Menge von 50 – 70 mg/kg KG i.m. und Xylazinhydrochlorid (Rompun Injektionslösung, Bayer, Leverkusen, Deutschland) zu 4,0 – 5,0 mg/kg KG i.m. in einer Mischspritze in den M. gluteus maximus des Tieres. Die Wirkungsdauer entsprach in etwa 30 Minuten (Romeis 1989(a)).

Nach Anlegen einer Venenverweilkanüle in die laterale Ohrvene, konnte die Narkose intravenös und perfusorgesteuert aufrechterhalten werden. Zusätzlich zur kontinuierlichen Infusion von Xylazinhydrochlorid (5,0 mg/kg KG pro Stunde) und Ketanest (25 mg/kg KG pro Stunde) erhielten die Tiere eine den Kreislauf stabilisierende NaCl-beziehungsweise Ringerlaktat-Infusion. Die Anästhesie der Kaninchen wurde stetig durch Sauerstoffinsufflation über eine Gesichtsmaske begleitet. Im direkten Anschluss an die Operation wurde die Narkose beendet.

Zur postoperativen Analgesie wurden Buprenorphin (Temgesic Injektionslösung, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland) in einer Dosierung von 0,01 – 0,05 mg/kg KG i.m. nach Bedarf und Diazepam (Diazepam-ratiopharm Zäpfchen, Ulm, Deutschland) in einer einmaligen postoperativen Gabe von 0,5 mg rektal) verwendet.

Operation

Nach Einleitung der Allgemeinnarkose wurde ein Hinterlauf des jeweiligen Tieres durch Randomisierung ausgewählt und rasiert. Anschließend erfolgte die Fixierung der unteren Extremitäten auf dem Operationstisch mit Hilfe einer Mullbinde. Es wurde eine weiträumige Desinfektion mit Octenisept/Braunol im Bereich des Operationsfeldes durchgeführt und steril abgedeckt. Die Abbildungen 13 bis 16 demonstrieren die einzelnen Operationsschritte, die zur Erzeugung der Pseudarthrose durchgeführt wurden.

Mittels Stichinzision der Haut und Präparation des darunter liegenden Gewebes bis zum Knochen, wurden 3 x 2 Schanz'sche Schrauben mit zwei Millimeter Durchmesser in die ventromediale Tibiadiaphyse eingebracht. Anhaltspunkte zur Orientierung waren das obere Sprunggelenk und die Tuberositas tibiae, die, dank der fehlenden Fettschicht, sehr gut zu tasten waren. Die mechanischen Gegebenheiten waren standardisiert und wurden konstant gehalten. Um eine achsengerechte Bohrung gewährleisten zu können, wurde der Fixateur selbst als Schiene genutzt (Abb. 13).

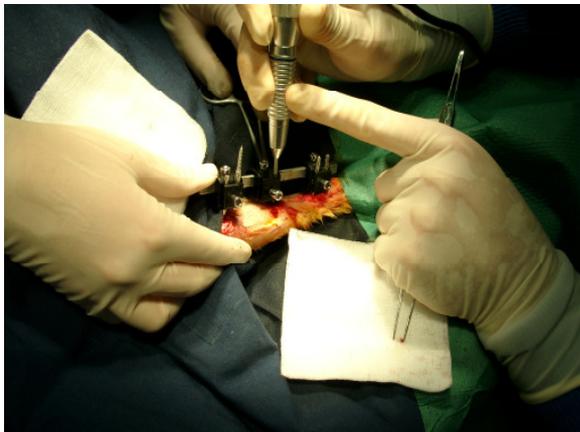


Abb. 13: Einbringen der Schanz-Schrauben



Abb. 14: Durchführung der Querosteotomie der Tibia mittels oszillierender Säge

Die Abstände zwischen den einzelnen Fixateurbacken wurden zu Beginn der Operation auf die festgelegten Werte eingestellt und waren in jedem Fall gleich (15 mm zwischen der proximalen und mittleren Backe und 30 mm zwischen mittlerer und distaler Backe). Die Osteotomie wurde ebenfalls standardmäßig am selben Punkt in Relation zum Fixateur positioniert (10 mm distal der mittleren Backe). Der seitliche „Knochen-zu-Fixateur“-Abstand lag im Mittel bei 15 mm.

Anschließend wurde ein größeres Hautstück im distalen Drittel der Tibia inzidiert und durch Präparation freigelegt. Nach der Querosteotomie der Tibia mittels oszillierender Säge (Abb. 14), wurde das Periost abgetragen, sowie der Markraum ausgeschabt – jeweils auf ein Zentimeter Länge (Abb. 15) – und mit Kochsalz gründlich gespült. Um nicht zuviel Spannung auf die umliegenden Weichteile auszuüben und somit keinen zusätzlichen Reparationsprozess zu stimulieren, wurde zuvor noch ein drei Millimeter dickes Stück der Tibia entfernt. Durch Anlage eines externen Miniaturfixateurs wurde der Osteotomiespalt auf vier Millimeter eingestellt (Abb. 16) und die Hautinzisionen mit nicht resorbierbarer Hautnaht verschlossen.



Abb. 15: Devastieren von dem verbliebenen Periost und Knochenmark (je 1 cm)

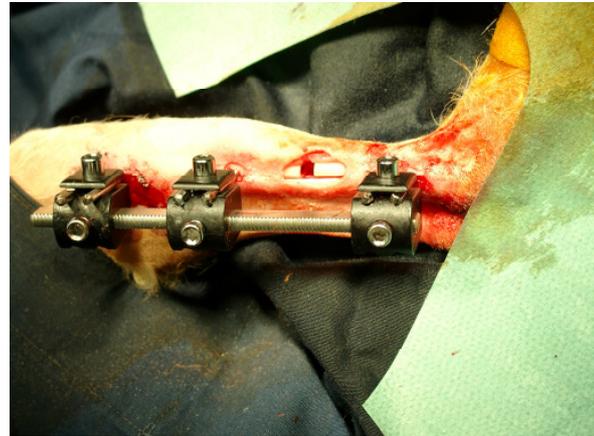


Abb.16: Postoperatives Bild des eingebrachten Mini-Fixateurs mit Einstellung der 4 mm großen Knochenlücke

Für die ersten postoperativen Tage wurden die Kaninchen mit einem trockenen Verband versorgt, der regelmäßig gewechselt wurde. Begleitend erfolgte eine antiseptische Wundversorgung mit Mercuchrom. Zur perioperativen Antibiotikaprophylaxe wurden den Tieren intraoperativ 15 mg/kg KG Cefuroxim i.v. (Zinacef 1,5 g Trockensubstanz für i.v.-Injektionen, GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG, Brentfort, Middlesex, UK) verabreicht. Postoperativ wurde die Antibiotikagabe in doppelter Dosierung (2 x 15 mg/kg KG Cefuroxim) für die folgenden drei Tage fortgeführt.

Postoperativ erfolgten mehrmals täglich Kontrollen mit Schmerztherapie nach Bedarf. Eine spezielle Dokumentation, das soziale Verhalten innerhalb der Kaninchengruppe sowie die Belastung des operierten Beines betreffend, wurden durchgeführt.

4.1.4 Stosswellenapplikation

Die Kaninchen standen unter kontinuierlicher tierärztlicher und tierpflegerischer Betreuung, so dass etwaige Infektionen oder andere Komplikationen sofort behandelt werden konnten.

Nach acht Wochen sollte sich nach dem etablierten Modell von Brownlow und Simpson (2000) eine atrophe Pseudarthrose in den Kaninchentibiae entwickelt haben. Dies konnte anhand von Röntgenaufnahmen in zwei Ebenen bestätigt werden. Es erfolgte nun die Applikation extrakorporaler Stosswellen zur Pseudarthrosetherapie.

Anästhesie

Die Stosswellen-Behandlung der Tiere erfolgte ebenfalls unter intravenöser Narkose. Nachdem die Kaninchen durch intramuskuläre Injektion eines Narkosegemisches von Ketamin (50 – 70 mg/kg KG i.m.) und Xylazinhydrochlorid (4,0 – 5,0 mg/kg KG i.m.) mittels Kanüle in den Glutealmuskel anästhesiert worden waren, wurde ihnen zur weiteren Steuerung der Narkose eine Venenverweilkanüle in die laterale Ohrvene eingebracht und fixiert (Romeis 1989(a)). Danach konnte auf eine intravenöse und perfusorgesteuerte Betäubung (Xylazinhydrochlorid 5,0 mg/kg KG pro Stunde, Ketamin 25 mg/kg KG pro Stunde) umgestellt werden. Das Ziel der Narkose waren sowohl die Immobilisierung als auch die Analgesie der Kaninchen, da die Behandlung mit der Stoßwelle bei der verwendeten Energieflussdichte bereits schmerzhaft ist.

Stosswellenquelle

Die Erzeugung der extrakorporalen Stosswellen erfolgte mittels der experimentellen, elektrohydraulischen Stosswellenquelle XL1 (Dornier Medizintechnik, Wessling, Deutschland). Bestandteile dieses Gerätes sind ein Wasserbad (Außenmaterial: Plexiglas), ein Heizstab, eine Halterung, ein Stosswellengenerator, ein Ellipsoidreflektor und ein Laserzielsystem. Die Ankopplung der Stosswellen erfolgte über nicht-ionisiertes Wasser. Durch das Plexiglas hindurch war eine konstante Beobachtung und Kontrolle des eingestellten Zielpunktes gegeben. Die Fokussierung der extrakorporalen Stosswellen wurde mittels zweier Laserpointer durchgeführt. Diese zwei rechtwinklig zueinander angeordneten Laserstrahlen konnten über adjustierbare

Spiegel gesteuert werden. Auf diese Weise wurde der zweite Brennpunkt der fokussierten Stosswellen (f_2 in Abb. 5: A) in der Zielregion markiert. Vor Beginn der Stosswellenapplikation wurde mit einem Laserhydrophon die Energieflussdichte (EFD) im Fokusgebiet gemessen und am Stosswellengenerator ein Wert von $0,5 \text{ mJ/mm}^2$ eingestellt.

Extrakorporale Stosswellenapplikation

Nach der initialen Narkoseinduktion wurde jeweils der zu behandelnde Hinterlauf der Versuchstiere im Bereich der Pseudarthrose rasiert. Die Kaninchen wurden im Wasserbad auf einem Holzbrett so positioniert, dass eine exakte Fokussierung auf die Zielregion möglich war. Dabei ragte das zu beschallende Bein des Tieres durch ein Loch in der Holzplatte in das Wasser hinein und wurde, gepolstert in einem Styroporring, fest fixiert (Abb. 17 und 18).



Abb. 17: Kaninchen unter Narkose, positioniert für die Stosswellenapplikation

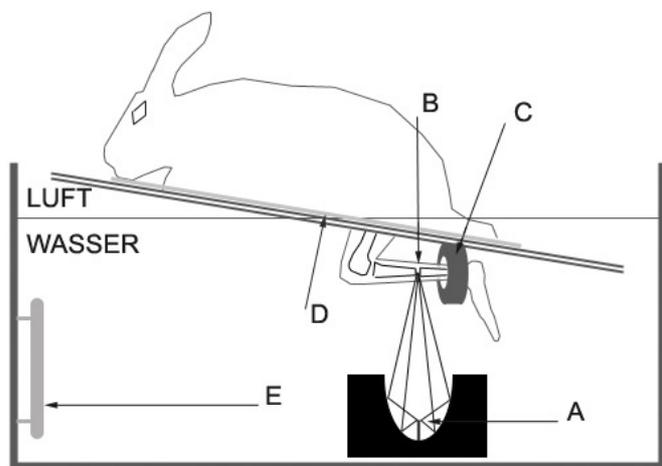


Abb. 18: Schemazeichnung zur Positionierung des Tieres in der Stosswellenquelle XL1; A Elektrode im Zentrum des Stosswellengenerators; B Pseudarthrose; C Styroporpolsterung; D Holzplatte; E Heizstab

Mit Hilfe eines Laserzielsystems konnten die Behandlungspunkte genau dargestellt werden (Abb. 19). Es wurden zwei unterschiedliche Zielpunkte gewählt, von medial jeweils proximal und distal des Osteotomiebereiches. Entsprechend umfasste die Behandlung der Tiere mit den extrakorporalen Stosswellen die Applikation von je zweimal 750 Impulsen (jeweils proximal und distal; insgesamt entspricht das 1500 Impulsen) bei einer Frequenz von einem Hertz. Die Ankoppelung der Stosswellen erfolgte in einem Wasserbad bei der gewählten Energiedichte von $0,5 \text{ mJ/mm}^2$ und einer Energie von 15 kV. Der -6 dB-Fokusedurchmesser betrug fünf Millimeter. Die Dauer der ESWT betrug in etwa 15 – 20 Minuten. Die Wassertemperatur wurde konstant zwischen $+34^\circ \text{ C}$ und $+36^\circ \text{ C}$ gehalten. Das gesamte Vorgehen an der experimentellen Stosswellenquelle XL1 entsprach dem bereits in der Literatur etablierten Procedere von Delius et al. (1995).

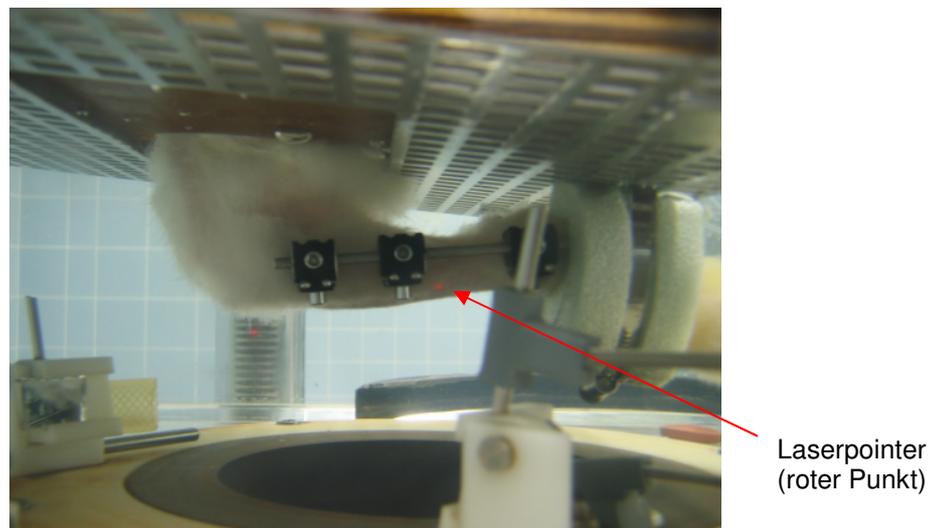


Abb. 19: Exakte proximale Fokussierung der ESWT mit Hilfe zweier sich treffender, orthogruader Laserpointer

4.2 Messparameter

4.2.1 Klinische Evaluation

Nach der Exartikulation der Kaninchentibia aus dem Knie- und oberen Sprunggelenk wurde der Fixateur externe entfernt und die Festigkeit der Bruchspaltüberbrückung klinisch überprüft. Der Knochen wurde hierzu horizontal gehalten und dessen Neigung unter dem Einfluss der Schwerkraft beurteilt (Abb. 20). Knickte der distale An-

teil der Tibia ohne zusätzlichen Druck ab, so wurde das als „instabile“ Pseudarthrose bezeichnet. Kam es zum Abknicken der distalen Tibia nur durch den Einsatz von leichtem Fingerdruck, galt dies als „straffe“ Pseudarthrose. Ließ sich der distale Tibiaknochen nicht bewegen, so war der Knochenspalt überbrückt und es konnte keine Pseudarthrose gefunden werden (Brownlow und Simpson 2000).

Ätiologie der klinischen Evaluation:

Klasse 1: instabile Pseudarthrose

Klasse 2: straffe Pseudarthrose

Klasse 3: keine Pseudarthrose

Alle Knochenpräparate wurden geblindet ausgewertet. Die Gruppenzugehörigkeit der Kaninchen war zum Zeitpunkt der Auswertung nicht bekannt. Dasselbe galt für die Auswertung der radiologischen Aufnahmen.

4.2.2 Radiologische Untersuchung

Unmittelbar postoperativ und nach weiteren vier, acht, zehn und zwölf Wochen wurden Kontroll-Röntgenbilder (Abb. 21 – 23) in zwei Ebenen angefertigt (anterior-posterior/ap und lateral). Alle radiologischen Aufnahmen wurden von zwei geblindeten und voneinander unabhängigen Untersuchern beurteilt. Bezug nehmend auf die Ausführungen von Brighton et al. (1981) mussten für die Bewertung einer „Pseudarthrose“ folgende Kriterien erfüllt werden:

- Knochenspaltüberbrückung nicht vorhanden (= fehlende Kontinuität des Knochens)
- keine reparativen Vorgänge nachweisbar (= fehlende Kallusbildung)

Radiologische Klassifikation:

Klasse 1: keine Durchbauung des Pseudarthrosespalt

Klasse 2: partielle Durchbauung des Pseudarthrosespalt

Klasse 3: komplette Durchbauung des Pseudarthrosespalt

4.2.3 Histopathologische Untersuchungen

4.2.3.1 Aufbereitung der Präparate

Nach Entnahme der Proben mussten diese zunächst fixiert werden, um beginnende Autolyseprozesse zu stoppen und das Gewebe in seinem originalen Zustand zu konservieren. Anschließend erfolgte die Einbettung in Kunstharz (Methylmethacrylat (MMA), Merck, Darmstadt, Deutschland), um die Proben histologisch weiter verarbeiten zu können. Der Einbettvorgang war zeitlich je nach Größe der Knochenpräparate sehr variabel und konnte bis zu mehreren Wochen dauern.

Die aus dem Knie- und oberen Sprunggelenk exartikulierten Kaninchenknochen wurden sorgsam von der Muskelmasse gelöst. Anschließend wurden die Präparate für 28 Tage in Methanol (100%) fixiert und hierfür bei +4° C im Kühlschrank gelagert. Im nächsten Schritt wurden die Knochenpräparate bei Raumtemperatur für vier Tage in 70%igen Ethanol eingebracht, dann erfolgte ein Wechsel in 90%iges Ethanol. Vier Tage später wurde das Ethanol durch Methanol (100%) ersetzt. Nach einem Austausch des Ethanols wurden die Präparate in 100%iges Methylmethacrylat eingelegt. Alle Phasen der Fixierung und Polymerisierung der Knochenpräparate erfolgten in luftdicht verschlossenen Schraubglasbehältern. Die Schritte in MMA wurden für mindestens 30 Minuten im Vakuum durchgeführt, um eine gute Durchdringung der Präparate mit dem Methylmethacrylat zu erreichen. Dort verblieben sie drei bis vier Tage; es folgte ein Austausch der Reagenzien in frisches MMA und als abschließender Schritt wurde die Einbettung in das polymerisationsfähige MMA-Einbettgemisch durchgeführt. Dieses Gemisch wurde, nach der Vakuumbehandlung, bei +4° C im Kühlschrank gelagert, um einer vorzeitigen Polymerisation entgegenzuwirken. Wärmere Temperaturen lassen es nicht zu, dass sich das Gas aus dem Einbettgemisch verflüchtigt und es könnten in der Folge störende Gasblasen im MMA-Block akkumulieren (Malluche und Faugere 1986). Die Basis des MMA-Einbettgemisches bestanden aus 100 ml Methylmethacrylat (Merck 8.00590.2500) als Grundkunststoff. Als Weichmacher wurden 18 ml Nonylphenyl-polyethyleneglycol acetate (Fluka 74432, Buchs, Schweiz) und als Katalysator 3 g Benzoylperoxid (Merck 8.01641.0250) verwendet (Romeis 1989(b)). Nach vier Tagen wurde das Einbettgemisch ein letztes Mal gewechselt und die Knochenpräparate konnten im Wasserbad bei einer konstant

geregelten Umgebungstemperatur von +28° C polymerisieren. Die vollständige Polymerisation und Aushärtung erfolgte bei +37° C im Brutschrank und konnte je nach Größe und Dicke des Präparates mehrere Wochen dauern. Insgesamt dauerte der Einbettvorgang in etwa zwei Monate und erforderte eine individuelle Kontrolle. Zur genauen Darstellung der Einbettprotokolle siehe Anhang (Seite XXV).

Nach der Aushärtung wurden die Präparate 24 Stunden in den +60° C Wärmeschrank und dann in den Kühlschrank gestellt. Vorsichtig wurde das Glas zerschlagen. Die übrigen Glassplitter wurden unter fließendem Leitungswasser von dem ausgehärteten Methylmethacrylat-Block abgespült.

4.2.3.2 Schneiden der Präparate

Mit einer Diamant-Bandsäge (Exakt, Norderstedt, Deutschland) wurden die Knochenblöcke (Abb. 20) zurechtgetrimmt und in die Innenlochsäge (Sägemikrotom Leica SP 1600, Nussloch, Deutschland) (Abb. 21) eingepasst. Die MMA-Blöcke wurden auf Präparatehalter geklebt und es wurden jeweils 15 – 25 Schnitte mit einer Dicke von 100 Mikrometer [μm] hergestellt. Bedingt durch die Sägeblattdicke des benutzten Schlittenmikrotoms lag der Substanzverlust zwischen zwei Schnitten bei 300 μm . Zur besseren Orientierung bei der Auswertung waren die Präparate vor Beginn des Einbettvorganges markiert worden. Zu diesem Zweck war der Bohrkanal der distalen Schanz'schen Schraube am distalen Knochenanteil belassen worden.



Abb. 20: Drei zugetrimmte MMA-Blöcke

Die Schnittrichtung verlief parallel zur Längsrichtung des Knochens; die Schnittebene lag in der Sagittalebene. Die Schnitfführung wurde so gewählt, dass die Knochen in 90° zum markierenden Bohrloch von ventral nach dorsal geschnitten wurden. Die so entstandenen Längsschnitte wurden vorsichtig abgetupft und zwischen zwei Glasplatten für einige Zeit glatt gepresst.



Abb. 21: Innenlochsäge (Leitz SP 1600, Bensheim, Deutschland) mit Kaltwasserdüse, Diamantsägeblatt und Justiervorrichtung als Stellschraube für die Schnittdicke

4.2.3.3 Paragon-Färbung

Um Zell- und Gewebestrukturen scharf hervorzuheben, wurden die Dünnschliffe nach der Paragon-Methode angefärbt. Die geringe Schrumpfung und die überaus gute Anfärbbarkeit waren dadurch bedingt, dass die Schnitte zuvor nicht entkalkt worden waren. Für die histologische Auswertung wurde jeweils der zentralste Schnitt für die Paragon-Färbung ausgewählt. Die Präparate wurden zu Beginn in 0,1%iger Ameisensäure kurz angeätzt, mit destilliertem Wasser ab gespült und danach für 60 – 90 Minuten in 40%iges Methanol gelegt. Anschließend wurden die Schnitte kurz in destilliertes Wasser getaucht und daraufhin für vier Minuten im Brutschrank (bei 60° C) in die bereits vorgewärmte Farbstofflösung eingebracht. Nach dem Färbevorgang wurden die Schnitte wieder mit destilliertem Wasser ab gespült und das Farbergebn mikroskopisch kontrolliert. Bei Bedarf wurde die Färbung wiederholt. Die Knochen-

präparate wurden in zwei Fraktionen Xylol (100%) getaucht, vorsichtig mit Filterpapier trocken getupft und für etwa zwei Wochen glatt gepresst. Darauf folgend konnten die fertigen Paragon-Schnitte mit Eukitt (O. Kindler GmbH & Co, Freiburg, Deutschland) auf den entsprechenden Objektträgern (Elka 50, No. 2406/1, 76 x 26 mm, mit Mattstreifen) eingedeckelt werden (Romeis 1989(c)). Das genaue Färbeprotokoll findet sich im Anhang (Seite XXVI).

Die Paragon-Färbung führt bei pH = 6 – 7 zu folgendem Ergebnis:

Zellkerne, basophiles Zytoplasma	blau
Osteoidsäume, Weichgewebe	blauviolett
Mineralisierte Matrix	zartrosa bis rot-violett

Für die Auswertung der Paragon-Schnitte wurde das Lichtmikroskop Axiophot (Zeiss, Jena, Deutschland) mit den verschiedenen Vergrößerungsaufsätzen (Plan Neofluar 2,5 x, 10 x, 20 x und 40 x) verwendet. Kriterium der Auswertung war die Ausbildung beziehungsweise das Fehlen von Bindegewebe im Bruchspalt.

Klassifikation der Bindegewebsbildung

Klasse 1: Bindegewebe zu weniger als 33% im Bruchspalt

Klasse 2: Bindegewebe zu mehr als 33% und zu weniger als 66% im Bruchspalt

Klasse 3: Bindegewebe zu mehr als 66% im Bruchspalt

Schon im Vorfeld zeigte sich, dass die untersuchte Bindegewebsbildung je nach Lage des Schnittes innerhalb der Tibia stark variieren konnte. So ergaben zentraler gelegene Schnitte schon augenscheinlich andere Klassifizierungen als Schnitte im Randbereich der Tibia des gleichen Tieres. Deswegen wurde als Standard der zentralste Schnitt für die Paragon-Färbung gewählt, um zu gewährleisten, dass sich die vorgestellten Ergebnisse unverfälscht auf dieselbe Knochenregion beziehen.

Alle geschnittenen und gefärbten Knochenpräparate wurden geblindet von zwei unabhängigen Untersuchern ausgewertet. Die Gruppenzugehörigkeit der zugehörigen Kaninchen war zum Zeitpunkt der Auswertung nicht bekannt.

4.2.3.4 Mikroradiografien

Von den Dünnschliffpräparaten wurden ebenfalls Mikroradiografien hergestellt. Bei einer solchen Röntgenkontaktaufnahme entsteht ein Negativbild mit Weiß-Schwarz-Kontrast der mineralisierten Anteile. Dafür wurden die 100 µm dicken Knochenschnitte auf hochauflösenden Photoplatten (AGFA 595204, FL5 HD 5 x 4 cm) positioniert und in einem Feinfokusgerät (Faxitron, Cabinet X-Ray-System, Faxitron Series, Hewlett Packard, USA) belichtet (Romeis 1989(d), Maier et al. 2001). Die Expositionszeit der Belichtung betrug 100 Minuten bei einer Geräteleistung von 21 kV und 2 mA.

Unter Decken-Rotlicht wurden die Entwickler- und Fixierlösungen speziell angesetzt. Die Entwicklerflüssigkeit bestand aus Agfa G 282c Entwickler und Leitungswasser im Verhältnis 1:4 (50 ml Agfa Entwickler + 200 ml H₂O). Es wurde jeweils nur eine Platte mit der beschichteten Seite nach oben (wegen der Kratzempfindlichkeit der dünnen Fotoschicht) in das Entwicklerbad gelegt. Der Entwicklungsvorgang dauerte 15 – 20 Minuten und fand bei einer Temperatur von 20° C und unter ständiger Bewegung der Platten statt. Nach einem kurzen Stoppbad in Leitungswasser erfolgte die 10 – 15 Minuten andauernde Fixierung der Fotoplatten. Die Fixierflüssigkeit beinhaltete 50 ml AGFA G 333c Fixierkonzentrat und 200 ml H₂O (1:4). Nach abgeschlossener Fixierung wurden die Platten 20 – 30 Minuten fließend gewässert und abschließend mit destilliertem Wasser abgewaschen. Nach dem Trocknen der Glasplatten im Wärmeschrank konnten sie mit einem Glasschreiber beschriftet werden. Das Protokoll zur Entwicklung der Mikroradiographien ist im Anhang aufgeführt (Seite XXVII).

Zur qualitativen Beurteilung der histologischen Dünnschnittpräparate wurden jeweils drei repräsentative Mikroradiografien jedes einzelnen Tieres im Lichtmikroskop deskriptiv beurteilt. Für die spezielle Analyse wurde das Fotomikroskop Zeiss Axio-phot (Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet und es wurden unter den verschiedenen Vergrößerungsaufsätzen (Plan Neofluar 2,5 x, 10 x, 20 x und 40 x) die folgenden Variablen untersucht.

Kriterium der Auswertung war das Fehlen oder Vorhandensein einer knöchernen Neubildung innerhalb des ursprünglichen Pseudarthrosespalt. Bei entsprechender Kallusbildung interessierte speziell der Reaktionstyp, das heißt ob die Konsolidierung gering, unvollständig oder sehr deutlich erfolgt war. In Bezug auf das mittlere relative

Ausmaß der Knochenneubildung lag ein besonderes Augenmerk auf der Lokalisation (periostal oder endostal) der neu gebildeten Knochenbälkchen. Zudem wurde die Bruchspaltdurchbauung auf ihre Vollständigkeit untersucht. In einer quantitativen Untersuchung wurde die Fläche des Kallus in Quadratmillimeter exakt ausgemessen. Die jeweiligen Einzelauswertungen finden sich in einer Gesamttabelle (Tab. 4) im Anhang (Seite XXVIII – XXXIV).

Reaktionstyp der Kallusbildung

Klasse 1: keine Kallusbildung entlang der Kortikalisoberfläche

Klasse 2: geringe + unvollständige Kallusbildung entlang der Kortikalisoberfläche

Klasse 3: deutliche + vollständige Kallusbildung entlang der Kortikalisoberfläche

Mittleres relatives Ausmaß der Knochenneubildung

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

Klasse 2: Knochenneubildung an mehr als 33%, jedoch weniger als 66% der periostalen bzw. endostalen Kortikalisoberfläche nachweisbar

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

Bruchspaltdurchbauung

Klasse 1: keine Durchbauung

Klasse 2: deutliche, jedoch nicht vollständige Durchbauung

Klasse 3: vollständige Durchbauung

Die Vorgehensweise der bildanalytischen Auswertung erfolgte analog zu der Vorgehensweise von Maier (2001) und Maier et al. (2004).

Quantitative Erfassung der Knochenneubildung

Des Weiteren wurde die gesamte Fläche der knöchernen Neubildung zwischen den Fragmentenden in Quadratmillimeter [mm²] an drei repräsentativen Schnitten gemessen. Hierfür wurde die Lupe Wild Makroskop M 420 (Leica, Wetzlar, Deutschland) an eine geeignete Videokamera (MC-3255, Sony) angeschlossen. Diese Kamera konnte über einen Computeranschluss an ein spezielles Bildanalyseprogramm (Zeiss KS 400 3.0) gekoppelt und zugleich entsprechend kalibriert werden. Mit Hilfe dieses Programms war es möglich das jeweilige Objekt in seiner gesamten Länge auf den Computerbildschirm zu übertragen und in einer entsprechenden Vergrößerung die Fläche des neu gebildeten Knochens quantitativ zu erfassen. Dies erfolgte durch eine manuelle Markierung bei einer digitalen Lupeneinstellung von 5,8 x und unter Verwendung eines zusätzlichen 0,5-Objektivs. Der Computer errechnete über der gekennzeichneten Fläche das maximale Knochenneubildungsvolumen jedes einzelnen Schnittes. Entscheidend war dabei die Fläche, die sich exakt im Bereich des ehemaligen Pseudarthrosespaltens befand.

In der tabellarischen Auswertung (Tab. 4) im Anhang (Seite XXVIII – XXXIV) lassen sich die einzelnen Werte ablesen, sowie das arithmetische Mittel als repräsentativer Wert für jedes einzelne Präparat.

Zu Beginn der bildanalytischen Auswertung der Schnitte zeigte sich, dass die Ergebnisse von der jeweiligen Lage des Schnittes zur Tibia abhingen. So konnte sich auf den peripheren Schnitten im Vergleich zu den zentralen Schnitten – bedingt durch die Anschnittsgeometrie – mehr Kortikalis als Spongiosa nachweisen lassen. Ebenso konnte in der Peripherie ein größeres Ausmaß an Knochenneubildung gefunden werden als in der zentralen Zone. Um einen systematischen Fehler zu vermeiden und ein repräsentatives und vergleichbares Resultat präsentieren zu können, wurde nicht nur ein Schnitt pro Tier gemessen, sondern eine Auswahl von insgesamt drei Schnitten getroffen. Für die Mikroradiographien wurden somit jeweils ein zentraler und zwei periphere Schnitte pro Präparat ausgewählt.

4.3 Statistische Verfahren

Die klinisch evaluierten, radiologischen, histomorphologischen und histomorphometrischen Daten wurden zunächst in Excel-Tabellen eingetragen. Die statistische Auswertung dieser Daten und alle in diesem Zusammenhang durchgeführten Berechnungen erfolgten mit dem Statistikprogramm PRISM, Version 3.02 (GraphPad Software Inc., San Diego California, USA, www.graphpad.com) auf einem Windows XP Betriebssystem.

Für jede Kombination aus der zu testenden Gruppe und der untersuchten Variable wurden zunächst Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes der erhobenen Daten berechnet. Zur Überprüfung der Signifikanz der Testergebnisse kam größtenteils der Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben, die nicht normalverteilt sind, zum Einsatz. Dieser nicht-parametrische Test wird bei Ordinal- bzw. Rangdaten – wie sie hier vorliegen – angewandt. Alle statistischen Tests wurden zweiseitig angegangen (bis auf eine Ausnahme, welche im nachstehenden Text erläutert wird). In zwei Einzelfällen wurde aus folgenden Gründen der T-Test verwendet. Zum einen im speziellen Fall der Flächenmessung im Bereich des Osteotomiespaltes, da es sich hier um Intervalldaten handelte. Zum anderen nahmen sämtliche Daten innerhalb einer Stichprobengruppe (mittleres relatives Ausmaß der periostalen Knochenneubildung) denselben Nominalwert an; somit stand schon vor Durchführung des Tests fest, dass die Mittelwerte nur auf einer Seite liegen können. Infolgedessen wurde der einseitige T-Test angewandt. Wahrscheinlichkeiten mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant und mit $p \leq 0,01$ als statistisch hoch signifikant festgelegt. Da das Konfidenzintervall bei 95% determiniert wurde, ist die Auswertung mit der überwiegenden Anzahl medizinischer Studien vergleichbar.

Die Darstellung der Daten erfolgte in Form von Säulendiagrammen, die mit der PRISM Software erstellt wurden.

5 Ergebnisse

5.1 Klinische Evaluation

Die Auswertung der klinischen Evaluation erfolgte nach der folgenden Einteilung.

Ätiologie der klinischen Evaluation:

Klasse 1: instabile Pseudarthrose

Klasse 2: straffe Pseudarthrose

Klasse 3: keine Pseudarthrose

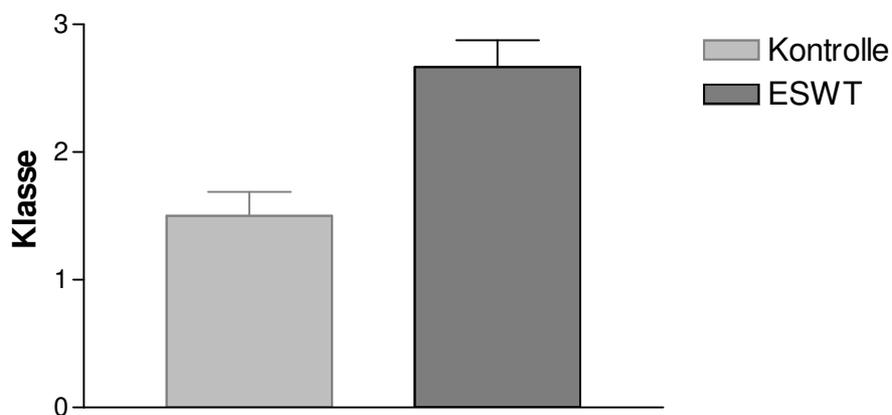


Abb. 22: Berechnete Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte beider Tiergruppen für die Variable „Klinische Evaluation“

Es ergaben sich in der Auswertung der klinischen Einteilung folgende Befunde: Die ESWT-Gruppe war zu 66,6% (vier Tiere) in Klasse 3 und zu 33,3% (zwei Tiere) in Klasse 2 einzustufen. Hingegen fanden sich jeweils 50% (je vier Tiere) der Kontrollgruppe in Klasse 1 und Klasse 2 (Abb. 38 – Anhang Seite XXXV).

In der Darstellung der berechneten Mittelwerte und deren Standardabweichungen (Abb.22) zeigte sich ein deutlicher Unterschied der beiden Gruppen. Entsprechend ergab sich im Mann-Whitney-Test für unabhängige Variablen ein statistisch hoch signifikantes Ergebnis ($p = 0,008$) im Vergleich der behandelten und der unbehandelten Gruppe.

Die nachstehende Abbildung (Abb. 23) zeigt einen Knochen der Kontrollgruppe.

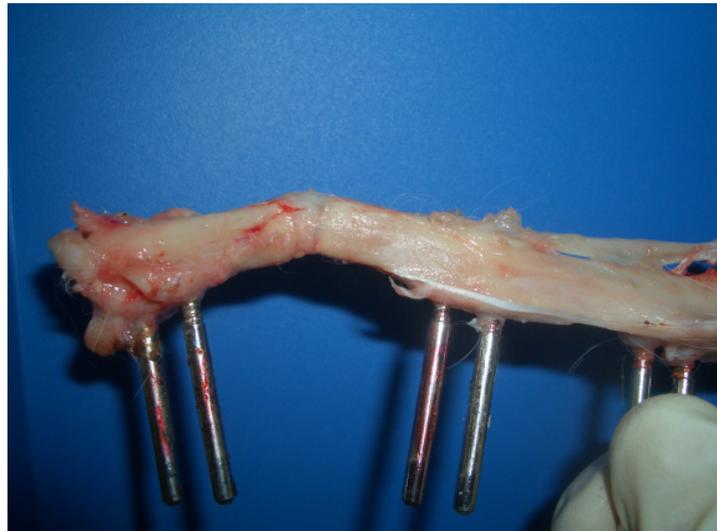


Abb. 23: Darstellung einer „instabilen“ Pseudarthrose der Klasse 1 (Kaninchen 2371 aus der Kontrollgruppe)

5.2 Radiologische Untersuchung

Die radiologische Analyse wurde nach der folgenden Klassifikation durchgeführt.

Radiologische Klassifikation:

Klasse 1: keine Durchbauung des Pseudarthrosespalt

Klasse 2: partielle Durchbauung des Pseudarthrosespalt

Klasse 3: komplette Durchbauung des Pseudarthrosespalt

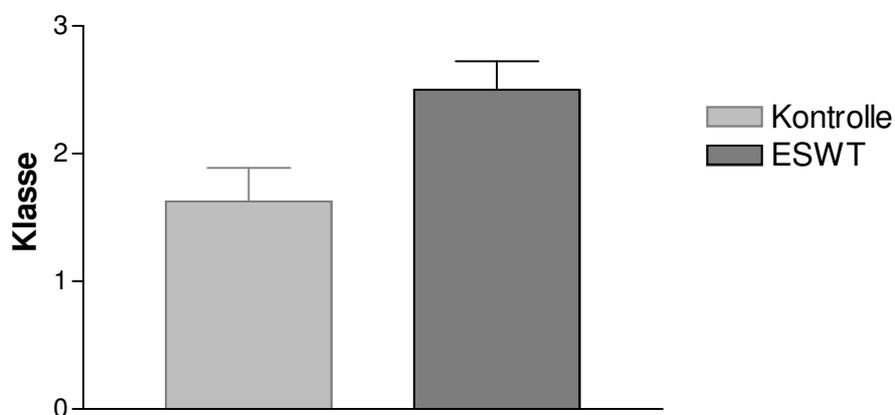


Abb. 24: Berechnete Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte beider Tiergruppen für die Variable „Radiologische Untersuchung“

In der radiologischen Untersuchung fanden sich 50% der mit ESWT behandelten Tiere (drei Kaninchen) in Klasse 3; weitere 50% (drei Kaninchen) der ESWT-Gruppe waren in Klasse 2 einzustufen. Die Kontrollgruppe gliederte sich zu 50% (vier Kaninchen) in Klasse 1, zu 37,5% (drei Kaninchen) in Klasse 2 und zu 12,5% (ein Kaninchen) in Klasse 3 auf (Abb. 39 – Anhang Seite XXXV).

Es zeigte sich in der statistischen Berechnung mittels des Mann-Whitney-Tests ($p = 0,0593$) kein eindeutig signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Dennoch ist eine richtungweisende Tendenz in der vergleichenden Darstellung der errechneten Mittelwerte und deren Standardabweichungen (Abb. 24) zu erkennen.

In der folgenden Abbildung (Abb. 25) sind beispielhaft die Röntgenbilder eines Kontrolltieres abgebildet.

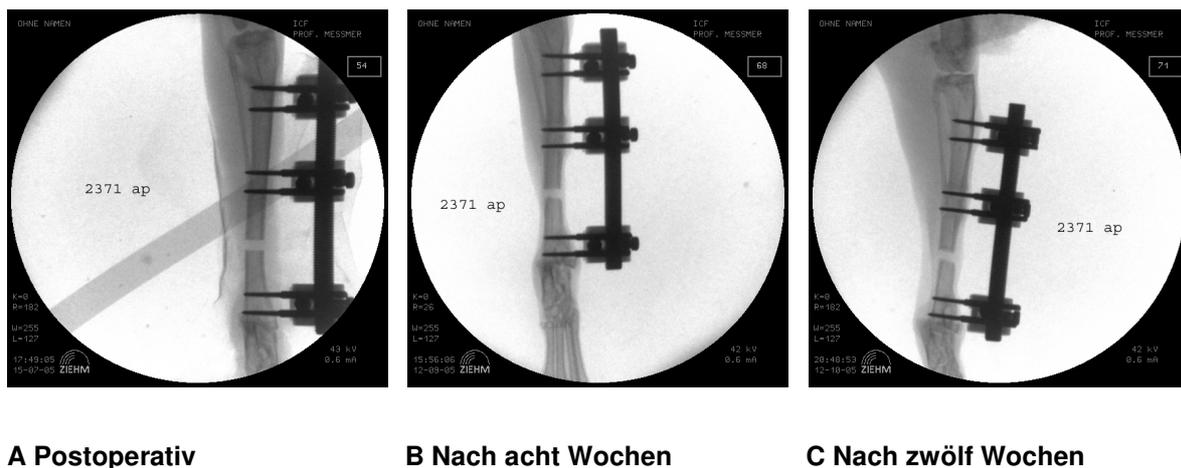


Abb. 25: Röntgenbilder (ap) der Klasse 1 (Kaninchen 2371 aus der Kontrollgruppe)

5.3 Histopathologische Untersuchungen

5.3.1 Paragon-Färbung

Die paragongefärbten Schnitte wurden anhand der unterschiedlichen Bindegewebsbildung lichtmikroskopisch nach den folgenden Kriterien ausgewertet. Die fehlende Bindegewebsbildung galt dabei als indirekter Beweis für die Knochenneubildung.

Klassifikation der Bindegewebsbildung

Klasse 1: Bindegewebe zu weniger als 33% im Bruchspalt

Klasse 2: Bindegewebe zu mehr als 33% und zu weniger als 66% im Bruchspalt

Klasse 3: Bindegewebe zu mehr als 66% im Bruchspalt

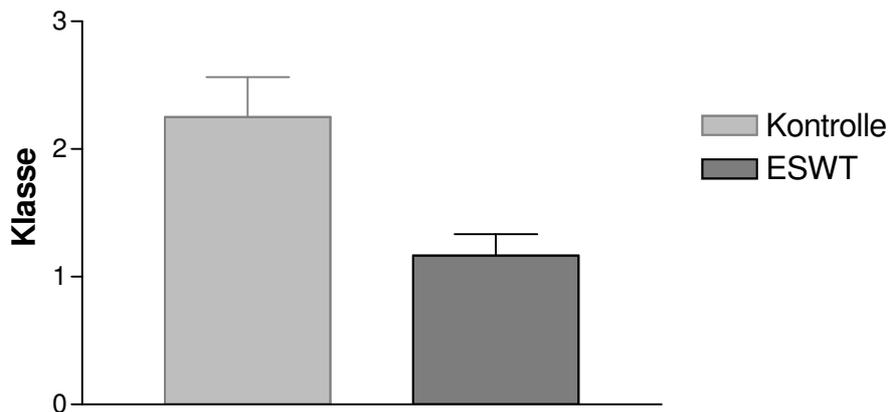


Abb. 26: Berechnete Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte beider Tiergruppen für die Variable „Bindegewebsbildung“

Es ergaben sich hinsichtlich der Bindegewebsbildung die folgenden Befunde: Der Großteil der mit ESWT behandelten Tiere befand sich mit 83,3% (fünf Tiere) in Klasse 1, das heißt es hatte sich kein oder kaum Bindegewebe im Bruchspalt ausgebildet. 16,6% (ein Tier) der ESWT-Gruppe wurden in Klasse 2 eingestuft. Hingegen war die Hälfte der Kontrollgruppe (vier Tiere) in Klasse 3 zu finden. Jeweils 25% (je zwei Tiere) der Kontrollgruppentiere wurden in Klasse 1 und 2 eingeordnet (Abb. 40 – Anhang Seite XXXVI).

Die vergleichende Darstellung der Mittelwerte (Abb. 26) ergab einen großen Unterschied, der sich im Mann-Whitney-Test als statistisch signifikant ($p = 0,0426$) erwies.

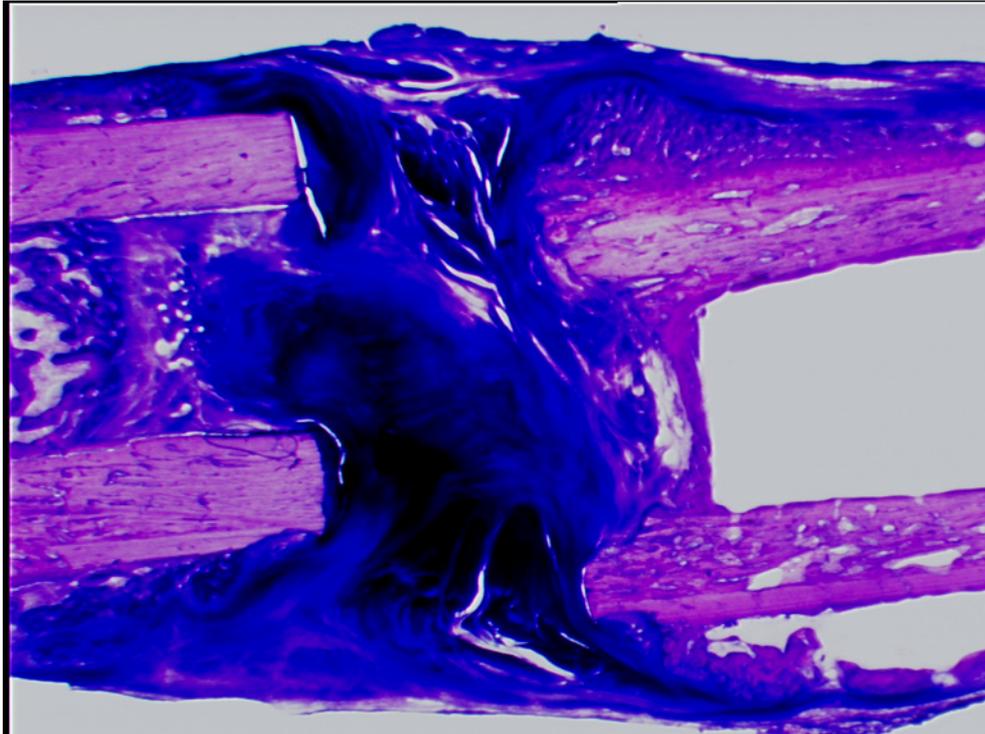


Abb. 27: Paragongefärbter Tibiadünnschnitt der Klasse 3 (Kaninchen 358 aus der Kontrollgruppe)

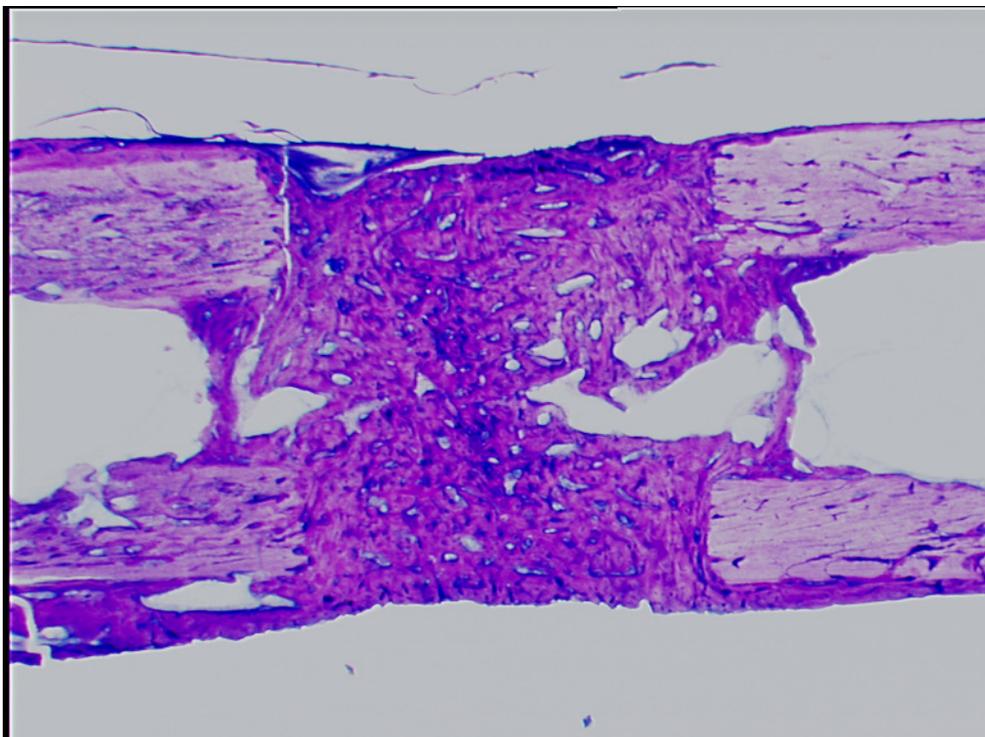


Abb. 28: Paragongefärbter Tibiadünnschnitt der Klasse 1 (Kaninchen 1331 aus der Behandlungsgruppe)

5.3.2 Mikroradiografien

Die Analyse der Mikroradiografien erfolgte lichtmikroskopisch unter verschiedenen Vergrößerungen. Die verwendeten Untersuchungskriterien werden im Folgenden näher erläutert.

Reaktionstyp der Kallusbildung

Klasse 1: keine Kallusbildung entlang der Kortikalisoberfläche

Klasse 2: geringe + unvollständige Kallusbildung entlang der Kortikalisoberfläche

Klasse 3: deutliche + vollständige Kallusbildung entlang der Kortikalisoberfläche

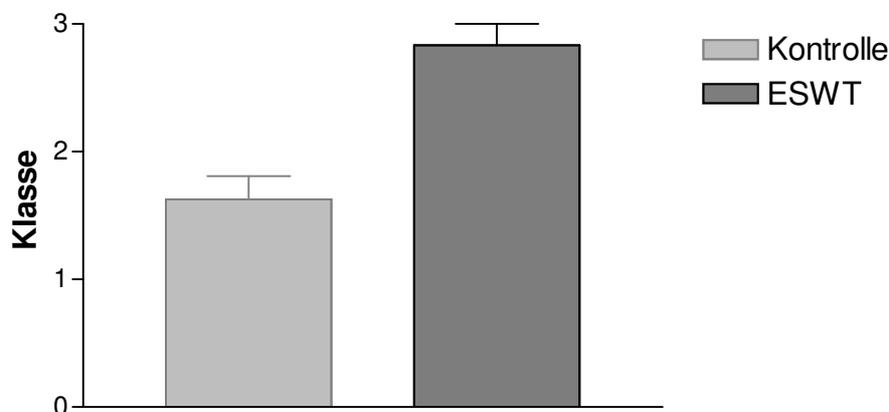


Abb. 29: Berechnete Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte beider Tiergruppen für die Variable „Reaktionstyp der Kallusbildung“

Die mikroradiografische Untersuchung hinsichtlich der Variablen „Reaktionstyp der Kallusbildung“ ergab die folgenden Resultate: Die ESWT-Gruppe gliederte sich zu 83,3% (fünf Tiere) in Klasse 3 und zu 16,6% (ein Tier) in Klasse 2 auf. In der Kontrollgruppe befanden sich 62,5% (fünf Tiere) in Klasse 2 und weitere 37,5% (drei Tiere) in Klasse 1 (Abb. 41 – Anhang Seite XXXVI).

Mittels des Mann-Whitney-Tests errechnete sich eine statistisch hoch signifikante Unterscheidung ($p = 0,0027$) zwischen der behandelten und der unbehandelten Gruppe. Diese Aussage hatte sich bereits zuvor in der Darstellung der Mittelwerte (Abb. 29) angedeutet.

Mittleres relatives Ausmaß der Knochenneubildung

Mittleres relatives Ausmaß der Knochenneubildung – periostal

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

Klasse 2: Knochenneubildung an mehr als 33%, jedoch weniger als 66% der periostalen Kortikalisoberfläche nachweisbar

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

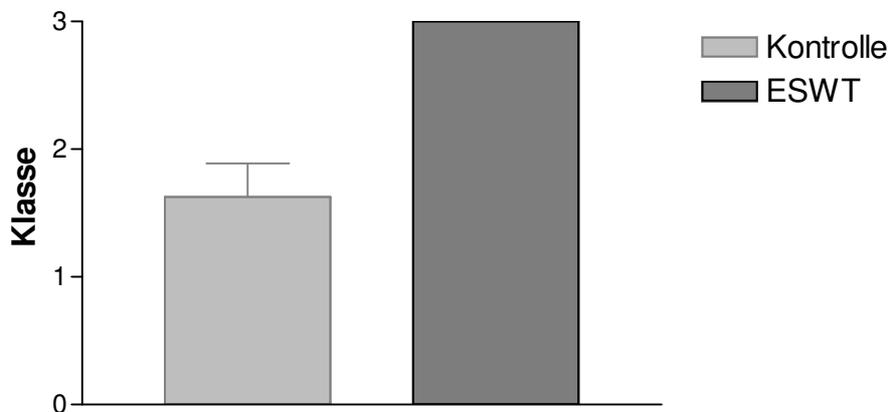


Abb. 30: Berechnete Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte beider Tiergruppen für die Variable „Mittleres relatives Ausmaß der Knochenneubildung - periostal“

In der histopathologischen Untersuchung zum mittleren relativen Ausmaß der Knochenneubildung auf der periostalen Seite ließen sich 100% der ESWT-Gruppe (sechs Kaninchen) in Klasse 3 einstufen. Die Tiere der Kontrollgruppe fanden sich zu 50% (drei Kaninchen) in Klasse 1 und zu 37,5% (zwei Kaninchen) in Klasse 2. Weitere 12,5% (ein Kaninchen) ließen sich in Klasse 3 eingruppiieren (Abb. 42 – Anhang Seite XXXVII).

Für die statistische Berechnung wurde der einseitige T-Test verwendet, da in diesem speziellen Fall innerhalb der Behandlungsgruppe keine unterschiedlichen Werte vorlagen. In der Balkendarstellung der Mittelwerte (Abb.30) zeigte sich eine deutliche Differenz der beiden Gruppen. Entsprechend konnte ein statistisch hoch signifikanter

Unterschied ($p = 0,005$) zwischen den mit ESWT behandelten und den unbehandelten Kaninchen berechnet werden.

Mittleres relatives Ausmaß der Knochenneubildung – endostal

Klasse 1: Knochenneubildung an weniger als 33% der endostalen Kortikalisoberfläche nachweisbar

Klasse 2: Knochenneubildung an mehr als 33%, jedoch weniger als 66% der endostalen Kortikalisoberfläche nachweisbar

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

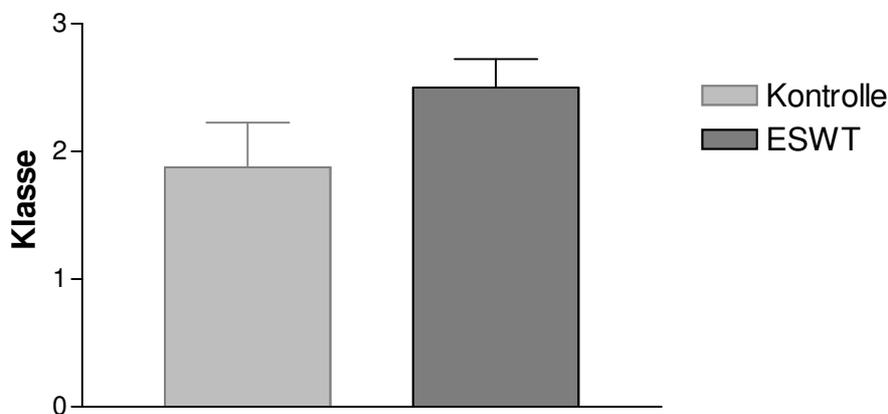


Abb. 31: Berechnete Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte beider Tiergruppen für die Variable „Mittleres relatives Ausmaß der Knochenneubildung - endostal“

Die ESWT-Gruppe gliederte sich zu 50% (drei Kaninchen) in Klasse 3 und zu weiteren 50% (drei Kaninchen) in Klasse 2 auf. In der unbehandelten Gruppe fanden sich 50% (vier Kaninchen) in Klasse 1, 12,5% (ein Kaninchen) in Klasse 2 und 37,5% (drei Kaninchen) in Klasse 3 (Abb. 43 – Anhang Seite XXXVII).

Die vergleichende Darstellung der Mittelwerte (Abb. 31) brachte keinen großen Unterschied zwischen den getesteten Gruppen. Folglich ergab die histopathologische Analyse im Hinblick auf das mittlere relative Ausmaß der endostalen Knochenneubildung keine signifikante Unterscheidung ($p = 0,2824$) zwischen den beiden untersuchten Gruppen.

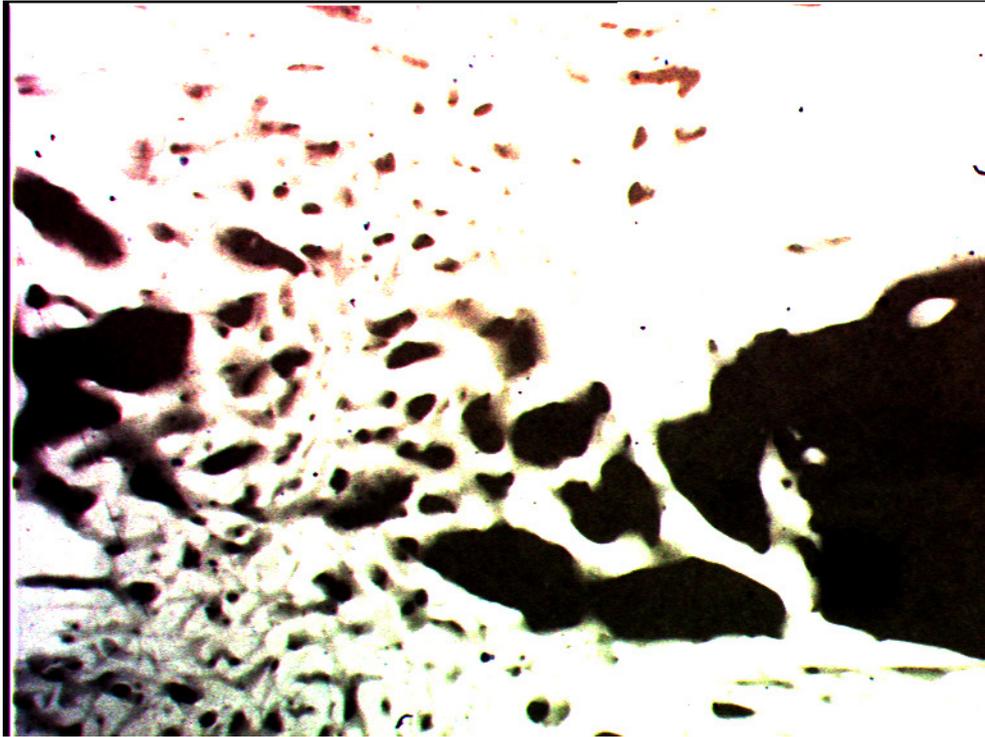


Abb. 32: Beispiel für die feine und exakte Strukturdarstellung der Knochenbälkchen in der Mikroradiografie (Kaninchen 1331 aus der Behandlungsgruppe)



Abb. 33: Beispiel für die endostale und periostale Osteoinduktion (Kaninchen 3258 aus der Behandlungsgruppe)

Bruchspaltdurchbauung

Klasse 1: keine Durchbauung

Klasse 2: deutliche, jedoch nicht vollständige Durchbauung

Klasse 3: vollständige Durchbauung

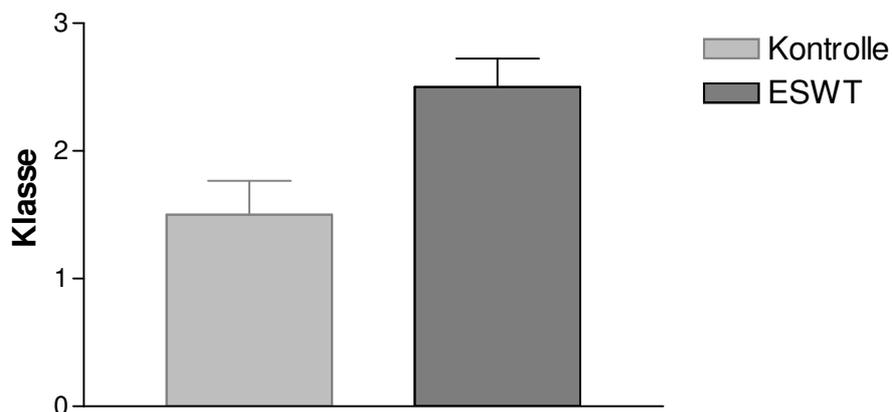


Abb. 34: Berechnete Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte beider Tiergruppen für die Variable „Bruchspaltdurchbauung“

In der speziellen Betrachtung der Durchbauung der einzelnen Präparate fanden sich die nachstehenden Ergebnisse: 50% (drei Tiere) der Behandlungsgruppe waren in Klasse 3 einzustufen, weitere 50% (drei Tiere) waren der Klasse 2 zuzuordnen. Die Kontrollgruppe lässt sich zu 62,5% (fünf Tiere) in Klasse 1 einordnen; 25% (zwei Tiere) der unbehandelten Gruppe findet sich in Klasse 2 und 12,5% (ein Tier) in Klasse 3 (Abb. 44 – Anhang Seite XXXVIII).

Der Vergleich der Mittelwerte (Abb. 34) ließ eine eindeutige Verschiedenheit der untersuchten Gruppen erkennen. Im Mann-Whitney-Test für voneinander unabhängige, nicht normal verteilte Variablen konnte entsprechend ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,0293$) zwischen den behandelten und unbehandelten Untersuchungsgruppe errechnet werden.



Abb. 35: Mikroradiografie der Klasse 1 in allen Variablen der mikroradiografischen Analyse. (Kaninchen 4334 aus der Kontrollgruppe)

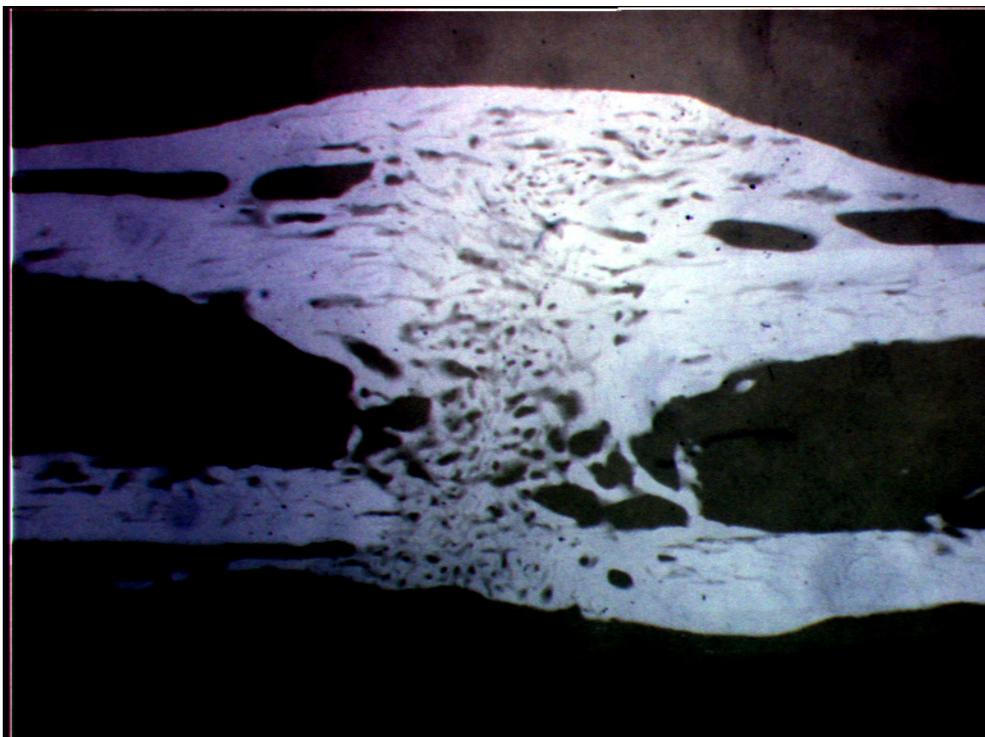


Abb. 36: Mikroradiografie der Klasse 3 in allen Variablen der mikroradiografischen Analyse. (Kaninchen 1331 aus der Behandlungsgruppe)

Quantitative Erfassung der Knochenneubildung

Zusätzlich erfolgte die quantitative Messung der knöchernen Neubildung zwischen den Fragmentenden in Quadratmillimeter [mm²]. Die Ergebnisse werden im folgenden Diagramm (Abb. 37) präsentiert.

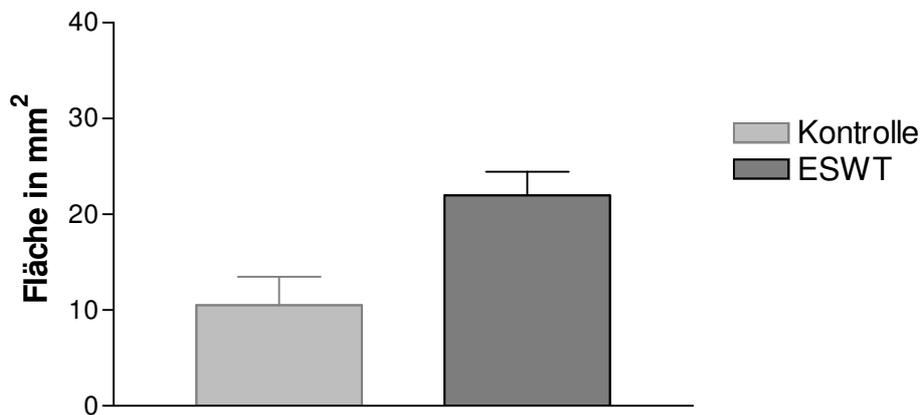


Abb. 37: Berechnete Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte beider Tiergruppen für die Variable „Quantitative Erfassung der Knochenneubildung“

Das arithmetische Mittel für die Stichprobengruppe der Kontrolltiere liegt bei 10,7 mm², daneben findet sich der Mittelwert der Stichprobengruppe der mit ESWT behandelten Tiere bei 22,5 mm². Die Einzelergebnisse sind im Anhang in der tabellarischen Gesamtauswertung (Tab. 4) gesondert aufgeführt (Seite XXVIII – XXXIV). Aus den gemessenen Einzelwerten wurde für jedes Präparat das spezifische arithmetische Mittel gebildet (Abb. 45 – Anhang Seite XXXVIII). Davon ausgehend wurde der Mittelwert der jeweiligen Stichprobengruppe sowie die Signifikanz der Variablen berechnet.

Im zweiseitigen T-Test für unverbundene Stichproben wurde ein statistische signifikanter Unterschied ($p = 0,0118$) zwischen den beiden Untersuchungsgruppen festgestellt. Veranschaulicht wurde dieses Ergebnis in der vergleichenden Darstellung der Mittelwerte und deren Standardabweichungen (Abb. 37).

6 Diskussion

6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Entsprechend den vorliegenden Ergebnissen konnte mit Hilfe der histopathologischen Untersuchungen die in der Zielsetzung formulierte **Hypothese** bestätigt werden.

Die fokussierte extrakorporale Stosswellentherapie (EFD bei 0,5 mJ/mm²) führt beim pathologischen, im Sinne einer Pseudarthrose veränderten Knochen zu einer deutlich beschleunigten knöchernen Ausheilung.

6.2 Validität der Methoden

Modell zur Induktion einer atrophen Pseudarthrose

Das in diesem Versuch verwendete Tiermodell zur Induktion einer atrophen Pseudarthrose erfolgte nach der Vorlage einer aktuell etablierten Methode (Brownlow und Simpson 2000). Verglichen mit den bisher bekannten Modellen (Forriol et al. 1994, Johannes et al. 1994, Rompe et al. 1997, Bulut et al. 2006) zur Entwicklung einer Pseudarthrose repräsentiert das hier praktizierte Vorgehen die klinische Situation am treffendsten. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass das verwendete Tiermodell direkt auf den Menschen übertragen werden kann. Es wurde darauf verzichtet, große Exzisionen am diaphysären Knochen durchzuführen (Johannes et al. 1994) oder Fremdmaterialien (wie beispielsweise Silikon) zwischen die beiden Knochenfragmente einzubringen (Bulut et al 2006). Somit kommt das angewandte Modell der tatsächlich zu Grunde liegenden pathophysiologischen Störung sehr nahe. Darüber hinaus sind auch keine zusätzlich komplizierenden Zweiteingriffe zum Entfernen des Silikons o.ä. nötig. Wie im Grundlagenteil dieser Arbeit detailliert beschrieben, besteht die wahrscheinlich bedeutsamste Ursache einer atrophen Pseudarthrose in einer Durchblutungsstörung. Zu einem geringeren Anteil haben auch mechanischen Faktoren, wie Distraction der Knochenenden und Instabilität in der vulnerablen Phase Einfluss auf die Entwicklung einer atrophen Situation. Bei diesem Modell wurden Knochenmark und Periost an der Osteotomiestelle komplett entfernt und

auf diese Weise die Vaskularisation unterbunden. Durch Implantation des Minifixateurs sollte die Stabilität gesichert werden. Trotz der genannten Vorteile muss das Tiermodell kritisch betrachtet werden. Wie sich in den eigenen Vorversuchen zeigte, war die von den Autoren angegebene Knochendistanz von zwei Millimeter zu gering, um eine atrophe Pseudarthrose zu induzieren. Die in den ersten Experimenten operierten Tiere hatten den Osteotomiespalt fast durchweg nach acht Wochen durchbaut, deshalb wurde die Distanz der Fragmentenden im hier angewendeten Modell auf vier Millimeter erweitert.

Des Weiteren gilt es einige Vor- und Nachteile des verwendeten Tiermodells zu erläutern: Zum einen besteht bei Kaninchen ein deutlich erhöhter Knochenstoffwechsel. Diese überaus schnelle und gute Regenerationsfähigkeit des Kaninchenknochens hebt sich stark ab von den eindeutig langsameren regenerativen Stoffwechselforgängen des menschlichen Knochens. Deshalb könnte der Eindruck entstehen, dass die vorgestellten Ergebnisse nur indirekt auf den Menschen zu übernehmen sind. Dies ist sicherlich ein problematischer Aspekt des angewendeten Tiermodells. Es soll aber auch darauf hingewiesen werden, dass das Ausbleiben der Durchbauung bei den unbehandelten Tibiapseudarthrosen vor allem unter diesem Gesichtspunkt ein gutes Argument für die Wirksamkeit der Stoßwellen ist. Zum anderen entsteht durch die Verwendung eines Fixateur externe, welcher die Ruhigstellung und Stabilität der Osteotomie gewährleistet, ein konstanter Reiz auf den Knochen. An den Stellen der eingebrachten Schanz'schen Schrauben wird der lokale Stoffwechsel angestoßen und es kommt zu Neovaskularisationen. Direkt postoperativ kann das zu einer unvorhergesehenen Beeinflussung der regenerativen Prozesse an der Osteotomiestelle führen. Allerdings ist zum Zeitpunkt der Stoßwellenanwendung nicht mehr davon auszugehen, dass dies von großer Bedeutung ist. Ferner soll noch auf die Problematik der Bodenhaltung versus Einzelkäfighaltung eingegangen werden. Bei der Bodenhaltung, welche auch im eigenen Modell durchgeführt wurde, entwickelt sich durch die hohe Belastung beim Hoppeln ein zusätzlicher Knochenreiz. Dies kann ebenfalls die lokalen Stoffwechselforgänge steigern und zu Gefäßneubildungen in diesem Bereich führen. Diese Tatsache ist der wahrscheinlichste Grund für die „schlechten“ Kontrolltiere (d.h. trotz Scheinbehandlung ist eine gewisse Knochenneubildung zu erkennen), da die Belastung einen stetigen Reiz auf den Knochen darstellt – auch zum Zeitpunkt der ESWT bzw. der Scheinbehandlung. Im

Gegensatz dazu führt die Einzeltierhaltung im kleinen (50 x 100 cm) Käfig dazu, dass die Tiere keinerlei Möglichkeit haben sich zu bewegen. Einerseits repräsentiert dies in keinem Fall die echte pathophysiologische Situation, da eine atrophe Pseudarthrose eher durch die fehlende Vaskularisation als durch den mangelnden Reiz auf den Knochen bedingt ist. Andererseits kann sich eine Inaktivitätsosteoporose ausbilden, welche im Extremfall Knochenabbaureaktionen und Frakturen verursachen kann.

Die unbehandelten Kontrollen wurden absichtlich nicht als intraindividuelle Kontrollen am anderen Bein des gleichen Tieres gewählt. Grund dafür, dass eine eigene Tiergruppe als Kontrollgruppe verwendet wurde, ist die Tatsache, dass systemische Effekte nicht vollkommen auszuschließen sind. Möglicherweise werden durch die Beschallung verschiedene Wachstumsfaktoren ausgebildet, die in den Körperkreislauf gelangen und an anderer Stelle wirken könnten.

Stosswellenapplikation

Das hier verwendete Modell am Kaninchenknochen ist in der Literatur etabliert, um Effekte extrakorporaler Stosswellen auf Knochengewebe zu untersuchen (Graff 1989, Delius et al. 1995, Maier 2001, Maier 2002(b), Maier et al. 2004). Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse lassen sich hinsichtlich ihrer Energieabhängigkeit mit den Resultaten in der Literatur zum Teil nur schwer vergleichen. In einer Vielzahl an Studien über die Anwendung extrakorporaler Stosswellen am Stütz- und Bewegungsapparat wird die so genannte Ladespannung der Stosswellengeneratoren in Kilovolt angeführt (Haupt et al. 1992, Seemann et al. 1992, Beutler et al. 1999). Die Angabe der Ladespannung stimmt allerdings keinesfalls mit der Energie im Fokusbereich überein. Diese ist jedoch entscheidend für die biologische Wirkung der extrakorporalen Stosswellen und bis zu einem gewissen Maß von der verwendeten Stosswellenquelle abhängig (Maier et al. 1998). Aus den genannten Gründen erscheint es notwendig, die Energie im Fokusbereich möglichst exakt zu bestimmen. Die derzeit genaueste Variante zur Bestimmung der Energie im Fokusbereich, besteht in der Anwendung von Glasfaserhydrophonen (Maier et al. 1998). Der hierbei gemessene Wert wird als Energieflussdichte im Fokusbereich angegeben. In der vorliegenden Arbeit wurde das beschriebene Verfahren zur exakten Messung der Energieflussdichte angewandt.

Histopathologische Untersuchungen

Für die in dieser Arbeit vorgestellten und durchgeführten histopathologischen Untersuchungen wurden ausnahmslos etablierte Methoden verwendet. Zur Erfassung der stosswellenvermittelten Effekte erfolgte vor der Erstellung der Schnittpräparate zunächst die Einbettung der Knochen in Methylmethacrylat, um mögliche Schrumpfungartefakte zu minimieren (Schenk 1965, Burck 1969, Romeis 1989(b)). Dieses Verfahren führt überdies zu einer gleichmäßigen Polarisationsfront, wodurch Spannungen oder Formabweichungen an der Probe selbst weitgehend vermieden werden konnten (Milz 1993, Adler 1999).

Der Vorteil der Verwendung unentkalkter Schnitte liegt in deren geringeren Schrumpfung und der besseren Anfärbarkeit. Mit der gewählten Paragon-Färbung kann besonders gut Bindegewebe (blauviolette Einfärbung) nachgewiesen werden (Romeis 1989(c)). Im Falle eines negativen Befundes für Bindegewebe im Bruchspalt ergibt sich somit ein indirekter Beweis für die bestehende Kallusbildung.

Eine Mikroradiografie entspricht im Prinzip einer sehr exakten Röntgenaufnahme. Durch die sehr lange Belichtungszeit von etwa 100 Minuten und die Tatsache, dass der Knochen direkt (und ohne Zusatz von Weichteil) durchleuchtet wird, sind die Konturen des Knochens genau zu erkennen – sowohl qualitativ hinsichtlich der Knochenstrukturen als auch quantitativ im Hinblick auf Mineralisierungsgehalt und Mineralverteilung (Romeis 1989(d)). Das Trabekelwerk der periostalen und endostalen Knochenneubildung kann anhand der mikroradiografischen Darstellung insgesamt sehr gut von der alten Kortikalis unterschieden werden. Die bildanalytische Auswertung am Mikroskop erfolgte in Anlehnung an analoge Studien (Maier 2001, Maier et al. 2004).

Der Zeitpunkt der Histologie (vier Wochen nach ESWT) gibt keine direkten Anhaltspunkte auf die Wirkweise, sondern hauptsächlich auf die Wirkung und Effektivität der Stosswellen. Dies unterstreicht die klinische Relevanz des durchgeführten Versuchs. Die genaue Wirkungsweise der ESWT sollte das Thema zukünftiger Forschungsarbeiten werden. Mittels Untersuchungen histologischer und szintigraphischer Parameter zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Stosswellenapplikation (beispielsweise nach 12h, 24h, 48h, 3d und 7d) könnten die Wirkmechanismen entschlüsselt werden.

6.3 Diskussion der Ergebnisse

Die extrakorporale Stosswellentherapie war in den vergangenen Jahren angesichts ihrer möglichen Wirkungen am Stütz- und Bewegungsapparat Gegenstand zahlreicher klinischer und experimenteller Studien. Neben der Tendinosis calcarea, der Epicondylitis humeri radialis, der Fasziiitis plantaris, den zahlreichen Tendinopathien und der aseptischen Hüftkopfnekrose gehört mittlerweile auch die aseptische Pseudarthrose zu den experimentellen und klinischen Anwendungsgebieten extrakorporaler Stosswellen (Heller und Niethard 1998, Maier 2001, Maier et al. 2002(a)). Speziell letztgenannte Indikation ist stark umstritten und wird gegenwärtig unter Einbeziehung der im Ergebnisteil dieser Arbeit vorgestellten eigenen Daten diskutiert.

Die bisher publizierten Untersuchungen zur stosswelleninduzierten Osteoinduktion am kranken Knochen haben stark divergierende Ergebnisse geliefert. Diese unbefriedigende Datenlage ist zweifellos dadurch bedingt, dass noch immer Ungewissheit über die exakte molekulare Wirkweise der ESWT bei deren Anwendung am Bewegungsapparat besteht. Zudem fehlen in diesem Zusammenhang strikte Behandlungsindikationen und genaue Vorgaben hinsichtlich der zu verwendenden Energieflussdichte, Impulszahl, Nachbehandlung, etc. Somit verfügen die meisten veröffentlichten Studien über stark inhomogene Parameter.

Zum Zeitpunkt der Erstellung der vorliegenden Arbeit existierten in der internationalen „peer-reviewed“ Literatur insgesamt 33 Arbeiten zur Wirkung extrakorporaler Stosswellen an pathologisch verändertem Knochengewebe. Im Detail setzten sich diese aus 12 tierexperimentellen Untersuchungen und 21 klinischen Studien zusammen. Dieses Ergebnis ergab die „PubMed“-Recherche am 20.04.2007 in der Medline Datenbank (U.S. National Library of Medicine). Eine Zusammenfassung der Internet-Recherche findet sich in Tabelle 5 und 6 im Anhang (Seite XXXIX – XLIII). Die Publikationen der klinischen Untersuchungen wurden hinsichtlich ihrer Gültigkeit nach den Vorgaben (Tab. 3) der „American Association for Spine Surgery“ (AASS) des U.S. Department of Health and Human Services bewertet (Bigos et al. 1994).

Beurteilung	Studiendesign
A	Prospektiv, mit Kontrollgruppe, mit adäquaten Scores und adäquater Nachuntersuchung bezogen auf Zeit und Umfang
B	Prospektiv, ohne Kontrollgruppe, mit adäquaten Scores und adäquater Nachuntersuchung bezogen auf Zeit und Umfang
C	Prospektiv, ohne Kontrollgruppe mit entweder nicht ausreichender Nachuntersuchungszeit oder nicht adäquater Nachuntersuchung
D	alle anderen Studien, außer Abstracts
E	Abstracts

Tab. 3: Validierung der Publikationen

Nach Einführung der Stosswellentherapie in die klinische Medizin waren – neben den kurz- und langfristigen Nebenwirkungen – auch mögliche neue Indikationsstellungen von bedeutendem Interesse. Der physikalische Effekt der Energiefreisetzung an Orten von Impedanzunterschieden lenkte die Aufmerksamkeit auf spezielle Anwendungsmöglichkeiten innerhalb des orthopädischen Fachgebietes. Die Tatsache, dass das Knochengewebe eine sehr viel höhere Impedanz aufweist als andere Medien (Tab. 1), hat im Rahmen der Stosswellenexposition beträchtliche Auswirkungen auf den Knochen. In diesem Zusammenhang sei angemerkt, dass sich die (direkte und indirekte) Wirkung der ESWT primär an der kortikalen Oberfläche manifestiert (Ogden et al. 2001). Dieser Befund kann physikalisch durch das Phänomen der Reflexion und der Brechung erklärt (Staudenraus 1995, Ueberle 1998) und in den eigenen Untersuchungen bestätigt werden. Im Folgenden soll darauf näher eingegangen werden.

Tierexperimentelle Arbeiten

Im Hinblick auf den Einsatz der ESWT in anderen Anwendungsgebieten untersuchte Graff im Rahmen seiner Habilitationsschrift 1989 die Wirkung extrakorporaler Stosswellen auf intaktes Knochengewebe. Er behandelte in seiner Pilotstudie zunächst 24 Chinchilla-Bastard Kaninchen an der Spina iliaca posterior superior und dem linken distalen Femur. Dabei wurden 1500 Impulse mit einer Energie von 20 kV und 25 kV verabreicht (Stosswellenquelle HM3, Dornier). Initial zeigten sich ab einer Generatorspannung von 25 kV subperiostale Blutungen, Osteozytenschäden und Knochenmarkhämatome. Zwei Wochen später bildeten sich Reparaturmechanismen aus, die sich durch die Aktivierung mesenchymaler Knochenmarkzellen und die erhöhte osteoblastische Aktivität nachweisen ließen. In der Folge kam es zu einer Zunahme des intramedullären Knochenbaus. Diese Feststellungen konnten von Graff (1989) in einer zweiten Pilotstudie an 24 Beagle-Hunden bekräftigt werden. Ausgehend von den Erkenntnissen der Grundlagenuntersuchung von Graff (1989) zur ESWT am intakten Knochen, machten Ekkernkamp et al. (1992), Haupt et al (1992) und Johannes et al. (1994) am pathologisch veränderten Tierknochen erstmals ähnliche Beobachtungen. Johannes et al. (1994) führten an zehn Beagle-Hunden mit einer hypertrophen Pseudarthrose des Radius eine Behandlung mit 4000 Stosswellenimpulsen bei einer EFD von 0,54 mJ/mm² (Stosswellenquelle Siemens Osteostar) durch. Nach zwölf Wochen zeigte sich bereits bei vier von fünf behandelten Tieren ein kompletter knöcherner Durchbau des Pseudarthrosespalt. Durch eine erneute ESWT kam es auch beim fünften Tier zu einer zügigen Durchbauung. In der Kontrollgruppe dagegen blieb bei vier von fünf Tieren die Heilung des Knochendefektes aus.

Die Studie von Haupt et al. (1992) konnte zusätzlich zur positiven Beeinflussung der Heilung noch eine Erhöhung der Knochenstabilität nach ESWT belegen. Hierbei erfolgte am Frakturmodell des Rattenhumerus die Applikation von 500 Stosswellenimpulsen (Stosswellengenerator Dornier XL 1) mit einer Energie von 14 kV und 18 kV.

Im Gegensatz zu den erläuterten positiven Aspekten extrakorporaler Stosswellen, berichteten einige Autoren auch von negativen Folgen der ESWT (Seemann et al. 1992, Perren 1993, Forriol et al. 1994, Augat et al. 1995, Mc Cormack et al. 1996).

Die Untersuchung von Forriol et al. (1994) wurde an 37 osteotomierten Schafstibiae durchgeführt. Zwei Wochen nach der Operation wurden die künstlich herbeigeführten Frakturen einer Stosswellenbehandlung (Stosswellenquelle Siemens Osteostar) unterzogen. Die Parameter der ESWT-Applikation waren mit 500 Impulsen und einer EFD zwischen $0,47 \text{ mJ/mm}^2$ und $1,2 \text{ mJ/mm}^2$ angegeben. In der histologischen und radiologischen Analyse – weitere drei Wochen später – zeigte sich eine Verzögerung der Bruchheilung. Es bleibt jedoch zu beanstanden, dass – neben der Auswahl eines nicht standardisierten Verfahrens – ein sehr kurzer Beobachtungszeitraum für den Versuch gewählt wurde. Wenn man bedenkt, dass die Untersuchungen von Delius et al. (1995) an frühen Untersuchungsterminen (in Relation zur Stosswellenapplikation) Einblutungen, Trabekelzerstörung und Periostschäden zeigten und zum späteren Zeitpunkt deutliche Knochenneubildungen nachweisen konnten, erweisen sich die Ergebnisse nicht unbedingt als so widersprüchlich zueinander. Hinzu kommt die Anwendung auffallend heterogener Energieflussdichten. Die Spanne der verwendeten EFD von $0,47 \text{ mJ/mm}^2$ bis zu $1,2 \text{ mJ/mm}^2$ ist weit gefasst und nicht exakt definiert. Möglicherweise bringen zu hohe EFD nicht den gewünschten Effekt einer Osteoinduktion, sondern wirken nachhaltig destruktiv auf das Knochengewebe.

Augat et al. (1995) empfehlen bezüglich der Anwendungsenergie ebenfalls die Verwendung einer geringeren Energiehöhe zur Frakturtherapie, wobei im speziellen Fall die Größenordnung nicht vergleichbar war. Im durchgeführten Versuch von Augat et al. (1995) handelte es sich um eine kontrollierte Studie mit 18 Schafen (Tibiaosteotomiemodell). Die Stosswellenapplikation (Gerät Dornier XL 2) mit 300, 1000 und 3000 Impulsen und einer Energie von 12 kV und 16 kV fand fünf Tage und 21 Tage postoperativ statt. In den radiologischen und biomechanischen Tests konnten keinerlei signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen festgestellt werden.

Eine gewisse Widersprüchlichkeit fiel in der Studie von McCormack et al. (1996) auf. Es wurde publiziert, dass die Arbeitsgruppe eine stosswellenbedingte Knochenneubildung am Kaninchenmodell (radiales Osteotomiemodell) bestätigen könne. Jedoch sei es trotzdem im weiteren Verlauf zu einer verzögerten Heilung der Osteotomie gekommen. Leider fehlten exakte Angaben über die verwendeten Studienparameter, so dass weitere Vermutungen über die ursächlichen Faktoren nicht möglich waren.

Bei nahezu allen ermittelten tierexperimentellen Arbeiten wurden so genannte „Heilungsmodelle“ verwendet. Etwas genauer formuliert heißt das, es wurde artefiziell eine Fraktur gesetzt und ihr Spontanheilungsverlauf mit der Heilung nach Stosswellenbehandlung verglichen. Daher muss die Aussagekraft dieser Studien auf die Pseudarthrosebehandlung des Menschen differenziert betrachtet werden. In diesem Zusammenhang ist vor allem noch ein wichtiger Punkt – die natürliche Kaskade der Osteoneogenese – zu bedenken. Ein bis zwei Wochen nach der Fraktur oder Osteotomie haben sich erste lockere Zellverbände gebildet, wobei einwandernde mesenchymale Zellen bereits zu proliferieren beginnen. Durch die ESWT zu diesem Zeitpunkt werden die beschriebenen Vorgänge beeinträchtigt und die bereits bestehenden Zellgruppen zerstört (Hausdorf und Maier 2006). Daher ist die Stosswellenbehandlung nicht geeignet, um den natürlichen Heilungsprozess zu beschleunigen. Bei einer Pseudarthrose allerdings sieht die Situation komplett anders aus. Hierbei besteht die Problematik darin, dass die natürliche Frakturheilung zum Stillstand gekommen ist. Deshalb kann in solchen Fällen die extrakorporale Stosswellentherapie den eigenen Ergebnissen zufolge gewinnbringend eingesetzt werden. Lediglich bei zwei recherchierten Tierstudien (Johannes et al. 1994, Bulut et al. 2006) und im eigenen Modell handelte es sich um ein „echtes“ Pseudarthrosemodell, bei dem jeweils die ausbleibende Knochenheilung zu einem bestimmten Zeitpunkt *post operationem* als Pseudarthrose definiert wurde. In allen drei Versuchen zeigte sich eine deutlich beschleunigte Ausheilung der Pseudarthrose.

Zur Vollständigkeit wird das Procedere von Bulut et al. (2006) nachfolgend erläutert. Die Verfasser osteotomierten zunächst beide Radii von 13 Kaninchen und schafften eine künstliche Pseudarthrose, indem sie ein Polyethylen-Interponat für 40 Tage zwischen den Knochenenden platzierten. Im Anschluss an die Kunststoffentfernung erfolgte am rechten Radius die Stosswellenbehandlung (Gerät PCK, Stonalith Smart Lithotripter) mit einer EFD von 0,46 mJ/mm² und 1000 Impulsen. Der linke Radius diente als Kontrolle. Fünf Tiere wurden nach vier Wochen getötet (Gruppe 1), die anderen acht Tiere nach weiteren zwei Wochen (Gruppe 2). Die Untersuchungen erfolgten computertomografisch und histologisch. In beiden Gruppen wurde im Vergleich zur Kontrollseite ein größeres Kallusvolumen (CT-Scan) gemessen. Statistische Signifikanz zeigte sich dabei allerdings nur für Gruppe 1. Die histologische Analyse erbrachte im Vergleich zur Kontrolle den signifikant hohen Nachweis von dich-

tem Trabekelwerk, einzelnen Knorpelinseln im reifen Knochen und stärkeren Vorkommen von hypertrophen Chondrozyten. Das so genannte „Bone Remodelling“ war deutlich angestiegen, wobei dieser Prozess bei Gruppe 2 eindeutig weiter fortgeschritten schien als bei Gruppe 1. Die beschriebene Studie von Bulut et al. (2006) kommt der selbst vorgestellten Untersuchung sehr nahe, wobei jedoch in der eigenen Studie geringfügig höhere EFD und Impulszahlen verwendet wurden. Hinsichtlich des benutzten Pseudarthrosemodells von Bulut et al. muss darauf hingewiesen werden, dass kein etabliertes Modell verwendet wurde. Der Einsatz körperfremden Materials bei der Induktion der Pseudarthrose reduziert die klinische Relevanz der Studie drastisch.

Klinische Studien

Weitere Erkenntnisse über die Stosswellenwirkungen wurden im Rahmen zahlreicher klinischer Studien gesammelt. Ihre Ergebnisse fielen in Abhängigkeit von den gewählten Versuchsbedingungen überwiegend positiv aus (Valchanou und Michailov 1991, Haist 1995, Haupt und Katzmeier 1995, Schleberger 1995, Russo et al. 1997, Schleberger et al. 1997(b), Wirsching et al. 1998, Wirsching und Lang 1999, Brandner und Späth 2001, Rompe et al. 2001, Schaden et al. 2001, Wang et al. 2001, Schöllner et al. 2002, Biedermann et al. 2003). Die starke Heterogenität der angewandten Untersuchungsparameter behindert die richtige Einschätzung dieser Therapieform allerdings erheblich.

In einer der ersten klinischen Studien zu diesem Thema behandelten Valchanou und Michailov (1991) 82 Patienten mit verzögerter Frakturheilung oder schon bestehender Pseudarthrose. Die Applikation der Stosswellen erfolgte mit 1000 – 4000 Impulsen (Gerät HM3) bei einer Druckeinstellung zwischen 1000 und 1700 bar. In 85,4% der Fälle kam es zu einer Stimulation der Knochenbildung mit folgender Durchbauung des Knochenspaltes. Die Autoren formulierten die These, dass die Stosswellenanwendung aufgrund der Impedanzunterschiede zwischen Weichteil und Knochen zu Mikrofissuren und somit zum Aufbrechen der knöchernen Sklerosezone geführt habe.

In einer späteren Untersuchung veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Schleberger (1997(b)) erstmals die Resultate einer groß angelegten, multizentrischen und nicht-

placebo-kontrollierten Studie zur Behandlung von Pseudarthrosen an langen Röhrenknochen. Eingeschlossen wurden insgesamt 185 nicht-infizierte, teilweise schon voroperierte Pseudarthrosen an vier verschiedenen medizinischen Zentren. Die verwendeten Stosswellengeneratoren waren nicht identisch. Demzufolge fanden sich abermals stark heterogene ESWT-Parameter. Diese sind in der Tabelle (Anhang Seite XL) im Detail aufgelistet. Die Erfolgsquote wurde mit 67% angegeben. Zudem prüften Schleberger et al. die Wirksamkeit der Stosswellenanwendung in Abhängigkeit von einer zusätzlichen Stabilisation mittels einer stabilen Osteosynthese. Es wurde festgestellt, dass die mit ESWT behandelten Patienten mit zusätzlicher Osteosynthese bessere Heilungsraten lieferten als die Patienten, die nach ESWT lediglich mit einer nicht-invasiven Ruhigstellungsmaßnahme durch Gips, Verband oder Orthese versorgt worden waren. Eine ähnliche Forderung nach obligater Stabilisierung der mit ESWT behandelten Extremität wurde von den Verfassern des Consensus Reports (Schleberger et al. 1997(a)) formuliert.

Obwohl sich in der Studie von Beutler et al. (1999) ein eher eingeschränkter Therapiererfolg präsentierte, bezeichneten die Autoren den Einsatz der ESWT bei Pseudarthrosen im Sinne einer nicht-invasiven, adjuvanten Therapie als durchaus berechtigt. Die durchgeführte ESWT-Behandlung erfolgte an 27 Patienten mit 2000 Impulsen und 18 kV (Gerät Dornier MFL 5000). Im Gesamtkollektiv kam es bei 11 Patienten klinisch und radiologisch zu einer Ausheilung. Bei einer Betrachtung der Unterguppen (hypertroph vs. atroph, diaphysär vs. metaphysär) zeigte sich, dass hypertrophe, diaphysäre Pseudarthrosen eine deutlich stärkere Tendenz zur Heilung aufwiesen als die Anderen. Eine Signifikanz wurde allerdings nicht erreicht. Bei der Betrachtung der schlechten Resultate diskutierten die Autoren folgende Ursachen. Zum einen war die Ausgangssituation im Vergleich zu analogen Studien strenger gewählt worden. In der Studie von Beutler et al. (1999) wurden ausschließlich echte (mindestens sechs Monate bestehende) Pseudarthrosen behandelt. Die beschallten Falschgelenke waren allerdings in ihrer Art verschieden (atroph und hypertroph). Dies machte zwar eine Aussage über die Wirksamkeit bei den unterschiedlichen Krankheitsbildern möglich, minimierte aber die jeweilige Aussagekraft. Zudem äußerten die Autoren die Vermutung, dass das primäre Vorliegen 14 offener Frakturen den Therapieverlauf möglicherweise negativ beeinflusst hätte. Zum anderen waren bei der Untersuchung uneinheitliche, nicht etablierte Therapieschemata verwendet wor-

den. Im Schlusswort postulieren Beutler et al. trotzdem nochmals die Effektivität und Rechtfertigung der ESWT. Sie fügten hinzu, dass die Besserung immer in den ersten drei Monaten klinisch und/oder radiologisch erkennbar sei.

Zur gleichen Zeit empfahlen Wirsching und Lang (1999) die hochenergetische extrakorporale Stoßwellentherapie bei allen Formen von Pseudarthrosen als Therapiealternative zur chirurgischen Intervention. Die problemlose Anwendung ohne relevantes Risiko für den Patienten und die durchaus optimistisch stimmenden Resultate der bisherigen Studien rechtfertigen, ihrer Meinung nach, den breiten klinischen Einsatz der ESWT. Vor allem unter dem Aspekt der geringeren Invasivität, der niedrigeren Komplikationsraten, der ambulanten Durchführbarkeit und der Kostenersparnis im Vergleich zur operativen Therapie, sehen die Autoren starke Vorzüge dieser Therapieoption. Durch genauere Kriterienvorgabe für die ESWT-Indikation lassen sich die Erfolgsraten erheblich steigern, so vermuten Wirsching und Lang. In ihrer klinischen Studie wurden 132 Patienten mit ESWT (Stoßwellengenerator Siemens Lithostar plus und Siemens Osteostar) bei einer EFD von $0,47 \text{ mJ/mm}^2$ – $0,84 \text{ mJ/mm}^2$ mit 2000 – 8000 Impulsen behandelt. In 70% der Fälle heilten die Pseudarthrosen aus. Sogar bei areaktiven, atrophen Pseudarthrosen war die Stoßwellenapplikation in mehr als der Hälfte der Fälle erfolgreich, solange ein enger Frakturspalt vorlag. Bei größeren Fragmentabständen stellten sich die Ergebnisse weniger günstig dar; in solchen Fällen konnte eine zusätzliche Spongiosaanlagerung zur gewünschten Heilung führen.

Wirkmechanismus

Eine gewisse Diskrepanz bezüglich der Wirkung der ESWT besteht darin, dass, entgegen der stetig wachsenden Anzahl an Studien, der Kenntnisstand über die genauen molekularen Wirkvorgänge der extrakorporalen Stoßwellentherapie auf dem nahezu gleichen Stand verblieben ist. In der Diskussion über die Effektivität der ESWT in der therapeutischen Anwendung orthopädischer Krankheitsbilder verkörpert aber der Wirkmechanismus einen sehr wichtigen Gesichtspunkt. Die Literatur weist diesbezüglich kontroverse Standpunkte zwischen den verschiedenen Arbeitsgruppen auf.

Die Theorien konnten zwar bislang noch nicht bestätigt werden, doch die positiven Resultate in den sehr ungleichen orthopädischen Anwendungsgebieten (Tendinosis

calcareo, Epicondylitis humeri radialis, Fasziitis plantaris, aseptische Hüftkopfnekrose und aseptische Pseudarthrose) deuten darauf hin, dass es nicht nur einen, sondern eine ganze Reihe von unterschiedlichen Wirkmechanismen geben muss (Rompe et al. 1997).

Wang et al. (2002) gehen von einer stosswellenvermittelten Reaktion aus, die die inflammatorische Phase verlängern soll. Durch die Einwanderung von Granulozyten, die diese Phase kennzeichnet, entsteht ein desorganisiertes histologisches Bild (Uslu et al. 1999). In der Folge bewirkt dies einen Anstoß der Kallusbildung. Einer anderen Theorie zufolge münden die (sub-)periostalen Einblutungen, die folglich zu Hämatomen umgebaut werden, indirekt auch in der Entzündungsphase (Graff 1989, Delius et al. 1995, Wang et al. 2001(b)). Möglicherweise spielt in diesem Zusammenhang auch die stosswellenvermittelte Induktion molekularer Signalstoffe (wie beispielsweise TGF β 1, Substanz P oder CBFA1) eine nicht unerhebliche Rolle (Maier 2001, Wang et al. 2001(c), Maier et al. 2002(a)). Zudem wird eine Induktion der Osteoneogenese durch Mikrofrakturen und Dekortikation im Fokusbereich mit Schädigung der Fibroblasten und konsekutiver Transformation in Osteoblasten postuliert (Haist et al. 1992, Haupt et al. 1992, Kaulesar Sukul et al. 1993, Johannes et al. 1994, Delius et al. 1995, Haupt 1997, Ikeda et al. 1999). Dieser zunächst eher osteodestruktive Vorgang wird abgelöst von der anschließenden Regenerationsphase. Bedingt durch Kapillareinsprossung und Umbau mesenchymaler Zellen zu Knorpel- und Knochengewebe besteht starke Ähnlichkeit zum Ablauf der natürlichen, indirekten Frakturheilung. Diese Hypothese konnte jedoch erstmals in der Habilitationsschrift von Maier (2001) widerlegt werden. Im vorgestellten Versuch (EFD = 0,5 mJ/mm²) konnten sowohl fluoreszenzmikroskopisch als auch mikroradiografisch Knochenneubildungen nachgewiesen werden, ohne dass Mikrofrakturen gezeigt werden konnten. Einschränkung muss darauf hingewiesen werden, dass sich diese Aussagen auf die Applikation extrakorporaler Stosswellen auf intaktes Knochengewebe beziehen. Dennoch ist die prinzipielle Bestätigung der Hypothese einer stosswelleninduzierten Knochenneubildung ohne Anhalt für Mikrofrakturen ein wertvoller Beitrag im Rahmen der Stosswellenforschung. Insbesondere deswegen, weil bei der Behandlung von Pseudarthrosen die Hypothese der Notwendigkeit von Mikrofrakturen zur Osteoinduktion bisher nicht von systematischen Dosis-Wirkungs-Studien abgeleitet wurde,

sondern lediglich auf der empirischen Beobachtung des gleichzeitigen Auftretens von Mikrofrakturen und Knochenneubildung basierte.

Eigene Untersuchung

Die in dieser Arbeit vorgestellte Untersuchung wurde am experimentell veränderten Kaninchenknochen durchgeführt. Dabei wurde das etablierte Pseudarthrosemodell für ausgewachsene New Zealand White Rabbits von Brownlow und Simpson (2000) verwendet. Dadurch, dass das angewandte Modell eine vergleichsweise „natürliche“ Ausbildung einer atrophischen Pseudarthrose herbeiführt, kann es ohne größere Einschränkungen auf die wirkliche Situation beim Menschen übertragen werden. Diese Tatsache erklärt auch die klinische Relevanz der vorgestellten tierexperimentellen Studie. Die Ergebnisse dieser Studie lassen Aussagen darüber zu, inwiefern sich der Knochenstoffwechsel einer avitalen Situation durch die Applikation extrakorporaler Stosswellen positiv beeinflussen lässt.

Die Kaninchtibiae der Gruppe A wurden mit 1500 Stosswellenimpulsen bei einer Energiedichte von $0,5 \text{ mJ/mm}^2$ behandelt. Diese EFD entspricht der zum gegenwärtigen Zeitpunkt klinisch und experimentell angewendeten Energie zur Behandlung von Knochenheilungsstörungen und Knochendefekten (Johannes et al. 1994, Schaden et al. 2001, Bulut et al. 2006). Das angrenzende Weichgewebe und die im Fokusbereich liegenden Sehnen werden dabei geschont (Kaulsar Sukul et al. 1993, Maier et al. 2002(b)). Die Kaninchtibiae der Gruppe B dienen als Kontrolle und wurden dementsprechend nicht mit Stosswellen behandelt.

In der klinischen Untersuchung zeigte sich bei den mit ESWT behandelten Tieren eine hoch signifikant erhöhte Stabilität der Tibiae. Dieses Ergebnis war sehr gut vereinbar mit einigen Resultaten der histopathologischen Analyse. Hierbei konnten unter anderem eine hoch signifikant stärkere Kallusbildung sowie signifikant höhere Bruchspaltdurchbauungsraten nachgewiesen werden. Die quantitative Flächenmessung der Knochenneubildung verdeutlicht den signifikanten Unterschied zwischen der Behandlungs- (A) und der Kontrollgruppe (B). Diese Befunde bestätigen die Vermutungen von verschiedenen Autoren (Schleberger et al. 1995, Brandner und Späth 2001, Schaden et al. 2001, Wang et al. 2001), dass extrakorporale Stosswellen eine osteoinduktive Wirkung haben. Wichtig scheint in diesem Zusammenhang die Verwen-

derung der „richtigen“ Energieflussdichte (Maier 2001; Maier et al. 2004). Kaulesar Sukul et al. (1993) beschreiben in ihrer in-vitro Studie eine Dosis-Wirkung-Beziehung zwischen der verwendeten EFD und der erfolgten Impulsanzahl im Hinblick auf entstehende kortikale Veränderungen bis hin zu großen knöchernen Frakturen. Die verursachten Mikrofissuren und Dekortikationen bedingen vermutlich eine periostale Reizung und lösen damit Knochenneubildungsvorgänge aus. In der eigenen Untersuchung konnte bei der Beurteilung des relativen Ausmaßes der periostalen Knochenneubildung ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den behandelten und den unbehandelten Kaninchen nachgewiesen werden. Alle sechs Tiere der Stosswellengruppe zeigten eine ausgeprägte periostale Knochenneubildung (Klasse 3), wohingegen sieben Kaninchen der Kontrollgruppe keine bis kaum eine periostale knöcherne Neubildung aufwiesen (Klasse 1 + 2). Lediglich ein Kontrolltier wurde in Klasse 3 eingestuft. Die Begründung für diesen „Ausreißer“ findet sich möglichenfalls in der diskutierbaren Indikationsstellung einer atrophen Pseudarthrose. Bei einer späteren Betrachtung wurde spekuliert, ob bei diesem Tier schon vor dem Zeitpunkt der Scheinbehandlung radiologisch sehr schwach Kallus nachweisbar war. Dagegen findet sich in der Analyse der endostalen Veränderungen kein signifikanter Unterschied zwischen beiden untersuchten Tiergruppen. Diese Beobachtung untermauert die, von Ogden et al. (2001) formulierte, Theorie, dass sich die ESWT-Wirkung primär an der kortikalen Oberfläche manifestiert. Diese Hypothese ist sowohl bedingt durch das Auftreffen der Stosswellen am Periost und den damit verbundenen Phänomenen der Reflexion und Brechung (Staudenraus 1995, Ueberle 1998) als auch begründet in der Hauptwirkung der ESWT über so genannte Osteoprogenitorzellen, welche am Periost lokalisiert sind.

Die radiologischen Ergebnisse beider Gruppen präsentierten sich in der statistischen Berechnung als nicht signifikant unterschiedlich. Obwohl die Durchbauung zum Untersuchungszeitpunkt offensichtlich erfolgt war – dies lässt sich aus den Ergebnissen der mikroradiografischen Analyse erkennen –, konnte im radiologischen Bild kein exaktes Korrelat zugeordnet werden. Diese Diskrepanz zwischen den histologischen und radiologischen Ergebnissen entspricht dem klinischen Alltag. Häufig ist im Röntgen keine Knochenneubildung zu sehen, obwohl sich klinisch schon eine weitgehende Durchbauung entsprechend einer unverhältnismäßigen Stabilität und Belastbarkeit vermuten lässt. Das liegt zu einem großen Anteil daran, dass der Knochen radio-

logisch nur dann nachzuweisen ist, wenn er vollständig mineralisiert ist. Im Vergleich zur histologischen Untersuchung stellt die Röntgenuntersuchung eine verhältnismäßig ungenaue, aber dennoch zweckmäßige Methode dar, um neu gebildete Knochen trabekel exakt nachzuweisen. Dieses nicht-invasive Verfahren eignet sich vor allem zur postoperativen Kontrolle und kontinuierlichen Verlaufsbeobachtung eines pathologischen Zustandes am Knochen.

Mit Hilfe der speziellen Paragon-Färbung konnte gezielt eine erfolgte Bindegewebsbildung nachgewiesen werden. Aufgrund der Tatsache, dass sich bei insuffizienter Knochenneubildung im Knochenspalt bindegewebiges Material entwickelt, dient der Nachweis von Bindegewebe als so genannter indirekter Beweis für den Stosswelleneffekt. In der histologischen Untersuchung fand sich für die Variable Bindegewebsbildung ein signifikanter Unterschied der beiden Tiergruppen. In diesem Zusammenhang soll noch erwähnt werden, dass die sich im Bindegewebe befindlichen Fibroblasten möglicherweise ebenfalls Zielzellen der ESWT darstellen, welche durch das Freisetzen von Wachstumsfaktoren aktiviert werden können (Hausdorf und Maier 2006). Folglich kann es zu einer Umwandlung aus fibroblastischen Zellen in osteoblastisches Gewebe kommen. Diese Feststellung spricht dafür, dass die Stosswellentherapie gerade im chronifizierten Zustand, wie er im klinischen Alltag (bei einer Pseudarthrose) häufig zu finden ist, eine sinnvolle Therapieoption darstellt.

Schlussfolgerung

Aus den Ergebnissen der vorgestellten Studie und der Diskussion der vergleichbaren Studien ergeben sich folgende Konsequenzen für die Klinik:

- Die extrakorporale Stosswellentherapie ($EFD = 0,5 \text{ mJ/mm}^2$) bewirkt eine Osteoinduktion und kann somit beim Krankheitsbild der Pseudarthrose gewinnbringend eingesetzt werden.
- Wie sich in dieser speziellen Untersuchung zeigte, kann auch die umstrittene Indikation einer atrophen Pseudarthrose dieser Therapieform zugeführt werden. Auch in diesem Fall ist eine beschleunigte Ausheilung zu erwarten.
- Unerwünschte Nebenwirkungen sind dabei, abgesehen von leichten Hämatomen und subperiostalen Blutungen im Fokusbereich, nicht zu erwarten.

Mit Hilfe zukünftiger Studien sollte nun im Sinne einer Grundlagenforschung nach den exakten zellulären und molekularen Wirkmechanismen extrakorporaler Stosswellen gesucht werden. Dies kann mittels vergleichender fluoreszenzmikroskopischer und mikroradiografischer Untersuchungen im direkten Anschluss an die Stosswellenanwendung (beispielsweise nach 12h, 24h, 48h, 3d und 7d) erreicht werden.

Zusätzlich scheint es sinnvoll auf der Basis der aktuell verfügbaren klinischen Daten geblindete, klinische, placebo-kontrollierte und randomisierte Multicenter-Studien zum Einsatz extrakorporaler Stosswellen bei der Therapie aseptisch-atropher Pseudarthrosen durchzuführen.

7 Zusammenfassung

Die Behandlung der atrophen Pseudarthrose stellt in der Orthopädie und Unfallchirurgie eine große Herausforderung dar. Die Pseudarthrose sowie deren gegenwärtig angewandte Therapiestrategien haben weitreichende interdisziplinäre Auswirkungen. In diesem Zusammenhang seien lange Immobilisation, Krankenhausaufenthalte und hohe Kosten für das Gesundheitswesen genannt. Deshalb ist es dringend geboten effiziente Behandlungskonzepte zu finden.

Die extrakorporale Stosswellentherapie (ESWT) könnte als Therapiealternative geeignet sein, wobei jedoch trotz intensiver orthopädisch-interdisziplinärer Forschung bisher wenig über deren Wirkmechanismen bekannt ist. Hinzu kommt, dass die Inhomogenität der bisher durchgeführten Untersuchungen zur ESWT die fachgerechte Wertigkeitseinschätzung dieser Behandlungsmethode erschwert.

In der vorliegenden Studie wurde die Wirkweise extrakorporaler Stosswellen am pathologisch veränderten Knochen, speziell am etablierten Kaninchenmodell nach Induktion einer atrophen Pseudarthrose, geprüft. Zu diesem Zweck wurden 14 New Zealand White Rabbits (Behandlungsgruppe n = 6, Kontrollgruppe n = 8) an der Tibia mit einem Fixateur externe versehen sowie osteotomiert und devastiert. Acht Wochen postoperativ wurden die Tiere der Behandlungsgruppe mit fokussierter ESWT behandelt. Die Energieflussdichte betrug 0,5 mJ/mm² bei 1500 Impulsen (zweimal 750 Impulse, die jeweils distal und proximal zum Knochenspalt fokussiert wurden) und einer Frequenz von 1 Hz. Die Kaninchen der Kontrollgruppe wurden einer Scheinbehandlung unterzogen.

Die Ergebnisse resultierten aus klinischen und radiologischen Betrachtungen sowie histomorphologischen und histomorphometrischen Analysen. Die histopathologischen Untersuchungen unterteilten sich in mikroradiografische Bilder der Knochenpräparate und in paragongefärbte Dünnschnittpräparate. Die Resultate zeigten in den Variablen „Klinische Evaluation“, „Bindegewebsbildung“, „Reaktionstyp der Kallusbildung“, „Mittleres relatives Ausmaß der Kallusbildung – periostal“, „Bruchspaltdurchbauung“, „Quantitative Erfassung der Knochenneubildung“ signifikante bis zum Teil hochsignifikante Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Tiergruppen.

Zusammenfassend ergibt sich, dass beim pathologisch veränderten Knochen eine beschleunigte knöcherne Ausheilung durch extrakorporale Stosswellen zu erzielen ist.

Literaturverzeichnis

1. Adler C (1999) Untersuchungstechniken. In: Adler C (Hrsg.) Knochenkrankheiten. Springer, 494-596
2. Augat P, Claes L, Suger G (1995) In vivo effect of shock-waves on the healing of fractured bone. *J Biomech* 7: 374-378
3. Bailey MR, Blackstock DT, Cleveland RO, Crum LA (1999) Comparison of electrohydraulic lithotripters with rigid and pressure-release ellipsoidal reflectors. II. Cavitation fields. *J Acoust Soc Am* 106: 1149-1160
4. Beickert R, Smieja S (2001) Kompressionsmarknagelung bei Pseudarthrosen. *Trauma Berufskrankh* 3: 195-202
5. Bergmann A, Schwarz B; Mittelmeier H (1998) Ursache, Prognose und Therapie von Tibiaschaftpseudarthrosen. *Aktuelle Traumatologie* 28: 205-208
6. Besch L, Bielstein D, Schuckart M, Zenker W (1994) Analysis of 55 post-traumatic pseudarthroses after tibial fracture. *Zentralbl Chir* 119: 702-705
7. Beutler S, Regel G, Pape HC, Machtens S, Weinberg AM, Kremeike I, Jonas U, Tscherne H (1999) Die extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWT) in der Behandlung von Pseudarthrosen des Röhrenknochens. Erste Ergebnisse einer prospektiven klinischen Untersuchung. *Unfallchirurg* 102: 839-847
8. Biedermann R, Martin A, Handle G, Auckenthaler T, Bach C, Krismer M (2003) Extracorporeal shock waves in the treatment of nonunions. *J Trauma* 54: 936-942
9. Bigos S, Bowyer O; Braen G, Brown K, Deyo RA, Haldeman S (1994) Acute low back problems in adults. Clinical Practice guideline No. 14, Rockville, MD: Agency for Health Care Policy and Research, Public Health Service
10. Birnbaum K, Wirtz DC, Siebert CH, Heller KD (2002) Use of extracorporeal shock-wave therapy (ESWT) in the treatment of non-unions. A review of the literature. *Arch Orthop Trauma Surg* 122: 324-330

11. Bischoff M, Kinzl L (2001) Pseudarthrosen. In: Wirth CJ (Hrsg.) Praxis der Orthopädie. Band 2, 3. Auflage, Thieme, Stuttgart New York, 93
12. Brandner H, Späth K (2001) Extrakorporale Stoßwellentherapie bei Knochenheilungsstörungen. *Trauma Berufskrankh* 3: 253-261
13. Brashear HR (1965) Treatment of ununited fractures of the long bones; diagnosis and prevention on non – union. *J Bone Joint Surg Am* 47: 174-178
14. Brendel W (1986) Shock waves: A new physical principle in Medicine. *Eur Surg Res* 18: 177-180
15. Brighton CT, Black J, Friedenber ZB, Esterhai JL, Day LJ, Connolly JF (1981) A multicenter study of the treatment of non-union with a constant current. *J Bone Joint Surg [Am]* 63: 2-13
16. Brownlow HC, Simpson AH (2000) Metabolic activity of a new atrophic non-union model in rabbits. *J Orthop Res* 18: 438-442
17. Brümmer F, Bräuner T, Hülser DF (1990) Biological effects of shock wave. *World J Urol* 8: 224-232
18. Bulut O, Eroglu M, Ozturk H, Tezeran G, Bulut S, Koptagel E (2006) Extracorporeal shock wave treatment for defective non-union of the radius: a rabbit model. *J Orthop Surg* 14: 133-137
19. Burck H (1969) Histologische Technik. Thieme, Stuttgart.
20. Cattaneo R, Catagni MA, Guerreschi F (1993) Applications of the Ilizarov method in the humerus. *Hand Clin* 9: 729-739
21. Chaussy C, Brendel W, Schmiedt E (1980) Extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves. *The Lancet* 2: 1265-1267
22. Chaussy C, Schmiedt E, Jocham D, Brendel W, Forssmann B, Walther V (1982) First clinical experience with extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves. *J Urol* 127: 417-420

23. Coleman AJ, Draguioti E, Tiptaf R, Shotri N, Saunders JE (1998) Acoustic performance and clinical use of a fiberoptic hydrophone. *Ultrasound Med Biol* 24: 143-151
24. Daecke W, Kusnierczak D, Loew M (2002) Extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWT) bei der Tendinosis calcarea der Rotatorenmanschette. *Orthopäde* 31: 645-651
25. Delacretaz G, Rink K, Pittomvils G, Lafaut JP, Vandeursen H, Boving R (1995) Importance of the implosion of ESWL-induced cavitation bubbles. *Ultrasound Med Biol* 21: 97-103
26. Delius M (1995) Biologische Wirkung von Stosswellen – mehr als „nur“ Steinzertrümmerung? *Zentralbl Chir* 120: 259-273
27. Delius M, Draenert K, Al Diek Y, Draenert Y (1995) Biological effects of shock waves: *in vivo* effect of high energy pulses on rabbit bone. *Ultrasound Med Biol* 21: 1219-1225
28. Delius M, Ueberle F, Gambihler S (1994) Destruction of gallstones and model stones by extracorporeal shock waves. *Ultrasound Med Biol* 20: 251-258
29. Diesch R, Haupt G (1997) Use of extracorporeal shock waves in the treatment of pseudarthrosis. In: Chaussy C, Eisenberger F, Jocham D, Wilbert D (Hrsg.) High energy shock waves in medicine. Thieme, Stuttgart New York, 136-139
30. Eisenberger F, Chaussy C (1978) Contact-free renal stone fragmentation with shock waves. *Urol Res* 6: 111
31. Ekkernkamp A, Bosse A, Haupt G, Pommer A (1992) Der Einfluß der extrakorporalen Stoßwellen auf die standardisierte Tibiafraktur am Schaf. In: Ittel T, Sieberth G, Matthias H (Hrsg.) Aktuelle Aspekte der Osteologie. Springer, Berlin Heidelberg New York, 307-310
32. Ekkernkamp A, Muhr G, Josten Ch (1996) Die infizierte Pseudarthrose. *Unfallchirurg* 99: 914-924

33. Folberth W, Kohler G, Rohwedder A, Matura E (1992) Pressure distribution and energy flow in the focal region of two different electromagnetic shock wave sources. *J Stone Dis* 4: 1-7
34. Forriol F, Solchaga J, Moreno JL, Canadell J (1994) The effect of shockwaves on mature and healing cortical bone. *Int Orthop* 18: 325-329
35. Gerdesmeyer L, Maier M, Haake M, Schmitz C (2002) Physikalisch-technische Grundlagen der extrakorporalen Stosswellentherapie (ESWT). *Orthopäde* 31: 610-617
36. Giannoudis PV, Mac Donald DA, Matthews SJ, Smith RM, Furlong AJ, De Boer P (2000) Nonunion of the femoral diaphysis. *J Bone Joint Surg Br* 82: 655-658
37. Graff J (1989) Die Wirkung hochenergetischer Stosswellen auf Knochen- und Weichteilgewebe. Habilitationsschrift, Ruhr-Universität, Bochum
38. Graff J, Richter KD, Pastor J (1988) Effect of high energy shock waves on bony tissue. *Urol Res* 16: 252-258
39. Granz B, Kohler G (1992) What makes a shock wave efficient in lithotripsy? *J Stone Dis* 4: 123-128
40. Greenstein A, Matzkin H (1999) Does the rate of extracorporeal shock wave delivery affect stone fragmentation? *Urology* 54: 430-432
41. Haake M, Böddeker IR, Decker T, Buch M, Vogel M, Labek G, Maier M, Loew M, Maier-Borries O, Fischer J, Betthausen A, Rehack HC, Kanovsky W, Müller I, Gerdesmeyer L, Rompe JD (2002) Side-effects of extracorporeal shock wave therapy (ESWT) in the treatment of tennis elbow *Arch Orthop Trauma Surg* 122: 222-228
42. Haake M, Deike B, Thon A, Schmitt J (2001) Value of exact focussing of extracorporeal shock waves (ESWT) in therapy of tendonitis calcarea. A prospective randomized study. *Biomed Tech (Berl)* 46: 69-74
43. Haist J (1995) Die Osteorestoration via Stoßwellenanwendung. Eine neue Möglichkeit zur Therapie der gestörten knöchernen Konsolidierung. In: Chaussy

- C, Eisenberger F, Jocham D, Wilbert D (Hrsg.) Die Stoßwelle – Forschung und Klinik. Tübingen: Attempto: 157-161
44. Haist J, Steeger D, Witzsch U, Bürger RA, Haist U (1992) The extracorporeal shock wave therapy in the treatment of disturbed bone union. 7th Int. Conference on biomedical engineering, Singapoure, 222-224
45. Haupt G (1997) Use of extracorporeal shock waves in the treatment of pseudarthrosis, tendinopathy and other orthopedic diseases. *J Urol* 158: 4-11
46. Haupt G, Haupt A, Ekkernkamp A, Gerety B, Chvapil M (1992) Influence of shock waves on fracture healing. *Urology* 39: 529-532
47. Haupt G, Katzmeier P (1995) Anwendung der hochenergetischen extrakorporalen Stoßwellentherapie bei Pseudarthrosen, Tendinosis calcarea der Schulter und Ansatzentendinosen (Fersensporn, Epicondylitis). In: Chaussy C, Eisenberger F, Jocham D, Wilbert D (Hrsg.) Die Stoßwelle – Forschung und Klinik. Tübingen: Attempto: 143-146
48. Hausdorf J, Maier M (2006) Extracorporeal shock waves and bone – can we shock the cells into growth? *Future Rheumatology* 1:1-4
49. Heller KD, Niethard FU (1998) Der Einsatz der extrakorporalen Stoßwellentherapie in der Orthopädie – eine Metaanalyse. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 136: 390-401
50. Howard D, Sturtevant B (1995) In vitro study of the mechanical effects of shock-wave lithotripsy. *Ultrasound Med Biol* 23: 1107-1122
51. Huber P, Jochle K, Debus J (1998) Influence of shock wave pressure amplitude and pulse repetition frequency on the lifespan, size and number of transient cavities in the field of an electromagnetic lithotripter. *Phys Med Biol* 43: 3113-3128
52. Ikeda K, Tomita K, Takayama K (1999) Application of extracorporeal shock wave on bone: preliminary report. *J Trauma* 47: 946-950

53. Johannes EJ, Kaulesar Sukul DM, Matura E (1994) High-energy shock waves for the treatment of nonunions – experiments on dogs. *J Surg Res* 57: 246-252
54. Kaulesar Sukul DM, Johannes EJ, Pierik E, van Eijck G, Kristelijn M (1993) The effect of high energy shock waves focused on cortical bone: an in vitro study. *J Surg Res* 54: 46-51
55. Köhrmann KU, Rassweiler J, Fröhner S, Raab M, Marlinghaus EH, Back W, Jaschke W, Alken P (1992) Stoßwelleninduzierte Nierenläsion am Hundemodell: Einfluß von Generatorspannung und Stoßwellenzahl im Akutversuch. *Akt Urol* 23: 169-178
56. Krause H (1997) Physik und Technik medizinischer Stosswellensysteme. In: Rompe JD (Hrsg.) Extrakorporale Stosswellentherapie. Chapman & Hall, Weinheim, 15-34
57. Kuner EH, Berwarth H, Lücke SV (1996) Behandlungsprinzipien bei aseptischen Pseudarthrosen. *Orthopäde* 25: 394-404
58. Loew M, Jurgowski W, Thomsen M (1995) Effect of extracorporeal shockwave therapy on tendinosis calcarea of the shoulder. A preliminary report. *Urologe* 34: 49-53
59. Maier M (2001) Untersuchungen zur Applikation extrakorporaler Stoßwellen am Knochen des Kaninchens. Habilitationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universität, München
60. Maier M, Hausdorf J, Tischer T, Milz S, Weiler C, Refior HJ, Schmitz C (2004) Knochenneubildung durch extrakorporale Stosswellen. Einfluss der Energieflussdichte. *Orthopäde* 33: 1401-1409
61. Maier M, Milz S, Wirtz DC, Rompe JD, Schmitz C (2002(a)) Grundlagenforschung zur Applikation extrakorporaler Stoßwellen am Stütz- und Bewegungsapparat. Eine Standortbestimmung. *Orthopäde* 31: 667-677
62. Maier M, Milz S, Tischer T, Münzing W, Manthey N, Stäbler A, Holzknicht N, Weiler C, Nerlich A, Refior HJ, Schmitz C (2002(b)) Influence of extracorporeal

- shock-wave application on normal bone in an animal model in vivo. Scintigraphy, MRI and histopathology. *JBJS Br* 84: 592-599
63. Maier M, Saisu T, Beckmann J, Delius M, Grimm F, Hupertz V, Milz S, Nerlich A, Refior HJ, Schmitz C, Ueberle F, Weiler C, Messmer K (2001) Impaired tensile strength after shock wave application in an animal model of tendon calcification. *Ultrasound Med Biol* 27: 665-671
64. Maier M, Ueberle F, Rupprecht G (1998) Physikalische Grundlagen extrakorporaler Stosswellen. *Biomed Tech (Berl)* 43: 269-274
65. Malluche HH, Faugere M (1986) Atlas of mineralized bone histology. Karger, Basel New York, 26-27
66. Mc Cormack D, Lane H, Mc Elwain J (1996) The osteogenic potential of extracorporeal shock wave therapy. An in-vivo study. *Ir. J Med. Sci.* 165: 20-22.
67. Milz S (1993) Morphologie der subchondralen Spongiosa und der subchondralen Mineralisierungszone des Tibiaplateaus. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München
68. Müller M (1990) Dornier Lithotripter im Vergleich. Messungen von Stosswellenfeldern und Fragmentationseffekten. *Biomed Tech (Berl)* 35: 250-262
69. Ogden JA, Toth-Kischkat A, Schultheiss R (2001) Principles of shock wave therapy. *Clin Orthop* 387: 8-17
70. Park SH, Park JB, Weinstein JN, Loening S (1991) Application of extracorporeal shock wave lithotripter (ECSWL) in orthopedics. I. Foundations and overview. *J Appl Biomater* 2: 115-126
71. Perren SM (1979) Physical and biological aspects of fracture healing with special reference to internal fixation. *Clin Orthop Relat Res* 138: 175-196
72. Perren SM (1993) Aktivierung der Knochenbildung durch Stosswellentherapie in der Frakturbehandlung. AO Forschungsinstitut, Davos. In: Vogel J, Eysel P, Hopf C, Rompe JD (1997(a)) Lithotripsy in non-unions of lower extremities: an alternative to surgery? In: Chaussy C, Eisenberger F, Jocham D, Wilbert DM

- (Hrsg.) High energy shock waves in Medicine. Thieme, Stuttgart New York, 129-135
73. Perren SM, Huggler A, Russenberger M, Allgöwer M, Mathys R, Schenk R, Wil-
lenegger H, Muller ME (1969) Cortical bone healing. The reaction of cortical
bone to compression. *Acta Orthop Scand* [Suppl] 125
74. Rahmzadeh und Meißner (1992) Störungen der Frakturheilung, 9. Steglitzer
Unfalltagung, Springer, Berlin Heidelberg
75. Rehn J, Lies A (1981) Die Pathogenese der Pseudarthrose, ihre Diagnostik und
Therapie. *Unfallheilkunde* 84: 1-13
76. Richter J, Schulze W, Muhr G (2000) Diapysäre Femurpseudarthrosen – nur ein
technisches Problem? *Chirurg* 71: 1098-1106
77. Romeis B (1989(a)) Anästhesie der Versuchstiere. In: Romeis B, Böck P (Hrsg.)
Mikroskopische Technik. 17. Aufl., Urban und Schwarzenberg, München – Wien
– Baltimore, 109-110
78. Romeis B (1989(b)) Einbetten in Methacrylat. In Romeis B, Böck P (Hrsg.) Mik-
roskopische Technik. 17. Aufl., Urban und Schwarzenberg, München – Wien –
Baltimore, 145-147
79. Romeis B (1989(c)) Färbemethoden für eingebettete Hartgewebeschnitte und
Dünnschliffpräparate. In Romeis B, Böck P (Hrsg.) Mikroskopische Technik. 17.
Aufl., Urban und Schwarzenberg, München – Wien – Baltimore, 553-556
80. Romeis B (1989(d)) Die mikroradiographische Technik. In Romeis B, Böck P
(Hrsg.) Mikroskopische Technik. 17. Aufl., Urban und Schwarzenberg, München
– Wien – Baltimore, 565-566
81. Rompe JD (1997) Tierexperimentelle und klinische Ergebnisse der Stosswellen-
therapie am Knochen. In: Siebert , Buch M (Hrsg.) Stoßwellenanwendung am
Knochen – Klinische und experimentelle Erfahrungen. Dr. Kovac, Hamburg, 38-
39

82. Rompe JD, Eysel P, Hopf C, Vogel J, Küllmer K (1997(a)) Extrakorporale Stoßwellenapplikation bei gestörter Knochenheilung. Eine kritische Bestandsaufnahme. *Unfallchirurg* 100: 845-849
83. Rompe JD, Küllmer K, Vogel J, Eckhardt A, Wahlmann U, Eysel P, Hopf C, Kirkpatrick CJ, Bürger R, Nafe B (1997(b)) Extrakorporale Stoßwellentherapie. Experimentelle Grundlagen, klinischer Einsatz. *Orthopäde* 26: 215-228
84. Rompe JD, Rosendahl T, Schöllner C, Theis C (2001) High-energy extracorporeal shock wave treatment of nonunions. *Clin Orthop Rel Res* 387: 102-111
85. Rosen H (1979) Compression treatment of pseudarthroses. *Clin Orthop* 138: 154
86. Runkel M, Rommels PM (2000) Pseudarthrosen. *Unfallchirurg* 103: 51-63
87. Russo S, Gigliotti S, De Durante C, Canero R, Corado B (1997) Treatment of non union with shock waves with special references to carpal scaphoid nonunion. In: Siebert W. Buch M (Hrsg.) Stoßwellenanwendung am Knochen. Dr. Kovac, Hamburg, 40-45
88. Rüter A, Mayr E (1999) Pseudarthrosen. *Chirurg* 70: 1239-1245
89. Schaden W, Fischer A, Sailler A (2001) Extracorporeal shock wave therapy of nonunion or delayed osseous union. *Clin Orthop* 387: 90-94
90. Schaden W, Kuderna H (1997) Extracorporeal shock wave therapy (ESWT) in 37 patients with non-union or delayed osseous union in diaphyseal fractures. In: Chaussy C, Eisenberger F, Jocham D, Wilbert DM (Hrsg.) High energy shock waves in Medicine. Thieme, Stuttgart New York, 121-128
91. Schaden W, Meznik A, Russe F, Pachucki A (1996) Anwendung der extrakorporalen Stosswellen-Therapie (ESWT) bei 40 Patienten mit Pseudarthrosen oder verzögerter Knochenbruchheilung. Nichtpublizierter Sonderdruck Prospekt der Firma HMT, 1-22a In: Heller und Niethard (1998)
92. Schäfer ME (1993) Cost-effective shock wave hydrophones. *J Stone Dis* 5: 73-76

93. Schenk R (1965) Zur histologischen Verarbeitung von unentkalktem Knochen. *Acta Anat* 60: 3-19
94. Schleberger R (1995) Anwendung der extrakorporalen Stoßwelle am Stütz- und Bewegungsapparat im mittelergetischen Bereich. In: Chaussy C, Eisenberger F, Jocham D, Wilbert D (Hrsg.) Die Stoßwelle – Forschung und Klinik. Tübingen: Attempto, 166-174
95. Schleberger R, Delius M, Dahmen GP, Diesch R, Schaden W, Thiele R, Vogel J (1997(a)) Orthopedic extracorporeal shock wave therapy (ESWT) – Method analysis and suggestion of a prospective study design – Consensus Report. In: Chaussy C, Eisenberger F, Jocham D, Wilbert D (Hrsg.) High energy shock waves in medicine. Thieme, Stuttgart New York, 108-111
96. Schleberger R, Diesch R, Schaden W, Rompe JD, Vogel J (1997(b)) Four-center result analysis of extracorporeal shock wave treatment (ESWT) of long bone non-unions. In: Chaussy C, Eisenberger F, Jocham D, Wilbert D (Hrsg.) High energy shock waves in medicine. Thieme, Stuttgart New York, 112-116
97. Schleberger R, Senge T (1992) Non-invasive treatment of long-bone pseudoarthrosis by shock waves (ESWL). *Arch Orthop Trauma Surg* 111: 224-227
98. Schoellner C, Rompe JD, Decking J, Heine J (2002) Die hochenergetische extrakorporale Stosswellentherapie (ESWT) bei Pseudarthrose. *Orthopäde* 31: 658-662
99. Schwartzman V, Choi SH, Schwartzman R (1990) Tibial nonunions. Treatment tactics with the Ilizarov method. *Orthopedic Clinics of North America* 21: 639-653
100. Schweiberer L, Baumgart R, Deiler St (1999) Die biologischen Bedingungen atrophier und hypertropher Pseudarthrosen am Schaftknochen. Ursachen und Erscheinungsbild. *Chirurg* 70: 1193-1201
101. Seemann O, Rassweiler J, Chvapil M, Alken P, Drach GW (1992) Effect of low dose shock wave energy on fracture healing: An experimental study. *J Endurol* 6: 219-233

102. Segmüller G, Czech O, Bekier A (1969) Die osteogene Aktivität im Bereich der Pseudarthrose langer Röhrenknochen. *Z Orthop* 106: 599-609
103. Staudenraus J (1995) In vivo Stoßwellendruckmessung – Eine Übersicht. In: Chaussy C, Eisenberger F, Jocham D, Wilbert D (Hrsg.) Die Stoßwelle – Forschung und Klinik. Tübingen: Attempto, 21-26
104. Staudenraus J, Eisenmenger W (1993) Fibre-optic probe hydrophone for ultrasonic and shock-wave measurements in water. *Ultrasonics* 31: 267-273
105. Stürmer KM (1996) Pathophysiologie der gestörten Knochenheilung. *Orthopäde* 25: 386-393
106. Stürmer KM (1987) Histomorphologie der Frakturheilung im Vergleich der Fixationsverfahren am Tibiaschaft. In: Schmit-Neuerburg KP, Stürmer KM, (Hrsg.) Die Tibiaschaftfraktur bei Erwachsenen. Springer, Berlin Heidelberg New York, 23-49
107. Stürmer KM, Scholten J (1989) Periostschädigung oder Stress-protection als Ursache der Porose im Plattenlager? Ein tierexperimenteller Rechts-Links-Versuch. *Unfallheilkd* 207: 255-256
108. Tavakkoli J, Birer A, Arefiev A, Prat F, Chapelon JY, Cathignol D (1997) A piezocomposite shock wave generator with electronic focusing capability: application for producing cavitation-induced lesions in rabbit liver. *Ultrasound Med Biol* 23: 107-115
109. Tischer T, Milz S, Anetzberger H, Müller PE, Wirtz DC, Schmitz C, Ueberle F, Maier M (2002) Extracorporeal shock waves induce ventral-periosteal new bone formation out of the focus zone – results of an in-vivo animal trial. *Z Orthop* 140: 281-285
110. Ueberle F (1997) Acoustic parameters of pressure pulse sources used in lithotripsy and pain therapy. In: Chaussy C, Eisenberger F, Jocham D, Wilbert D (Hrsg.) High energy shock waves in medicine. Thieme, Stuttgart New York, 76-85

111. Ueberle F (1998) Shock wave technology. In: Siebert W, Buch M (Hrsg.) Extracorporeal shock waves in orthopaedics. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokio, 59-87
112. Uslu MM, Bozdogan O, Guney S, Bilgili H, Kaya U, Olcay B, Korkusuz F (1999) The effect of extracorporeal shock wave treatment (ESWT) on bone defects. An experimental study. *Bull Hosp Joint Dis* 58: 114-118
113. Valchanou VD, Michailov P (1991) High energy shock waves in the treatment of delayed and nonunion of fractures. *Int Orthop* 15: 181-184
114. Vogel J, Eysel P, Hopf C, Rompe JD (1997(a)) Lithotripsy in non-unions of lower extremities: an alternative to surgery? In: Chaussy C, Eisenberger F, Jocham D, Wilbert DM (Hrsg.) High energy shock waves in Medicine. Thieme, Stuttgart New York, 129-135
115. Vogel J, Rompe JD, Hopf C, Heine J, Bürger R (1997(b)) Die hochenergetische extrakorporaler Stosswellentherapie (ESWT) in der Behandlung von Pseudarthrosen. *Z Orthop* 135: 145-149
116. Wang CJ, Chen HS, Chen CE, Yang KD (2001(a)) Treatment of nonunions of long bone fractures with shock waves. *Clin Orthop Relat Res* 387: 95-101
117. Wang CJ, Huang HY, Chen HH, Pai CH, Yang KD (2001(b)) Effect of shock waves therapy on acute fractures of the tibia: a study in a dog model. *Clin Orthop Relat Res* 387: 112-118
118. Wang CJ, Huang HY, Yang K, Wang FS, Wong M (2002) Pathomechanism of shock wave injuries on femoral artery, vein and nerve. An experimental study in dogs. *Injury* 33: 439-446
119. Wang FS, Wang CJ, Huang HJ, Chung H, Chen RF, Yang KD (2001(c)) Physical shock wave mediates membrane hyperpolarization and Ras activation für osteogenesis in human bone marrow stromal cells. *Biochem Biosphys Res Commun* 287: 648-655

120. Wang CJ, Yang KD, Wang FS, Hsu CC, Chen HH (2003) Shock wave treatment shows dose-dependent enhancement of bone mass and bone strength after fracture of the femur. *Bone* 34: 225-230
121. Weber BG, Czech O (1973) Pseudarthrosen. Huber, Bern Stuttgart Wien
122. Wess O (2001) Stoßwellen versus Druckwellen. Thieme, Stuttgart New York
123. Wess O (2004) Physikalische Grundlagen der extrakorporalen Stosswellentherapie. *J Miner Stoffwechs* 11:7-18
124. Wess O, Ueberle F, Dührssen RN, Hilcken D, Krauss W, Reuner T, Schultheiss R, Staudenraus I, Rattner M, Haaks W, Granz B (1997) 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, 59-71
125. Wirth CJ (1992) Pseudarthrosen. In: Jäger M, Wirth CJ (Hrsg.) Praxis der Orthopädie. 2. Aufl., Thieme, Stuttgart New York, 284-291
126. Wirsching RP, Eich W, Misselbeck E (1998) Langzeitergebnisse nach extrakorporaler Stosswellentherapie bei Pseudarthrosen. *Stosswelle* 1: 22-26
127. Wirsching RP, Lang P (1999) Extrakorporale Stoßwellenanwendung bei Pseudarthrosen. In: Siebert W, Buch M (Hrsg.)(2001) Extrakorporale Stoßwellentherapie in der Orthopädie. Grundlagen und Anwendung. Ecomed Verlagsgesellschaft AG & Co. KG, 205-225
128. Wiss DA, Stetson WB (1994) Nonunion of the tibia treated with a reamed intramedullary nail. *J Orthop Trauma* 8: 189-194
129. Wu CC, Shih CH (1992) Treatment of 84 cases of femoral non-union. *Acta Orthop Scand* 63: 57-60
130. Younger EM, Chapman MW (1989) Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 3: 192-195

131. Zhong P, Cioanta I, Cocks FH, Preminger GM (1997) Inertial cavitation and associated acoustic emission produced during electrohydraulic shock wave lithotripsy. *J Acoust Soc Am* 101: 2940-2950

Anhang

Aufbereitung der Präparate

Stufenweise Methylmethacrylat (MMA)-Einbettung

(nach Romeis 1989(b), Schenk (1965), Milz 1993)

28 Tage in 100%igen Methanol fixierte Präparate

1. 70% EtOH in Aqua dest. für 3 Tage bei Raumtemperatur
2. 90% EtOH in Aqua dest. für 3 Tage bei Raumtemperatur
3. 100% MetOH in Aqua dest. für 3 Tage bei Raumtemperatur
4. 100% MethOH in Aqua dest. für 3 Tage bei Raumtemperatur
5. 100% MMA für 3 – 4 Tage bei Raumtemperatur (Vakuumverschluss für 30 min.)
6. 100% MMA für 3 – 4 Tage bei Raumtemperatur (Vakuumverschluss für 30 min.)
7. MMA-Einbettgemisch* 4 Tage (Vakuumverschluss für 30 Minuten) bei +4° C
8. Neues MMA-Einbettgemisch und Polymerisation im Wasserbad bei +28° C (im Wärmeschrank) für 28 Tage
9. Vollständige Aushärtung bei 37° C im Brutschrank für 7 Tage

* Methylmethacrylat (MMA)-Einbettgemisch

(nach Romeis 1989(b) und Schenk 1965)

Methylmethacrylat (Merck 8.00590.2500)	100 ml (Grundkunststoff)
Nonylphenyl-polyethyleneglycol acetate (Fluka 74432)	18 ml (Weichmacher)
Benzoylperoxid – wasserfrei (Merck 8.01641.0250)	3 g (Katalysator)

Das Benzoylperoxid muss vor der Zugabe getrocknet werden, da es im Lieferzustand ca. 25% Wasser enthält. Die Trocknung kann bei niedriger Temperatur im Wärmeschrank oder bei Raumtemperatur im Vakuum erfolgen. Getrocknetes Benzoylperoxid ist explosionsgefährlich und sollte daher möglichst frisch zubereitet werden.

Die Ingredienzien in der angegebenen Reihenfolge in einem Erlenmeyerkolben auf dem Magnetrührer (Rühdauer: circa 30 Minuten) vermischen, bis sich das Benzoylperoxid vollständig gelöst hat. Nicht benötigtes MMA kann im Kühlschrank für einige Wochen aufbewahrt werden.

Protokoll der Färbetechnik

Paragon-Färbung

(nach Romeis 1989(c))

1. Schliffpräparat für 3 Minuten mit 0,1%iger Ameisensäure anätzen, kurz mit destilliertem Wasser abspülen und für 60 – 90 Minuten in 40%iges Methanol legen.
2. Spülen in destilliertem Wasser.
3. 4 Minuten in bereits auf 60° C vorgewärmte Farbstofflösung** in den Brutschrank stellen.
4. In destilliertem Wasser spülen und die Färbung mikroskopisch kontrollieren, je nach Ergebnis weiterfärben, evtl. in 70%igen Ethanol differenzieren und trocken tupfen.
5. Kurz in reinem Xylol schwenken und trocknen lassen.
6. Mit einer Presse die gefärbten Schnitte circa 14 Tage glatt und trocken pressen und mit Eukitt (O. Kindler GmbH & Co, Freiburg, Deutschland) auf Objektträgern (Elka 50, No. 2406/1, 76 x 26 mm, mit Mattstreifen) eindeckeln.

** Paragon-Farbstofflösung

0,73 g Toluidinblau (Sigma C.I. 52040 Basic Blue 17)

0,27 g basisches Fuchsin (Chroma 1A 308, C.I. 42510, S. Nr. 780)

Das Toluidinblau und das Fuchsin werden in 100 ml EtOH 100% auf dem Magnetrührer gelöst und in einer dunklen Flasche aufbewahrt. Der pH-Wert wird durch Zugabe von N NaOH auf pH = 6 – 7 eingestellt, um auch eine Anfärbung der mineralisierten Matrix (zartrosa bis rot-violett) zu erreichen. Das Weichgewebe stellt sich mit

einer stärkeren Anfärbung (blau-violett) dar und hebt sich so mit ihrer deutlich anderen optischen Beschaffenheit vom Knochen ab.

Protokoll der Entwicklung von Mikroradiografien (MRG)

1. Unter Decken-Rotlicht die MMA-Schnitte auf der beschichteten Seite der Mikroradiografieplatten (AGFA 595204, FL5 HD 5 x 4 cm) befestigen und vorsichtig in ein Papierkuvert eintüten.
2. Belichtungszeit (gültig für 100 µm dicke Knochenschnitte, die in MMA eingebettet sind) der Mikroradiografieplatten im Faxitron (Cabinet X-Ray-System, Faxitron Series, Hewlett Packard, USA): 100 Minuten bei einer eingestellten Geräteleistung von 21 kV und 2 mA
3. Solange der Fixiervorgang nicht beendet ist nur Decken-Rotlicht verwenden!
3. MRG-Entwicklerflüssigkeit herstellen: im Verhältnis 1:4 (50 ml Agfa 282c Entwickler + 200 ml H₂O)
4. MRG-Fixierflüssigkeit herstellen: im Verhältnis 1:4 (50 ml AGFA G 333c Fixierkonzentrat + 200 ml H₂O)
5. Entwicklung der Fotoplatten: Jeweils nur eine Platte für 15 – 20 Minuten bei 20° C mit der beschichteten Seite nach oben in das Entwicklerbad geben und ständig in Bewegung halten.
6. Kurzes Stoppbad in Leitungswasser.
7. Fixiervorgang der Fotoplatten: Jeweils nur eine Platte für 10 – 15 Minuten bei 20° C mit der beschichteten Seite nach oben in das Entwicklerbad geben und ständig in Bewegung halten.
8. Fließend wässern für mindestens 20 Minuten und mit Aqua dest. abspülen.
9. Im Wärmeschrank trocknen und danach mit Glasschreiber auf der beschichteten Seite beschriften.

Tabellarische Gesamtauswertung

Tier	233	233	1181	1181
Klinische Evaluation	straffe PA		keine PA	
Radiologie	komplette Durchbauung		komplette Durchbauung	
Bindegewebe im Bruchspalt	kein		kein	
Reaktionstyp der Knochenneubildung	deutlich + vollständig		deutlich + vollständig	
Kallus (Lokalisation+Ausmaß)	endostal periostal	> 66% > 66%	endostal periostal	> 66% > 66%
Bruchspaltdurchbauung	komplett		komplett	
Art des Kallus	normotroph		hypertroph	
Kallusbildung	gering		deutlich	
Abstand der Knochen	d=4		d=4	
Mikroradiografie	233/6	23,04	1181/4	25,11
Mikroradiografie	233/10	23,34	1181/10	39,77
Mikroradiografie	233/19	10,05	1181/13	28,73
Paragonschnitt	233/9		1181/11	
MRG-Messung Mittelwert	18,81		31,2	
ESWT	nein		ja	

PA: Pseudarthrose

MRG: Mikroradiografie

ESWT: Extrakorporale Stosswellentherapie

Tier	4334	4334	3258	3258
Klinische Evaluation	instabile PA		keine PA	
Radiologie	keine Durchbauung		komplette Durchbauung	
Bindegewebe im Bruchspalt	komplett		kein	
Reaktionstyp der Knochenneubildung	keine		deutlich + vollständig	
Kallus (Lokalisation+Ausmaß)	endostal	< 33%	endostal	> 66%
	periostal	< 33%	periostal	> 66%
Bruchspaltdurchbauung	keine		komplett	
Art des Kallus	atroph		normotroph	
Kallusbildung	keine		deutlich	
Abstand der Knochen	d=4		d=3,5	
Mikroradiografie	4334/2	0	3258/16	27,56
Mikroradiografie	4334/7	5,4	3258/19	22,62
Mikroradiografie	4334/13	3,95	3258/23	15,21
Paragonschnitt	4334/9		3258/20	
MRG-Messung Mittelwert	3,12		21,8	
ESWT	nein		ja	

PA: Pseudarthrose

MRG: Mikroradiografie

ESWT: Extrakorporale Stosswellentherapie

Tier	474	474	2277	2277
Klinische Evaluation	keine PA		straffe PA	
Radiologie	partielle Durchbauung		keine Durchbauung	
Bindegewebe im Bruchspalt	partiell, < 33%		partiell, > 66%	
Reaktionstyp der Knochenneubildung	deutlich + unvollständig		deutlich + unvollständig	
Kallus (Lokalisation+Ausmaß)	endostal	> 33%+< 66%	endostal	> 66%
Bruchspaltdurchbauung	periostal	> 66%	periostal	> 33%+< 66%
Art des Kallus	partiell, dtl. Kallusbildung, kein Kontakt		keine	
Kallusbildung	hypertroph		hypertroph	
Abstand der Knochen	d=4,5		d=4	
Mikroradiografie	474/4	29,3	2277/6	29,75
Mikroradiografie	474/8	29,28	2277/11	7,32
Mikroradiografie	474/16	21,792	2277/14	22,22
Paragonschnitt	474/7		2277/10	
MRG-Messung Mittelwert	26,79		19,76	
ESWT	ja		nein	

PA: Pseudarthrose

MRG: Mikroradiografie

ESWT: Extrakorporale Stosswellentherapie

Tier	4303	4303	358	358
Klinische Evaluation	straffe PA		instabile PA	
Radiologie	partielle Durchbauung		keine Durchbauung	
Bindegewebe im Bruchspalt	partiell, > 33%+< 66%		komplett	
Reaktionstyp der Knochenneubildung	deutlich + unvollständig		keine	
Kallus (Lokalisation+Ausmaß)	endostal	> 66%	endostal	< 33%
	periostal	> 33%+< 66%	periostal	< 33%
Bruchspaltdurchbauung	keine		keine	
Art des Kallus	normotroph		atroph	
Kallusbildung	gering		keine	
Abstand der Knochen	d=4		d=4	
Mikroradiografie	4303/5	18,83	358/3	0
Mikroradiografie	4303/7	18,44	358/7	0
Mikroradiografie	4303/9	17,89	358/13	4,62
Paragonschnitt	4303/6		358/4	
MRG-Messung Mittelwert	18,22		1,54	
ESWT	nein		nein	

PA: Pseudarthrose

MRG: Mikroradiografie

ESWT: Extrakorporale Stosswellentherapie

Tier	2234	2234	3352	3352
Klinische Evaluation	straffe PA		keine PA	
Radiologie	partielle Durchbauung		partielle Durchbauung	
Bindegewebe im Bruchspalt	partiell, > 33%+< 66%		partiell, > 33%+< 66%	
Reaktionstyp der Knochenneubildung	deutlich + unvollständig		keine	
Kallus (Lokalisation+Ausmaß)	endostal	> 33%+< 66%	endostal	< 33%
Bruchspaltdurchbauung	partiell, dtl. Kallusbildung, kein Kontakt	> 66%	partiell, dtl. Kallusbildung, kein Kontakt	< 33%
Art des Kallus	hypertroph		atroph	
Kallusbildung	deutlich		gering	
Abstand der Knochen	d=4		d=3,5	
Mikroradiografie	2234/4	15,31	3352/1	1,04
Mikroradiografie	2234/6	16,76	3352/5	8,22
Mikroradiografie	2234/10	12,16	3352/11	13,4
Paragonschnitt	2234/8		3352/10	
MRG-Messung Mittelwert	14,74		7,55	
ESWT	ja		nein	

PA: Pseudarthrose

MRG: Mikroradiografie

ESWT: Extrakorporale Stosswellentherapie

Tier	2370	2370	4351	4351
Klinische Evaluation	straffe PA		straffe PA	
Radiologie	partielle Durchbauung		partielle Durchbauung	
Bindegewebe im Bruchspalt	kein		partiell, < 33%	
Reaktionstyp der Knochenneubildung	deutlich + unvollständig		deutlich + unvollständig	
Kallus (Lokalisation+Ausmaß)	endostal	> 33%+< 66%	endostal	> 66%
	periostal	> 33%+< 66%	periostal	> 66%
Bruchspaltdurchbauung	partiell, dtl. Kallusbildung, kein Kontakt		partiell, dtl. Kallusbildung, kein Kontakt	
Art des Kallus	normotroph		normotroph	
Kallusbildung	gering		gering	
Abstand der Knochen	d=3,5		d=3,5	
Mikroradiografie	2370/2	6	4351/4	7,68
Mikroradiografie	2370/10	14,89	4351/11	20,9
Mikroradiografie	2370/13	24,84	4351/14	29,15
Paragonschnitt	2370/9		4351/12	
MRG-Messung Mittelwert	15,24		19,24	
ESWT	nein		ja	

PA: Pseudarthrose

MRG: Mikroradiografie

ESWT: Extrakorporale Stosswellentherapie

Tier	2371	2371	1331	1331
Klinische Evaluation	instabile PA		keine PA	
Radiologie	keine Durchbauung		komplette Durchbauung	
Bindegewebe im Bruchspalt	partiell, > 66%		partiell, < 33%	
Reaktionstyp der Knochenneubildung	keine		deutlich + vollständig	
Kallus (Lokalisation+Ausmaß)	endostal	< 33%	endostal	> 33%+< 66%
	periostal	< 33%	periostal	> 66%
Bruchspaltdurchbauung	keine		komplett	
Art des Kallus	atroph		normotroph	
Kallusbildung	keine		deutlich	
Abstand der Knochen	d=3		d=4	
Mikroradiografie	2371/3	0	1331/2	27,3
Mikroradiografie	2371/9	0	1331/5	26,65
Mikroradiografie	2371/16	0	1331/11	0,54
Paragonschnitt				
MRG-Messung Mittelwert	0		18,16	
ESWT	nein		ja	

PA: Pseudarthrose

MRG: Mikroradiografie

ESWT: Extrakorporale Stosswellentherapie

Tab. 4: Gesamtauswertung des Untersuchungskollektivs

Einzelauswertungen

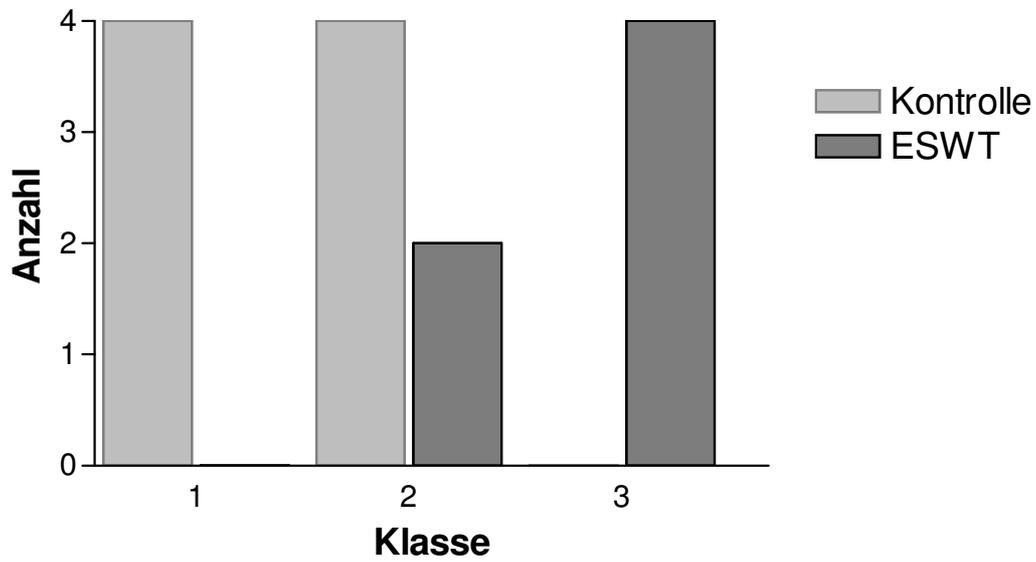


Abb. 38: Häufigkeiten der Tiere in den einzelnen Klassen für die Variable „Klinische Evaluation“

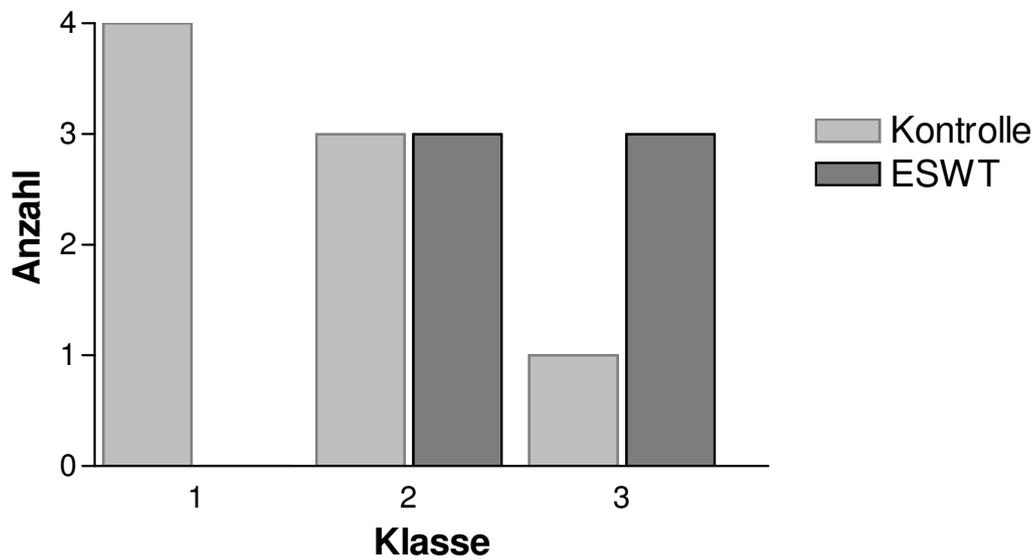


Abb. 39: Häufigkeiten der Tiere in den einzelnen Klassen für die Variable „Radiologische Untersuchung“

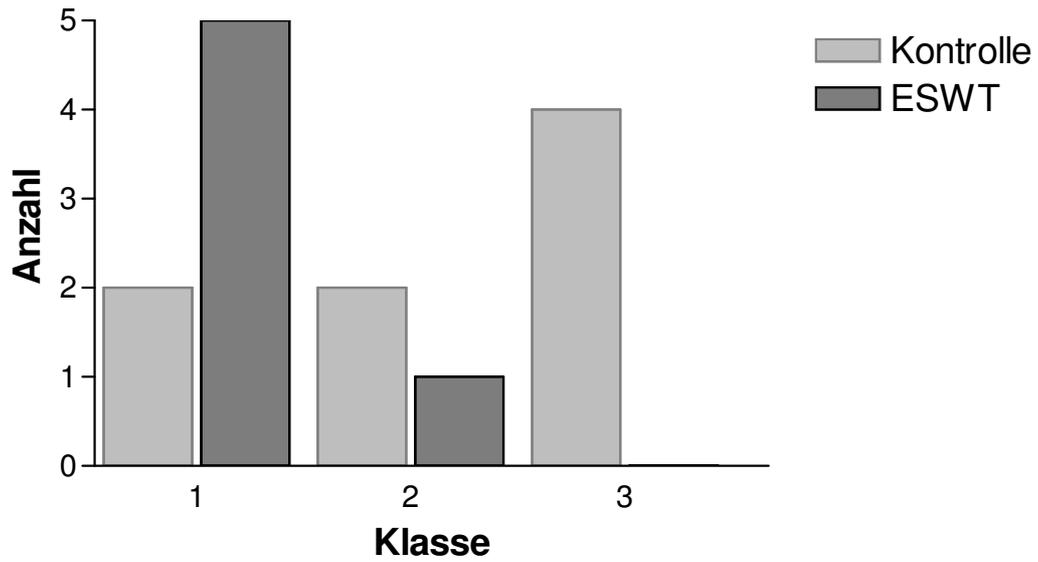


Abb. 40: Häufigkeiten der Tiere in den einzelnen Klassen für die Variable „Bindegewebsbildung“

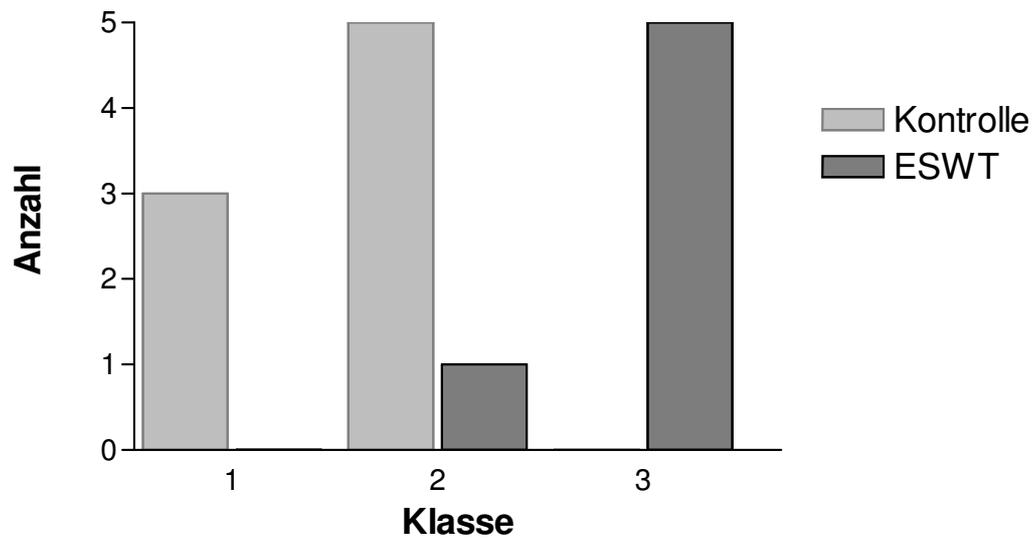


Abb. 41: Häufigkeiten der Tiere in den einzelnen Klassen für die Variable „Reaktionstyp der Kallusbildung“

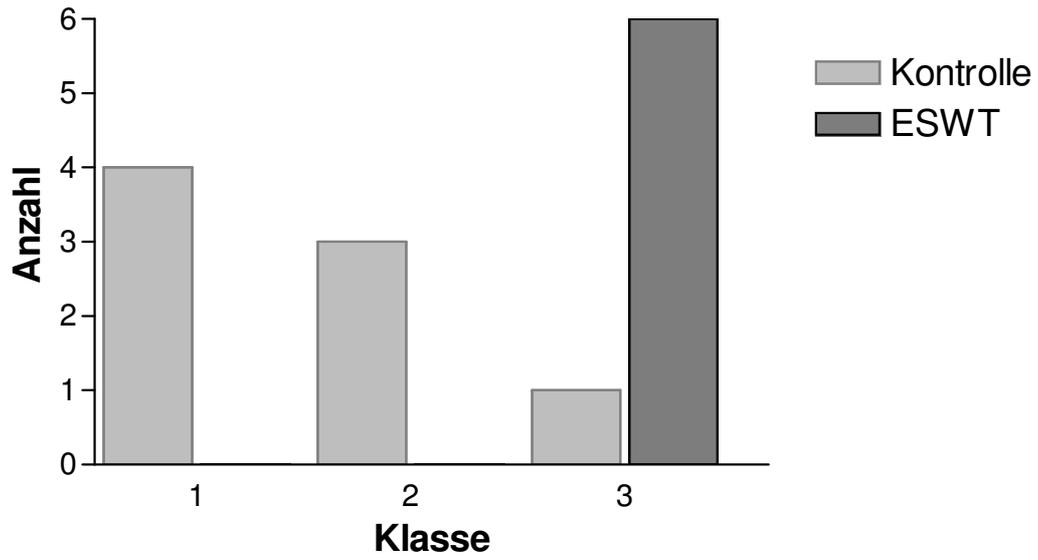


Abb. 42: Häufigkeiten der Tiere in den einzelnen Klassen für die Variable „Mittleres relatives Ausmaß der Knochenneubildung – periostal“

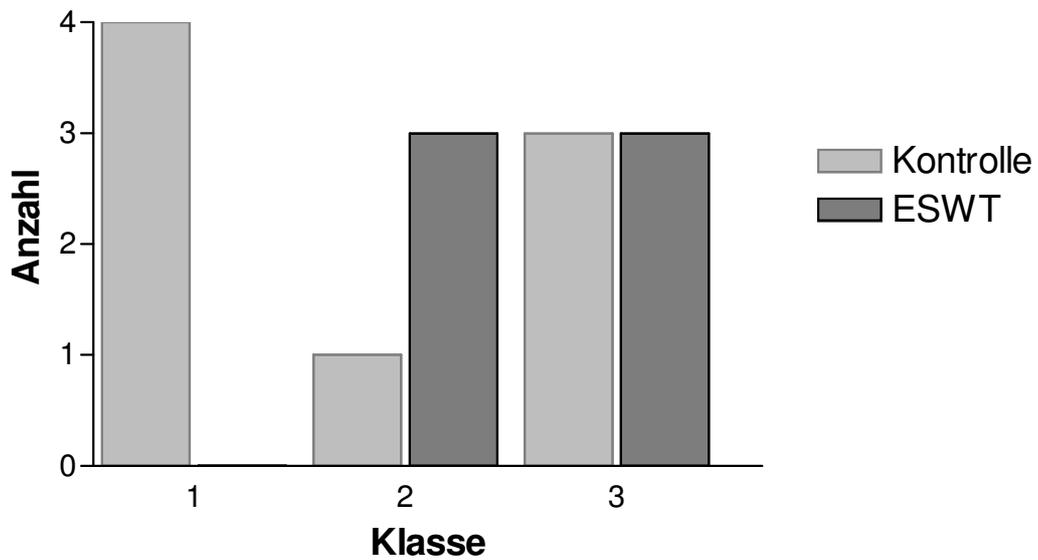


Abb. 43: Häufigkeiten der Tiere in den einzelnen Klassen für die Variable „Mittleres relatives Ausmaß der Knochenneubildung – endostal“

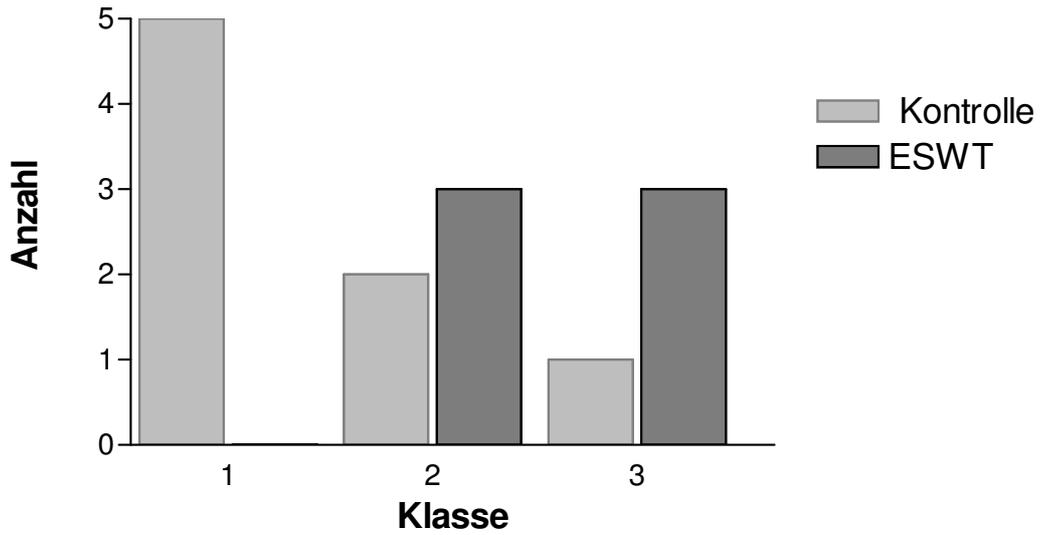


Abb. 44: Häufigkeiten der Tiere in den einzelnen Klassen für die Variable „Bruchspaltdurchbauung“

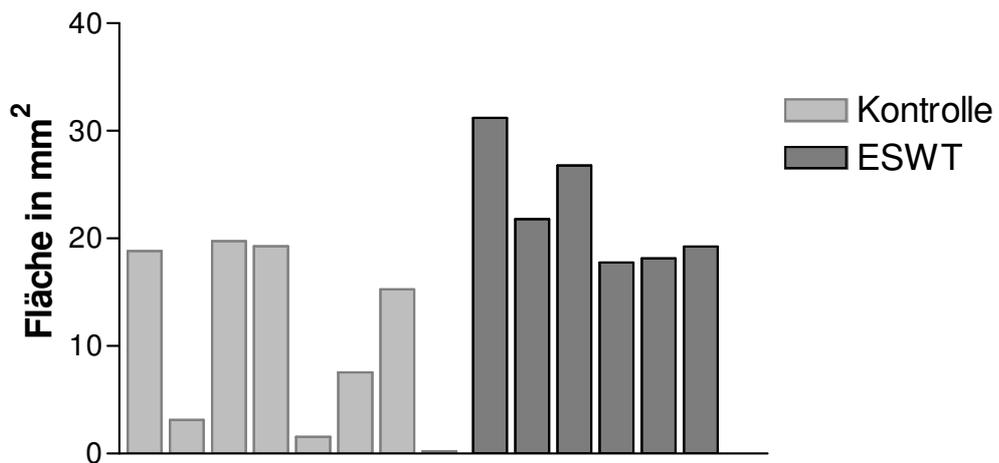


Abb. 45: Arithmetische Mittelwerte der Variable „Quantitative Flächenmessung der Knochenneubildung“ der einzelnen Tiere

Literaturübersicht über die Wirkung extrakorporaler Stosswellen auf den pathologisch veränderten Tierknochen

Tierart	Autor	Jahr	Modell + Zielregion der ESWT	Gerät	Parameter	Ergebnis
Hund	Johannes et al.	1994	Modell zur Erstellung hypertropher Pseudarthrosen (Radius)	Siemens Osteostar	4000 Impulse 0,54 mJ/mm ²	Beschleunigte Heilung
Hund	Wang et al.	2001 (b)	Frakturmodell (Tibia)	OssaTron	2000 Impulse 14 kV	Gesteigerte Kallusbildung + bessere Frakturheilung
Schaf	Ekkernkamp et al.	1992	Frakturmodell	Dornier HM3	3000 Impulse 20 kV + 24 kV	Beschleunigte Frakturheilung
Schaf	Forriol et al.	1994	Osteotomiemodell (Tibia)	Siemens Osteostar	500 Impulse 0,47 – 1,2 mJ/mm ²	Verzögerte Bruchheilung
Schaf	Augat et al.	1995	Akutes Frakturmodell (Tibia)	Dornier XL 2	300, 1000 + 3000 Impulse 12 kV + 16 kV	Keine positive Beeinflussung der Frakturheilung; Verminderung der mechanischen Stabilität
Ratte	Haupt et al.	1992	Frakturmodell (Humerus)	Dornier XL 1	500 Impulse 14 kV + 18 kV	Positive Beeinflussung der Frakturheilung + Anstieg der mechanischen Stabilität
Ratte	Seemann et al.	1992	Frakturmodell	Keine Angabe	Keine Angabe	Verzögerte Frakturheilung
Kaninchen	Mc Cormack et al.	1996	Osteotomiemodell (Radius)	Keine Angabe	Keine Angabe	Knochenneubildung, jedoch verzögerte Heilung
Kaninchen	Rompe et al.	1997 (b)	Fibulaosteotomie versus Fibuladefekt	Siemens Osteostar	1000 Impulse 0,08 + 0,28 mJ/mm ²	Anzeichen einer Osteoinduktion
Kaninchen	Uslu et al.	1999	Knochendefekt (Radius)	Elmed	1000 Impulse 14 kV	Gesteigerte Kallusbildung

Tierart	Autor	Jahr	Modell + Zielregion der ESWT	Gerät	Parameter	Ergebnis
Kaninchen	Wang et al.	2003	Frakturmodell (Femur)	OssaTron	2000 Impulse 0,18 mJ/mm ² 4000 Impulse 0,47 mJ/mm ²	Knochendichte, Knochenstärke, Kallusgröße + Kalziumgehalt signifikant höher bei 0,47mJ/mm ²
Kaninchen	Bulut et al.	2006	Nonunion-Modell (Radius)	PCK, Stonalith Smart Lithotripter	1000 Impulse 0,46 mJ/mm ²	Beschleunigte + deutlich gesteigerte Knochenneubildung

Tab. 5: Tierexperimentelle Studien zur Wirkung extrakorporaler Stosswellen auf pathologisch verändertes Knochengewebe

Literaturübersicht der klinischen Studien zur Wirkung extrakorporaler Stosswellen auf krankes Knochengewebe

Autor	Studie*	Jahr	Zielregion der ESWT	Gerät	Parameter	Fallzahl	Erfolgsquote
Valchanoou und Michailov	B	1991	Pseudarthrosen	HM3	1000 – 4000 Impulse Druck: 1000 – 1700 bar	82	85,4%
Schleberger und Senge	B	1992	Diaphysäre Pseudarthrosen	Dornier MFL 5000 HM3	2000 Impulse 18 kV	4	75%
Schleberger	D	1995	Pseudarthrosen	Dornier MFL 5000	2000 Impulse 18 kV	45	91%
Haist	C	1995	Pseudarthrosen	Keine Angabe	2000 – 10200 Impulse; unterschiedliche Impulsstärken	40	75%
Haupt und Katz-Katzmeier	D	1995	Pseudarthrosen an oberer + unterer Extremität	OssaTron HMT	3000 Impulse 28 kV (EFD = 0,35 mJ/mm ²)	30	73%
Schaden et al.	C	1996	Pseudarthrosen	OssaTron HMT	1000 – 4000 Impulse; keine Angabe zur Energie	40	55%
Vogel et al.	B	1997 (a)	Pseudarthrosen an der unteren Extremität	Siemens Osteostar	3000 Impulse 0,6 mJ/mm ²	48	60,4%
Vogel et al.	B	1997 (b)	Pseudarthrosen an oberer + unterer Extremität	Siemens Osteostar	3000 Impulse 0,6 mJ/mm ²	52	52%
Russo et al.	B	1997	Pseudarthrosen posttraumatisch + nach Osteotomie	Modulith SLV Minilith (Storz)	Variable Impulse mit 0,2 – 1,0 mJ/mm ²	125	67,2%
Rompe et al.	B	1997 (a)	Pseudarthrosen	Siemens Osteostar	3000 Impulse 0,6 mJ/mm ²	52	52%

Autor	Studie*	Jahr	Zielregion der ESWT	Gerät	Parameter	Fallzahl	Erfolgsquote
Schleberger et al.	B	1997 (b)	Pseudarthrosen an Röhrenknochen	Dornier MFL 5000 Philips IDME Siemens Osteostar OssaTron HMT Compact S	Humerus + Thigh: 2000 – 4000 Impulse 0,4-1,1 mJ/mm ² Ulna + Radius: 1000 – 2000 Impulse 0,6 mJ/mm ² Tibia: 2500 – 12000 Impulse 0,6-1,1 mJ/mm ²	185	67% (62% obere Extremität + 69% untere Extremität)
Diesch und Haupt	B	1997	Pseudarthrosen	OssaTron HMT Dornier Compact S / Philips MFL 5000	2000 – 3000 Impulse 0,3 – 0,35 mJ/mm ²	172	66%
Wirsching et al.	B	1998	Pseudarthrosen: hypertroph (H)+ atroph (A)	Keine Angabe	500 Impulse pro 5mm Knochenfissur 0,84 mJ/mm ²	115	81%, davon: H:100% A: 57%
Wirsching und Lang	B	1999	Pseudarthrosen an Becken, Femur, Tibia, Fibula, Mittelfuß, Clavicula, Humerus, Unterarm, Os naviculare, Finger	Siemens Lithostar plus Siemens Osteostar	2000 – 8000 Impulse 0,47 – 0,84 mJ/mm ²	132	70%
Beutler et al.	B	1999	Pseudarthrosen	Dornier MFL 5000	2000 Impulse 18kV	27	41%
Wang et al.	B	2001 (a)	Diaphysäre Pseudarthrosen an oberer + unterer Extremität	OssaTron	Femur + Tibia: 6000 Impulse 0,62 mJ/mm ² Humerus: 3000 Impulse 0,56 mJ/mm ² Radius + Ulna : 2000 Impulse 0,56 mJ/mm ² Metatarsus: 1000 Impulse 0,47 mJ/mm ²	55	80%
Rompe et al.	B	2001	Diaphysäre + metaphysäre PA	Siemens Osteostar	3000 Impulse 0,6 mJ/mm ²	43	72%

Autor	Studie*	Jahr	Zielregion der ESWT	Gerät	Parameter	Fallzahl	Erfolgsquote
Schaden et al.	B	2001	Pseudarthrosen oder verzögerte Bruchheilung unterschiedlicher Art	Philips	Scaphoid: 1000 – 2500 Impulse 0,25 – 0,35 mJ/mm ² Tibia + Femur: 12000 Impulse 0,4 mJ/mm ²	115	75,7%
Brandner und Späth	B	2001	Nur „echte“ Pseudarthrosen, davon 60% hypertroph (H) +40% atroph (A)	Dornier Epos-Fluoro	2000 Impulse 0,49 – 0,79 mJ/mm ²	105	84,8%, davon H: 92% A: 79%. Schmerzen ↓ in 80%
Schoellner et al.	B	2002	Pseudarthrosen	Siemens Osteostar	3000 Impulse 0,6 mJ/mm ²	43	72,1%
Biedermann et al.	B	2003	Pseudarthrosen (n=57) oder verzögerte Bruchheilung (n=16) unterschiedlicher Art	Dornier MFL 5000	2900 Impulse 0,7 mJ/mm ²	73	PA: 56%, davon H: 62% A: 50% verzögerte Bruchheilung: 93%

* Studiendesign bewertet nach den Vorgaben (Tab. 3) der „American Association for Spine Surgery“(AASS) des U.S. Department of Health and Human Services (Bigos et al. 1994).

Tab. 6: Klinische Studien zur Wirkung extrakorporaler Stosswellen auf pathologisch verändertes Knochengewebe

Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. med. Markus Maier für die Überlassung des Themas und die mir jederzeit gewährte Hilfe und Unterstützung bei Erstellung der Arbeit. PD Dr. med. Markus Maier hat mich durchweg sehr gut betreut und durch seine konstruktive Kritik meinen wissenschaftlichen Werdegang nachhaltig geprägt.

Herrn Dr. med. Jörg. Hausdorf, Oberarzt der Orthopädischen Klinik der LMU München, danke ich für die engagierte Hilfe bei der Durchführung der Arbeit und für die sehr gute Betreuung.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Ulrich Pohl, Kommissarischer Vorstand des Institutes für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Möglichkeit zur Durchführung der Untersuchungen. Durch die Arbeit an dem Institut für Chirurgische Forschung wurde mein Interesse am experimentellen Arbeiten geweckt. Herrn Professor Dr. med. Michael Delius danke ich für die Hilfe bei der Versuchsplanung.

Besonderer Dank gilt Herrn Alexander Preuss, Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Stosswellenforschung am Institut für Chirurgische Forschung, der mich in vielen praktischen Arbeiten unterstützt hat.

Zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. Reinhardt Putz, Vorstand des Lehrstuhles I der Anatomischen Anstalt der LMU, sowie Herrn PD Dr. med. Stefan Milz für und Dr. med. Thomas Tischer für die Anleitung zur Durchführung der histologischen Untersuchungen und für die jederzeit gewährte Unterstützung und Hilfe bei der Auswertung der histologischen Ergebnisse. Ferner bedanke ich mich für die praktische Unterstützung bei den histopathologischen Untersuchungen bei Frau Gisela Lippelt, MTA des anatomischen Labors.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen anderen, die mich bei der Durchführung und Ausarbeitung der Studie unterstützt haben und hier nicht genannt wurden.

Schließlich danke ich meinen Eltern, die mich während meines gesamten Medizinstudiums und bei der Erstellung der Doktorarbeit jederzeit und uneingeschränkt unterstützt haben.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Christina Dorothea Baron
Geburtsdatum/-ort: 24. August 1979, München
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung

09/ 1985 – 07/ 1989 Grundschule, München
09/ 1989 – 06/ 1998 Ludwigsgymnasium München
09/ 1996 – 12/ 1996 Auchmuty High School, Glenrothes, Fife, Schottland
06/ 1998 Allg. Hochschulreife (Ludwigsgymnasium, München)

Studium der Humanmedizin

04/ 2000 – 04/ 2002 Medizinstudium an der Philipps-Universität, Marburg
04/ 2002 Ärztliche Vorprüfung
04/ 2002 – 12/ 2006 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität,
München
04/ 2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/ 2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
12/ 2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Ärztliche Tätigkeit

Seit 11/ 2007 Innere Medizin, Asklepios Lungenfachklinik München-
Gauting

München, 2007