

**Aus dem Med. Zentrum für Orthopädie der Philipps-Universität
Marburg**

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Susanne Fuchs



**Pilotstudie zur Erfassung von durch extrakorporaler
Stoßwellentherapie (ESWT) induzierten mikroskopischen
Veränderungen im Knochen**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Medizin**

**Dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität
Marburg vorgelegt von Dominik Weller aus Hamm**

Marburg, 2005

**Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-
Universität Marburg am 20.10.2005**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. med. T. Wirth

Correferent: Univ.-Prof. Dr. med. S. Fuchs

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	2
1.1. Knochenheilung und Pseudarthrose	2
1.2. Technische Grundlagen der ESWT	5
1.3. Allgemeine Biologische Effekte durch ESWT	16
1.4. ESWT-Anwendung an Zellkulturen	18
1.5. Tierexperimentelle ESWT-Anwendung am Knochen	20
1.6. Klinische Ergebnisse der ESWT-Anwendung bei Pseudarthrose	23
2. Zielsetzung	25
3. Material und Methode	26
3.1. Versuchstiere	26
3.2. Technische Beschreibung des Lithotrypters	26
3.3. ESWT-Applikation	29
3.4. Präparation der Versuchstiere	31
3.5. Aufbereitung der Präparate	32
3.6. Mikroskopie und Datenerfassung	35
4. Ergebnisse	38
4.1. Gefäßdichte	38
4.2. Knochendicke	47
4.3. Periostveränderungen	56
4.4. Lungenveränderungen	58
5. Diskussion	61
6. Literaturverzeichnis	71
7. Zusammenfassung	80
8. Anhang	82

1. Einleitung

1.1 Knochenheilung und Pseudoarthrose

Nach einem Knochenbruch kommt es zu Blutungen aus den eröffneten Gefäßen des Knochens, der Markhöhle und des beteiligten Bindegewebes, danach zum Untergang von Knochenzellen und zu einer Schädigung der Knochengrundsubstanz.

Die Knochenheilung geht sowohl vom Periost als auch vom Endost aus und stellt sich als eine Knochenneubildung im Bruchgebiet und eine Eingliederung des neugebildeten in den vorbestehenden Knochen dar.

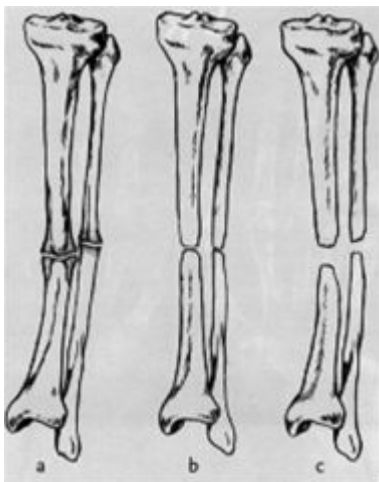
Vom Periost und Endost aus wachsen Blutgefäße und kollagenfaserbildende Bindegewebszellen in den Frakturspalt ein. Zusätzlich proliferieren die osteogenen Vorläuferzellen mesenchymaler Herkunft, die in der Nähe der inneren und äußeren Knochenoberfläche sowie in den Havers-Kanälen liegen. Von diesen Zellen wird zunächst Knorpel gebildet. Gleichzeitig werden das Blutgerinnsel und die geschädigten Zellen resorbiert. Nach Art der enchondralen Ossifikation wird neuer Knochen gebildet, d.h. der neugebildete Knorpel wird abgebaut und durch Geflechtknochen ersetzt. Aus diesem Grund kann man im Frakturgebiet gleichzeitig hyalinen Knorpel, desmale und enchondrale Ossifikation beobachten. So werden die Bruchenden durch unregelmäßige Knochenbälkchen aus unreifem Knochen verbunden.

Die Neubildung ist dabei immer überschüssig. Dieser Überschuß wird als Kallus bezeichnet.

Früher wurden Frakturen einer Druckbehandlung durch Verschraubung ausgesetzt, während man heute vor allem Frakturen mit größeren Knochendefekten auch zur Beschleunigung der Knochenheilung auf Dehnung setzt (Baumgart et al., 1994; Malevez et al., 2002). Dadurch wird durch Anregung der Bildung von Zytokinen (Transforming Growth Factor, TGF), Bone Morphogenetic Protein (BMP), Interleukinen und anderen Mediatoren die Zelldifferenzierung stimuliert (Weiss et al., 2002; Pacicca et al., 2003).

Diese komplexen Vorgänge können durch mehrere Faktoren gestört werden. Bei Instabilität, Fragmentdiastase, Knochendefekt, Knochennekrose und Infektionen ist die Bildung einer Pseudoarthrose begünstigt. Diese ist durch einen über mindestens sechs Monate persistierenden Bruchspalt definiert (Pschyrembel, 257.Aufl., 1994). Es handelt sich hierbei um eine Falschgelenkbildung durch Ausbleiben der knöchernen Heilung. Sie weist auf eine gestörte Frakturheilung hin, die durch die eben genannten Faktoren hervorgerufen sein kann. Man unterscheidet zwischen hypertrophischer und atrophischer Form der

Pseudoarthrose (Abbildung 1.1.1 nach Wehner/Sander 1981).



hypertrophische (a), atrophische (b),
Defektpseudoarthrose (c)

Die Ursache für eine hypertrophische Pseudoarthrose ist die insuffiziente Ruhigstellung bei ausreichender Durchblutung der Fragmente. Das Gewebe besitzt eine gewisse osteogenetische Potenz. Die Ursache für eine atrophische Pseudoarthrose ist die Instabilität gekoppelt mit einer Durchblutungsstörung der Fragmente. Bei ausgedehnten Defekten kann es zu einer Defektpseudoarthrose kommen.

Abb. 1.1.1:
Pseudoarthrosearten

Die Behandlung einer Pseudoarthrose kann auf mehreren Wegen erfolgen. Das konservative Vorgehen besteht in einer Ruhigstellung und weiterem Abwarten. Der Goldstandard ist neben der Schaffung einer stabilen Situation das operative Anfrischen der Frakturenenden, um einen Heilungsprozeß zu induzieren. In den letzten Jahren wurden mehreren Studien publiziert, die die extracorporale Stoßwellentherapie als weitere Therapiemöglichkeit vorschlagen. Es wird von einer Erfolgsquote von 52-83% berichtet und die ESWT als Alternative zur Operation empfohlen (Rompe et al., 1997; Haupt et al., 1997; Heller et al., 1998; Ogden et al., 2001).

1.2 Technische Grundlagen der ESWT

Stoßwellen stellen Druckimpulse dar, die sich räumlich ausbreiten. Charakteristischerweise kommt es innerhalb einer sehr kurzen Zeit zu einem deutlichen Anstieg des Druckes. Die überwiegende Zahl der medizinisch verwendeten Geräte erreicht ihr Druckmaximum innerhalb weniger Nanosekunden. Ein weiteres Charakteristikum neben dem schnellen Druckanstieg und dem sich ausbildenden Druckmaximum ist die sich an die positive Druckphase anschließende negative Druckphase

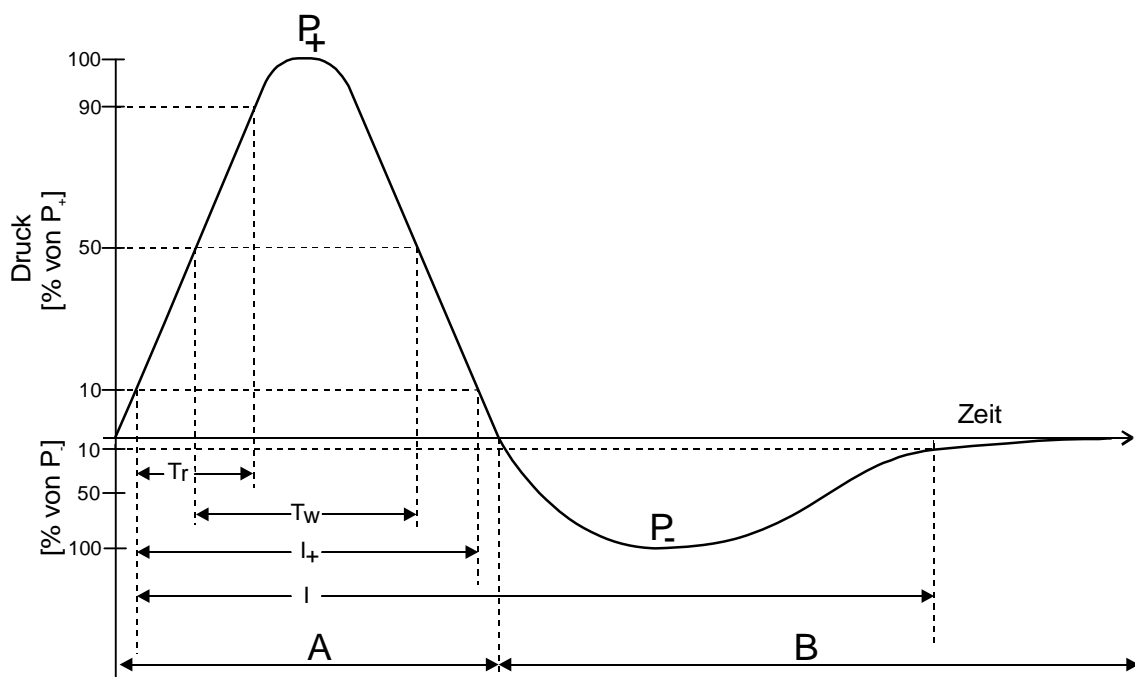


Abb. 1.2.1:

Graphische Darstellung einer standardisierten Stoßwelle. Der Druck der Stoßwelle ist als Funktion gegen die Zeit aufgetragen. Positive Druckphase (A), negative Druckphase (B), positiver Spitzendruck (P_+), negativer Spitzendruck (P_-), Anstiegszeit (T_r), Pulsbreite (T_w), Standardintervalle zur Berechnung der sogenannten „positiven Energien“ (I_+) und der sogenannten „totalen Energien“ (I)

Wie die Abbildung 1.2.1 zeigt, können prinzipiell folgende charakteristische Eigenschaften von Stoßwellen festgelegt werden (Wess et al. 1997, Ogden et al. 2001, Gerdesmeyer et al. 2002):

- Positiver Spitzendruck (P_+): P_+ definiert sich als die Differenz zwischen dem Umgebungsdruck und dem maximalen positiven Spitzendruck der Stoßwelle und kann Werte zwischen 5 MPa und 120 MPa erreichen.
- Negativer Spitzendruck (P_-): P_- definiert sich als der maximale negative Spitzendruck und erreicht Werte zwischen 10% und 20% von P_+ .
- Anstiegszeit (T_1): T_1 definiert sich als das Zeitintervall, während dessen der Druck von 10% von P_+ bis auf 90% von P_+ ansteigt und kann Werte von unter 1 ns bis 500 ns annehmen.
- Pulsbreite (T_W): T_W definiert sich als das Zeitintervall, das zwischen dem Zeitpunkt, an dem der Druck erstmals 50% von P_+ übersteigt und dem Zeitpunkt, an dem der Druck während des Abfalls innerhalb der ersten Phase der Welle unter 50% von P_+ fällt. Dieses Intervall kann Werte zwischen 200 ns und 500 ns annehmen. Man kann für T_W auch synonym den Begriff „full width half maximum (FWHM)“ benutzen. Durch die Dauer von T_W wird direkt die Energieflußdichte extracorporaler Stoßwellen beeinflusst.

Die Werte von P_+ , P_- , T_1 und T_W einer Stoßwelle ändern sich mit der benutzten Stoßwelle und deren Einstellung (Huber et al., 1998; Krause et al., 1997).

In der klinischen Anwendung benutzt man Geräte, die die akustische Energie in kleinen Arealen fokussieren, um zum einen die Wirkung im Zielgebiet zu erhöhen und zum anderen das angrenzende Gewebe zu schonen. Der Fokus ist ein dreidimensionales Stoßwellenfeld, das eine komplexe Verteilung der wirkenden Drücke im Raum und über die Zeit aufweist. Er zeigt eine

zigarrenähnliche Gestalt, die man durch Druck-Zeit-Verläufe erfassen kann. Stellt man die Flächen dar, innerhalb derer noch 50% des Spitzendrucks P_+ erreicht werden, zeigt sich ein Ellipsoid, die -6dB Isobare (Abb. 1.2.2: Ellipsoid). Die Position des positiven Spitzendrucks definiert die Lage des akustischen Fokusses.

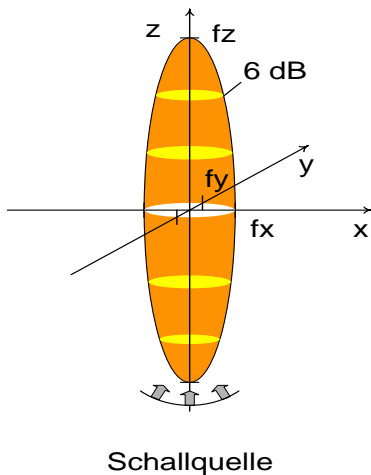


Abb. 1.2.2: Fokusgestalt, definiert als 6 dB-Druckabnahme des positiven Spitzendrucks

Zusätzlich zur -6dB Isobare kann man auch die 5 MPa Isobare bestimmen und als 5 MPa Fokus definieren (Abbildung 1.2.3). Man begnügt sich mit der Bestimmung eines 5mm Fokus, da keine Notwendigkeit besteht, genauere Foki zu bestimmen, denn die meisten aktuellen Ortungssysteme haben eine Positionierungsgenauigkeit in diesem Bereich und meist ist der zu behandelnde Bereich nicht wesentlich größer.

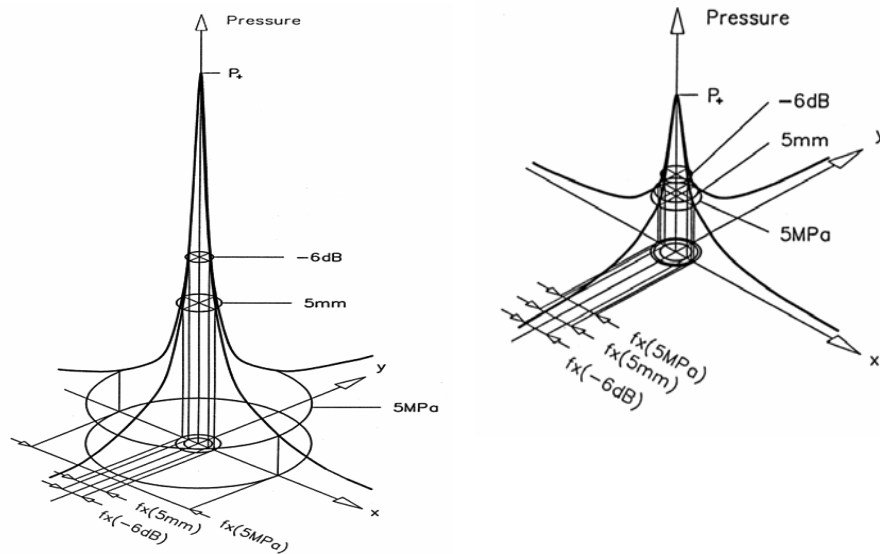


Abb. 1.2.3: Laterale Druckverteilung bei hoher Energiestufe (links) und bei niedriger Energiestufe (rechts) (Wess et al., 1997)

Um die applizierte Stoßwellenenergie zu quantifizieren, wird in den meisten neueren Publikationen die Einheit Energieflußdichte benutzt. Der Betrag der Stoßwellenenergie, den man in einem Quadratmillimeter innerhalb der Fläche der Fokuszone eines akustischen Feldes mißt, ist als Energieflußdichte definiert. Die Maßeinheit der Energieflußdichte ist Millijoule pro mm^2 [mJ/mm^2].

Im klinischen Alltag wird eine Einteilung in niederenergetische ($\text{ED} < 0,08 \text{ mJ}/\text{mm}^2$) und hochenergetische ($\text{ED} > 0,28 \text{ mJ}/\text{mm}^2$) benutzt. Diese Einteilung wurde willkürlich definiert (Rompe et al., 1997).

Es gibt mehrere Prinzipien, nach denen Stoßwellen generiert werden können. Die Gemeinsamkeit aller Verfahren besteht darin, daß ein Druckimpuls erzeugt wird, der über Koppelmedien in den Körper eingeleitet wird.

Man benutzt heute im Wesentlichen vier physikalisch-technische Verfahren, um die Stoßwellen zu erzeugen (Krause et al., 1997). In der Abbildung 1.2.4 sind die Grundprinzipien schematisch dargestellt:

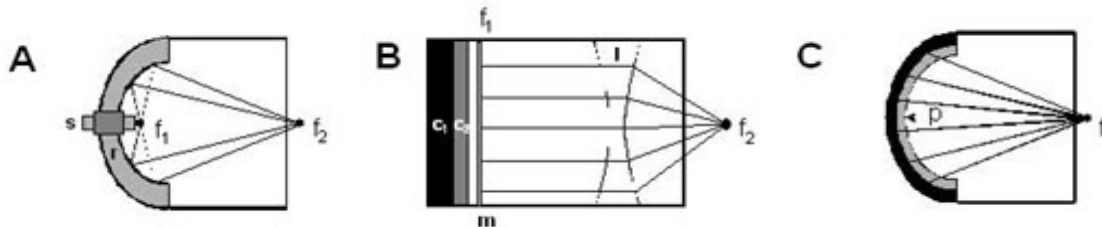


Abb.1.2.4: Elektrohydraulisches, elektromagnetisches, piezoelektrisches Prinzip

- Elektrohydraulisches Prinzip (Abb. 1.2.4A): Durch die Funkenentladung einer Elektrode entstehen Plasmablasten in dem die Elektrode umgebenden Medium, das dadurch komprimiert wird. So entstehen Druckwellen (Stoßwellen), die man über einen elliptischen Spiegel bündelt und im Brennpunkt fokussiert. Ein Nachteil ist dabei jedoch, daß man die Zündkerze aufgrund des Verschleißes nach einer bestimmten Anzahl von Entladungen auswechseln muß. Zusätzlich zeigt die Stoßwelle dieses Verfahrens eine Schwankung in Energie und Form von Schuß zu Schuß (Bailey et al., 1999). Diese ist zwar meßbar, jedoch wahrscheinlich von keiner klinischen Relevanz.
- Elektromagnetisches Prinzip (Abb. 1.2.4B): Man induziert mittels einer Flachspule Wirbelströme in einer dünnen Kupferfolie. Durch den Effekt der Lorentz-Kraft auf bewegte Ladungen wird die Folie explosionsartig ausgelenkt. Dadurch lenkt sich auch die ihr anliegende Wassersäule aus und der Impuls wird in das nächste Medium eingekoppelt und weitergeleitet. Die so entstandenen Stoßwellen fokussiert man durch eine akustische Linse.
- Piezoelektrisches Prinzip (Abb. 1.2.4C): Hier wird im Mittelpunkt einer mit Piezoaktoren ausgelegten Kugelschale durch pulsformige

Bestromung der einzelnen Piezokristalle eine Vielzahl kleine Druckimpuls emittiert. Da die Kristalle auf einer Halbschale ausgelegt sind, lassen sich die einzelnen Druckwellen in einem Fokus bündeln. (Tavakkoli et al., 1997).

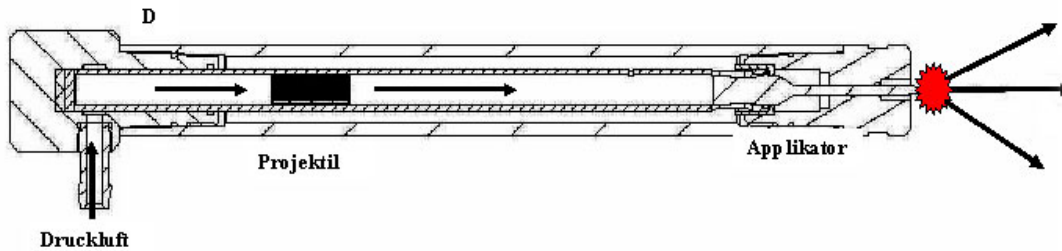


Abb. 1.2.4D: Ballistisches Prinzip

- Ballistisches Prinzip (Abb. 1.2.4D): Man beschleunigt ein Projektil in einem Lauf mittels hoher Preßluft in kurzer Zeit sehr stark. Wie eine Pistolenkugel trifft es auf einen Applikator, durch den der Energieimpuls in das Gewebe eingekoppelt wird. Ein Problem dieses Verfahrens besteht darin, daß die Spitze des Applikators den Fokus darstellt, sich die Stoßwellen von der Spitze radiär ausbreiten, also keine Fokussierung möglich ist. Aufgrund dieser radiären Ausbreitung lassen Druck und Energiedichte bei der ballistischen Erzeugung stetig nach. Deshalb kann man z.B. eine Pseudoarthrose, die tiefer im Gewebe lokalisiert ist, nicht behandeln. Jedoch eignen sich oberflächennah gelegene Indikationen für eine Therapie durch die radiäre Stoßwelle.

Da bislang nicht beschrieben werden konnte, welcher Parameter für die biologischen Effekte und klinischen Ergebnisse von Bedeutung ist, kann kein Prinzip für die medizinische Anwendung favorisiert werden (Haake et al. 2002). Für eine optimale Vergleichbarkeit sollten deshalb möglichst viele Parameter angegeben werden.

Die Stoßwelle muß, wie schon erwähnt, in das Gewebe eingekoppelt werden. Für diesen Zweck wurden mögliche Agenzien, wie z.B. Vaseline, Instillagel und handelsübliches Ultraschallgel, untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß das Ultraschallgel am Besten geeignet ist (Cartledge et al., 2001).

Um die Einkopplung der Stoßwellen in das Gewebe zu erleichtern, werden diese in der Regel in Wasser erzeugt. Die Ausbreitung der Stoßwelle im Gewebe ist durch ein Phänomen gekennzeichnet, das „Aufsteilung“ genannt wird. Es bedingt die sehr steile und kurze Anstiegszeit bis zum Erreichen des Druckmaximums der Stoßwelle. Es entsteht durch eine asymmetrische Dämpfung einzelner Frequenzanteile der Stoßwellenfront und durch die temperatur- und druckabhängigen Schalleitungsgeschwindigkeiten. Die Schallgeschwindigkeit entwickelt sich proportional zur Dichte des durchschallten Mediums. Das bedeutet in der Anwendung, daß frühere Anteile der Schalldruckfront das Gewebe verdichten und erwärmen. Dadurch laufen die späteren Anteile der Schalldruckfront beschleunigt und holen die früheren Anteile ein. Durch diese unterschiedliche Dämpfung einzelner Stoßwellenanteile, die zusätzlich von einer lokalen Phasengeschwindigkeit abhängt, kommt es zu einer immer größer werdenden asymmetrischen Verformung und zu einer weiteren Aufsteilung des Druckimpulses. Die typische Gestalt einer Stoßwelle bildet sich aus (Staudenraus et al., 1995). Im akustischen Fokus bildet sich dann die typische Wellenkonfiguration mit steiler Anstiegsflanke und flacherer Druckabfallflanke der Stoßwelle aus. Hinter dem Fokus setzt die sogenannte „Defokussierung“ ein, da die einzelnen Druckpulsanteile unterschiedlicher Frequenz und Intensität wieder auseinander laufen.

Ein entscheidender physikalischer Parameter für die Wirkung der Stoßwelle ist die akustische Schallkennimpedanz oder auch kurz Impedanz genannt. Die Impedanz ist der Schalleitungswiderstand, der der Schallausbreitung entgegenwirkt und gewebetypisch ist. Die Einheit ist in Ns/m^3 anzugeben. Wenn eine Schallwelle auf die Trennfläche zwischen zwei Ausbreitungsmedien, z.B. Luft und Wasser oder Muskel und Kalkdepot, trifft, findet dort eine Beeinflussung, die der Größe des Impedanzsprunges proportional ist, statt.

Die Grenzflächen beeinflussen die durchlaufende Druckwelle dem Winkel des Auftreffens entsprechend im Sinn einer Reflexion und Beugung. Deshalb wird nicht die gesamte Energie fortgeleitet (Krause et al., 1997). Es kommt stattdessen zu einer Transformation akustischer zu mechanischer Energie, deren Effekte in einer Kalkdepotdesintegration, Steinertrümmerung und Trabekelfrakturen bestehen können (Granz et al., 1992; Loew et al., 1995; Lokhandwalla et al., 2000). Der Anteil akustischer Energie, der zu mechanischer transformiert wird, wird sowohl von der Größe des Impedanzsprunges als auch von dessen Art ab. Eine Druckwelle, die z.B. durch Wasser ($1,49 \text{ Ns/m}^3$) läuft und auf einen Nierenstein (bis zu 15 Ns/m^3) trifft, behält einen Großteil ihrer Energie. Auf der Rückseite tritt jedoch der umkehrte Fall ein. Trifft eine Druckwelle aus einem Gewebe mit hoher Impedanz (z.B. Nierenstein [bis zu 15 Ns/m^3]) in ein Gewebe niedriger Impedanz (z.B. Muskel [$1,74 \text{ Ns/m}^3$]) wird ein Großteil der akustischen Energie reflektiert, erfährt eine Phasenumkehr und kumuliert mit dem nachfolgenden späteren Anteil der Stoßwelle (Ueberle et al., 1997). Aus diesem Grund wird klar, daß die stoßwelleninduzierten Effekte auf der Seite zu sehen sind, die der Schallquelle abgewandt ist. Ein weiterer Grund besteht in der Schallbeugung. Durch diesen Effekt werden die Schallwellen, die an einem Nierenstein oder Kalkkonkrement vorbeilaufen, zu dem Gewebe mit der höheren Impedanz hin

gebogen. Dies trägt zur Fokussierung der Schallwellen auf der Rückseite des Gewebes mit der höheren Impedanz bei (Staudenraus et al., 1995).

Aufgrund der bisher beschriebenen Erzeugungsmechanismen und den physikalischen Eigenschaften der Stoßwellen sieht man, daß sie entweder direkt oder indirekt wirken (Delacretaz et al., 1995; Howard et al., 1997; Zhong et al., 1997). Man muß von drei Wirkmechanismen ausgehen, von denen die thermischen und chemischen Effekte zu vernachlässigen sind. In erster Linie wirken Stoßwellen mechanisch. Um aber überhaupt wirken zu können, muß die erzeugte akustische Energie in mechanische, thermische oder chemische umgewandelt werden. Eine Grundvoraussetzung für eine derartige Umwandlung besteht jedoch darin, daß Gewebe mit verschiedener Impedanz durchschallt werden. Wie aus der klinischen Anwendung in der Nierensteinlithotripsie und der Behandlung der Tendinitis calcarea bereits bekannt ist, ist die direkte mechanische Wirkung direkt proportional zur Größe des Impedanzunterschiedes (Steinbach et al., 1993; Loew et al., 1995; Howard et al., 1997). Die aufgrund der hohen Druckamplituden und der Wechselwirkung zwischen Kompression und Dekompression bestehenden thermischen Effekte sind zu vernachlässigen, da die Temperaturerhöhung unter starker lokaler Druckzunahme zwar experimentell meßbar, aber von nur extrem kurzer Dauer ist.

Den indirekten Wirkmechanismen ist die Induktion von Kavitation zuzuordnen (Delius et al., 1998; Bailey et al., 1999). Aufgrund der oben erwähnten auftretenden negativen Drücke bilden sich in der durchschallten Flüssigkeit gasgefüllte Blasen. Sind die Kohäsionskräfte des durchschallten Mediums geringer als der im Zuganteil der Stoßwelle auftretende Negativdruck, reichen bereits wenige MPa aus, um Unterdruckhöhlräume zu schaffen. Durch diesen Unterdruck kommt es am Rand der Kavitationsblase zum Verdampfen der

anliegenden Flüssigkeit, so daß die Blase noch an Größe zunehmen kann. So können in Wasser Kavitationsblasen mehrerer Millimeter Durchmesser geschaffen werden. Nachdem die Druckwelle das Gebiet passiert hat, kommt es durch die Normalisierung der Druckverhältnisse zu einem Kollaps der Blase. Aufgrund der meistens auftretenden Asymmetrie des Kollapses treten Hochgeschwindigkeitsflüssigkeitsströme mit bis zu 800 m/s (jet-stream) auf (Zhong et al., 1997). Je nach Applikationsfrequenz kann man den Kollaps forcieren. Durch sehr hohe Frequenzen erreicht man, daß die von der vorausgehenden Stoßwelle geschaffene Blase noch nicht kollabiert ist, wenn sie von der nächsten Druckwelle erreicht wird (Delius et al., 1990; Delacretaz et al., 1995; Ueberle et al., 1997). In dieser Situation wird die Blase innerhalb kürzester Zeit zum Kollaps gezwungen, sie wird förmlich „zusammengeschossen“. Die aufgrund dieses forcierten asymmetrischen Kollapses entstehenden Jet-streams sind deutlich ausgeprägter und besitzen einen dementsprechenden lokal destruierenden Effekt (Huber et al., 1998; Greenstein et al., 1999).

Zusätzlich zur Kavitation gibt es noch den Mechanismus der quasistatischen Quetschung, der für Drücke über 35 MPa und Steine mit einem Radius von 15 mm oder kleiner quantitativ bewiesen wurde (Eisenmenger et al., 2001). In diesem Mechanismus entstehen die ersten Spalten parallel oder senkrecht zur Wellenrichtung. Insgesamt scheint es hiermit möglich, den Fokus zu vergrößern und die Energie zu verringern, was das Auftreten von negativen Nebeneffekten verringern kann (Eisenmenger et al., 2002).

Auch das Auftreten freier Radikale rechnet man zu den indirekten Effekten. Aufgrund der hohen Temperaturen, des großen Druckgradienten und der freigesetzten mechanischen Energie geht man davon aus, daß freie Radikale auftreten. Ähnlich des irrelevanten thermischen Effektes schreibt man ihnen

aber keine nachweisbaren klinischen oder biologischen Effekte zu (Sonden et al., 2002). Es ist bislang auch noch nicht nachgewiesen, ob diese experimentell zu beobachtenden Wirkmechanismen auf die klinische Anwendung übertragbar sind. Die direkten mechanisch zerstörenden Effekte sind unbestritten, auch wenn sie durch die sehr individuelle Anatomie eines Patienten sehr unterschiedlich ausfallen können (Brendel et al., 1987; Seidl et al., 1994). Das Zusammenwirken aller bekannten Effekte ist für das Auftreten der biologischen Wirkungen der extracorporalen Stoßwellentherapie verantwortlich.

1.3 Allgemeine biologische Effekte durch ESWT

Die primären biologischen Effekte bestehen aus der Zerstörung von Blutgefäßen, Blutungen und Thrombenbildung in Gefäßen. Das Ansteigen des Ausmaßes der Gewebedefekte bei höheren Pulszahlen und durch eine begleitende Gasbläscheninjektion läßt vermuten, daß Kavitation großen Einfluß auf die Gewebszerstörung hat. Während Schockwellen in vitro Kavitation verursachen, bewirken sie Hämorrhagien in vivo. Zwei Arten der Veränderung kann man durch konventionellen Ultraschall erkennen: Man konnte an der Schweineleber vorübergehende Veränderungen sehen, die sich auf Gasbläschen in den venösen Gefäßen zurückführen ließen und nur Mikrosekunden zu sehen waren, bevor sie vom Blutstrom fortgespült wurden, sowie bleibende Veränderungen, die erst später auftraten und minutenlang persistierten. Bei der Autopsie der Lebern fanden sich Hämorrhagien und Thromben im Strahlengang der Schockwellen. Das Auftreten der Kavitation und die Gewebedefekte lassen vermuten, daß Kavitation Gewebedefekte mitverursacht (Delius 1990, Delius 1998).

Auf das Mikrogefäßsystem haben die Stoßwellen einen vasokonstriktorischen Effekt (Brendel et al., 1987). Zusätzlich wurden an der Niere auch bleibende Schäden an der Mikrovaskularisation beobachtet. So führte die extracorporale Stoßwellentherapie zu mikroangiographischen Veränderungen, die zu einer Undichtigkeit von kortikalen, subkapsulären und medullären Gefäßen führten. Diese bewirkte eine fibrotische, kapsuläre Verdickung und eine Parenchymvernarbung, die auch Stellen der Avaskularität zur Folge hatte (Fajardo et al., 1990). An größeren Gefäßen wurden auch ernstere Schäden beobachtet: In einem Versuch an Hunden wurden Hoch-Energie-Stoßwellen auf die Femoralarterie, -vene und -nerv appliziert. Die schwersten Schäden waren an der Arterie zu beobachten. Dort waren in einigen Fällen die

Zerreißung der Media und die Ablösung von der Adventitia zu beobachten. An der Vene und dem Nerv waren die Schäden vor allem an den äußeren Strukturen und im umgebenden Gewebe zu erkennen. Dies erklärt sich durch die im Vergleich zu der Arterie vermehrte Fähigkeit, den Stoßwellen ausweichen zu können, da die Arterie im umgebenden fester verankert ist (Wang et al., 2002).

Auch eine Wachstumsverzögerung und Remission von kleinen Tiertumoren hat man bei alleiniger oder von Medikamenten begleiteter Anwendung beobachtet (Delius et al., 1989; Delius et al., 1998).

Die applizierten Schockwellen zeigen auch auf zellulärer Ebene eine Wirkung. So fügen sie den Zellorganellen Schäden zu, deren Ausmaß von der applizierten Energiemenge abhängt. Eine mögliche Auswirkung ist die Erhöhung der Membranpermeabilität. Es konnte ein Zusammenhang zwischen Stoßwellenbeschuß und der Hämolyse humaner Erythrocyten gezeigt werden, der unmittelbar von der Applikationsfrequenz abhängt. Bei geringerer Frequenz ist auch die Hämolyserate der Erythrocyten kleiner. Folgen zwei starke Schockwellen direkt aufeinander, so steigt die Hämolyserate bei der zweiten Welle deutlich an (Delius et al., 1998). Für diesen Effekt zeichnet das Phänomen der Kavitation verantwortlich.

1.4 ESWT-Anwendung an Zellkulturen

Die ersten Versuche fanden bereits im Jahre 1988 statt. Wie in den meisten Arbeitsgruppen wurden hier humane Knochenmarkszellen benutzt, die steigenden Impulszahlen von extracorporalen Stoßwellen ausgesetzt wurden. Es ist festzustellen, daß mit steigender Impulszahl eine steigende Zytotoxizität vorliegt (Yang et al., 1988). In Abhängigkeit von Impulszahl und Intensität kommt es zu einer Abnahme der Überlebensrate der behandelten Knochenzellen, wobei die Impulszahl der maßgebliche Parameter ist. Hohe Dosen bewirken kurzfristig eine Zelledestruktion und mittelfristig eine Stimulation der überlebenden Zellen.

Neuerdings wird auch der Nutzen der ESWT zur Bakterienbekämpfung überprüft (Gerdesmeyer et al., 2005). Hierbei nutzt man die zelldestruktive Wirkung aus. Diese Technik ist aber noch im experimentellen Stadium.

Während von einigen Arbeitsgruppen eine „Mindest-EFD“ postuliert wird, um Effekte auf das Knochenzellverhalten nachzuweisen (Kusnierczak et al., 2000), haben andere durch standardisierte Applikation bereits bei niedrigsten Energieflußdichten, von denen bislang keine Wirkung angenommen wurde, Veränderungen feststellen können. So nehmen mit zunehmender Energieeinwirkung und steigender Impulsanzahl Größe und Anzahl der Löcher im Zellrasen und das Ausmaß der Zellablösung zu. Ebenfalls läßt die Regenerationsfähigkeit (Wiederanwachsen, Sprouting, normale Zellform) mit steigender Energie nach (Haake et al., 1999).

An Prostatakarzinomzellen wurden Grenzwerte aufgestellt, die den Übergang zur Schädigung der Zellen anzeigen. In diesem Versuch war ein Zellverlust von bis zu 40% festzustellen. Es waren Schäden an Zellmembranen (ab

0,12mJ/mm²), Vimentin (ab 0,21mJ/mm²), Mitochondrien (ab 0,33mJ/mm²) und Kernmembranen (ab 0,5mJ/mm²) festzustellen (Steinbach et al., 1992).

Aber auch eine Stimulation konnte beobachtet werden. Bei der Behandlung mit mittlereenergetischer Stoßwelle und steigenden Impulszahlen war bis 1000 Impulse ein aktivierender Effekt zu sehen, wobei 500 Impulse die besten Resultate zur Folge hatte und über 1000 Impulse eine suppressive Wirkung eintrat. Es zeigte sich nach 5 Minuten eine Membranhyperpolarisation, nach 30 Minuten eine Ras-Aktivierung und nach 2 Tagen eine Zellproliferation. Durch Membranhyperpolarisation und Ras-Aktivierung aufgrund der ESWT wird die Differenzierung der Zellen zu osteogenetisch wirkenden verstärkt (Wang et al., 2001; Martini et al., 2003). Diese Osteogenese beinhaltet das Potential, verzögerte Frakturheilungen und Pseudoarthrosen zu therapieren.

1.5 Tierexperimentelle ESWT-Anwendung am Knochen

Man begann vor ungefähr 15 Jahren mit der tierexperimentellen ESWT-Anwendung, um den osteogenetischen Effekt näher zu untersuchen. Die Arbeitsgruppen arbeiteten mit verschiedenen Tieren, es wurden Ratten, Kaninchen, Hunde, Schafe und Schweine benutzt. Eine Fragestellung war, ob die Anwendung extracorporaler Stoßwellen eine Wachstumsverzögerung an der Epiphyse bewirkt. Es zeigte sich, daß zwar Dysplasien auftreten, diese aber nur in schweren Fällen mit einer Wachstumsverzögerung einhergehen (Yeaman et al., 1989). Im Gegensatz dazu reagiert Knorpelgewebe ohne pathologische Veränderungen (Väterlein et al., 2000). Die Versuche, die sich mit der Wirkung auf das Knochengewebe befassen, kann man in zwei Gruppen einteilen. Auf der einen Seite wurde die Wirkung auf intakten Knochen, auf der anderen Seite die Wirkung auf einen Knochendefekt untersucht. Behandelt man intakten Knochen mit hochenergetischen Stoßwellen, kann man Defekte induzieren. Die aufgetretenen Knocheneffekte reichten von abgesprengten Knochenchips bis zu kompletten Frakturen (Sukul et al., 1993; Ikeda et al., 1999). Einige Autoren beschreiben als weiteres Anzeichen für einen durch die ESWT induzierten Defekt subperiostale Blutungen. Durch die Einwirkung der Stoßwellen kommt es zu Zerreißungen von Gefäßen und dadurch zu den angesprochenen subperiostalen Hämatomen (Delius et al., 1997; Ikeda et al., 1999; Väterlein et al., 2000). Jedoch konnten einige Autoren diese Beobachtung nicht sichern. Sie konnten keine Blutungen im subperiostalen Raum sehen (Forriol et al., 1994; Benthien et al., 1999).

Um die Wirkung der Stoßwellen auf einen Knochendefekt zu untersuchen, wurde bei den Versuchstieren meist eine Osteotomie durchgeführt. Dieser Knochendefekt wurde mit Stoßwellen behandelt und beobachtet. Meist wurde er danach radiologisch und histologisch untersucht. Es zeigte sich eine stärkere Durchbauung mit Kallus und mehr unreifem Knochen (Haupt et al., 1992;

Barrios et al., 1993; Johannes et al., 1994; McCormack et al., 1996; Wang et al., 2001; Tischer et al., 2002). Auch außerhalb der Fokuszone wurde eine Knochenneubildung gesehen (Tischer et al., 2002). Die gemachten Überlegungen führen zu der Hypothese, daß die ESWT einen desorganisierenden Effekt auf die Fraktur hat und damit die inflammatorische Phase verlängert und so zu vermehrter Kallusbildung führt. Dies kann man als indirekt osteogenetische Wirkung bezeichnen (Uslu et al., 1999; Wang et al., 2001).

Es gab jedoch auch Studien, bei denen die Stoßwelle keinen (Augat et al., 1995; Benthien et al., 1999) oder sogar einen hemmenden Einfluß auf die Frakturheilung hatte. So wurde zwar neuer trabekulärer Knochen gesehen, aber die Heilung verzögert (Forriol et al., 1994).

Bei einigen Arbeiten wurden zusätzlich Blutwerte bestimmt, um zu überprüfen, ob die extracorporale Stoßwellentherapie Einfluß darauf nimmt. Man untersuchte die Erythro-, Leuko- und Thrombocyten, den Hämatokrit und den Hämoglobinwert. Zusätzlich wurden die Serumwerte der Elektrolyte, der alkalischen Phosphatase (AP), der Creatinkinase (CK), von Alaninaminotransferase (ALAT) und Aspartataminotransferase (ASAT) bestimmt. Es fanden sich alle Werte im Normbereich. Eine Erhöhung war nur bei dem Wert der Creatinkinase (CK) festzustellen, der aber auf die begleitende Muskelverletzung zurückzuführen ist (Ekkernkamp et al., 1991; Ikeda et al., 1999). Immunhistochemisch konnte eine Erhöhung von Gefäß-Endothel-Wachstums-Faktor (VEGF) und Endothel-Nitrat-Oxid-Synthetase (eNOS) beobachtet werden. Ebenso war ein Anstieg von dem nukleären Antigen proliferierender Zellen (PCNA) festzustellen (Wang et al., 2003). Diese Werte sind aber nur einmal untersucht worden und wurden nach Stoßwellen-Applikation an der Sehnen-Knochen-Verbindung gemessen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Möglichkeit von Lungenembolien bei ESWT-Behandlung. Als Ursache werden durch die ESWT-Applikation abgesprengte Knochenfragmente angenommen, die in verletzte Gefäße eingeschwemmt und dann durch den Blutkreislauf bis in die Lunge transportiert werden. Dort verlegen sie kleine Gefäße und bewirken dadurch multiple Blutstauungen, die dann konsekutiv zu Embolien führen (Maier et al., 2003). Der Autor hat seine Beobachtungen an Kaninchen gewonnen, die mit 1500 Impulsen mit einer Energieflußdichte von $0,9 \text{ mJ/mm}^2$ behandelt wurden. Die makroskopische und histologische Aufarbeitung der Präparate erfolgte nach sechs Wochen. Bei 87,5% der Versuchstiere wurde eine fleckige Verfärbung der Lungenoberfläche festgestellt und bei 75% der Tiere konnte man in der histologischen Aufarbeitung in Resorption befindliche Knochenfragmente beobachten.

An der Sehnen-Knochen-Verbindung wurden nach Applikation von Niedrig-Energie-ESWT zwar im Sehngewebe neue Gefäße gesehen, jedoch konnten in dieser Arbeit keine Veränderungen in der Knochenmatrix, der osteozytären Aktivität und der Vaskularisation im Knochen beobachtet werden (Wang et al., 2002).

1.6 Klinische Ergebnisse der ESWT-Anwendung bei Pseudarthrose

Die klinischen Studien zur Anwendung der extracorporalen Stoßwellentherapie wurden durchgeführt, nachdem die tierexperimentellen Studien erste Erfolge gezeigt hatten. Man untersuchte die Wirkung der Stoßwellen auf verschiedene orthopädische Krankheitsbilder. Die Einsatzmöglichkeiten begründeten sich sowohl auf die physikalischen Eigenschaften als auch auf die in den bisherigen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse. Man versuchte, die Epikondylitis, die Tendinitis calcarea, den Fersensporn und natürlich die Pseudarthrose zu behandeln. Bei der Tendinitis calcarea war das Kalkdepot Ziel der Stoßwellen. Die Theorie war, durch das Beschießen eine Auflösung zu erreichen.

Das in den tierexperimentellen Studien beobachtete osteogenetische Potential bildete die Grundlage für die Überlegungen, auch Patienten mit Pseudarthrosen mit der extracorporalen Stoßwellentherapie zu behandeln. Leider wurde den verschiedenen Studien ein sehr unterschiedlicher Aufbau zugrunde gelegt. Die einzelnen Arbeiten differieren in mehreren wichtigen Punkten zum Teil deutlich. Als erstes sei hier die Festlegung der Einschlußkriterien genannt. Eine Pseudarthrose liegt per definitionem vor, wenn die knöchernen Konsolidierung im Anschluß an eine Fraktur nach sechs Monaten oder länger ausgeblieben ist (Pschyrembel, 257.Aufl., 1994). Einige Studien beziehen außer den wirklichen Pseudarthrosen auch Patienten mit verzögerter Frakturheilung, das heißt mit fehlendem Frakturschluß für weniger als sechs Monate, mit ein. Teilweise wird zwischen Patienten mit hypertropher und atropher Pseudarthrose getrennt. Auch Patienten mit einer infizierten Pseudarthrose werden je nach Autor ein- oder ausgeschlossen. Zu den unterschiedlichen Einschlußkriterien kommen auch Unterschiede in der Behandlungsfrequenz. Einige Autoren behandeln die Patienten nur einmal, andere mehrmals. Auch die Anzahl und Zeitpunkte der

Nachuntersuchungen differieren voneinander. Unterschiede sind auch in der applizierten Energiemenge der Studien zu finden. Die verwendeten Energiemengen liegen zwischen 0,3 und 0,79 mJ/mm² bei 1000 bis 12000 Impulsen. Da sich die Studien in ihrem Aufbau stark voneinander unterscheiden, ist es nicht verwunderlich, daß die Autoren auch sehr unterschiedliche Ergebnisse veröffentlicht haben. Eine knöcherne Konsolidierung ist in 41 – 91% der Fälle zu beobachten (Valchanou et al., 1991; Rompe et al., 1997; Heller et al., 1998; Beutler et al., 1999; Schaden et al., 2000; Brandner et al., 2001; Ogden et al., 2001; Pigozzi et al., 2004; Liu et al., 2004).

Eine neue Studie vergleicht die Ergebnisse der Studien, in denen ESWT angewendet wurde, mit Studien, in denen eine konservative Behandlung angewendet wurde. Hier zeigt sich, daß die konservative Behandlung zu den gleichen Heilungsraten wie die ESWT kommt. Konservativ wird die jeweilige Fraktur durch Schienen oder Pflaster immobilisiert, sofern keine suffiziente interne Stabilisation vorhanden ist. Dieses Behandlungsprinzip wird auch bei allen Studien, die zusätzlich noch Stoßwellen applizieren, verwendet. Der Heilungsprozeß bei konservativer Behandlung ist häufig noch nicht abgeschlossen, es kommt vielfach auch noch nach mehr als sechs Monaten zur knöchernen Durchbauung. Obschon noch möglicherweise eine Konsolidierung zu erwarten wäre, werden viele Patienten mit ESWT behandelt. Bei diesen Studien ist es dann sehr schwierig, den möglicherweise durch die ESWT entstandenen Effekt von der regulären Heilung abzugrenzen. Es konnte leider wegen ethischer Bedenken bisher keine prospektive, randomisierte Studie durchgeführt werden, da den Patienten kein möglicher Nachteil zugemutet werden sollte (Biedermann et al., 2003).

2 Zielsetzung

Die bisherigen Arbeiten zur Wirkung der ESWT haben sehr unterschiedliche Ergebnisse geliefert. Einige Autoren wollen eine Wirkung beobachtet haben, andere nicht. Es bestehen mehrere Theorien über die Wirkungsweise der ESWT. Einige Autoren vertreten die Meinung, daß durch den Stoßwellenbeschuß die inflammatorische Phase verlängert wird und es so zu gesteigerter Kallusbildung kommt. In unseren Versuchen soll nun am Kaninchenmodell untersucht werden, ob hochenergetische ESWT z.B. durch eine Entzündung neovaskuläre Prozesse in gesundem knöchernem Gewebe induzieren kann. Hierzu wird die Gefäßdichte in Knochengewebe erfaßt.

Zusätzlich wird histologisch die Dicke des Periosts untersucht, um mögliche Knochenanbauvorgänge zu entdecken, die durch die Stoßwelle ausgelöst sein könnten.

Durch den Einsatz verschiedener Energieflußdichten, verschiedener Behandlungsintervalle und durch verschiedene Tötungszeitpunkte nach der letzten ESWT-Behandlung soll eine mögliche Dosis-Wirkungsbeziehung im Kaninchen nachgewiesen werden.

Die Zielsetzung der Arbeit lautet daher, mögliche mikroskopisch nachweisbare Effekte der extrakorporalen Stoßwellentherapie auf die Vaskularisation in dem gesunden Kaninchen nachzuweisen. Sollte sich etwas Derartiges darstellen lassen, kann diese orientierende Arbeit als Grundlage für eine größere Studie dienen.

3. Material und Methode

3.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche New Zealand White Rabbits, die sechs Monate alt waren, der Firma Charles River (Kisslegg, Deutschland) verwendet. Die Tiere hatten ein Gewicht zwischen 2700 und 3200 Gramm. Für die Dauer der Versuche wurden die Tiere bei einem zwölfstündigen Zyklus von Licht und Dunkelheit gehalten. Der Raum hatte eine Temperatur von 18° Celsius und eine relative Luftfeuchte von 50%. Die Kaninchen hatten freien Zugang zu Futter und Wasser und wurden mit der Kaninchen-Standard-Diät 20/20 der Firma Altromin ernährt.

3.2 Technische Beschreibung des Lithotrypters

Die Erzeugung von Stoßwellen kann, wie schon in der Einleitung erläutert, auf verschiedene Arten erfolgen, wobei bei allen Verfahren ein elektrischer Speicherkondensator zuerst aufgeladen und dann sehr schnell über verschiedene elektro-akustische Wandler entladen wird. In der Medizin spielen vier Erzeugungsmechanismen eine Rolle: Die elektro-hydraulische, die piezo-elektrische und die elektro-magnetische, wobei diese noch einmal in verschiedene Systeme mit Flachspulen und akustischen Linsen und solche mit Zylinderspulen und Paraboloidreflektoren unterteilt werden kann. Das verwendete Gerät der Firma Storz arbeitet nach dem elektro-magnetischen Prinzip.

Physikalisch gesehen sind extracorporale Stoßwellen energiereiche Wellen mit hoher Amplitude, die sich durch extrem kurze Anstiegszeiten auszeichnen. Die in der Medizin verwendeten akustischen Stoßwellen werden durch volumenfordernde, explosionsartig ablaufende Prozesse, wie z.B. Sprengkörperdetonationen, erzeugt. Ein derartiges, in der Natur vorkommendes Phänomen, ist z.B. der Blitzschlag, bei dem sich der Funkenkanal schlagartig aufheizt und die umgebende Luft verdrängt. Der gleichförmige Umgebungsdruck wird gestört und diese Störung als Knall- oder Stoßwelle (Donnerschlag) abgestrahlt. Charakteristisch für die Stoßwelle ist der sprunghafte Druckverlauf.

Man kann den räumlichen Druckverlauf durch die Geometrie der Anordnung beeinflussen. Das Druckfeld kann man sich als Gebirge vorstellen. Der Fokuspunkt ist durch die Spitze des Druckgebirges symbolisiert. Mit zunehmender Entfernung vom Fokus fällt der Druck mehr oder weniger steil ab. Das bedeutet, daß auch außerhalb des eigentlichen Fokus noch zum Teil erhebliche Drücke gemessen werden können, die man aufgrund ihrer beträchtlichen akustischen Energie nicht vernachlässigen darf (Storz Medical).

Der verwendete Lithotrypter Minilith SL1 der Firma Storz Medical arbeitet wie oben erwähnt nach dem elektro-magnetischen Prinzip. Die physikalischen Parameter und die Fokusburchmesser der Stoßwellenquelle wurden vor der ersten Behandlung mittels PVDF-Nadelhydrophon und Glasfaser-Laser-Hydrophon gemessen. Der -6dB -Fokusburchmesser betrug $1,9\text{ mm}$. Unter diesem Fokus wird derjenige Anteil des Stoßwellenfeldes verstanden, in dem Werte von $\geq 50\%$ des positiven Spitzendruckes gemessen werden. Der 5-MPa -Fokusburchmesser betrug $17,4\text{ mm}$ und wird als derjenige Anteil des Stoßwellenfeldes verstanden, in dem Drücke von $\geq 5\text{ MPa}$ erzielt werden. Der maximale Energiefluß (ED^+) erreichte einen Wert von $1,49\text{ mJ/mm}^2$. Die

Versuche wurden vollständig auf dieser höchsten Energiestufe durchgeführt. Alle weiteren Angaben wie die einzelnen Energiewerte in den unterschiedlichen Fokuszonen sind im Anhang A angefügt.

3.3 ESWT-Applikation

Um die ESWT-Applikation durchführen zu können, wurden die Tiere narkotisiert. Nachdem die Tiere durch eine i.m.-Injektion eines Narkosegemisches (Rompun 2% und Ketavet 100mg/ml, 1,5:2 gemischt, ca. 1,5ml/kgKG) mittels einer Kanüle anästhesiert worden waren, wurde ihnen zur weiteren Steuerung der Narkose eine Verweilkanüle in die laterale Ohrvene eingebracht und fixiert.

Das Ziel der Narkose war sowohl die Immobilisation der Kaninchen als auch die Analgesie, da die Behandlung mit der Stoßwelle bei den verwendeten Energieflußdichten bereits schmerzhaft ist.

Es wurde ein Stoßwellengerät Typ Minilith SL1 der Firma Storz Medical, Schweiz, eingesetzt. Die verwendeten Energieflußdichten ED^+ betragen einheitlich $1,49 \text{ mJ/mm}^2$. Die Tiere wurden bei ihrer Behandlung mit einer vorher festgelegten Anzahl von Impulsen in einer Frequenz von 120/Minute beschossen. Der Stoßwellengenerator des Typs Storz Minilith SL-1 wurde für diese Studie mit einer 'inline' Röntgenortung ausgestattet: Das serienmäßige 'inline' Ultraschallgerät in der zentralen zylindrische Öffnung der Stoßwellenquelle wurde durch eine spezielle Zielvorrichtung ersetzt. Die Zielvorrichtung besteht aus einem doppelten Fadenkreuz, das koaxial in der Quelle sitzt und nach dem Prinzip von Kimme und Korn den Fokuspunkt anvisiert. Mit Hilfe der Zielvorrichtung läßt sich eine bewegliche Röntgenanlage (mobiler C-Bogen) des Typs Phillips BV 25 mit dem Fokuspunkt des Stoßwellenkopfes aufeinander justieren. Aufgrund der individuellen speziellen Geometrie des verwendeten C-Bogens wurde die Länge des rückwärtigen Tubus der Zielvorrichtung angepaßt. Dadurch fällt der Fokuspunkt des Therapiekopfes

mit dem Zentrum des C-Bogens zusammen, wenn der Tubus am Gehäuse der Röntgenröhre anliegt. Durch die Feinverstellung wurde der Therapiekopf nun unter Röntgenkontrolle so ausgerichtet, daß das Röntgenbild des doppelten Fadenkreuzes zu einem einzigen auf dem Monitor verschmolz. Der Therapiefokus (Stoßwellenfokus) befand sich jetzt exakt im Zielgebiet. Mögliche Abweichungen in der Position des Zielgebietes wurden während der Stoßwellenapplikation mittels Röntgendurchleuchtung kontrolliert und korrigiert. Wenn die Zielvorrichtung mit ihrem rückseitigen Ende das Gehäuse der Röntgenröhre berührte, die Fadenkreuze als Einfachlinien zu sehen waren und das Zielgebiet im Zentrum des Fadenkreuzes erschien, befand sich es sich genau im Stoßwellenfokus. Da die axiale Fokausdehnung der Stoßwelle ca. 25 mm beträgt, konnte ein kleiner Abstand von wenigen Millimetern (< 5 mm) der Zielvorrichtung vom Röhrengehäuse ohne Einschränkung der Effektivität toleriert werden. Die Zone der höchsten Energiedichte kam somit trotzdem im Zielgebiet zu liegen.

Der rechte Femur jedes Kaninchens wurde rasiert. Er wurde manuell in den Fokus des Gerätes gebracht und dort fixiert. Während der Kontrolle wurden einige weitere Sichtkontrollen mittels Durchleuchtung durchgeführt, um die korrekte Position zu überprüfen und gegebenenfalls nachzujustieren.

3.4 Präparation der Versuchstiere

Die Präparation der Kaninchen begann mit einem medianen Bauchschnitt. Zuerst wurde sorgfältig bis auf den Hauptgefäßstrang des Bauches präpariert, um die Vena cava inferior und die Aorta abdominalis darzustellen. Die Aorta wurde zweimal angeschlungen, um die Blutzufuhr kurzzeitig zu unterbrechen, und zwischen den Schlingen wurde eine maulförmige Querinzision durchgeführt. Durch die Inzision wurde eine Kanüle eingebracht, die mit zwei Knoten gesichert wurde. Die Öffnung der Kanüle kam oberhalb der Bifurcatio zum liegen, so daß beide A. iliaca communis gespült werden konnten. Jedes Bein wurde zuerst mit 50 ml NaCl-Lösung, danach mit 40 ml Tusche-Gelatine-Lösung und schließlich mit 20 ml Glutaraldehydlösung gespült. Während des Spülvorgangs wurde das Kaninchen durch eine Überdosis Narkoselösung getötet.

Danach wurde der Femur entnommen und sorgfältig das Weichteilgewebe entfernt. Die Knochen wurden in Formalin fixiert.

Zusätzlich wurde den Versuchstieren die Lunge zur histologischen Untersuchung entnommen. Dazu wurde der Brustkorb mit einer Schere entlang des Brustbeins langstreckig eröffnet, um eine freie Sicht auf die Lunge zu erhalten. Danach wurden die Lungenarterie und -vene herznah aufgesucht und unterbunden. Zuletzt durchtrennten wir die Trachea kurz oberhalb der Lunge, um diese dann entnehmen zu können. Auch die Lunge wurde in Formalin fixiert.

3.5 Aufbereitung der Präparate

Die Fokuszone der in Formalin eingelegten Knochen wurde zur Weiterverarbeitung im ersten Schritt in 2-3 mm dicke Scheiben geschnitten und dann entwässert. Dazu bettete man sie in einer Isopropanollösung, deren Konzentration täglich um 10% erhöht wurde. Das heißt, die ersten 24 Stunden wurden die Knochenscheiben in einer 50%-Isopropanollösung eingelegt, dann 24 Stunden in einer 60%-Isopropanollösung, die nächsten 24 Stunden in einer 70%-Isopropanollösung und so weiter. In der 100%-Isopropanollösung verblieben die Knochenscheiben für 48 Stunden, wobei die Lösung aber nach 24 Stunden gewechselt wurde.

Im nächsten Schritt wurden die Knochenscheiben eingebettet. Dazu benutzte man eine Lösung aus 30% Technovit (7200VLC) der Firma Kulzer und 70% Isopropanol (100%). Nach 24 Stunden wurden die Präparate in eine Lösung aus 50% Technovit (7200VLC) und 50% Isopropanol (100%) und nach weiteren 24 Stunden in eine Lösung aus 70% Technovit (7200VLC) und 30% Isopropanol (100%) gelegt. Den Abschluß bildete für mindestens drei Tage eine Lösung aus 100% Technovit (7200VLC).

Danach wurden die Präparate mit Fixationskleber (7230) in der Ausgießform fixiert und das Gefäß mit Technovit (7200VLC) aufgefüllt. Die Probe polymerisierte in einem Histolux Lichtpolymerisationsgerät der Firma Kulzer für zehn Stunden. Danach wurde sie mit Präzisionskleber (7210) der Firma Kulzer auf einen Objektträger geklebt.

Bevor man den zweiten Objektträger aufkleben konnte, wurde die Probe angeschliffen. Nun zersägte man die Probe zwischen den Objektträgern. Der zweite Objektträger wurde bis auf 60µm heruntergeschliffen.

Im nächsten Schritt wurde die Probe zuerst poliert, um sie dann mit 0,5% Methylenblau zu färben. In der Methylenblaulösung blieb die Probe für 30 Minuten. Als letztes wurde sie mit Wasser gespült und getrocknet.

Danach war das Präparat fertig und konnte untersucht werden.

Die Lungen wurden zuerst in Paraffin (Firma Leica) eingebettet. Danach erfolgte eine Fixierung mittels einer 4%-Formalinlösung (Firma Merck) für 24 Stunden. Zur Entwässerung wurden die Lungen für jeweils eine Stunde in eine 70%-, 80%-, 90%-, 96%-, 100%-, 100%- und 100%-Isopropanollösung (Firma Merck) gelegt. Danach wurden sie dreimal für jeweils eine Stunde in Xylol (Firma Merck) gelegt und zum Abschluß zweimal für jeweils zwei Stunden wieder in Paraffin. Diese Entwässerung und Paraffindurchtränkung erfolgte im Einbettautomat Hypercenter 2 (Fa. Shandon, Frankfurt). Das Ausgießen der Proben fand im Histocenter 2 (Fa. Shandon, Frankfurt) statt. Danach wurden 5µm dicke Schnitte angefertigt, die zum Trocknen über Nacht bei 40° im Brutschrank gelagert wurden.

Für die Hämatoxillin-Eosin-Färbung erfolgte die Entparaffinierung mittels Einlegen der Proben in Xylol für dreimal 10 Minuten, dann in 98%-Isopropanol für zweimal fünf Minuten, dann in 96%-Isopropanol für zweimal fünf Minuten, dann in 90%-Isopropanol für einmal fünf Minuten und abschließend wurden die Proben mit Aqua dest. gespült.

Die Färbung erfolgte durch Hämatoxillin (Fa. Sigma) nach Mayer für fünf Minuten, danach bläuen in Leitungswasser für 10 Minuten, danach wurden die Proben erst mit Eosin (Fa. Sigma) für fünf Minuten und dann mit Aqua dest. gespült. Die abschließende Entwässerung wurde durch Einlegen kurzzeitig in

80%-Isopropanol, zweimal kurzzeitig in 96%-Isopropanol, zweimal für fünf Minuten in 98%-Isopropanol und danach dreimal für fünf Minuten in Xylol erreicht. Als letzter Schritt der Aufbereitung erfolgte das Eindecken mit Entellan (Fa. Merck).

3.6 Mikroskopie und Datenerfassung

Die fertigen Präparate wurden auf durch ESWT induzierte Veränderungen hin mikroskopisch untersucht. Das Augenmerk lag hierbei auf einer Gefäßproliferation, die auf eine gesteigerte Durchblutung hingewiesen hätte, und auf einer Dickenzunahme der Kortikalis, was auf einen Knochenanbau durch Kallusbildung hätte hinweisen können.

Für die Untersuchung wurde das Mikroskop Axiophot (Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet. Zusätzlich kam zur Datenmessung und -erfassung die Morphometrie-Software Diskus 4.15 (Hilgers, Königswinter, Deutschland) zum Einsatz.

Die Messung der Kortikalisdicke erfolgte durch vier Standardstrecken. Da der Kaninchenfemur eine charakteristische Form (s. Abb. 3.6.1) hat, die sich durch eine spornartige Muskelansatzstelle an der Außenseite, vergleichbar der Linea aspera an der humanen Femurinnenseite, auszeichnet, war es möglich, die Festlegung dadurch zu standardisieren. Da der Sporn auf der Außenseite des Knochens liegt, war er anatomisch in der Fokuszone des ESWT-Gerätes plziert und so der Stoßwellenenergie direkt ausgesetzt.

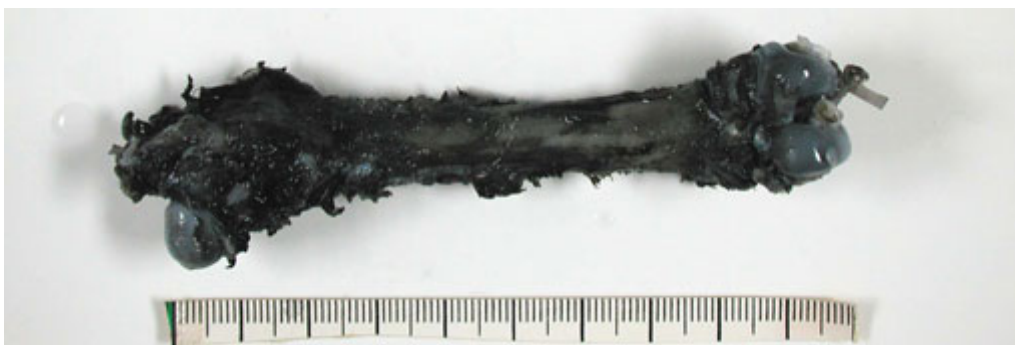


Abb. 3.6.1: Typischer Femur (Farbveränderung aufgrund der Tuschefärbung)

Die Datenerfassung durch die Morphometrie-Software unterlag einem festgelegten Muster. Das Präparat wurde zuerst in seiner Gesamtheit so dargestellt, daß der erwähnte Sporn im Bild links oben zu liegen kam.

Die erste Strecke (Strecke A) wird senkrecht durch den Sporn gelegt (s. Abb. 3.6.2). Die zweite Strecke (Strecke B) liegt der ersten genau gegenüber und ebenfalls senkrecht durch die Kortikalis. Im rechten Winkel zu der Ebene der ersten beiden Strecken liegt die dritte Strecke (Strecke C) auf der linken Seite des Knochens senkrecht zur Kortikalis und die vierte Strecke (Strecke D) dieser genau gegenüber, so daß die zwei Ebenen ein Kreuz ergeben. Die Länge jeder einzelnen Strecke wurde durch die Software bestimmt.

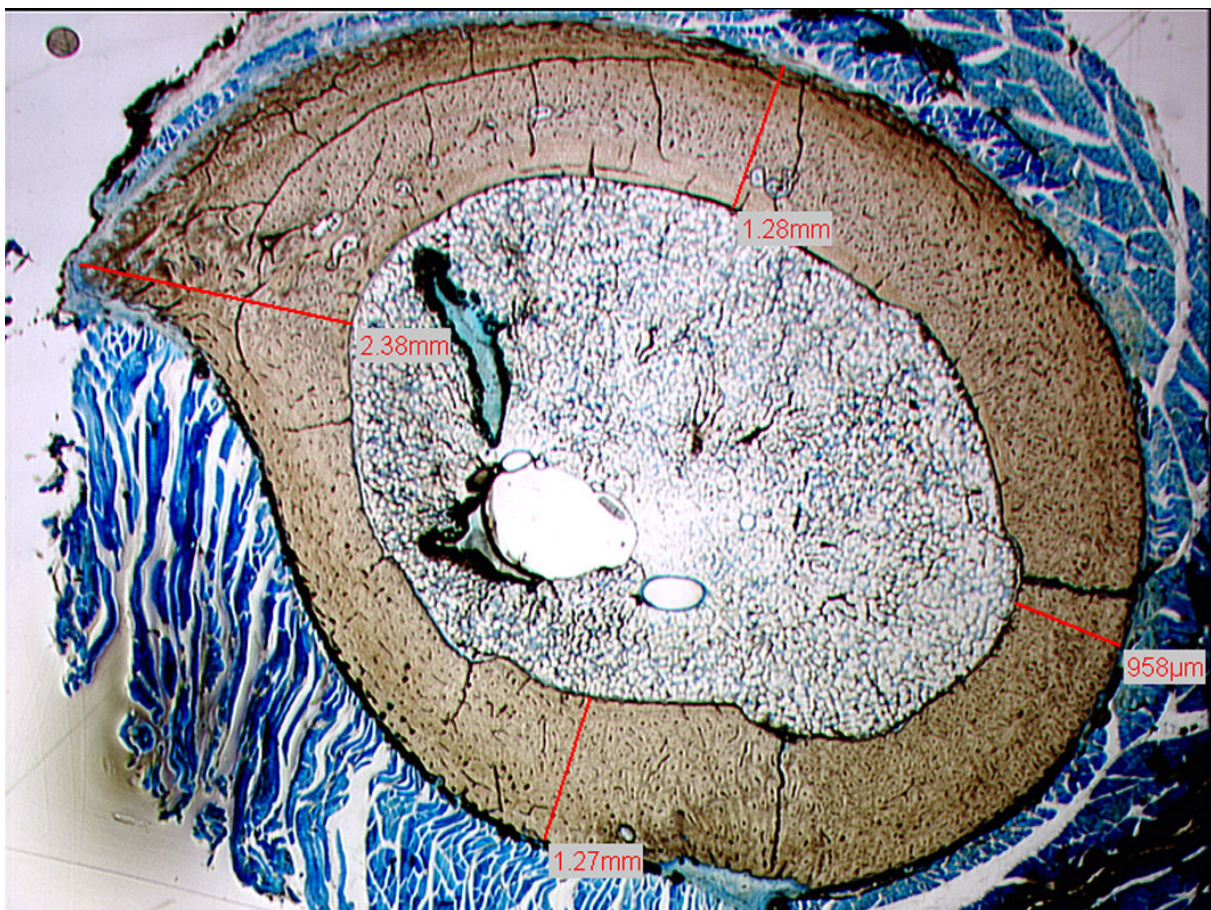


Abb. 3.6.2: Messung der Kortikalisdicke durch vier typische Strecken

Die Erfassung der Gefäßdicke erfolgte ebenfalls nach einem standardisierten Muster (s. Abb. 3.6.3). Hierfür wurde eine vierfache Vergrößerung gewählt und

der Sporn mit seiner Spitze nach oben mittig im Bildausschnitt eingestellt. Man maß mit Hilfe der Morphometrie-Software nun die im Bildausschnitt liegende Fläche des Sporns. Innerhalb dieses Bereiches wurde mit der Weibel-Grid-Methode die mit Gefäßanschnitten bedeckte Fläche im Verhältnis zur Gesamtfläche ausgezählt. Die Kantenlänge der Kästchen ist bei dieser Methode nicht relevant, weil es sich nicht um eine absolute, sondern um eine relative Größe handelt. Dieses ergab den Wert für die Gefäße (n), den man danach durch die Fläche teilte, um die Gefäßdichte (n/mm^2) zu erhalten.

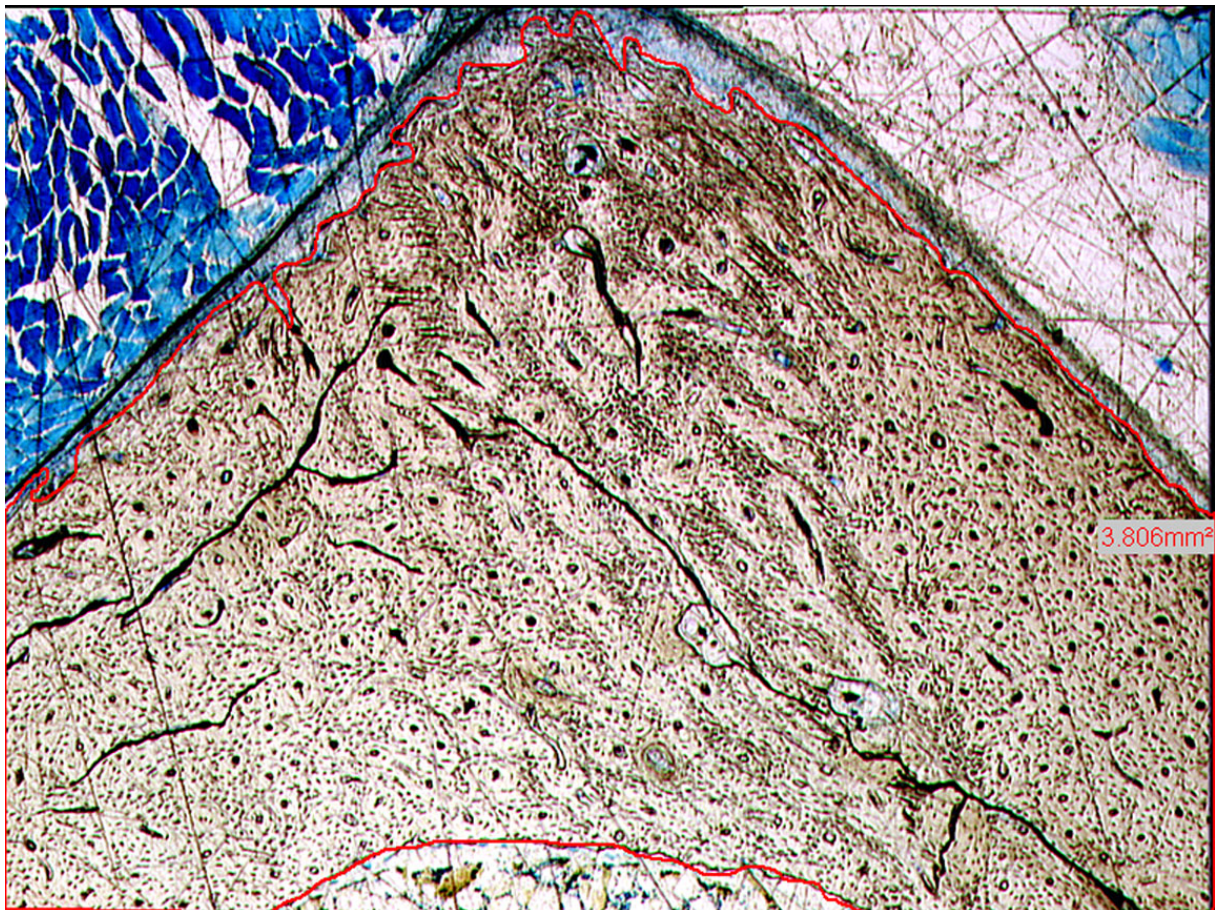


Abb. 3.6.3: Messung der Gefäßdichte

4. Ergebnisse

4.1 Gefäßdichte

Die Werte für die Gefäßdichte der behandelten Seite wurden mit der unbehandelten Gegenseite verglichen, um durch ESWT induzierte Gefäßproliferationen zu erkennen.

Die Präparate aus den gewonnenen Knochenscheiben des beschossenen mittleren Femurabschnittes wurden einzeln mit der Bildanalyse ausgewertet und hieraus Mittelwerte gebildet.

Kaninchen 1 wurden 1000 Impulse appliziert und es wurde zur Knochenentnahme nach einem Tag getötet. Die Fläche der behandelten Seite war $3,568 \text{ mm}^2$ groß und enthielt 245,5 Gefäße (n), was eine Gefäßdichte von $68,5 \text{ Gefäße n/mm}^2$ ergibt. Die unbehandelte Seite hatte eine Fläche von $3,815 \text{ mm}^2$ und enthielt 265 Gefäße (n). Das ergibt eine Gefäßdichte von $69,4 \text{ n/mm}^2$.

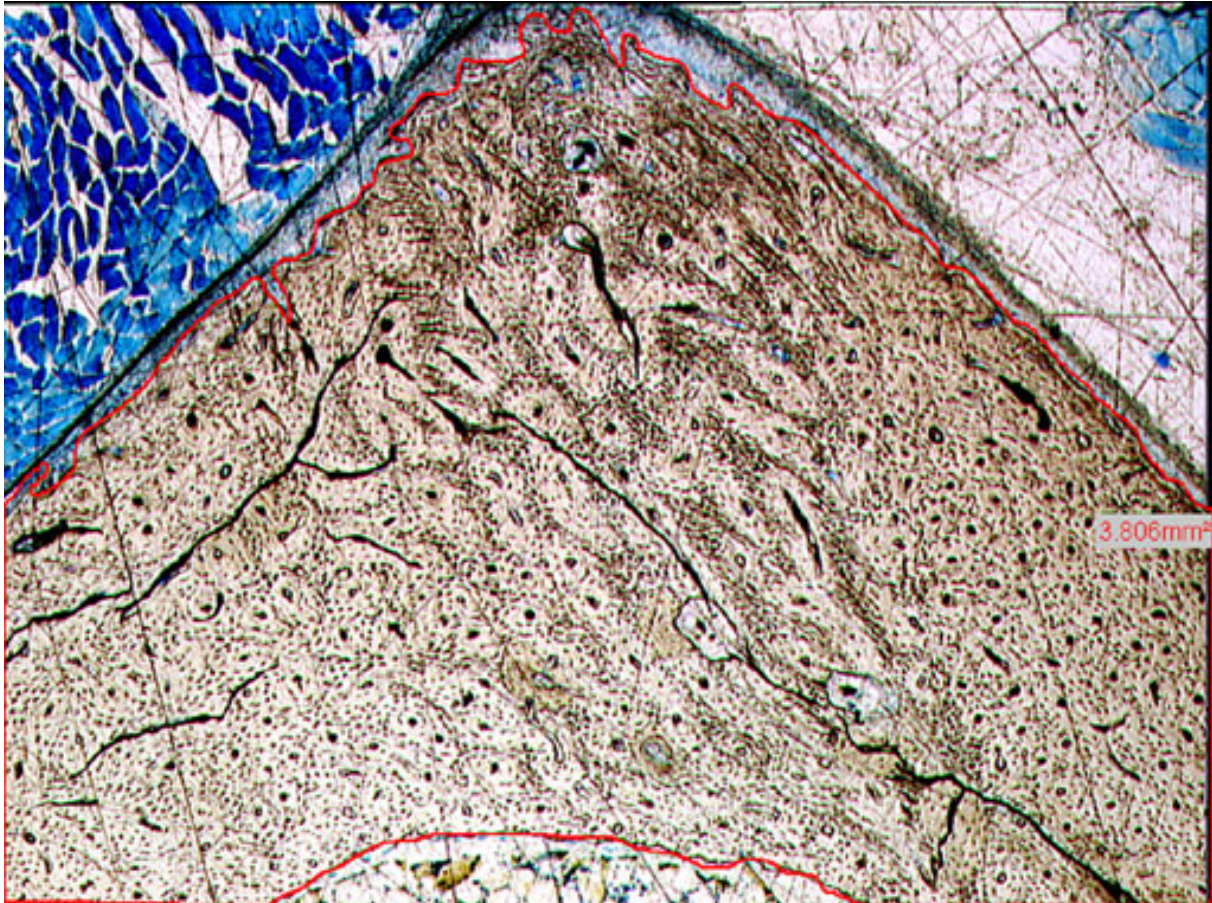


Abb. 4.1.1: Gefäßdichte Kaninchen 1

Kaninchen 2 wurden ebenfalls 1000 Impulse appliziert. Die Knochenentnahme fand nach 14 Tagen statt. Die behandelte Seite dieses Tieres zeigte eine Fläche von $4,002 \text{ mm}^2$ und enthielt 301,2 Gefäße (n). Das resultiert in einer Gefäßdichte von $74,6 \text{ n/mm}^2$. Die unbehandelte Seite war $4,057 \text{ mm}^2$ groß und wies 315,5 Gefäße (n) auf, was eine Gefäßdichte von $77,8 \text{ n/mm}^2$ ergibt.

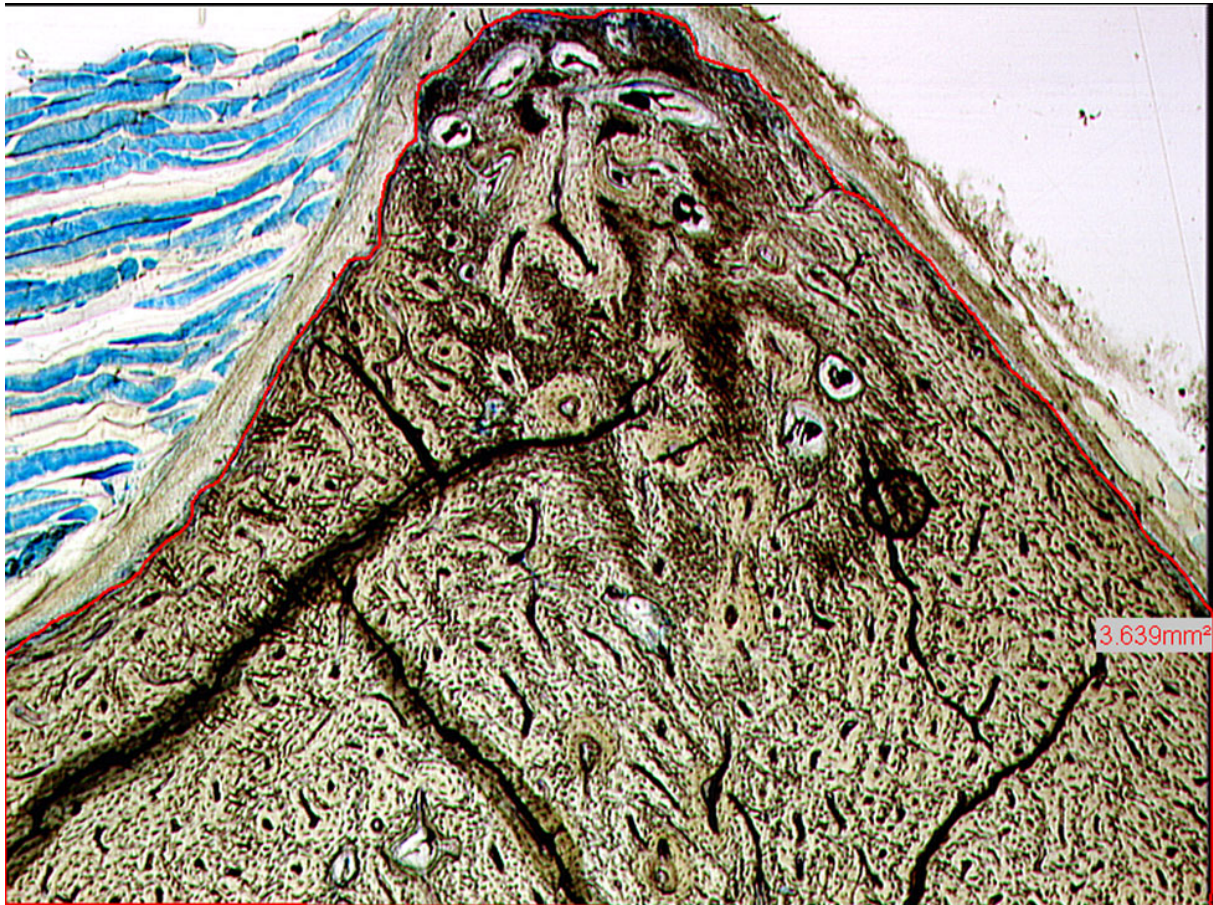


Abb. 4.1.2: Gefäßdichte Kaninchen 2

Die Impulsanzahl, mit der Kaninchen 3 behandelt wurde, betrug 2000. Nach 8 Tagen wurden die Knochen zur Untersuchung entnommen. Die Fläche der behandelten Seite wies eine Größe von $3,865 \text{ mm}^2$ und eine Gefäßanzahl von 296,4 Gefäßen (n) auf. Das ergibt eine Gefäßdichte von $76,4 \text{ n/mm}^2$. Demgegenüber hatte die unbehandelte Seite eine Größe von $3,506 \text{ mm}^2$ und eine Gefäßanzahl von 289 Gefäßen (n). Daraus errechnet sich eine Dichte der Gefäße von $82,4 \text{ n/mm}^2$.

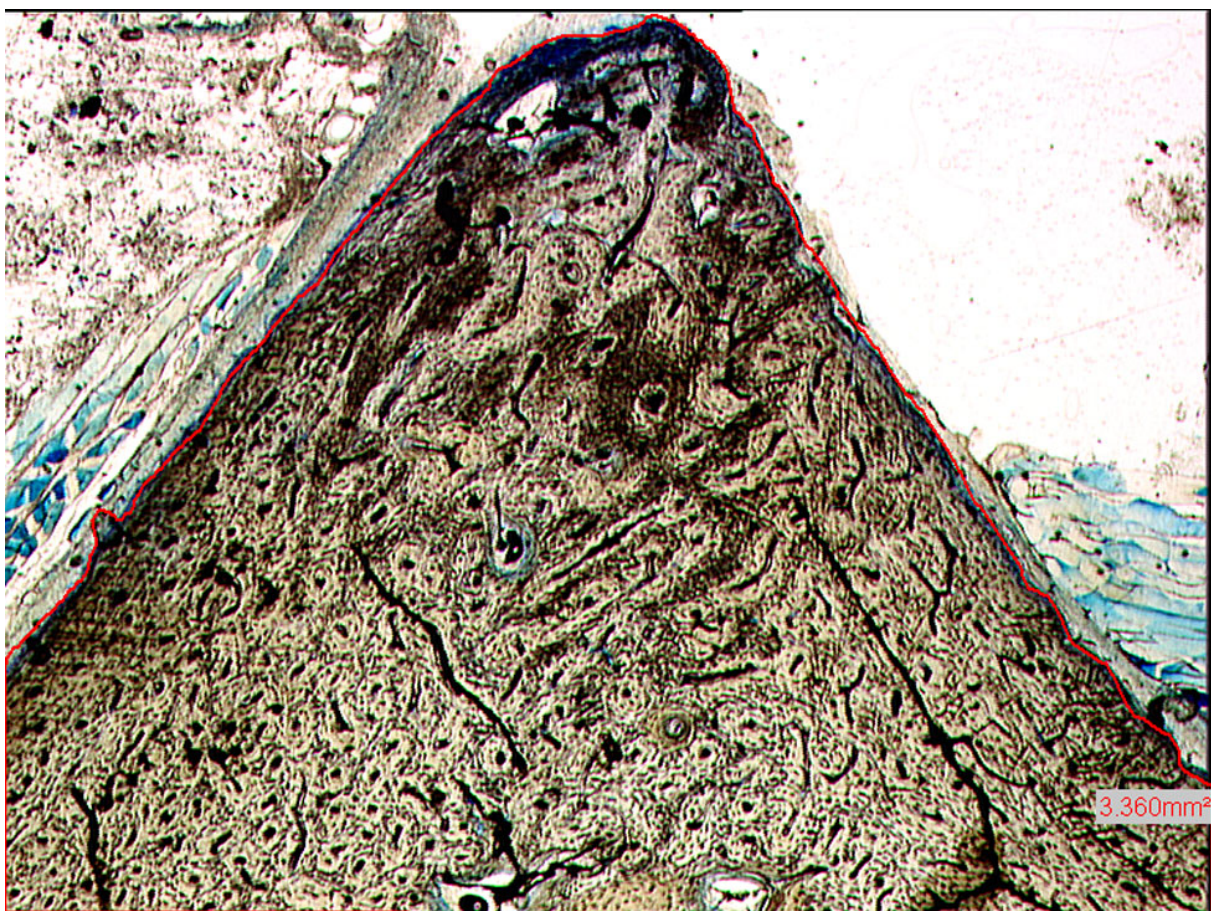


Abb. 4.1.3: Gefäßdichte Kaninchen 3

Dem Kaninchen 4 wurden 4000 Impulse appliziert, woraufhin am Tag 1 nach der Behandlung direkt die Entnahme folgte. Auf der behandelten Seite wurden eine Fläche von $3,795 \text{ mm}^2$ und eine Gefäßanzahl von 240,1 Gefäßen (n) gemessen, aus denen eine Gefäßdichte von $54,5 \text{ n/mm}^2$ resultiert. Die unbehandelte Seite war $3,34 \text{ mm}^2$ groß und hatte 209 Gefäße (n). Das ergibt eine Gefäßdichte von $62,6 \text{ n/mm}^2$.

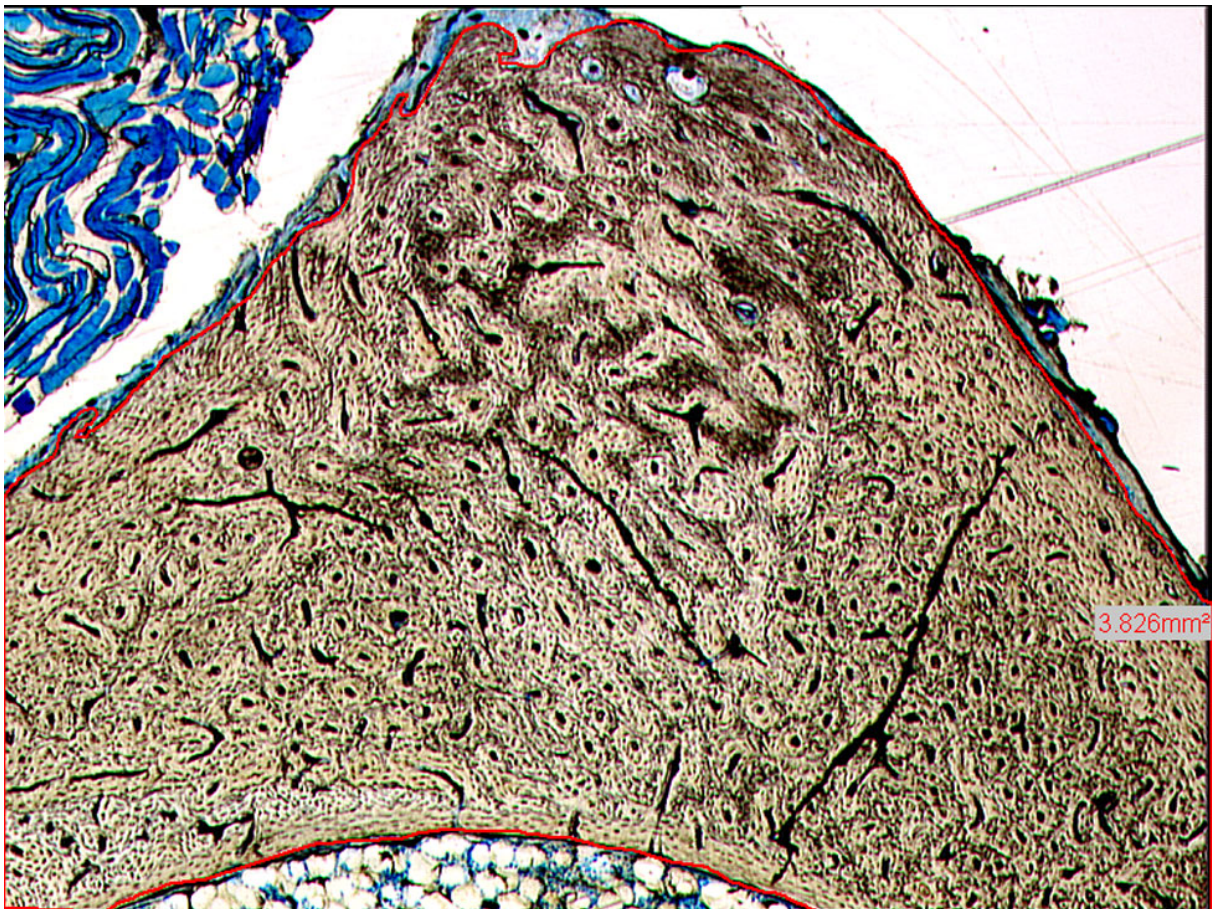


Abb. 4.1.4: Gefäßdichte Kaninchen 4

Kaninchen 5 wurde mit 4000 Impulsen behandelt und die Knochen am Tag 13 entnommen. Die behandelte Seite hatte eine Fläche von 3,781 mm² und wies 249,7 Gefäße (n) auf. Aus diesen Werten errechnet sich die Gefäßdichte von 66,1 n/mm². Die Fläche der unbehandelten Seite betrug 3,708 mm². Darin waren 246,7 Gefäße (n), was zu einer Gefäßdichte von 66,5 n/mm² führt.

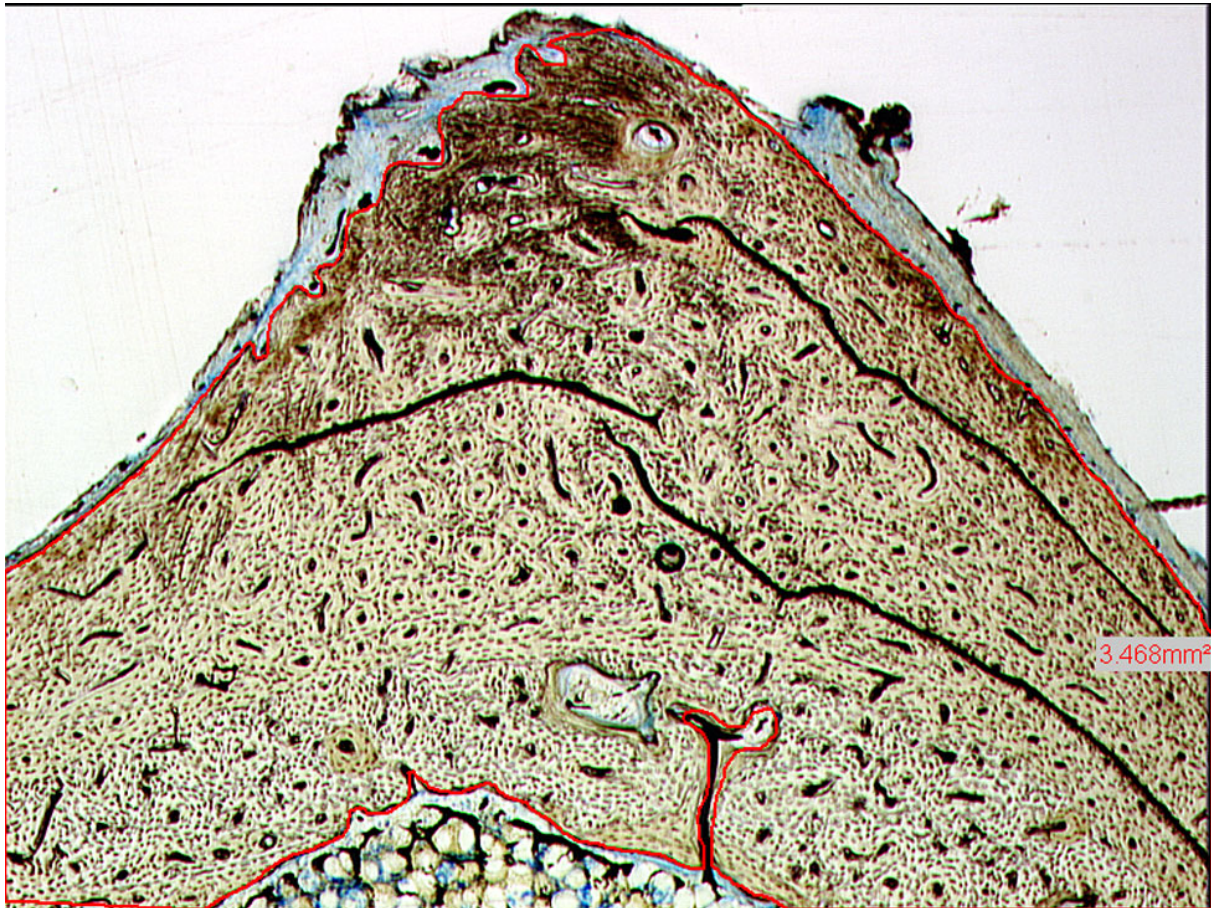


Abb. 4.1.5: Gefäßdichte Kaninchen 5

Das Kaninchen 6 wurde mit 4000 Impulsen beschossen. Die Knochenentnahme erfolgte am Tag 28. Die Fläche der behandelten Seite war $3,415 \text{ mm}^2$ groß und enthielt 229,8 Gefäße (n). Daraus folgt eine Gefäßdichte von $67,0 \text{ n/mm}^2$. Die unbehandelte Seite dieses Tieres war $3,845 \text{ mm}^2$ groß und zeigte 270,7 Gefäße (n). Das bedeutet eine Dichte der Gefäße von $70,9 \text{ n/mm}^2$.

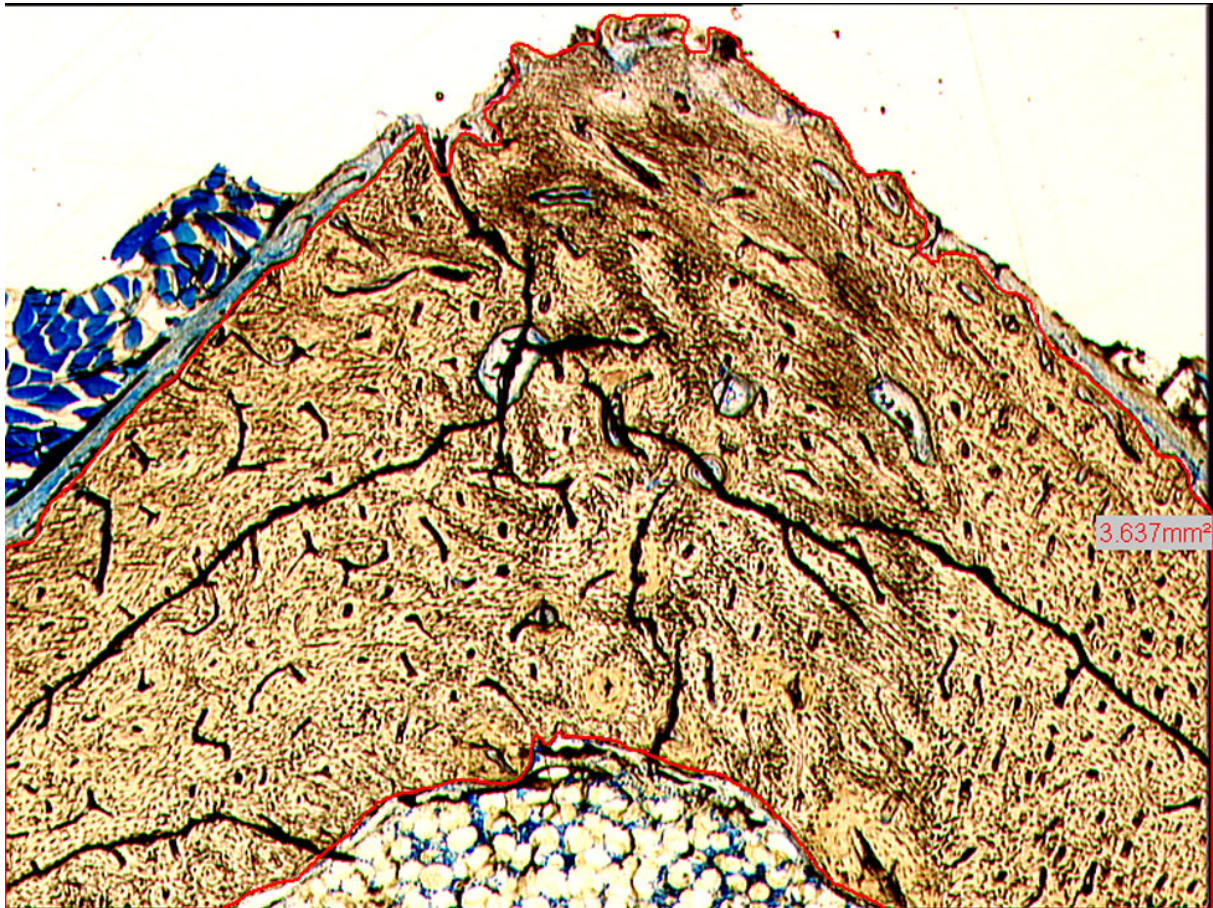


Abb. 4.1.6: Gefäßdichte Kaninchen 6

Das Kaninchen 7 wurde mit 4000 Impulsen behandelt und die Knochen am Tag 28 entnommen. Die Fläche der behandelten Seite zeigte eine Größe von 3,938 mm² und 284,4 Gefäße (n). Das bedeutet, daß die Gefäßdichte 72,5 n/mm² betrug. Die unbehandelte Seite war 3,524 mm² groß und hatte 256,3 Gefäße (n). Damit wies sie eine Gefäßdichte von 72,8 n/mm² auf.

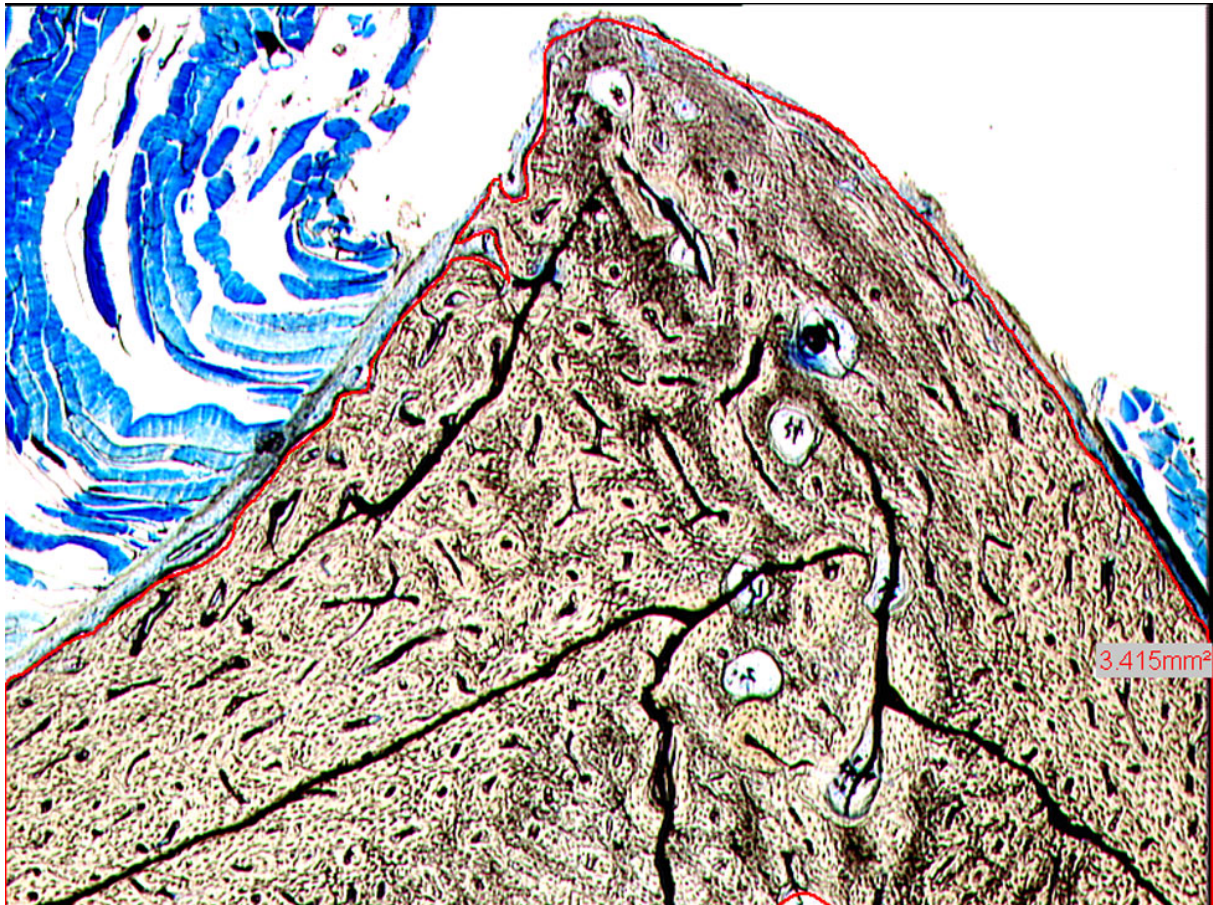


Abb. 4.1.7: Gefäßdichte Kaninchen 7

Die sehr geringen Unterschiede in der Gefäßdichte von der behandelten zur unbehandelten Seite zeigen, daß es durch die Einwirkung der ESWT zu keiner Gefäßproliferation und zu keiner Abnahme der Gefäßdichte gekommen ist.

Tabelle 4.1.1: Impulsanzahl und Standzeit

	Impulse	Standzeit (Tage)
Kaninchen 1	1000	1
Kaninchen 2	1000	14
Kaninchen 3	2000	8
Kaninchen 4	4000	1
Kaninchen 5	4000	13
Kaninchen 6	4000	28
Kaninchen 7	4000	28

Tabelle 4.1.2: Gefäßdichte

		Fläche (mm ²)	Gefäße (n)	Gefäßdichte (n/mm ²)
Kaninchen 1	behandelt	3,568	245,5	68,5
	unbehandelt	3,815	265	69,4
Kaninchen 2	behandelt	4,002	301,2	74,6
	unbehandelt	4,057	315,5	77,8
Kaninchen 3	behandelt	3,865	296,4	76,4
	unbehandelt	3,506	289	82,4
Kaninchen 4	behandelt	3,795	240,1	54,5
	unbehandelt	3,34	209	62,6
Kaninchen 5	behandelt	3,781	249,7	66,1
	unbehandelt	3,708	246,7	66,5
Kaninchen 6	behandelt	3,415	229,8	67,0
	unbehandelt	3,845	270,7	70,9
Kaninchen 7	behandelt	3,938	284,4	72,5
	unbehandelt	3,524	256,3	72,8

4.2 Knochendicke

Die Werte für die Knochendicke der behandelten Seite wurden mit denen der unbehandelten Gegenseite verglichen, um durch ESWT induzierte Kallusproliferationen zu erkennen.

Die Präparate aus den gewonnenen Knochenscheiben des beschossenen mittleren Femurabschnittes wurden einzeln mit der Bildanalyse ausgewertet und hieraus Mittelwerte gebildet.

Das Kaninchen 1 zeigte auf der behandelten Seite für die Strecke A den Wert 1629,8 mm, für die Strecke B 1029,3 mm, für die Strecke C 1023 mm und für die Strecke D 1073,3 mm. Auf der unbehandelten Seite erreichte die Strecke A den Wert 1669 mm, die Strecke B 1048 mm, Strecke C 1068 mm und die Strecke D 1108 mm.

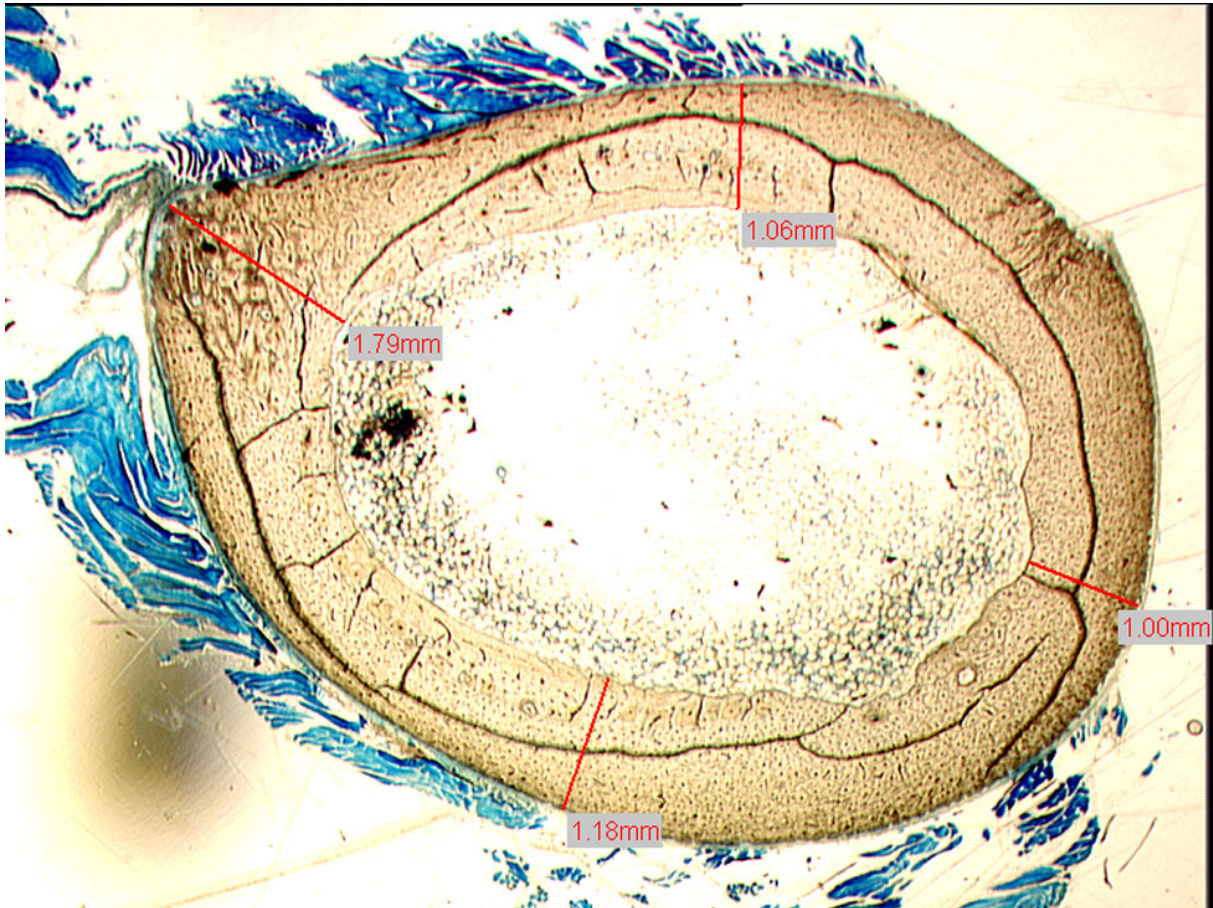


Abb. 4.2.1: Kortikalisdicke Kaninchen 1

Die behandelte Seite von Kaninchen 2 zeigte für Strecke A den Wert 1966,6 mm, für Strecke B 1300,4 mm, für Strecke C 1185 mm und für Strecke D 1265,6 mm. Demgegenüber wies die unbehandelte Seite für die Strecke A den Wert 1836 mm, für Strecke B 1141 mm, für Strecke C 1267,5 mm und für Strecke D 1146,5 mm auf.

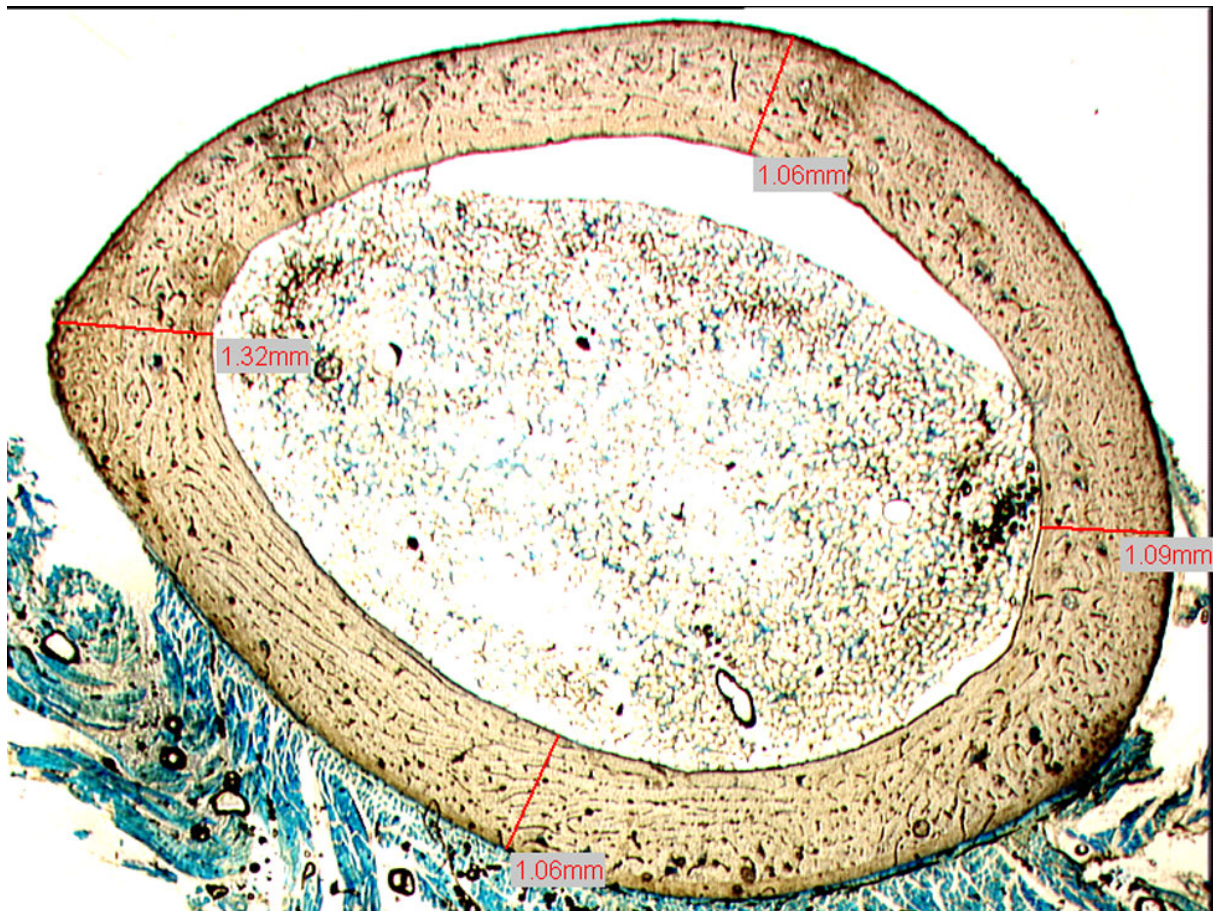


Abb.4.2.2: Kortikalisdicke Kaninchen 2

Die Strecke A der behandelten Seite von Kaninchen 3 war 1986 mm, Strecke B 1142,8 mm, Strecke C 1184,2 mm und Strecke D 1136,2 mm lang. Die Strecke A der unbehandelten Seite war dagegen 1321 mm, Strecke B 1089 mm, Strecke C 1064 mm und Strecke D 1063 mm lang.

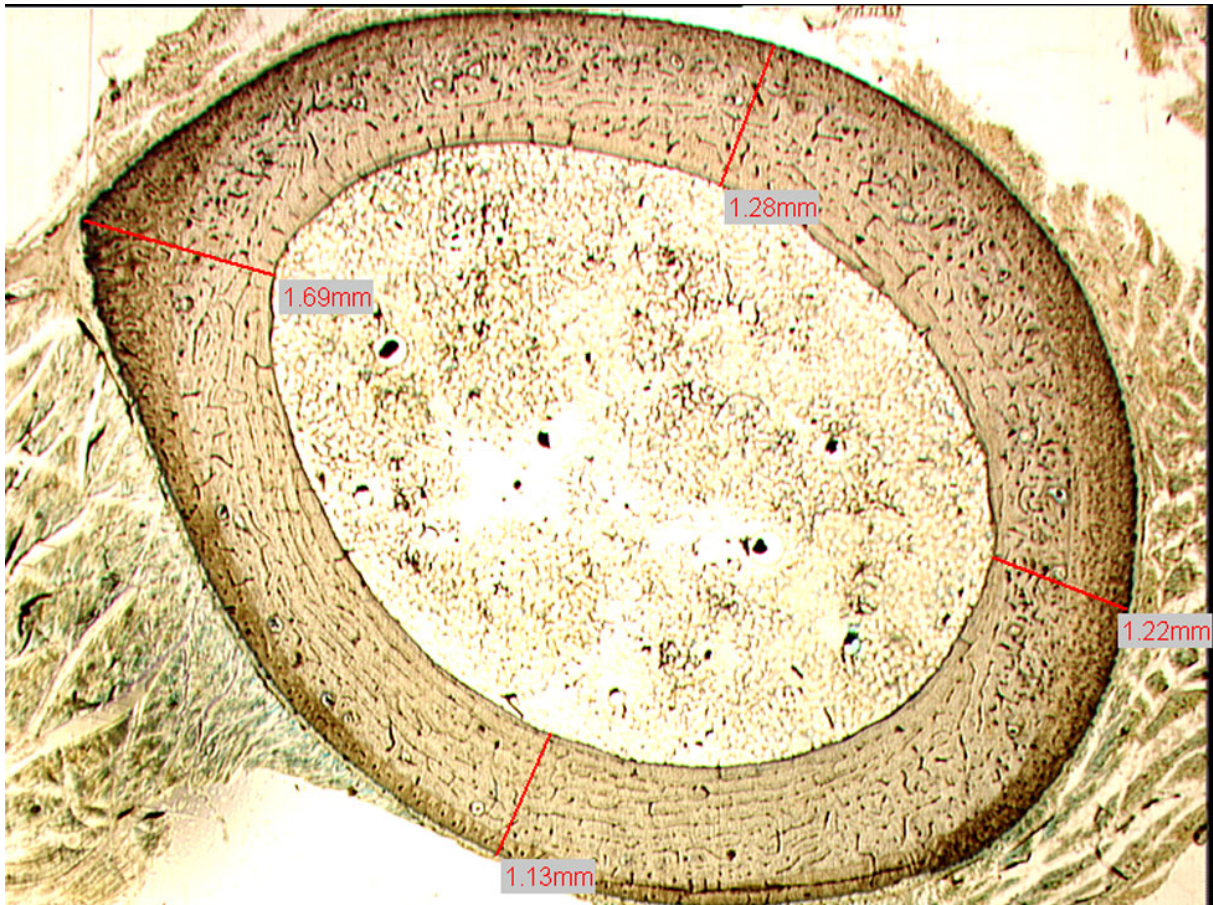


Abb. 4.2.3: Kortikalisdicke Kaninchen 3

Das Kaninchen 4 wies auf der behandelten Seite für Strecke A einen Wert von 1795,7 mm, für Strecke B 1041,6 mm, für Strecke C 1081,1 mm und für Strecke D 1030,7 mm auf. Auf der unbehandelten Gegenseite war Strecke A 2089,8 mm, Strecke B 1074,3 mm, Strecke C 1052,8 mm und Strecke D 1165 mm lang.

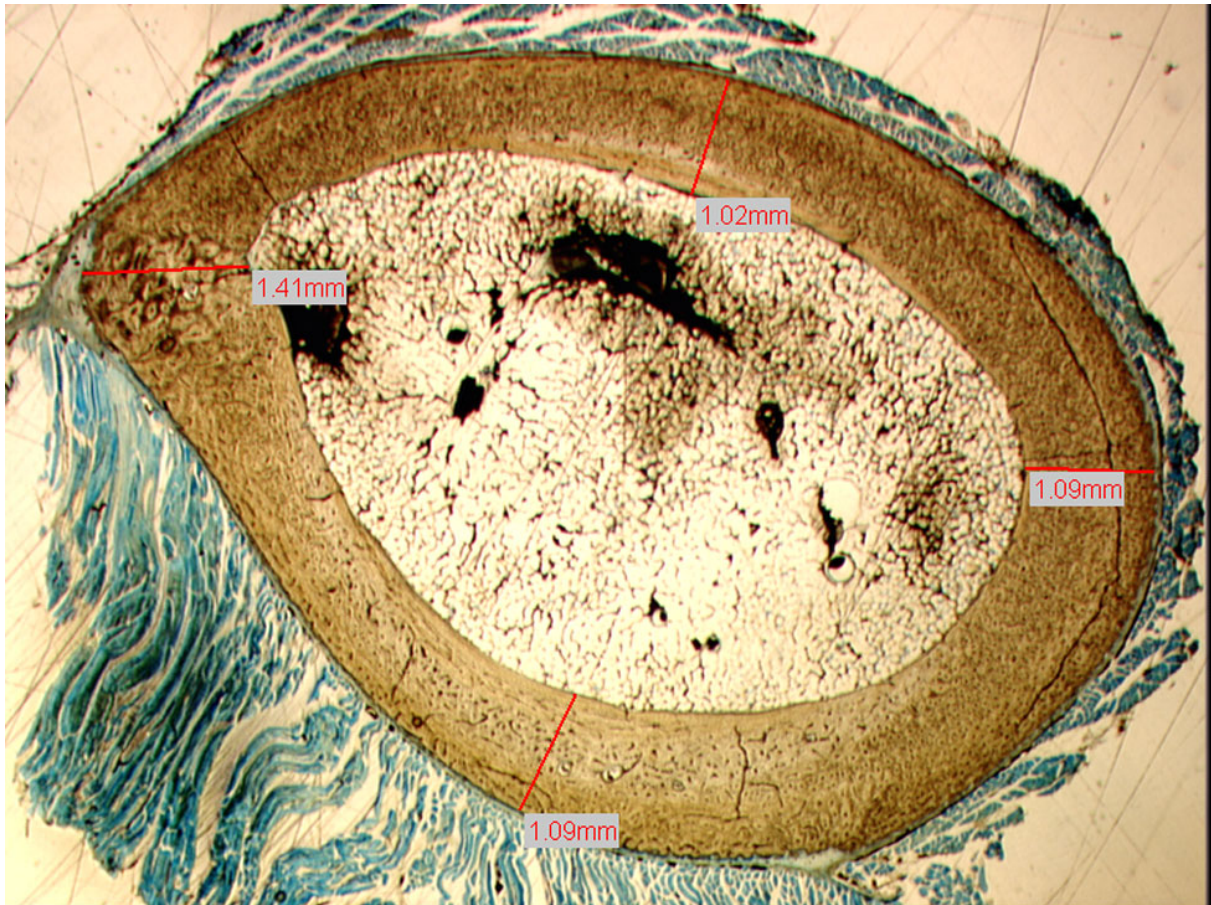


Abb. 4.2.4: Kortikalisdicke Kaninchen 4

Die behandelte Seite von Kaninchen 5 wies für Strecke A eine Länge von 1553,8 mm, für Strecke B 1221,7 mm, für Strecke C 1131,7 mm und für Strecke D 1064,5 mm auf. Demgegenüber zeigte sich auf der unbehandelten Gegenseite für Strecke A eine Länge von 1778,7 mm, für Strecke B 1103 mm, für Strecke C 957 mm und für Strecke D 1022,5 mm.

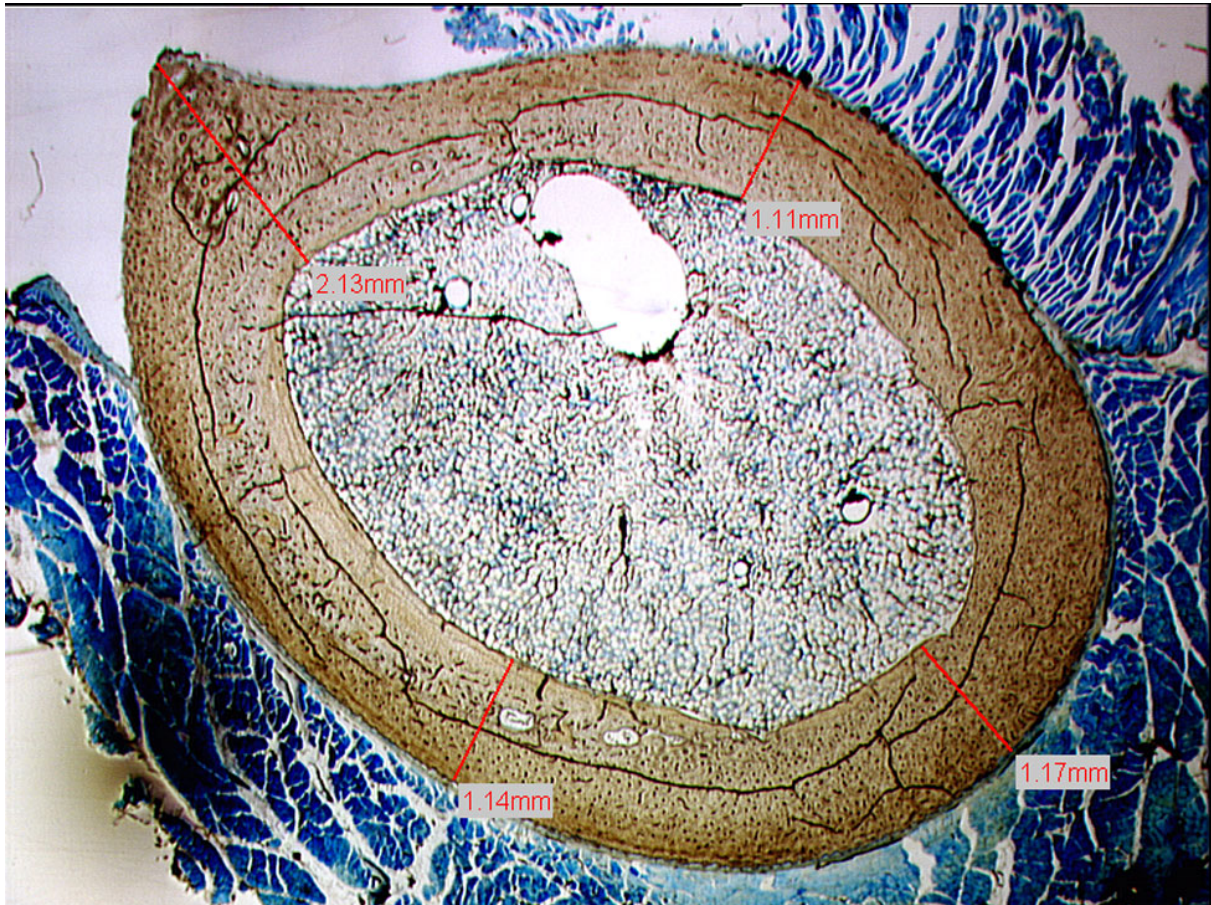


Abb. 4.2.5: Kortikalisdicke Kaninchen 5

Die Strecke A war auf der behandelten Seite von Kaninchen 6 2320 mm, Strecke B 1129 mm, Strecke C 1177 mm und Strecke D 1252 mm lang. Auf der unbehandelten Seite war Strecke A 1739,3 mm, Strecke B 967,7 mm, Strecke C 1283 mm und Strecke D 1219 mm lang.

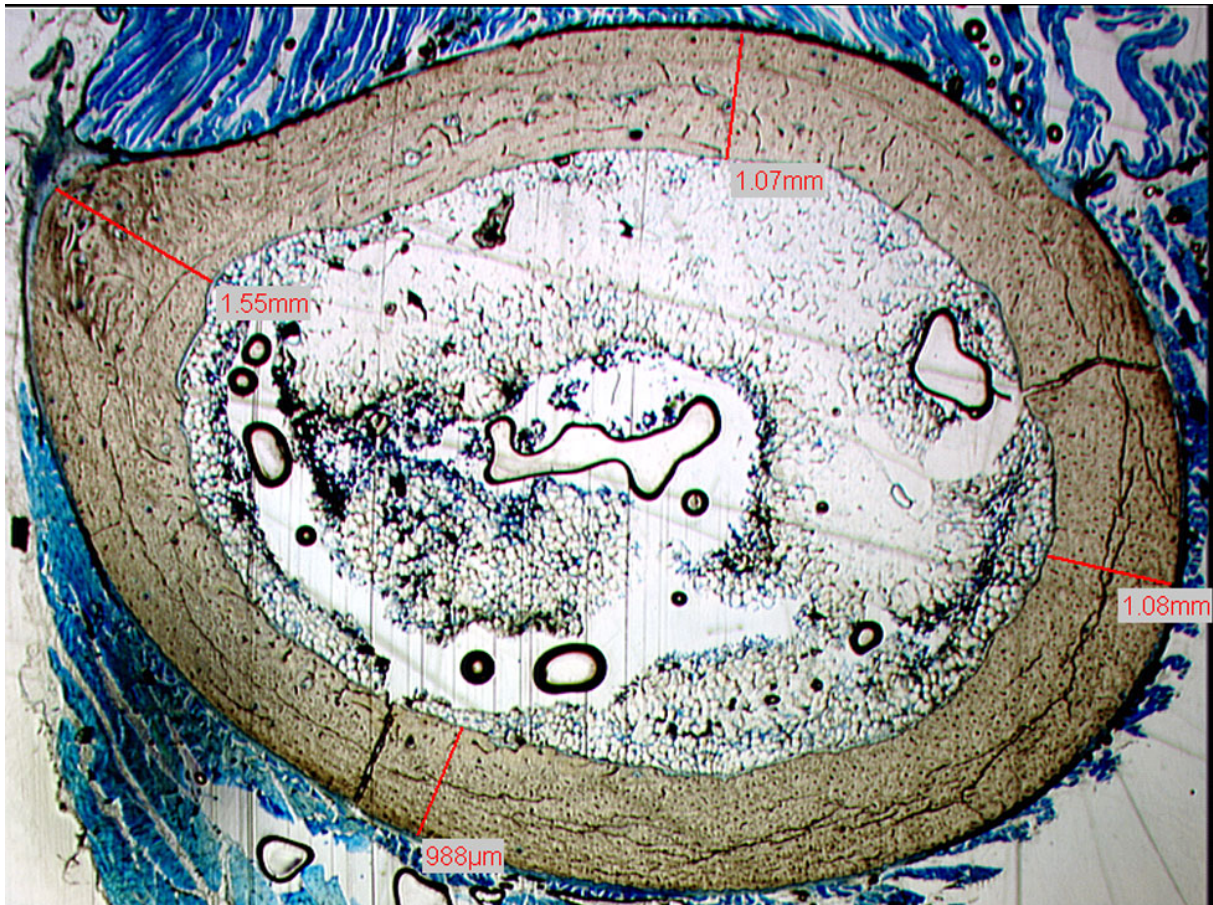


Abb. 4.2.6: Kortikalisdicke Kaninchen 6

Das Kaninchen 7 zeigte auf der behandelten Seite für die Strecke A eine Länge von 1863,2 mm, für Strecke B 1401,2 mm, für Strecke C 1189,8 mm und für Strecke D 1262,2 mm. Auf der unbehandelten Seite wies die Strecke A eine Länge von 1682 mm, Strecke B 1215,3 mm, Strecke C 1069,7 mm und Strecke D von 1113,7 mm auf.

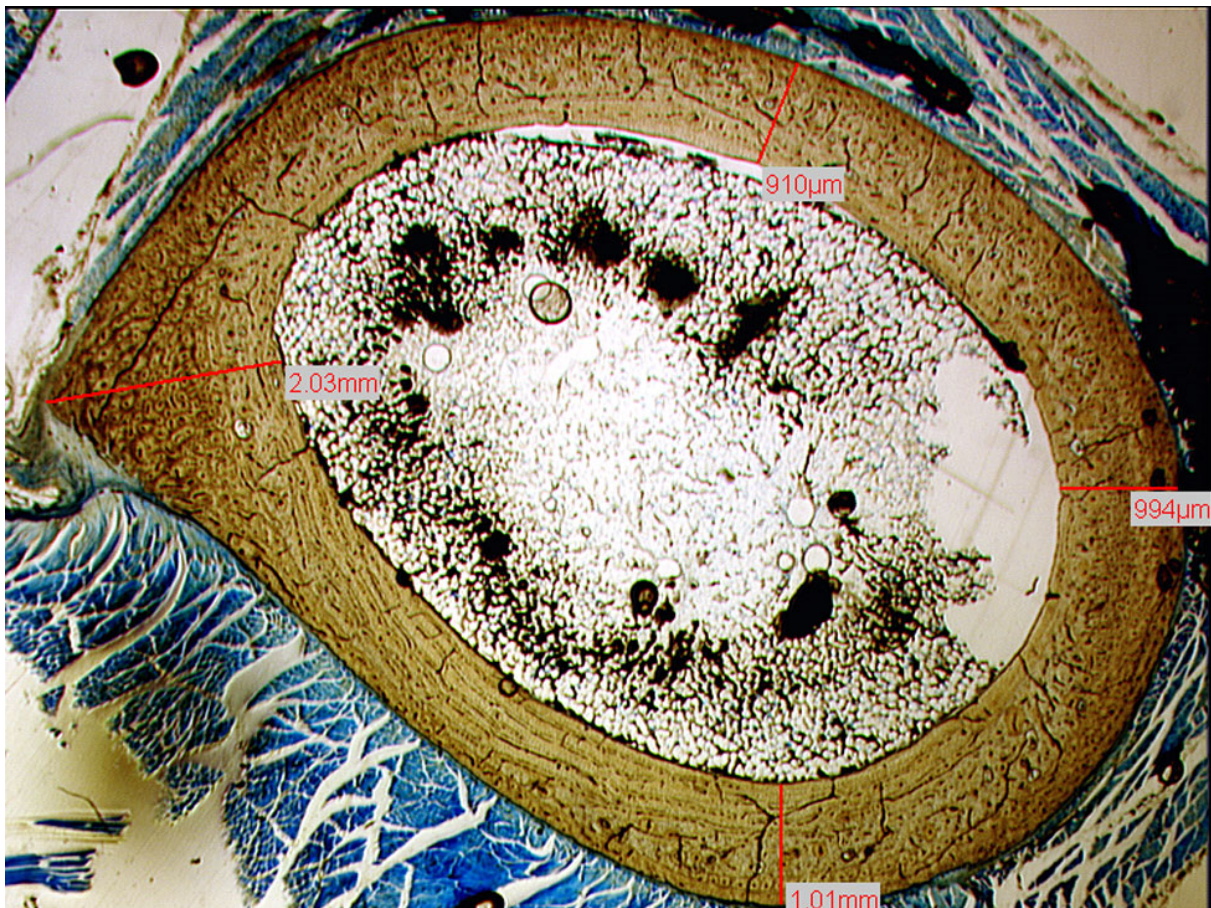


Abb. 4.2.7: Kortikalisdicke Kaninchen 7

Eine Knochenanbaureaktion auf der behandelten Seite ist nach diesen Ergebnissen auszuschließen, da die Unterschiede von behandelter zu unbehelter Seite zu gering sind.

Tabelle 4.2.1: Knochendicke

		Strecke A (mm)	Strecke B (mm)	Strecke C (mm)	Strecke D (mm)
Kaninchen 1	behandelt	1629,8	1029,3	1023	1073,3
	unbehandelt	1669	1048	1068	1108
Kaninchen 2	behandelt	1966,6	1300,4	1185	1265,6
	unbehandelt	1836	1141	1267,5	1146,5
Kaninchen 3	behandelt	1986	1142,8	1184,2	1136,2
	unbehandelt	1321	1089	1064	1063
Kaninchen 4	behandelt	1795,7	1041,6	1081,1	1030,7
	unbehandelt	2089,8	1074,3	1052,8	1165
Kaninchen 5	behandelt	1553,8	1221,7	1131,7	1064,5
	unbehandelt	1778,7	1103	957	1022,5
Kaninchen 6	behandelt	2320	1129	1177	1252
	unbehandelt	1739,3	967,7	1283	1219
Kaninchen 7	behandelt	1863,2	1401,2	1189,8	1262,2
	unbehandelt	1682	1215,3	1069,7	1113,7

4.3 Periostveränderungen

Einige Autoren berichteten von subperiostalen Periostblutungen, die nach ESWT aufgrund von Zerreißungen von kleinen Gefäßen aufgetreten seien (Delius et al., 1997; Ikeda et al., 1999; Väterlein et al., 2000).

In keinem der von uns gewonnenen Präparate waren subperiostale Blutungen zu erkennen. Die Präparate zeigten in den histologischen Untersuchungen keine durch die ESWT verursachten Veränderungen. Die in einem Präparat zu beobachtenden Periostverletzungen sind als Artefakte zu werten, die bei der Präparation entstanden sind.

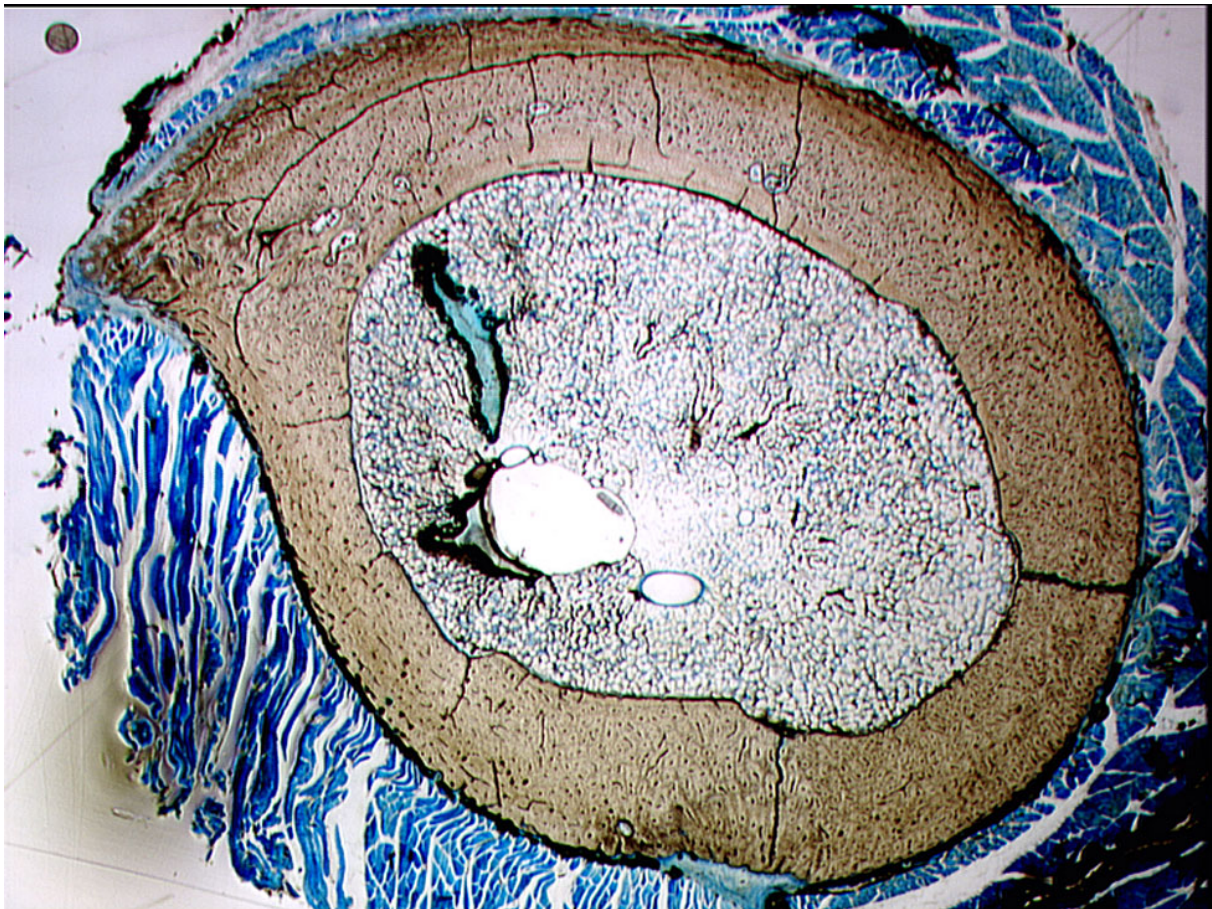


Abb. 4.3.1: unbeschädigtes Periost

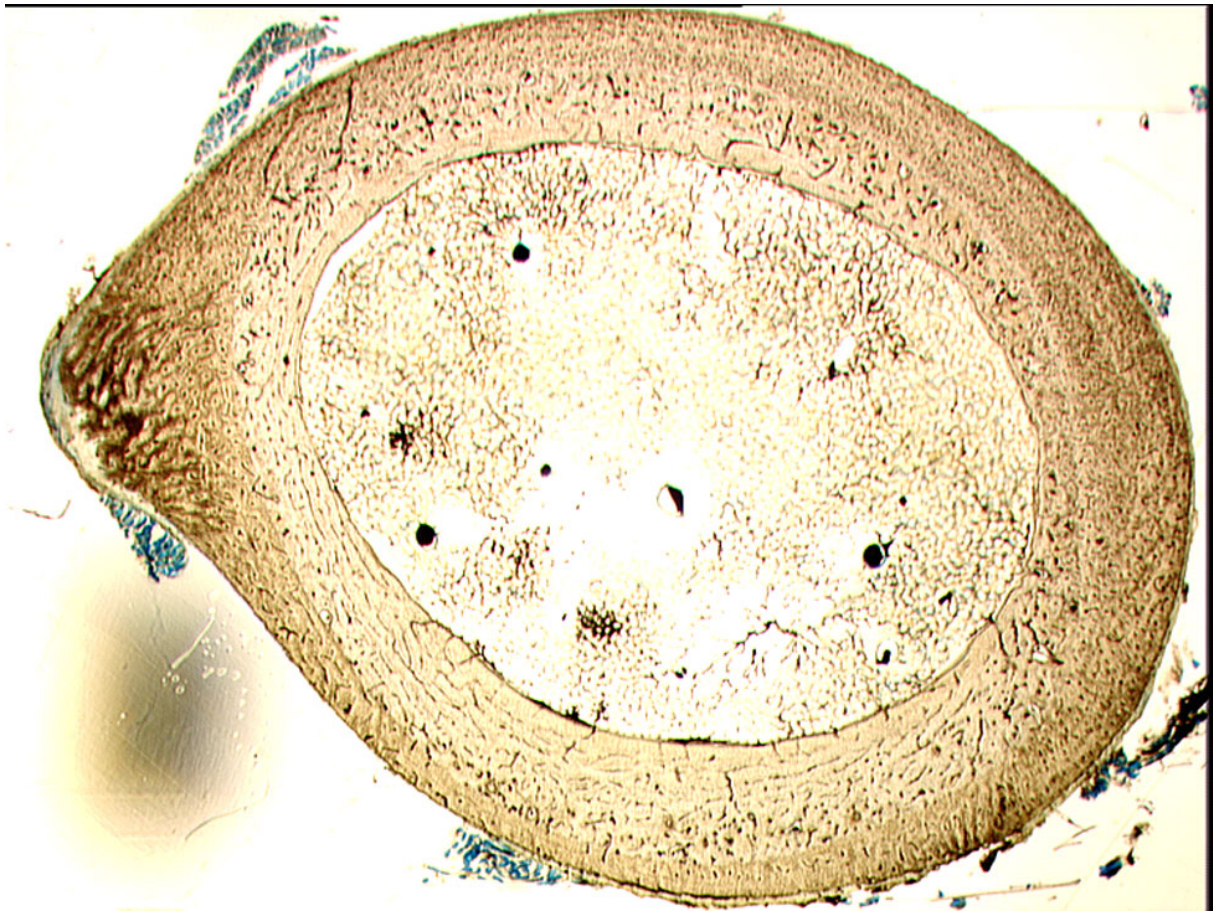


Abb. 4.3.2: beschädigtes Periost

4.4 Lungenveränderungen

Die untersuchten Lungen zeigten keinerlei farbliche Veränderungen an der Lungenoberfläche und waren in der makroskopischen Beobachtung regelgerecht. In der Abbildung 4.4.1 ist exemplarisch eine der regulären Lungenoberflächen zu sehen.

Die histologische Aufarbeitung zeigte ebenfalls keinerlei Hinweise auf stattgefundene Embolien. Die Alveolarstruktur war intakt, es fanden sich weder im Lungeninneren noch an der Oberfläche Kontusionsherde. Es sind keine Knochenfragmente in den Schnitten festzustellen gewesen. Ebenfalls sind keine Entzündungszellen zu sehen, die auf eine Abräumungsreaktion von Fremdkörpern durch Makrophagen oder andere Fresszellen hindeuten könnten. Exemplarisch werden hier für alle Tiere der Versuchsreihe nur zwei Normalbefunde der histologischen Aufarbeitung gezeigt, da sich bei keiner Dosierung Veränderungen darstellten. In Abbildung 4.4.2 ist eine intakte Alveolarstruktur ohne Knochenfragmente und in Abbildung 4.4.3 ein unbeschädigtes Lungengefäß zu sehen.



Abb. 4.4.1: reguläre Lungenoberfläche

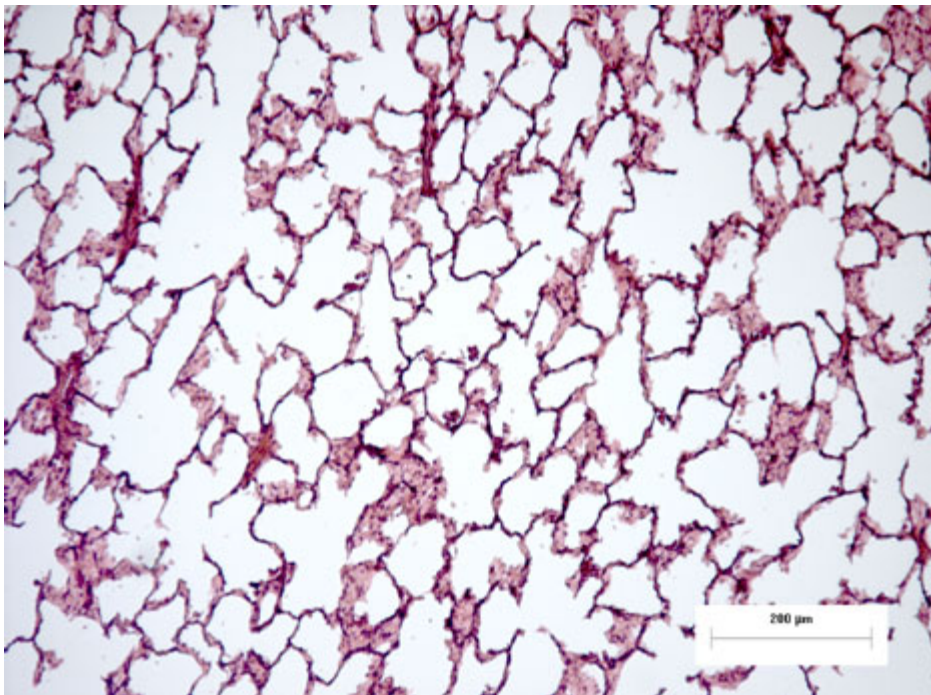


Abb. 4.4.2: intakte Alveolarstruktur ohne Knochenfragmente

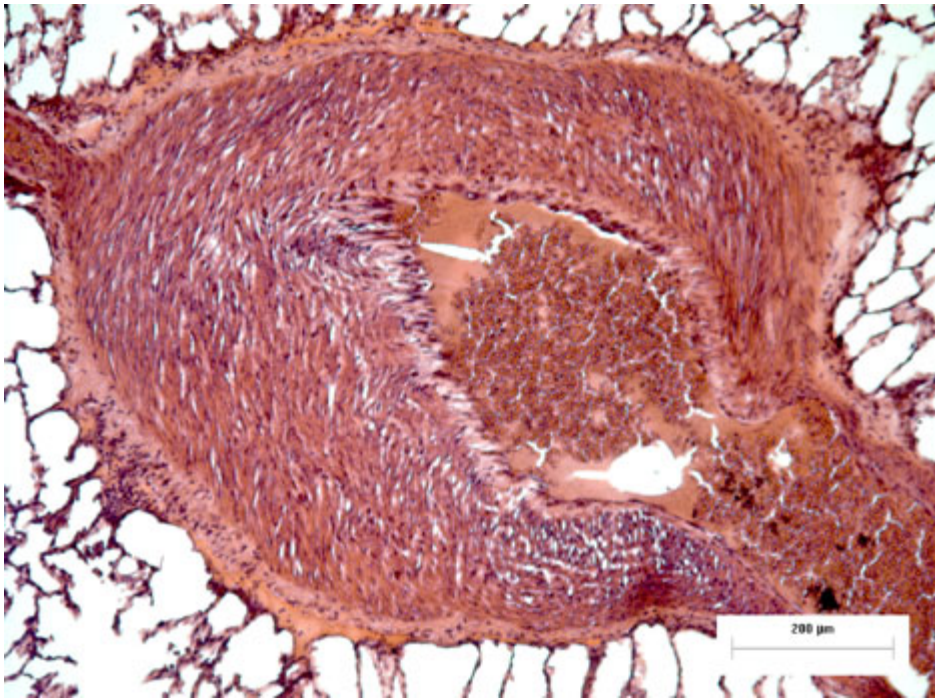


Abb. 4.4.3: unbeschädigtes Lungengefäß

5. Diskussion

Die ESWT wird zwar schon seit mehreren Jahren auch im klinischen Alltag eingesetzt, allerdings berichten die Autoren der publizierten Arbeiten und Studien über sehr verschiedene Ergebnisse. Die Meinungen über die Anwendbarkeit der ESWT reichen weit auseinander. Das liegt zu einem großen Teil auch daran, daß der mögliche Wirkungsmechanismus immer noch nicht abschließend geklärt ist. Wir haben mit unseren Versuchen einige der postulierten Wirkungsmuster der ESWT überprüft.

Es wurden schon mehrere Hypothesen zu den möglichen Wirkungsmechanismen aufgestellt, jedoch konnte noch keine bestätigt werden. Einige der unten genannten Autoren gehen von einer durch die Stoßwelle induzierten und verlängerten inflammatorischen Phase aus, andere berichten von Gefäßzerstörungen, die zu Hämatomen führen. Diese wiederum führen auch zu einer inflammatorischen Reaktion. An anderer Stelle wurden auch Knochendestruktionen gesehen, die zu einem erneuten Heilungsprozeß führen könnten. In den gleichen Bereich sind Mikrotraumata einzuordnen. Außerdem räumen neuere Untersuchungen die Möglichkeit einer stoßwellenvermittelten Induktion von molekularen Signalstoffen ein, die zu Knochenwachstum oder -umbau führen könnten.

Viele Autoren gehen von einer durch den Stoßwellenbeschuß verlängerten oder induzierten inflammatorischen Phase aus. Diese Phase zeichnet sich durch eine histologische Desorganisation aus und zeigt als bestimmendes Merkmal eine Neutrophileneinwanderung (Wang et al., 2002). Die Hypothesen stützen sich auf die Beobachtung, daß eine im Tiermodell durch ESWT behandelte Knochenheilung histologisch durch ein desorganisiertes Bild im Vergleich zu

einer regulären Heilung auffällt (Uslu et al., 1999). Durch diese verlängerte inflammatorische Phase soll es auch zu einer vermehrten Kallusbildung und damit auch zu einer Vermehrung der Knochensubstanz kommen (Haupt et al., 1992; McCormack et al., 1996; Uslu et al., 1999; Ikeda et al., 1999; Wang et al., 2001; Tischer et al., 2002). Diese Vermehrung wird von vielen Autoren als bessere und schnellere Heilung bewertet. Die desorganisierende Wirkung der ESWT zeigt sich histologisch auch in dem Auftreten von Dysplasien in der Wachstumsfuge, die allerdings nur in schweren Fällen mit einer Wachstumsverzögerung einhergingen (Yeaman et al., 1989).

Jedoch sind in der Literatur auch negative Ergebnisse nach ESWT zu finden. Einige Autoren berichten von keiner sichtbaren Wirkung der ESWT-Applikation auf den Knochen. Es wurden Versuche durchgeführt, bei denen keine Wirkung auf die histologische Beschaffenheit des Knochens zu erkennen war (Benthien et al., 1999). Keinen beschleunigten Frakturschluß oder einen anderen Effekt auf den Knochen wurde in einer weiteren Studie gesehen (Augat et al., 1995).

Um diese Beobachtungen zu überprüfen, wurden der vorliegenden Arbeit Kaninchenfemora mit ESWT behandelt. Es wurden unterschiedliche Impulszahlen appliziert und die Standzeit bis zur Knochenentnahme variiert, um einen orientierenden Überblick zu erlangen, ob überhaupt eine Wirkung eintreten würde. Die Ergebnisse zeigen jedoch keinen Unterschied in Bezug auf die histologische Organisation von der behandelten zur unbehandelten Seite. Ein Indikator für die Hypothese der verlängerten inflammatorischen Phase ist die überschießende Kallusbildung, die durch eine Dickenzunahme der Kortikalis zu überprüfen ist. Die Knochendicke wurde bestimmt, um mögliche Knochenanbauvorgänge, die durch ESWT hervorgerufen sein könnten, nachzuweisen. Als Vergleichswert zur behandelten Seite wurde wiederum die unbehandelte Gegenseite gewählt. Auch in diesem Punkt konnte bei den

Versuchstieren kein Unterschied zur unbehandelten Gegenseite festgestellt werden. Es konnte keine Dickenzunahme der Kortikalis aufgedeckt werden, der auf eine überschießende Kallusbildung hätte hinweisen können.

Eine andere Möglichkeit für eine histologisch erkennbare Desorganisation durch eine verlängerte inflammatorische Phase sind die beschriebenen Periostdefekte (Ikeda et al., 1999). Diese subperiostalen Blutungen können über eine Entzündungsreaktion zu einer Gefäßeinsprossung geführt haben. Durch diese Gefäßeinsprossung können Umbau- oder Wachstumsvorgänge induziert worden sein. Diese Gefäßeinsprossung wird zumindest an der Sehnen-Knochen-Grenze beschrieben (Wang et al., 2002). Jedoch gibt der Autor in der Arbeit auch an, daß keine Veränderungen in der Knochenmatrix und vor allem der Vaskularisation im Knochen zu finden sind. Die Hämatome könnten durch eine durch die ESWT-Applikation bedingte Gefäßzerstörung verursacht sein. Hinweise auf eine Gefäßzerstörung sind jedoch nur bei wenigen Autoren zu finden (Ikeda et al., 1999; Wang et al., 2002), wobei sich diese Arbeiten deutlich von der vorliegenden unterscheiden. Bei Ikeda wurden Energien verwendet, die zum Teil vierzig Mal so groß sind, wie die aktuell verwendeten. Daß es bei so hohen Energien, die nicht im klinischen Alltag zur Anwendung kommen, zu Verletzungen kommen kann, liegt im Bereich des Möglichen.

In der anderen Arbeit wurde von Wang absichtlich auf die Femoralgefäße geschossen, an denen er dann Schäden beobachtete. Die Schäden waren hierbei vor allem an der Arterie zu beobachten, die aufgrund ihrer Anatomie an der Stelle fest eingebettet ist und deshalb nicht in der Lage war, durch Flexibilität den Stoßwellen auszuweichen, wie es z.B. dort die Vene schaffte. Andere Gefäßzerstörungen finden sich in der Literatur nur an anderer Stelle. So berichten einige Autoren von Hämatomen und Hämorrhagien in der Nierenkapsel und im Nierenparenchym, die zu fibrotischen Umbauvorgängen,

einer Parenchymverdickung und Bereichen von Avaskularität geführt haben (Brendel et al., 1987; Fajardo et al., 1990).

Aber auch zu Schäden am Gefäßsystem gibt es negative Beobachtungen. So wurde durch die ESWT-Behandlung histologisch und radiographisch kein Effekt auf die periostale Oberfläche gesehen (Forriol et al., 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund der kontroversen Meinungen auch auf das Periost und den subperiostalen Raum geachtet. Es waren keine periostalen Schäden oder Blutungen erkennbar. Auch der subperiostale Raum stellte sich unversehrt dar. Es waren auch hier keinerlei Blutungen oder Abhebungen zu erkennen, die auf stattgefundene Blutungen hätten hindeuten können.

Eine Gefäßeinsprossung, die im Rahmen des inflammatorischen Geschehens entstanden und als Hinweis auf knöchernes Wachstum anzusehen wäre, konnte auch von uns nicht beobachtet werden. Die Gefäßdichte der behandelten Seite zeigte keinen signifikanten Unterschied zur unbehandelten Seite. Dieses ist so auch bereits in der Literatur beschrieben worden. So war bei Hunden keine Veränderung der Vaskularisation im Knochen nach ESWT-Behandlung zu erkennen (Wang et al., 2002). Diese Beobachtungen werden durch die vorliegenden Ergebnisse unterstützt.

Eine andere Hypothese sieht Knochendestruktionen oder Mikrotraumata, die durch die Stoßwellen verursacht sein sollen, als Ursache der Heilungsbeschleunigung (Sukul et al., 1993; Ikeda et al., 1999). Die beobachteten Destruktionen reichen von kleinen Mikrotraumata, über abgesprengte Knochenchips bis hin zu Frakturen. Bestimmende Punkte der Schwere der Destruktionen sind die verwendete Dosis und aufgrund der unterschiedlichen Knochenanatomie die Spezies des eingesetzten Versuchstieres.

Diese Beobachtungen waren an unseren Versuchstieren ebenfalls nicht nachzuvollziehen. Es sind weder Frakturen, noch kleine Knochendefekte zu beobachten, obwohl die verwendete Energieflußdichte ED_+ von $1,49 \text{ mJ/mm}^2$ in dem üblicherweise genutzten Energiespektrum liegt. So arbeitete z.B. Sukul mit Energien von $0,23$ und $0,6 \text{ mJ/mm}^2$, Tischer mit $0,9$ und $1,2 \text{ mJ/mm}^2$ und Ikeda mit 10 bis 40 mJ/mm^2 . Insgesamt werden von der Mehrzahl der Autoren Energien zwischen $0,6$ und $1,2 \text{ mJ/mm}^2$ verwendet. Das zeigt, daß die von uns verwendete Energie im oberen Bereich der genutzten Energien liegt.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die durch die anderen Autoren teilweise beobachteten Veränderungen ist die Induktion und Expression von molekularen Signalstoffen, die dann zu Veränderungen wie Knochenumbau oder Knochenwachstum führen. Eine ESWT-Applikation hat in Versuchen an humanen Knochenmarkszellen zu einer Membranhyperpolarisation geführt, die von einer Ras-Aktivierung gefolgt war und zu einer Expression von Osteogenetischen-Transkriptionsfaktor (CBFA1) geführt hat (Wang et al., 2001). Desweiteren wird die stoßwellenvermittelte Induktion des Wachstumsfaktors TGF- β 1 und des Neurotransmitters Substanz P diskutiert (Tischer et al., 2002). Ob und in welchem Ausmaß diese Beobachtungen eine Relevanz für Knochenumbauvorgänge haben, ist zurzeit Gegenstand weiterer Forschungen. Dieser Punkt konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch aufgrund des Studienaufbaus nicht überprüft werden.

Unsere Untersuchungen geben keinen Hinweis auf abgesprengte Knochenfragmente in der Lunge, wie dies bislang in einer Arbeit beschrieben wurde (Maier et al., 2003). In dieser Arbeit wurden fleckige Oberflächenveränderungen der Lungen als Folge einer ESWT-Behandlung beschrieben, die als kleine Lungenembolien gewertet wurden. Dazu korrespondierend wurden ca. $300 \text{ }\mu\text{m}$ große Knochenfragmente in den

Lungengefäßen gefunden, die sich zum Großteil in Resorption befunden haben. So konnten bei 87,5% der Kaninchen fleckige Veränderungen und bei 75% Knochenfragmente in den histologischen Schnitten beobachtet werden. Diese Veränderungen waren nach einer ESWT-Behandlung am distalen Femur mit 1500 Impulsen bei einer Energieflußdichte von $0,9 \text{ mJ/mm}^2$ zu sehen. Der Nachuntersuchungszeitpunkt lag sechs Wochen nach der Behandlung (Maier et al., 2003).

Im Gegensatz dazu wurden unsere Tiere mit bis zu 4000 Impulsen bei einer Energieflußdichte ED_+ von $1,49 \text{ mJ/mm}^2$ am zentralen Femur behandelt. In den Nachuntersuchungen nach bis zu vier Wochen waren keinerlei Hinweise auf ein ähnliches Geschehen zu sehen. Die Lungenoberflächen zeigten keine makroskopischen Flecken, ebenso konnten in den histologischen Schnitten Knochenfragmente weder in Lungengefäßen noch in den Alveolarräumen nachgewiesen werden, obwohl unsere Untersuchungsmethodik in der Lage gewesen wäre, selbst Partikel in der Größe bis zu $10 \mu\text{m}$ zu detektieren.

Unsere Ergebnisse stehen daher im Gegensatz zu denen von Maier et al.. Obwohl unsere Tiere mit Energien behandelt wurden, die über 50% höher lagen und auch unsere Impulszahl deutlich höher lag, haben wir keine Hinweise auf ein solches embolisches Geschehen finden können. Ein ungeklärter Punkt ist, wie Knochenfragmente dieser Größe durch die Gefäße bis in die Lunge gelangen sollen, ohne daß massive Verletzungen sowohl am Knochen innerhalb der Fokuszone, als auch an den Gefäßwänden nachweisbar sind. Ebenso können die Fragmente nicht in den alveolaren Raum gelangen, ohne daß Verletzungen an der Basalmembran der Alveolaren nachweisbar sind. Zusätzlich sind auch dort Gefäßverletzungen nötig, damit die Fragmente von den Gefäßen in den Alveolarraum übertreten können. In der Arbeit Maiers fehlt auch der konkrete Beweis, daß die beschriebenen Fragmente aus dem durch ESWT-Applikation

behandelten Bereich des Femurs stammen. Es sind in seiner Arbeit keine Verletzungen des Knochens, wie z.B. Trabekelfrakturen oder andere Frakturen, beschrieben. Bei einer Fragmentgröße von ca. 300 μm sollten die Frakturen, die die Herkunft der Fragmente darstellen, eigentlich sichtbar sein.

Die divergenten Ergebnisse könnten durch die Verwendung von verschiedenen Tierspezies zu erklären sein. So haben Haupt und Yeaman ihre Beobachtungen z.B. an Ratten (Yeaman et al., 1989; Haupt et al., 1992), Ikeda und Wang ihre an Hunden gemacht (Ikeda et al., 1999; Wang et al., 2002), Augat hat mit Schafen (Augat et al., 1995) und Benthien mit Schweinen gearbeitet (Benthien et al., 1999), während die vorliegenden Ergebnisse an Kaninchen gewonnen wurden. Auch die Beobachtungen von Fajardo und Brendel sind durch die Unterschiede der parenchymatösen Niere zum Knochen nicht direkt vergleichbar (Brendel et al., 1987; Fajardo et al., 1990). Durch die unterschiedlichen Spezies der verwendeten Versuchstiere und den daraus resultierenden anatomischen Unterschieden sind die Ergebnisse der unterschiedlichen Arbeiten untereinander schwer zu vergleichen.

Auch unterscheiden sich die applizierten Impulszahlen und verwendeten Energieflußdichten weit voneinander. Während Augat 300 Impulse auf den Knochen appliziert hat (Augat et al., 1995), wurden von Sukul 10000 Impulse angewendet (Sukul et al., 1993). Bei den Energieflußdichten reichen die benutzten Werte ebenfalls weit auseinander. Während Wang mit Energieflußdichten von $0,18\text{mJ}/\text{mm}^2$ gearbeitet hat, die deutlich unter den von uns verwendeten Energien lagen, wurden von Ikeda Energien bis zu $40\text{mJ}/\text{mm}^2$ verwendet (Ikeda et al., 1999). Die vorliegenden Ergebnisse wurden mit $1,49\text{mJ}/\text{mm}^2$ und bis zu 4000 Impulsen gewonnen. Diese Parameter sind also weder sehr hoch, noch sehr niedrig angesiedelt. Vergleicht man die unterschiedlichen Energieparameter der Arbeiten, fällt zusätzlich auf, daß es

derzeit keinen sicheren Hinweis auf eine „Schwellendosis“ gibt, ab der oder bis zu der die ESWT-Applikation zu Veränderungen an Knochen oder Gefäßen führt. Es sind sowohl positive Ergebnisse mit hohen Energien, als auch mit niedrigen Energien veröffentlicht worden. Deshalb wurden bei den vorliegenden Versuchen Energien verwendet, die am oberen Rand des klinisch benutzten Intervalls liegen.

Es wurden auch unterschiedliche Nachbeobachtungszeiträume benutzt. So wurden die Ergebnisse der anderen Studien teilweise bereits direkt nach ESWT-Applikation (Ikeda et al., 1999), teilweise auch erst nach 12 Wochen (Wang et al., 2003) gewonnen. Auch darin könnten die unterschiedlichen Ergebnisse begründet liegen. So können erwartete ESWT-induzierte Vorgänge noch nicht eingetreten, oder bereits abgeschlossen sein. Aus diesem Grund wurde bei den vorliegenden Ergebnissen die Standzeit nach ESWT bis zur Knochenentnahme variiert, um auszuschließen, daß bei einem längeren oder kürzeren Intervall eine Wirkung zu beobachten gewesen wäre. Es ist jedoch nicht sicher auszuschließen, daß bei einer Standzeit von über 4 Wochen noch eine Wirkung zu beobachten gewesen wäre, obschon dann zumindest Hinweise zu finden gewesen sein sollten.

Unterschiede in der Literatur finden sich auch hinsichtlich der Applikationstechnik der Stoßwellen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Stoßwellen über ein Kissen und mit Kontaktgel ins Gewebe eingekoppelt. Bei den anderen Autoren wurden die Tiere häufig in einem Wassertank behandelt, die Ankoppelung erfolgte also durch das Wasser (Yeaman et al., 1989; Sukul et al., 1993; Väterlein et al., 2000). Bei einem solchen Versuchsaufbau kann möglicherweise nicht so präzise behandelt werden, wie bei der aktuell benutzten Methode.

Eine andere Möglichkeit bestünde darin, daß mit der Fokuszone der aktuellen Arbeit der Knochen nicht getroffen worden wäre. Dieses ist jedoch durch die verwendete Versuchsanordnung mit hoher Sicherheit auszuschließen, da vor der ESWT-Applikation die korrekte Lage des Femurs in der Fokuszone kontrolliert wurde. Während der in etwa 30minütigen Therapiedauer könnte ein kleiner Teil der Impulse durch Lageänderungen des Femurs nicht die Zielregion getroffen haben. Es kann jedoch mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden, daß ein relevanter Anteil der Impulse das Zielgebiet verfehlt hat, da während der ESWT-Applikation regelmäßige Durchleuchtungskontrollen durchgeführt wurden, um die korrekte Lage des Femurs zu sichern.

Die weite Spreizung der verwendeten Beschußparameter bezüglich Energie, Impulsanzahl und die unterschiedlich langen Standzeiten bis zur Knochenentnahme grenzt auch die Möglichkeit ein, daß bei anderen Werten eine Wirkung zu sehen gewesen wäre. Daß sich bei einer noch längeren Standzeit eine Wirkung ausbildet, von der in den gewonnenen Proben noch keine Anzeichen zu entdecken waren, ist sehr unwahrscheinlich. Natürlich muß bedacht werden, daß bei einer größeren Versuchsanzahl möglicherweise ein Effekt zu sehen gewesen wäre. Da jedoch bei keinem Tier Anzeichen zu erkennen waren, war es ethisch nicht vertretbar, weitere Tiere für den Versuch zu opfern. Aufgrund der geringen Fallzahl wurde auch auf statistische Tests verzichtet, die bei solch geringen Zahlen unsinnig gewesen wären.

Unter dem Eindruck dieser Ergebnisse muß man die bislang durchgeführten klinischen Studien kritisch betrachten. Obschon die Vergleichbarkeit dadurch eingeschränkt ist, daß sich die menschliche Anatomie deutlich von der tierischen unterscheidet, sind die gewonnenen negativen Ergebnisse, die keine Gefäßeinsprossung und keine Dickenzunahme der Kortikalis zeigen, ein Hinweis. Da im klinischen Alltag ähnliche Energien wie im Tierversuch

eingesetzt werden und der menschliche Knochen aufgrund seiner Größe schwerer zu beeinflussen ist als z.B. ein Kaninchenknochen, ist es eher unwahrscheinlich, daß eine Behandlung, die im Tierversuch keine Wachstumsbeschleunigung zeigt, weil keine zusätzliche Gefäßeinsprossung und keine Kortikalisvolumenzunahme nachweisbar ist, in ihrer klinischen Anwendung positive Ergebnisse zeigt.

Die in der klinischen Anwendung beobachteten Ergebnisse sind nicht sicher auf die ESWT-Applikation zurückzuführen, da hierbei viele weitere Co-Faktoren eine Rolle spielen. So ist es durchaus denkbar, daß ein instabiler Bruch durch die in den Studien durchgeführte Stabilisierung alleine zum Ausheilen gebracht worden wäre. Auch sollte man berücksichtigen, daß der Heilungsprozeß an sich individuell sehr unterschiedlich verlaufen kann, so daß mit der willkürlich festgelegten Definition, einen nach sechs Monaten nicht ausgeheilten Bruch als Pseudoarthrose zu bezeichnen, auch Brüche, deren Heilungspotential noch gar nicht erschöpft ist und die alleine zur Ausheilung kommen würden, mit in die Gruppe der Pseudoarthrosen einbezogen werden (Biedermann et al., 2003).

Bei einem erstmalig durchgeführten Vergleich von klinischen Literaturdaten über den Langzeitverlauf von Pseudarthrosen mit dem klinischen Verlauf nach ESWT von Pseudarthrosen konnte kein Unterschied in der doch noch eintretenden Konsolidierungsrate festgestellt werden. Es konnte gezeigt werden, daß auch bei eingetretener sogenannter Pseudarthrose doch noch verzögert in den meisten Fällen eine knöcherne Heilung erfolgte und daß durch ESWT keine Steigerung der Heilung möglich war, obwohl die Autoren dies aufgrund von methodischen Fehlern gefordert hatten. Somit bestätigen unsere negativen Tierversuchsergebnisse den erst seit kurzem bekannten unbeeinflussten klinischen Verlauf unter ESWT.

6. Literatur

Augat, P.; Claes, L.; Suger, G.:

In vivo effect of shock-waves on the healing of fractured bone.

J Biomech 1995;7:374-378.

Baumgart, R.; Betz, A.; Kessler, S.; Kettler, M.; Schweiberer, L.:

Possibilities in the reconstruction of bone defects.

Orthopäde 1994;23(6):396-403.

Bailey, M.R., Blackstock, D.T., Cleveland, R.O., Crum, L.A.:

Comparison of electrohydraulic lithotripters with rigid and pressure-release ellipsoidal reflectors. II. Cavitation fields.

J Acoust Soc Am 1999;106:1149-1160.

Barrios, R.; Solchaga, L.; Forriol, F.; Canadell, J.:

Effect of high energy shock waves on bone. An experimental study on sheep.

JBJS (Br) 1993;75-B;SUPP II.

Benthien, J.P.; Notni, A.; Fuhrmann, R.; Venbrocks, R.; Schulze, E.:

Die Wirkungen von extrakorporalen Stoßwellen (ESWT) auf die Epiphysenfuge beim Schwein.

Orthopädische Praxis 35 1999;2;69-73.

Beutler, S.; Regel, G.; Pape, H.C.; Machtens, S.; Weinberg, A.M.; Kremeike, I.; Jonas, U.; Tscherne, H.:

Extracorporeal shock wave therapy for delayed union of long bone fractures - preliminary results of a prospective cohort study.

Unfallchirurg 1999;102(11):839-47.

Biedermann, R.; Martin, A.; Handle, G.; Auckenthaler, T.; Bach, C.; Krismer, M.:

Extracorporeal shock waves in the treatment of nonunions.

J Trauma 2003;54:936-42.

Brandner, H.; Späth, K.:

Extrakorporale Stoßwellentherapie bei Knochenheilungsstörungen.

Trauma Berufsk 2001;3:253-261.

Brendel, W.; Delius, M.; Goeth, A.:

Effect of shock waves on the microvasculature.

Prog appl microcirc 12 1987;41-50.

Cartledge JJ, Cross WR, Lloyd SN, Joyce AD.

The efficacy of a range of contact media as coupling agents in extracorporeal shockwave lithotripsy.

BJU Int. 2001;88(4):321-4.

Delacretaz, G.; Rink, K.; Pittomvils, G.:

Importance of the implosion of ESWL-induced cavitation bubbles.
Ultrasound Med Biol 1995;21:97-103.

Delius, M.; Weiss, N.; Gambihler, S.; Goetz, A.; Brendel, W.:

Tumor therapy with shock waves requires modified lithotripter shock waves.

Naturwissenschaften 1989;76:573.

Delius M., Denk R., Berding Ch.:

Biological effects of shock waves: Cavitation by shock waves in piglet liver.

Ultrasound Med Biol 1990;16:467-472.

Delius, M.; Ueberle, F.; Gambihler, S.:

Destruction of gallstones and model stones by extracorporeal shock waves.

Ultrasound Med Biol 1994;20:251-258.

Delius, M.; Draenert, K.; Al Diek, Y.; Draenert, Y.:

Biological effect of shock waves: in vivo effect of high energy pulses on rabbit bone.

Ultrasound Med Biol 1995;21:1219-25.

Delius, M.; Ueberle, F.; Eisenmenger, W.:

Extracorporeal shock waves act by shock wave-gas bubble interaction.

Ultrasound Med Biol 1998;24:1055-59.

Eisenmenger, W.:

The mechanisms of stone fragmentation in ESWL.

Ultrasound Med Biol 2001;27(5):683-93.

Eisenmenger, W.:

The first clinical results of "wide-focus and low-pressure" ESWL.

Ultrasound Med Biol 2002;28:769-774.

Ekkernkamp, A.; Haupt, G.; Knopf, H.-J.; Püllenber, P.; Muhr; Senge, Th.:

Effects of extracorporeal shock waves on standardized fractures in sheeps.

J Endourology 1991;5:S.49 A 25 (Abstr).

Fajardo, L.L.; Hillman, B.J.; Weber, C.; Donovan, J.M.; Drach, G.W.:
Microvascular changes in rabbit kidneys after extracorporeal shock wave treatment.

Invest Radiol 1990;25(6):664-9.

Forriol, F.; Solchaga, J.; Moreno, L.; Canadell, J.:
The effect of shockwaves on mature and healing cortical bone.

International Orthopaedics (SICOT) 1994;18:325-329.

Granz, B.; Kohler, G.:
What makes a shock wave efficient in lithotripsy?

J Stone Dis 1992;4:123-128.

Gerdesmeyer, L.; Maier, M.; Haake, M.; Schmitz, C.:
Physikalisch-technische Grundlagen der extrakorporalen Stosswellentherapie (ESWT).

Orthopäde 2002;31:610-617.

Gerdesmeyer, L.; von Eiff, C.; Horn, C.; Henne, M.; Roessner, M.; Diehl, P.; Gollwitzer, H.:

Antibacterial effects of extracorporeal shock waves

Ultrasound in Medicine & Biology 2005; 1:115-119.

Greenstein, A.; Matzkin, H.:

Does the rate of extracorporeal shock wave delivery affect stone fragmentation?

Urology 1999;54:430-432.

Haake, M.; Wessel, C.; Wilke, A.:

Einwirkung extrakorporaler Stoßwellen (ESWT) auf humane Knochenmarkszellkulturen.

Biomed Tech 1999;44:278-282.

Haake, M.; Böddeker, I.R.; Decker, T.; Buch, M.; Vogel, M.; Labek, G.; Maier, M.; Loew, M.; Maier-Boerries, O.; Fischer, J.; Betthäuser, A.; Rehack, H.C.; Kanovsky, W.; Müller, I.; Gerdesmeyer, L.; Rompe, J.D.:

Side effects of Extracorporeal Shock Wave Therapy (ESWT) in the treatment of tennis elbow.

Arch OrthopTraum Surg 2002.

Haupt, G.; Haupt, A.; Ekkernkamp, A.; Gerety, B.; Chvapil, M.:

Influence of shock waves on fracture healing.

Journal of endourology 1992;529.

Haupt, G.:

Use of Extracorporeal Shock Waves in the treatment of pseudarthrosis, tendinopathy and other orthopedic diseases.

J Urol 1997;158(1):4-11.

Heller, K.-D.; Niethard, F.U.:

Der Einsatz der extrakorporalen Stoßwellentherapie in der Orthopädie – eine Metaanalyse.

Z Orthop 136 1998;390-401.

Howard, D.; Sturtevant, B.:

In vitro study of the mechanical effects of shock-wave lithotripsy.

Ultrasound Med Biol 1997;23:1107-1122.

Huber P, Jochle K, Debus J:

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 1998;43:3113-3128.

Ikeda, K.; Tomita, K.; Takayama, K.:

Application of extracorporeal shock wave on bone: preliminary report.

J Trauma 1999;47(5):946-50.

Johannes, E.J.; Sukul, K.; Matura, E.; Schutte, H.E.:

High-energy shock waves for the treatment of nonunions - experiments in dogs.

J Surg Res 1994;57:246–252.

Krause H.:

Physik und Technik medizinischer Stoßwellensysteme.

In Rompe JD (ed). **Extrakorporale Stoßwellentherapie.** Weinheim, Chapman and Hall;15-34;1997.

Kusnierczak, D.; Brocai, D.R.; Vettel, U.; Loew, M.:

Effect of extracorporeal shockwave administration on biological behavior of bone cells in vitro.

Z Orthop Ihre Grenzgeb 2000;138(1):29-33.

Liu, M.Q.; Guo, X.; Kuang, S.C.; Wang, S.H.; Rong, G.W.:

Application of extracorporeal shock-wave therapy (ESWT) in delayed unions and non-unions.

Beijing Da Xue Xue Bao 2004; 36(3):327-9.

Loew, M.; Jurgowski, W.; Thomsen, M.:

Effect of extracorporeal shockwave therapy on tendinosis calcarea of the shoulder. A preliminary report.

Urologe 1995;34:49-53.

Lokhandwalla, M.; Sturtevant, B.:

Fracture mechanics model of stone comminution in ESWL and implications for tissue damage.

Phys Med Biol 2000;45:1923-1940.

Maier, M.; Freed, J.A.; Milz, S.; Pellengahr, C.; Schmitz, C.

Nachweis von Knochenfragmenten in Lungengefäßen nach hochenergetischer Stoßwellenapplikation am distalen Femur in einem In-vivo-Tiermodell.

Z Orthop Ihre Grenzgeb. 2003;141:223-6.

Malevez, Ch.; Dujardin, T.; Glorieux, V.; Swennen, G.; Schutyser, F.; Van Cleynenbreugel, J.:

Bone distraction osteogenesis.

Rev Belge Med Dent 2002;57(2):137-49.

Martini, L.; Giavaresi, G.; Fini, M.; Torricelli, P.; De Pretto, M.; Schaden, W.; Giardino, R.:

Effect of Extracorporeal Shock Wave Therapy on Osteoblastlike Cells.

Clin Orthop. 2003;413:269-280.

McCormack, D.; Lane, H.; McElwain, J.:

The osteogenic potential of extracorporeal shock wave therapy. An in-vivo study.

Ir J Med Sci 1996;165(1):20-2.

Ogden, J.A.; Alvarez, R.G.; Levitt, R.; Marlow, M.:

Shock wave therapy (Orthotripsy) in musculoskeletal disorders.

Clin Orthop 2001;387:22-40.

Ogden, J.A.; Toth-Kischkat, A.; Schultheiss, R.:

Principles of shock wave therapy.

Clin Orthop 2001;387:8-17.

Pacicca, D.M.; Patel, N.; Lee, C.; Salisbury, K.; Lehmann, W.; Carvalho, R.; Gerstenfeld, L.C.; Einhorn, T.A.:

Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis.

Bone 2003;33(6):889-98.

Pigozzi, F.; Moneta, M.R.; Giombini, A.; Giannini, S.; Di Cesare, A.; Fagnani, F.; Mariani, P.P.:

Low-intensity pulsed ultrasound in the conservative treatment of pseudoarthrosis.

J Sports Med Phys Fitness 2004;44(2):173-8

Pschyrembel, 257. Auflage, Walter de Gruyter-Verlag Hamburg 1994;1257.

Rompe, J.-D.; Eysel, P.; Hopf, C.; Vogel, J.; Kuellmer, K.:

Extrakorporale Stosswellenapplikation bei gestörter Knochenheilung. Eine kritische Bestandsaufnahme.

Unfallchirurg 1997;Vol.100;10:845-849.

Rompe, J.-D.; Küllmer, K.; Vogel, J.; Eckardt, A.; Wahlmann, U.; Eysel, P.; Hopf, C.:

Extrakorporale Stoßwellentherapie- Experimentelle Grundlagen, klinischer Einsatz.

Orthopäde 1997;26:215-228.

Rompe, J.-D.:

Extrakorporale Stoßwellentherapie.

London, Chapman and Hall, 1997.

Schaden, W.:

Extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWT) bei Pseudarthrosen und verzögerter Frakturheilung.

Trauma und Berufskrankheit 2000;2[Suppl 3];333-339.

Seidl, M., P. Steinbach, et al.:

Induction of stress fibers and intercellular gaps in human vascular endothelium by shock waves.

Ultrasonics 1994;Vol.32(5):397ff..

Sonden, A.:

Mechanisms of shock wave induced endothelial cell injury.

Lasers in Surgery and Medicine 2002;31:233-241.

Staudenraus, J.:

In Vivo Stosswellenmessung.

In Chaussy, C. (Hrsg.): **Die Stosswelle in Forschung und Klinik.** Attempto Verlag 1995;21-26.

Steinbach, P.; Hofstaedter, F.; Nicolai, H.; Roessler, W.; Wieland, W.:
In vitro investigations on cellular damage induced by high energy shock waves.

Ultrasound Med Biol 1992;Vol.18;8:691-699.

Steinbach, P.; Hofstaedter, F.; Nicolai, H.; Roessler, W.; Wieland, W.:
Determination of the energy-dependent extent of vascular damage caused by high-energy shock waves in an umbilical cord model.

Res 1993;21:279-282.

Sukul, K.S., Johannes, E.J.; Pierik, E.G.J.M.; Van Eijck, J.W.M.; Kristelijn, M.J.E.:

The effect of high energy shock waves focused on cortical bone: an in vitro study.

Journal of surgical research 1993;53:1-6.

Tavakkoli, J.; Birer, A.; Arefiev, A.:

A piezocomposite shock wave generator with electronic focusing capability: application for producing cavitation-induced lesions in rabbit liver.

Ultrasound Med Biol 1997;23:107-115.

Tischer, T; Milz, S.; Anetzberger, H.; Müller P.E.; Wirtz, D.C.; Schmitz, C.; Ueberle, F.; Maier, M.:

Extracorporale Stoßwellen induzieren ventral-periostale Knochenneubildung außerhalb der Fokuszone – Ergebnisse einer in-vivo Untersuchung am Tiermodell.

Z Orthop 2002;140:281-285.

Ueberle, F.:

Shock wave technology.

In Siebert, W. (Hrsg.): **Extracorporal shock waves in orthopaedics.**

Springer 1997;59-87.

Uslu, M.M.; Bozdogan, O.; Guney, S.; Bilgili, H.; Kaya, U.; Olcay, B.; Korkusuz, F.:

The effect of extracorporeal shock wave treatment (ESWT) on bone defects. An experimental study.

Bull Hosp Jt Dis 1999;58(2):114-8.

Valchanov, V.; Michailov, P.:

High energy shock waves in the treatment of delayed non-union of fractures.

International orthopaedics 1991;181-184.

Väterlein, N.; Lüssenhop, S.; Hahn, M.; Delling, G.; Meiss, A.L.:
The effect of extracorporeal shock waves on joint cartilage - an in vivo study in rabbits.

Arch Orth Traum Surg 2000;120;7/8;403-406.

Wang, C.J.; Huang, H.Y.; Chen, H.H.; Pai, C.H.; Yang, K.D.:
Effect of shock wave therapy on acute fractures of the tibia: a study in a dog model.

Clin Orthop 2001;387:112-8.

Wang, C.J.; Huang, H.Y.; Yang, K.; Wang, F.S.; Wong, M.:
Pathomechanism of shock wave injuries on femoral artery, vein and nerve. An experimental study in dogs.

Injury 2002;33(5):439-46.

Wang, C.J.; Huang, H.Y.; Pai, C.H.:
Shock wave-enhanced neovascularization at the tendon-bone junction: an experiment in dogs.

J Foot Ankle Surg 2002;41:16-22.

Wang, C.J.; Wang, F.S.; Yang, K.D.; Weng, L.H.; Hsu, C.C.; Huang, C.S.; Yang, L.C.:

Shock wave therapy induces neovascularization at the tendon-bone junction. A study in rabbits.

J Orthop Res 2003;21:984-9.

Wang, F.S.; Wang, C.J.; Huang, H.J.; Chung, H.; Chen, R.F.; Yang, K.D.:
Physical shock wave mediates membrane hyperpolarization and Ras activation for osteogenesis in human bone marrow stromal cells.

Biochem Biophys Res Commun 2001;287:648-55.

Weiss, S.; Baumgart, R.; Jochum, M.; Strasburger, C.J.; Bidlingmaier, M.:
Systemic regulation of distraction osteogenesis: a cascade of biochemical factors.

J Bone Miner Res 2002;17(7):1280-9.

Wess, O.; Überle, F.; Dührssen, R. N.; Hilcken, D.; Krauss, W.; Reuner, T.; Schultheiss, R.; Staudenraus, I.; Rattne, M.; Haaks, W.; Granz, B.:

Working Group Technical Developments- Consensus Report.

In: Chaussy C, Eisenberger F, Jocham D, Wilbert D.: High Energy Shock Waves in Medicine. Thieme Stuttgart 1997;59-71(ISBN 3-13-104831).

Yang, C., W.D.W. Heston, S. Gulati, W.R. Fair:

The effect of high energy shock waves (HESWT) on human bone marrow.
Urol Res 16 1988;427-429.

Yeaman, L.D., Jerome, C.P., McCullough, D.:

Effects of shock waves on the structure and growth of the immature rat epiphysis.

The journal of Urology 1989;141:670-674.

Zhong, P.; Cioanta, I.; Cocks, F.H.; Preminger, G.M.:

Inertial cavitation and associated acoustic emission produced during electrohydraulic shock wave lithotripsy.

J Acoust Soc Am 1997;101:2940-2950.

7. Zusammenfassung

Die extracorporale Stoßwellentherapie wird seit Jahren im klinischen Alltag eingesetzt, obwohl ihr genauer Wirkungsmechanismus noch ungeklärt ist. Diese Arbeit befaßt sich mit den Auswirkungen dieser Therapieform auf gesunden Knochen, um mögliche Knochenwachstums- oder –umbauprozesse erkennen zu können, die durch die Stoßwellen induziert sein könnten. Zu diesem Zweck wurden sieben New Zealand White Rabbits mit einer Energieflußdichte von $1,49 \text{ mJ/mm}^2$ bei 1000, 2000 oder 4000 Impulsen an einem Femur behandelt, während die Gegenseite als Kontrolle diente. Nach einem Beobachtungszeitraum von 1, 8, 14 oder 28 Tagen wurden die Knochen entnommen und für eine histologische Untersuchung aufgearbeitet. Bei dieser Untersuchung wurden die Femora eingebettet und geschnitten. Die Schnitte wurden digitalisiert und Messungen mittels einer Morphometrie-Software durchgeführt, um die Kortikalisdicke an allen vier Seiten und die Gefäßdichte in der Fokuszone zu messen. Die Gefäßdichte wurde durch die Weibel-Grid-Methode bestimmt, bei der das Verhältnis der mit Gefäßanschnitten bedeckten Fläche zur Gesamtfläche gemessen wird. Zusätzlich wurde auf Periostveränderungen wie z.B. Blutungen geachtet. Als weiteres Beobachtungskriterium wurden vier Lungen exemplarisch auf durch Knochenfragmente ausgelöste Embolien untersucht. Dazu wurden die Lungen ebenfalls eingebettet und geschnitten. Danach wurden die Schnitte unter dem Mikroskop durchgemustert, um mögliche Veränderungen zu entdecken und nachzuweisen.

Die Ergebnisse zeigen, daß trotz der wechselnden Energien und des unterschiedlich langen Beobachtungszeitraumes keine Veränderungen zu erkennen sind, die auf durch ESWT induzierte Knochenum- oder –

anbauprozesse hindeuten könnten. Ebenso sind keine Unterschiede in der Gefäßdichte von behandelter zu unbehandelter Seite zu sehen. Dadurch scheidet auch die Induktion einer Neovaskularisation durch ESWT aus. Es waren weiterhin keine Periostveränderungen zu erkennen. Die Lungenuntersuchung zeigte ebenfalls keine Veränderungen.

Somit bestätigen unsere negativen Tierversuchsergebnisse den erst seit kurzem bekannten unbeeinflussten klinischen Verlauf unter ESWT.

Anhang A

Stosswellenparameter MINILITH SL1 gemäß DGS-Konvention

Drucksonde : PVDF-Nadelhydrophon und Glasfaser-Laser-Hydrophon ()

Die grau hinterlegten Werte sind interpoliert aus den gemessenen Werten für die drei Energiestufen 1,6 und 8

List of Shock Wave Parameters

Parameter	Symbol	Energy setting minimum level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5	Energy setting medium level 6	Level 7	Energy setting maximum level 8
Peak positive pressure PVDF	P ₊ (MPa)	8	9.5	13.6	18.3	24.6	35	44.5	70
(Laser)	P ₊ (MPa)	(12.5)	1(5)	(20)	(26)	(35)	(45.0)	(62.5)	(91.8)
Peak negative Pressure (Laser)	P ₋ (MPa)	(8.4)					(16.5)		(19.2)
-6-dB focal extend in x,y and z-direction PVDF	f _{x(-6dB)} (mm)	4,4 (5.5)	(5.1)	(4.75)	(4.35)	(3.9)	2.75(3.4)	(2.8)	1.9 (2.2)
	f _{y(-6dB)} (mm)	4.4 (5.5)	(5.1)	(4.75)	(4.35)	(3.9)	2.75 (3.4)	(2.8)	1.9 (2.2)
	f _{z(-6dB)} (mm)	41 (35.5)	(32.5)	(30)	(28)	(26.5)	30 (25)	(24.5)	24.5 (24)
5-MPa focal extend, lateral PVDF	F _{x(5MPa)} (mm)	3.5 (7.5)	5.2 (11)	6.8 (14)	8.7 (17.3)	10.5 (21)	12.7 (24)	15 (27)	17.4 (30)
(Laser)	f _{y(5MPa)} (mm)	3.5 (7.5)	5.2 (11)	6.8 (14)	8.7 (17.3)	10.5 (21)	12.7 (24)	15 (27)	17.4 (30)
5-mm focal zone, lateral	f _{x(5mm)} f _{y(5mm)}								

Positive energy flux density PVDF	ED₊ (mJ/mm²)	0.03	0.04	0.07	0.11	0.17	0.25	0.35	0.5
(Laser)		(0.08)	(0.13)	(0.22)	(0.33)	(0.44)	(0.63)	(0.78)	(1.10)
Total energy flux density* (Laser)	ED (mJ/mm²)	(0.15)	(0.22)	(0.32)	(0.44)	(0.59)	(0.78)	(1.05)	(1.49)

Positive energy of the -6-dB focus PVDF	$E_{+(-6dB)}$ (mJ)	0.32					1.20		1.25
(Laser)		(1.23)	(1.35)	(1.65)	(1.8)	(2.2)	(2.49)	(2.9)	(3.36)
Total energy of the -6-dB focus*	$E_{(-6dB)}$ (mJ)	(2.59)	(3.75)	(4.9)	(5.7)	(6.2)	(6.37)	(5.8)	(4.85)
Positive energy of the 5-MPa focus	$E_{+(5MPa)}$ (mJ)	0.24 (1.77)	0.7 (2.0)	1.5 (3.1)	2.5 (4.5)	4 (6.2)	6.55 (8.06)	9.0 (11.3)	13.40 (15.74)
Total energy of the 5-MPa focus*	$E_{(5MPa)}$ (mJ)	(4.03)	(13)	(22)	(30)	(37)	(49.2)	(62)	(74.0)
Positive energy of the 5-mm focal area PVDF	$E_{+(5mm)}$ (mJ)	0.38					2.62		4.44
(Laser)		(0.91)	(1.0)	(1.4)	(1.9)	(2.5)	(3.25)	(4.8)	(6.59)
Total energy of the 5-mm focal area* (Laser)	$E_{(5mm)}$ (mJ)	(1.91)	(3.4)	(5.3)	(7.3)	(9.8)	(12.03)	(15.2)	(18.43)

Interpolierte Werte

Energiestufen, Druck und positive Energieflußdichten ED_+ gemessen mit dem PVDF-Nadelhydrophon:

Energiestufen	Druck (MPa)	ED_+ (mJ/mm²)
0.1	2.6	0.003
0.2	3.4	0.006
0.4	4.9	0.012
0.6	6.0	0.018
0.8	7.1	0.024
1.0	8.0	0.030
1.5	8.8	0.035
2.0	9.5	0.040
2.5	11.7	0.055
3.0	13.6	0.070
3.5	16.0	0.090
4.0	18.3	0.110
4.5	21.5	0.140
5.0	24.6	0.170
5.5	29.0	0.210
6.0	35.0	0.250
6.5	39.1	0.300
7.0	44.5	0.350
7.5	54.8	0.425
8.0	70.0	0.500

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Dominik Weller
 Wohnort: Julienweg 70
 59071 Hamm
 Tel.: 0163 / 7 09 09 77
 Geburtstag und –ort: 09.09.77 in Hamm / Westf.
 Nationalität: deutsch

Schulbildung

1984 – 1988 Ketteler-Grundschule Hamm
 1988 – 1997 Freiherr-vom-Stein Gymnasium Hamm
 1995 – 1996 Sprecher der Schülerversretung
 1997 Abitur

Wehrdienst

1997 – 1998 Truppführer in 8. / Sanitätsregiment 7 (Hamm)

Studium

1998 – 2000 Vorklinisches Studium / Universität Marburg
 09/2000 Physicum
 2000 – 2004 Klinisches Studium / Universität Marburg
 09/2001 1. Staatsexamen
 09/2003 2. Staatsexamen
 2004 – 2005 Praktisches Jahr / TU München
 04/2004 – 07/2004 1. PJ-Tertial (Innere Medizin) / Krankenhaus München
 Bogenhausen
 08/2004 – 11/2004 2. PJ-Tertial (Chirurgie) / Kantonsspital Luzern, Schweiz
 12/ 2004 – 03/2005 3. PJ-Tertial (Orthopädische Chirurgie) / Kantonsspital
 St.Gallen, Schweiz
 05/2005 3.Staatsexamen

Famulaturen

02/2001 – 03/2001 Chirurgie / Ev. Krankenhaus Hamm
 02/2002 – 03/2002 Anästhesie / Klinikum Oberstdorf
 07/2002 – 08/2002 Sportorthopädie / TU München
 02/2003 – 03/2003 Anästhesie / Dr. Mendoza, Coburg

Verzeichnis der akademischen Lehrer

An der Philipps-Universität Marburg:

Arnold, Aumüller, Barth, Cetin, Czubayko, Daut, Engenhard-Cabillic, v. Garrell, Gemsa, Gerdes, Geus, Gotthardt, Gotzen, Görg, Grebe, Grimm, Griss, Haake, Happle, Hassilik, Heeg, Heller, Hildebrandt, Hoersch, Hoffmann, Hofmann, Höffken, Junge, Just, Kalinowski, Kern, Kim-Berger, Klose, v. Knobloch, König, Koolmann, Kretschmer, Krüger, Kroll, Kuhlmann, Lammel, Lemke, Lippert, Lorenz, Löffler, Maisch, Mennel, Moll, Mueller, Mutters, Neubauer, Oertel, Remschmidt, Renz, Richter, Rothmund, Röhm, Sattler, Schachtschabel, Schäfer, Schädel-Höpfner, Schlieck, Schmidt, Schnabel, Schuhmacher, Seyberth, Slenczka, Spies, Steiniger, Stief, Sure, Troeltsch, Vohland, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Wilke, Wille, Wirth, Wulf, Zielke, Zwioerek

An der TU München:

Feußner, Fuchs, Imhoff, Lorenz, Martinek, Rechel, Schepp und Schmidt-Truchseß.

Am Kantonsspital Luzern:

Babst, Curti, Metzger, Müller, Pfarr und Weller.

Am Kantonsspital St.Gallen:

Grob, Kessler, Kuster, Lattig, Oswald und Weber.

Danksagung

Ich müßte so vielen Menschen danken, die mir bei der Fertigstellung dieser Arbeit vor allem in moralischer Hinsicht geholfen haben, daß die damit verbundene Aufzählung den Rahmen sprengen würde. Aus diesem Grund werde ich zum Einen Gruppen bilden und zum Anderen einige wenige Personen, die mir besonders hilfreich zur Seite standen, exemplarisch erwähnen.

An erster Stelle gilt mein Dank meiner Familie, die es mir überhaupt erst ermöglicht hat, Medizin zu studieren und mich auch während des Studiums dem Studieren widmen zu können. Ein besonderer Dank geht deswegen an meine Eltern und meine Großmutter Renate.

Dann danke ich Michael Haake, Thomas Wirth, Moritz Konerding und Fr. Bahr für ihre Unterstützung während der gesamten Zeit.

Weiterhin will ich meinen Freunden danken, die mich vor allem in moralischer Hinsicht immer wieder aufgebaut und mir durch so manches Stimmungstief hindurch geholfen haben. Besonders hervorheben möchte ich Till Fischborn, Michaela Geßner, Inken Kemmer, Verena Adam und Myriam Bauer. Meine Freunde wissen selber am besten, wie, wodurch und womit sie mir geholfen haben.

Zu guter Letzt entschuldige ich mich bei allen, die sich hier vielleicht nicht namentlich erwähnt gefunden haben, aber sich gerne hätten lesen wollen. Wie oben schon erwähnt, hätte eine vollständige Aufzählung aller Personen, die mir geholfen haben, den Rahmen gesprengt und so mußte ich mich auf einige Wenige beschränken. Trotzdem bin ich mir bewußt und werde immer im Kopf haben, wem ich zu Dank verpflichtet bin!!!

DANKE!!!

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich, Dominik Weller, geboren am 09.09.1977, erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Pilotstudie zur Erfassung von durch extrakorporaler Stoßwellentherapie (ESWT) induzierten mikroskopischen Veränderungen im Knochen“ im Institut für Orthopädie unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Wirth ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Dominik Weller