

Aus der Orthopädischen Klinik,
Direktor Prof. Dr. med. D. Kohn,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

**Der Einfluß von Stoßwellen auf Chondrozyten
und die Bedeutung
für die Anwendung extrakorporaler Stoßwellenlithotripsie
in der Orthopädie**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2008

vorgelegt von: Henrike Renz

geb. am: 20.01.1976 in München

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung – Summary	1
2. Einleitung	3
2.1. Stoßwellen – Grundlagen	4
2.1.1. Definition	4
2.1.2. Erzeugungsmechanismen	4
2.1.3. Physikalische Merkmale	5
2.1.4. Fokus	5
2.2. Wirkungsmechanismen	5
2.2.1. Direkter Effekt: Zug- und Scherkräfte	6
2.2.2. Indirekter Effekt: Kavitationskräfte	6
2.2.3. Analgetischer Effekt	7
2.3. Historische Entwicklung	8
2.3.1. Erste Geräte	8
2.3.2. Verschiedene Ankopplungsverfahren	8
2.3.3. Ausweitung des Einsatzes auf Gastroenterologie bzw. HNO	10
2.3.4. Einsatz der ESWL in Tumor- und Genterapie	10
2.3.5. Einsatz in der Orthopädie	11
2.4. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	12
3. Material und Methodik	14
3.1. Probengewinnung	14
3.2. Knorpelzellkultur	14
3.3. Passage	17
3.4. Beschuß in Suspension	18
3.5. Beschuß in Alginat	23
3.6. Abschließende Zellzählung der Beads	24
3.7. Statistische Auswertung	24
3.8. Untersuchung der DNA – Zusammenarbeit: Institut für Physiologie	24
3.8.1. Isolierung der genomischen DNA	24
3.8.2. DNA-Elektrophorese	25

4. Ergebnisse	26
4.1. Mikroskopische Zellzählung	26
4.1.1. Einzelmesswerte	26
4.1.2. Vergleich der Toxizität der beiden Testsubstanzen	28
4.1.3. Einfluß der verwendeten Medien auf den Stoßwelleneffekt	29
4.1.4. Werte drei Wochen nach Beschuß	30
4.2. Untersuchung der DNA	32
4.2.1. DNA-Elektrophorese – erste Proben	32
4.2.2. Ergänzungsversuch zur Bestimmung des DNA-Detektionslimits	33
4.2.3. DNA-Elektrophorese – restliche Proben	34
5. Diskussion	36
6. Literaturverzeichnis	49
7. Dank	55
8. Lebenslauf	56

1. Zusammenfassung

Die extrakorporale Stoßwellenlithotripsie (ESWL) hat in den letzten Jahren ein wachsendes Einsatzgebiet in der Medizin für sich erobert. Unklar ist nach wie vor der genaue Wirkungsmechanismus der Stoßwellen. Anscheinend trifft der Effekt der ESWL in der Orthopädie jedoch speziell chronisch verändertes Gewebe.

In der hier durchgeführten Studie wurden die Auswirkungen der Stoßwellen auf Knorpel untersucht, der sich bei orthopädischen Indikationen für ESWL oft unbeabsichtigt im Fokus befindet. Dabei wurde gleichzeitig der Einfluß des Aggregatzustandes der beschossenen Substanz auf die Zelleletalität bewertet. Mit dem Piezoson 300 wurden Chondrozyten von 12 Patienten mit 200 Stoßwellen unterschiedlicher Energieflußdichte ($0,08 \text{ mJ/mm}^2$ und $0,26 \text{ mJ/mm}^2$) beschossen. Die Zellen wurden dafür jeweils in zwei unterschiedlichen Medien – Suspension bzw. Alginat – aufbereitet. Anschließend wurde sowohl mikroskopisch der prozentuale Anteil toter Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt, als auch in einer DNA-Elektrophorese eine mögliche Fragmentierung der DNA untersucht.

Bei den Versuchen in Suspension stieg die Anzahl toter Zellen mit zunehmender Beschußstärke signifikant an ($p = 0,001$), nicht aber bei Versuchen in Alginat ($p = 0,263$). Als Ursache dafür kommt die sogenannte Kavitation in Frage, bei der durch Auftreffen von Stoßwellen auf Luftblasen in Flüssigkeit kleine, hochenergetische Ströme entstehen, die eine zerstörerische Wirkung haben, die mit zunehmender Festigkeit der beschossenen Substanz abnimmt. Somit ist sie in Flüssigkeiten hoch, in gelartigen Strukturen wie Alginat eher gering. Das Langzeitüberleben der Chondrozyten war in einer erneuten Kultivierung über drei Wochen im Anschluß an den Beschuß für beide Testsubstanzen nicht beeinträchtigt. Auf molekularer Ebene wurde eine Beschädigung der Zellmembran festgestellt (wieder deutlich stärker bei Suspension als bei Alginat), die DNA blieb jedoch auch unter hochenergetischer ESWL unbeschädigt. Insgesamt kommt das Modell des Alginats dem Zustand von Knorpel in vivo sicher näher als Suspension. Und somit sind die in vielen Versuchen in Suspension beobachteten negativen Effekte der ESWL nicht generell als Nebenwirkungen des Verfahrens zu erwarten. Vielmehr ist anzunehmen, daß in der klinischen Anwendung kaum Nebenwirkungen auftreten werden. Für eine abschließende Beurteilung der Vor- und Nachteile der ESWL in der Orthopädie müssen aber noch etliche ungeklärte Einflüsse genauer untersucht werden.

Summary

Extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL) has been used increasingly in clinical practice over the last few years. The exact mechanism of the effect of shock waves is still unknown. Effects of ESWL in orthopedics seem to affect especially tissue with chronic alterations.

The aim of this study was to investigate the effects of shock waves on cartilage, which is often unintentionally placed inside the focal volume. At the same time we investigated whether the physical state of the substance exposed to shock waves has any influence on cell lethality. Chondrocytes of 12 patients were exposed to shock waves generated by Piezoson 300. We used 200 shock waves of different energy levels (0,08 mJ/mm² and 0,26 mJ/mm²), and the cells were prepared in two media: suspension and alginate. After ESWL the percentage of dead cells was determined by microscopy and DNA-electrophoresis was carried out to detect fragmentation of the DNA.

There was found a significant increase of dead cells at higher energy levels in suspension ($p = 0,001$) in contrast to alginate medium ($p = 0,263$). A possible cause for these differing results is cavitation. This is a mechanism where shock waves hit gas bubbles in suspension, producing high-energy water jets with destructive forces. The effect of cavitation is suppressed by increasing viscosity of the substance exposed to shock waves. This means that there should be more effects due to cavitation in suspension than in the more viscous alginate. The long-term survival of chondrocytes was not affected in either substance, as shown in an investigation of the cells three weeks after ESWL. At the molecular level there was found a permeabilisation of the cell membrane (this effect was more pronounced in suspension than in alginate). DNA was not affected, even at high-energy levels. Alginate is definitely closer to the real state of cartilage in vivo than suspension. Therefore the negative effects of shock waves which are shown in many investigations that used cells in suspension are not necessarily to be expected in vivo. It can be assumed that side effects won't occur in a clinical setting. There are still influences of unknown significance such as a possible reflexion of the shock waves at the cartilage-bone interface. They need to be investigated in order to allow a final evaluation of advantages and disadvantages of ESWL in orthopedics.

2. Einleitung

Stoßwellen begegnen uns im täglichen Leben, z.B. in Form von Applaus einer Menschenmenge, Donner während eines Gewitters, Explosionsknall, etc. Dabei können sie Energie über weite Strecken hinweg übertragen: Der Knall, der beim Durchbrechen der Schallmauer durch ein Flugzeug entsteht, kann zum Bersten eines Fensterglases führen; die Energie wird also über Stoßwellen vom Flugzeug auf das Glas übertragen.

Diese Wirkung von Stoßwellen wird im nichtmedizinischen Bereich genutzt, z.B. zum Zerkleinern von Altglas für den Recycling-Prozeß.

Einen anderen Einsatzbereich stellen Stoßwellen als Signalquelle dar, z.B. bei Messungen der Tiefsee, wo sie durch einen geringen Energieverlust, auch über große Distanzen hinweg, bestehen (THIEL, 2001).

Im Zweiten Weltkrieg wurden zum ersten Mal die Auswirkungen von Stoßwellen auf menschliches Gewebe beschrieben. Damals wurden Beobachter der Firma Dornier in Deutschland auf die Verletzungen von Schiffsbrüchigen (im Zusammenhang mit Explosionen von Wasserbomben) aufmerksam. Trotz fehlender äußerer Zeichen der Gewalteinwirkung war es zum Zerreißen von Lungengewebe gekommen, und zwar durch die Übertragung von Stoßwellen im Wasser. Die Gattin eines der Ingenieure war es dann, die den Einfall hatte, Stoßwellen und das damit verbundene neu erworbene Wissen für die Therapie von Nierensteinen einzusetzen.

Und 1966 kam es bei Versuchen mit Hochgeschwindigkeitsprojektilen zufällig dazu, daß eine gerade vom Projektil getroffene Scheibe von einem Angestellten berührt wurde. Dieser beschrieb sein Gefühl dabei wie einen elektrischen Stromstoß. In daraufhin erfolgten Messungen konnte allerdings keine Elektrizität festgestellt werden. Der Angestellte hatte also die Auswirkungen der Stoßwellen des Projektils gespürt (KARPMAN et al., 2001; THIEL, 2001).

Stoßwellen zur Zertrümmerung von Nierensteinen beim Menschen wurden erstmals 1980 durch Chaussy et al. in München eingesetzt, nachdem die Methode Anfang der 70er Jahre entwickelt und experimentell an Tieren getestet worden war (BRÄUNER et al., 1989; DELIUS, 1995; KARPMAN et al., 2001). Seitdem wurden weltweit mehr als 1 Mio. Patienten erfolgreich mit diesem Verfahren behandelt, das inzwischen als

Goldstandard der Therapie der Urolithiasis gilt (BRÄUNER et al., 1989; OGDEN et al., 2001).

2.1. Grundlagen

2.1.1. Definition

Lithotripter-Stoßwellen bestehen aus einem positiven Druckimpuls sehr hoher Amplitude (9-114 MPa) und kurzer Dauer (wenige ns), auf den eine negative Spannungswelle von 2,8-9,9 MPa folgt. Dabei ist die Ausbreitungs-Geschwindigkeit proportional zum Druck der Welle (GAMBIHLER et al., 1994; KODAMA et al., 1998; KUSNIERCZAK et al., 1999; OGDEN et al., 2001).

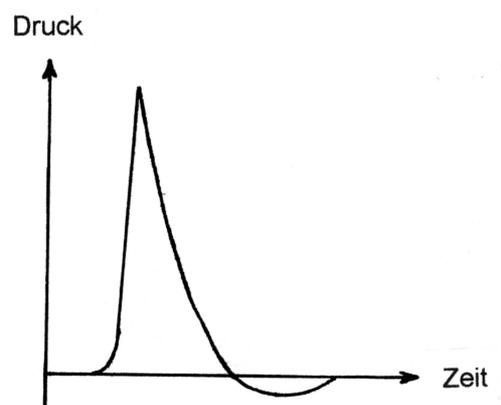


Abbildung 1: schematische Darstellung der Stoßwelle

2.1.2. Erzeugungsmechanismen

Erzeugt werden können Stoßwellen durch drei verschiedene Mechanismen: elektrohydraulisch über eine Funkenentladung wie bei Zündkerzen, elektromagnetisch durch Auslenken einer Metallmembran durch ein impulsartig erzeugtes Magnetfeld, oder piezoelektrisch durch Schwingung von Quarzkristallen in einem elektrischen Wechselfeld (ROMPE, 1996). Bei dem zuletzt genannten Mechanismus entstehen z.B. extrem präzise Stoßwellen hoher Energiedichte mit einem gut umschriebenen Fokus (OGDEN et al., 2001).

2.1.3. Physikalische Merkmale

Die Stoßwelle wird definiert durch Geometrie (Länge und Durchmesser in mm), Druckmaximum (bar) und Energieflussdichte (mJ/mm^2) im Fokus (HAMMER et al., 2000).

Man unterscheidet hierbei zwischen niedrig-, mittel- und hochenergetischem Bereich, wobei die Einteilung je nach Arbeitsgruppe willkürlich erfolgte (z.B. niedrigenergetisch um $0,08 \text{ mJ}/\text{mm}^2$, mittelenergetisch um $0,28 \text{ mJ}/\text{mm}^2$ und hochenergetisch um $0,60 \text{ mJ}/\text{mm}^2$) (RUPP et al., 1998). Je nach Erzeugungsmechanismus handelt es sich eher um niedrigenergetische (v.a. piezoelektrisch) oder hochenergetische (v.a. elektrohydraulisch erzeugte) Stoßwellen (OGDEN et al., 2001).

2.1.4. Fokus

Als Fokus wird der Bereich definiert, in dem der Druck 50% oder mehr des Spitzendrucks beträgt. Die Form des Fokus ist ein in der Ausbreitungsrichtung der Stoßwellen langgezogenes Ellipsoid. Sein Ausmaß ist dabei abhängig vom Erzeugungsmechanismus. Bei piezoelektrisch erzeugten Stoßwellen des Piezolith 2501 ist der Fokus sehr klein mit einer Ausdehnung von z.B. nur ca. $18 * 2,5 \text{ mm}$ (RUPP et al. 1998).



Abbildung 2: Volumen des Fokus

2.2. Wirkungsmechanismen

Die Wirkung der Stoßwellen im Fokus kann unterteilt werden in thermale (im Bereich der klinischen Stoßwellentherapie zu vernachlässigen (HUBER et al., 1999)) und mechanische Effekte; letztere wiederum in direkte und indirekte Effekte (KUSNIERCZAK et al., 1999).

2.2.1. Direkter Effekt: Zug- und Scherkräfte

Beim Auftreffen von Stoßwellen auf einen Körper oder ein Gewebe anderer Dichte, z.B. auf einen Stein, kommt es zur Abschwächung der Stoßwellen, da sie gestreut bzw. reflektiert werden, d.h. ihre kinetische Energie wird je nach physikalischen Eigenschaften des getroffenen Materials absorbiert. Dadurch entsteht innerhalb des Gewebes ein Druckgradient, und es kommt zur Ausbildung von Zug- und Scherkräften, die z.B. einen Stein fragmentieren können.

Interessant ist hierbei, dass die akustische Impedanz der meisten Gewebe im menschlichen Körper in etwa der von Wasser entsprechen (KARPMAN et al., 2001; OGDEN et al., 2001).

Kindliches Gewebe hat dabei einen noch höheren Wasseranteil als das von Erwachsenen und ist damit auch noch empfindlicher gegenüber Stoßwellen laut VILLANYI et al. (2001).

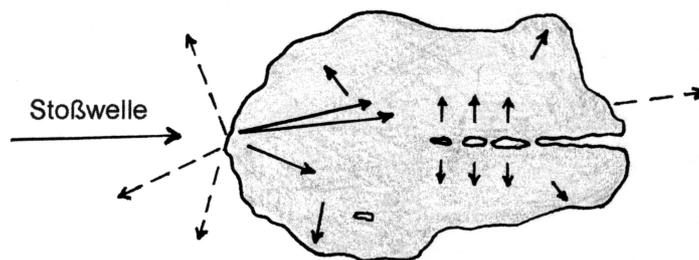


Abbildung 3: durch Stoßwellen im Stein aktive Kräfte

2.2.2. Indirekter Effekt: Kavitationskräfte

Als indirekten Effekt bezeichnet man die Kavitation, eine Interaktion zwischen Stoßwellen und im Gewebe vorhandenen Gasblasen. Diese entstehen, da die dynamische Spannkraft von Wasser bzw. interstitieller Flüssigkeit durch die Spannungskräfte der Stoßwellen überschritten wird. Die Blasen werden durch die Wellen bewegt, dehnen sich aus (während des negativen Wellenanteils) und kollabieren (während des darauf folgenden positiven Wellenanteils). Bei diesem Kollaps entstehen wiederum kleine Flüssigkeitsströme, die mit einer Geschwindigkeit von bis zu 100 m/s auf benachbarte Oberflächen übergreifen (DELIUS, 1997; LOKHANDWALLA et al., 2000; OGDEN et al., 2001).

Bisher existiert noch keine Dosis-Wirkungsbeziehung für Kavitation. Bei vielen unterschiedlichen Empfehlungen hinsichtlich der Dosierung der Stoßwellen kommt es dadurch auch zu ganz verschiedenen biologischen Effekten im Gewebe (HUBER et al., 1999).

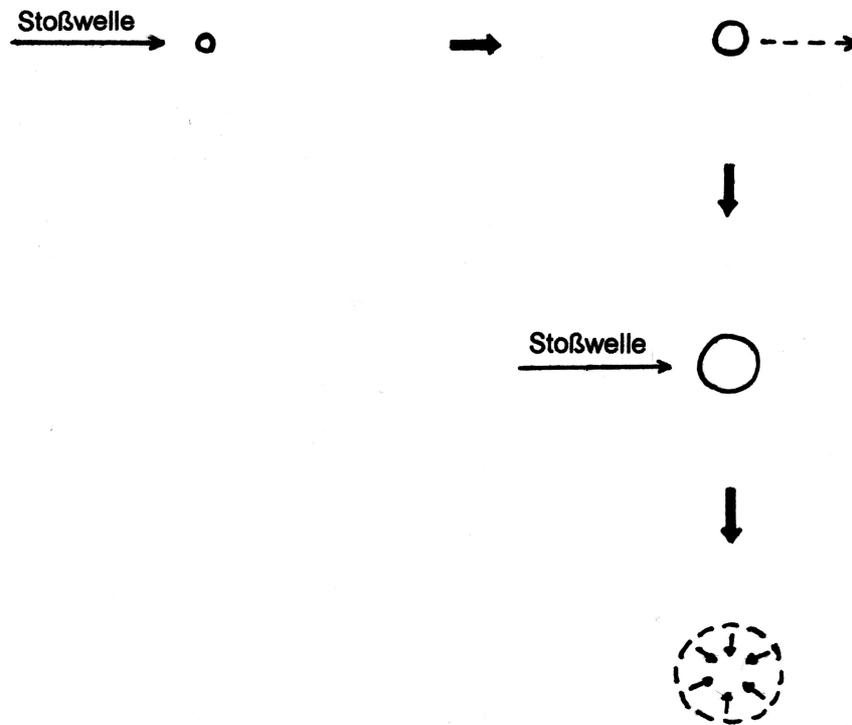


Abbildung 4: Darstellung von Kavitation (Ausdehnung der Gasblase nach Stoßwelleneinwirkung; bei Auftreffen einer weiteren Stoßwelle Kollaps der Gasblase)

2.2.3. Analgetischer Effekt

Zur analgetischen Wirkung der extrakorporalen Stoßwellenlithotripsie (= ESWL) existieren mehrere Hypothesen:

Durch die Schädigung der Zellmembranen von Nozizeptoren kann die Erzeugung von deren Generatorpotential verhindert werden.

In der Theorie der Hyperstimulationsanalgesie werden durch einen starken Reiz die marklosen C-Fasern des deszendierenden inhibitorischen Systems auf Hirnstammebene aktiviert, wodurch dann die Weiterleitung parallel eingehender nozizeptiver Informationen am Hinterhorn unterbunden wird. Letzteres tritt wohl vor allem bei niedrigenergetischer ESWL auf.

Die These des Gate-Control-Mechanismus geht von einer Aktivierung niederschwelliger Mechanorezeptoren aus, die dann die Weiterleitung nozizeptiver

Afferenzen auf spinaler Ebene unterbinden (RUPP et al., 1998; PERLICK et al., 1999).

In jedem Fall kommt es zunächst zu einer Unterdrückung des Schmerzes, im Anschluß dann auch zu einer Änderung pathologischer Bewegungsmuster und damit zu einer längerfristigen Beschwerdeverbesserung (HAMMER et al., 2000).

Insgesamt sind die genauen Wirkungsmechanismen jedoch noch nicht völlig geklärt, auch wenn in den letzten Jahren die verschiedensten Studien weiteren Aufschluß in diesem Bereich geliefert haben.

2.3. Historische Entwicklung

2.3.1. Erste Geräte

Das erste Stoßwellengerät für den klinischen Routineeinsatz (1983 in Stuttgart hergestellt) funktionierte über eine elektrische Zündkerzenentladung unter Wasser (BRÜMMER et al., 1989; THIEL, 2001).

Bei den Lithotriptern der ersten Generation erfolgte die Ankopplung des Patienten noch über ein Wasserbad, in dem sich beide – Stoßwellenkopf und Patient – befanden. Dies war deshalb nötig, da sich Stoßwellen in Wasser gut ausbreiten, in Luft aber sehr schnell abgeschwächt werden. Gleichzeitig führte es aber auch verstärkt zu Nebenwirkungen (siehe 2.4.!).

In den folgenden (bisher insgesamt drei) Lithotripter-Generationen wurden immer exakter zu fokussierende Systeme entwickelt, um eine bestmögliche Fragmentation der Steine zu gewährleisten (auch durch Perfektionierung der Ortungsmöglichkeiten per Ultraschall, Röntgen oder CT), gleichzeitig aber die Nebenwirkungen so gering wie möglich zu halten (EISENMENGER, 2001).

2.3.2. Verschiedene Ankopplungsverfahren

Das Verfahren des Wasserbades wurde abgelöst durch den Einsatz von einem wassergefüllten Kissen, hinter dem sich der Stoßwellenkopf befindet, und das an der Haut des Patienten platziert wird. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass sich Luft zwischen der Patientenhaut und dem Kissen befindet, sollte die Haut am Applikationsort rasiert werden, außerdem wird der Kontakt durch ein zusätzliches

Ankopplungsmedium wie z.B. Ultraschallgel gewährleistet (CARTLEDGE et al., 2001; SCHADEN et al., 2001). Dabei unterscheiden sich die dafür in Frage kommenden Substanzen grundlegend: Je nach Dichte bzw. Viskosität scheinen die verschiedenen Stoffe die Energie der Stoßwellen mehr oder weniger stark zu absorbieren. So treten unter Vaseline oder auch Rizinusöl als Ankopplungsmedium deutlich weniger Schmerzen an der Haut auf, als unter Ultraschallgel. Dementsprechend geringer fiel dann aber auch die Fragmentationswirkung der Stoßwellen aus (CARTLEDGE et al., 2001).



Abbildung 5: Beispiel einer Stoßwellenapplikation (Piezoson 300)

2.3.3. Ausweitung des Einsatzes auf Gastroenterologie bzw. HNO

Seit Mitte der 80er Jahre erfolgt der Einsatz von Stoßwellen (neben dem bei der Therapie von Nierensteinen in der Urologie) auch in der Gastroenterologie. Hier zur Behandlung von Pankreas-, Gallengang- und z.T. auch Gallenblasensteinen. Hierbei wird der Einsatz der ESWL meist mit der Gabe von Gallensalzen kombiniert und so sowohl die Auflösung der Steine unterstützt, als auch das Risiko eines Rezidivs verringert (STEPHENSON, 1996; CHARRIN et al., 2001).

Speichelsteine können ebenfalls mit Stoßwellen angegangen werden (DELIUS, 1995).

2.3.4. Einsatz der ESWL in Tumor- und Gentherapie

Auch in der Tumorthherapie liegen zumindest experimentell positive Resultate der ESWL bei Anwendung in vitro vor. (Allerdings sind die Ergebnisse einiger seit 1985 durchgeführter in vivo-Studien hinsichtlich einer möglichen Hemmung des Tumorwachstums widersprüchlich.) (LIQUN et al., 1996). Hierbei ist - neben einer Ischämie des Tumors durch stoßwellenbedingte Gefäßverletzungen mit nachfolgender Nekrose (ROESSLER et al., 1995; HUBER et al., 1999) - u. a. die vorübergehende Erhöhung der Membranpermeabilität als Wirkungsmechanismus entscheidend.

Das ist auch für die Gentherapie sehr interessant, da andere, die Permeabilität erhöhende Maßnahmen oft nicht in vivo durchführbar sind. Durch ESWL ist ein nichtinvasives Fokussieren auf ein tief im Körper liegendes Zielorgan möglich, wo dann Zellen mit Molekülen aus dem Extrazellulärmedium beladen werden können, z.B. mit Farbstoffen, Medikamenten oder Genen, und das bei geringer Zellsterblichkeitsrate (DELIUS, 1995; DELIUS et al., 1995; LEE et al., 1996).

2.3.5. Einsatz in der Orthopädie

1991 wurde ESWL zum erstenmal im Bereich des muskuloskelettalen Systems eingesetzt (man spricht hier dann von „Orthotripsie“ (OGDEN et al., 2001)), und zwar bei Pseudarthrosen.

Auf dieses neue Einsatzgebiet war man aufmerksam geworden, nachdem bei ESWL im Beckenbereich von Tieren zufällig ein Ansprechen von Osteoblasten auf Stoßwellen festgestellt worden war (OGDEN et al., 2001).

Die Resultate der darauf folgenden Versuche waren so ermutigend, u.a. auch in einer Veröffentlichung über den Einsatz bei multilokulären Enthesiopathien von Dahmen 1992, dass daraufhin ab 1994 orthopädische Erkrankungen wie Pseudarthrosen, kalzifizierende Tendopathien der Schulter, chronischer Fersenschmerz und chronischer Tennisellbogen (Epicondylopathia humeri radialis und ulnaris) in Deutschland in die Liste der Indikationen für ESWL aufgenommen wurden, denn es wurden positive Heilungserfolge und gleichzeitig geringe Nebenwirkungen berichtet (LOEW et al., 1995; DELIUS et al., 1998; KUSNIERCZAK et al., 1999; HAMMER et al., 2000; HELBIG et al., 2001). Als weitere Indikationen werden Osteochondrosis dissecans und Osteonekrose der Femurkopfes diskutiert (LUDWIG et al., 2001; OGDEN et al., 2001).

Die Effekte der ESWL auf Gewebe gelten dabei prinzipiell nur für den Lithotripter, bei dessen Gebrauch sie beobachtet wurden – sie sind nicht unbedingt auf andere Geräte übertragbar, auch aufgrund unterschiedlicher Erzeugungsmechanismen und Energiestärken (STEPHENSON, 1996).

2.4. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Das Verfahren der ESWL gilt bisher als relativ nebenwirkungsarm. So traten im Bereich der urologischen Indikationsgebiete zwar akute Gewebsverletzungen auf mit - allerdings hauptsächlich vorübergehendem - Sinken der Nierenfunktion. Nur in wenigen Fällen persistierten die Beeinträchtigungen und es kam als Langzeitfolge zur Bildung einer chronischen Narbe (Nierenfibrose) mit möglicher arterieller Hypertonie als Folge (STROHMAIER et al., 1996).

Bisher als Einzelfall beschrieben wurde das Auftreten einer rapid progredienten Glomerulonephritis nach ESWL (COHEN et al., 1998; IWAMOTO et al., 1998). Außerdem wurden – ebenfalls vorübergehend – Blutungen im Bereich des Darmes und der Ovarialregion berichtet (JAEGER et al., 1995).

Bei ESWL im Bereich der Gastroenterologie kam es zu Epithelschäden, biliärer Kolik, akuter Cholezystitis und akuter Pankreatitis, die sich aber innerhalb weniger Tage zurückbildeten. Als Einzelfall wurde eine Leberfibrose beschrieben (STEPHENSON, 1996).

Ursprünglich wurden als Erklärung der Hämaturie als auffallendste Nebenwirkung Urothelläsionen durch im Nierenbecken befindliche Steinpartikel vermutet. Dies konnte jedoch in mehreren in vitro-Versuchen widerlegt werden (JAEGER et al., 1995).

Heute gelten als Hauptgebiet der Stoßwellen-bedingten Nebenwirkungen akute Gefäßverletzungen, vor allem auf Mikrogefäßebene, besonders im venösen Schenkel. Dadurch kann es zu Blutungen, Hämatomen und Bildung von Venenthromben kommen (DELIUS et al., 1998; COHEN et al., 2001).

Aus eben genannten Nebenwirkungen ergeben sich einige Kontraindikationen, wie z.B. laufende Behandlung mit Antikoagulantien wegen erhöhter Blutungsgefahr, Infektion oder Tumor im Fokusbereich wegen der Gefahr der Streuung.

Außerdem gelten als weitere Kontraindikationen Schwangerschaft, Vorliegen eines Herzschrittmachers (auch wenn ein komplikationsloser Beschuß eines Patienten mit Schrittmacher von BOXBERG et al. (1996) beschrieben wurde) und neurologische Störungen. Bei Anwendung im gastroenterologischen Bereich sollte der Beschuß z.B. bei Leberparenchymsschäden vermieden werden (SEIL et al., 1999; HAMMER et al., 2000; CHARRIN et al., 2001).

Beim Einsatz der ESWL am Tennisellenbogen sowie bei der Tendinosis calcarea wurde bisher in klinischen Studien nicht über nennenswerte Nebenwirkungen berichtet. Nach KO et. al. (2001) bzw. SEIL et al. (1999) sind als Negativfolgen lediglich Hautrötungen, subkutane Hämatome und Petechien zu erwarten.

Bei der Mehrzahl der meist gelenknahen Indikationen findet sich immer auch Knorpelgewebe im Fokusbereich. Dies gilt besonders bei der diskutierten Indikation Osteochondrosis dissecans und Femurkopfnekrose. Ein möglicher schädlicher Einfluß von Stoßwellen auf Chondrozyten könnte daher fatale Folgen haben, da Knorpel zu einer Restitutio ad integrum nicht in der Lage ist. Knorpel stellt ein hochdifferenziertes Gewebe dar, bei dem es durch eine Schädigung immer zu einer Defektheilung mit entsprechenden langfristigen Folgen kommt.

Experimentelle Studien über damit verbundene Nebenwirkungen der ESWL liegen bisher nicht vor.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, den möglicherweise schädigenden Einfluß von ESWL auf Chondrozyten zu untersuchen.

Hierfür wurde ESWL sowohl im niedrig- als auch mittlereenergetischen Bereich getestet, da diese Energiebereiche in vivo typischerweise in der Orthopädie eingesetzt werden.

Wir untersuchten das Verhalten der Knorpelzellen in Abhängigkeit zweier verschiedener Medien. Zum einen wurden Zellen in Suspension beschossen und zum anderen Zellen, die fest in ein dreidimensionales Gitter eingebettet waren.

Bei dem dreidimensionalen Modell handelte es sich um semiliquide Alginat-Beads, in denen die Chondrozyten als Knorpelzellen ausdifferenzieren.

Dabei sollten folgende Fragen geklärt werden:

Welchen Einfluß hat die ESWL auf Chondrozyten in Suspension?

Welche potentiellen Schädigungsmechanismen liegen zugrunde?

Welchen Einfluß hat die ESWL auf Chondrozyten, die in Alginat eingebettet sind?

Ist die Suspension, die das bisher gängigste Modell für die Untersuchung der Wirkung von ESWL auf zellulärer Ebene ist, als Modell der in vivo-Situation geeignet?

Welche Schlußfolgerungen können hinsichtlich des Schädigungspotentials von ESWL auf hyalinen Knorpel im Fokus der Stoßwelle gezogen werden?

3. Material und Methodik

In dieser Studie wurden Chondrocyten von insgesamt 12 Patienten mit Stoßwellen unterschiedlicher Intensität beschossen. Dabei wurden je zwei Versuchsreihen – mit flüssigem (Suspension) bzw. semiliquidem Medium (Alginat) - durchgeführt. (Siehe schematische Darstellung des gesamten Versuchsablaufs, Abb. 7, Seite 15.)

3.1. Probengewinnung

Von insgesamt 12 Patienten wurden Knorpelspane verwendet, die steril bei Implantation von Endoprothesen (10 Hüftendoprothesen, 2 Knieprothesen) gewonnen worden waren.

Bei den Patienten handelt es sich um 5 Frauen und 7 Männer, zum Zeitpunkt der Operation zwischen 44 und 73 Jahren alt (im Durchschnitt 62,5 Jahre).

Probenbezeichnung	SH	BW	VH	KU	DG	PR	SA	KO	MU	KW	FP	HO
Geschlecht des Pat.	m	m	m	w	m	w	m	m	w	w	m	w
Alter des Pat.	65	68	57	60	68	62	65	62	64	62	44	73
Art der Operation	H	H	H	K	H	H	H	H	H	H	K	H

m = männlich, w = weiblich, H = Hüft-TEP, K = Knie-TEP, Altersangaben in Jahren

Tabelle 1:Knorpelproben – Patientenkollektiv

3.2. Knorpelzellkultur

In der Sterilbank (Gelaire Flow Laboratoriers TC 48, Meckenheim) wurden die Knorpelspane (OP-Präparate) eines Patienten in einer Petrischale (100/20mm, Greiner Labortechnik, Frickenhausen) mit dem Skalpell (Skalpellklinge steril, Gebrüder Martin, Tuttlingen) zu kleinen Stückchen zerkleinert. Durch dieses Vorgehen wurde die Angriffsfläche des Knorpels für den anschließenden enzymatischen Verdau maximal vergrößert.



Abbildung 6: Zerkleinern des Knorpels (vgl. auch Abb. 7)

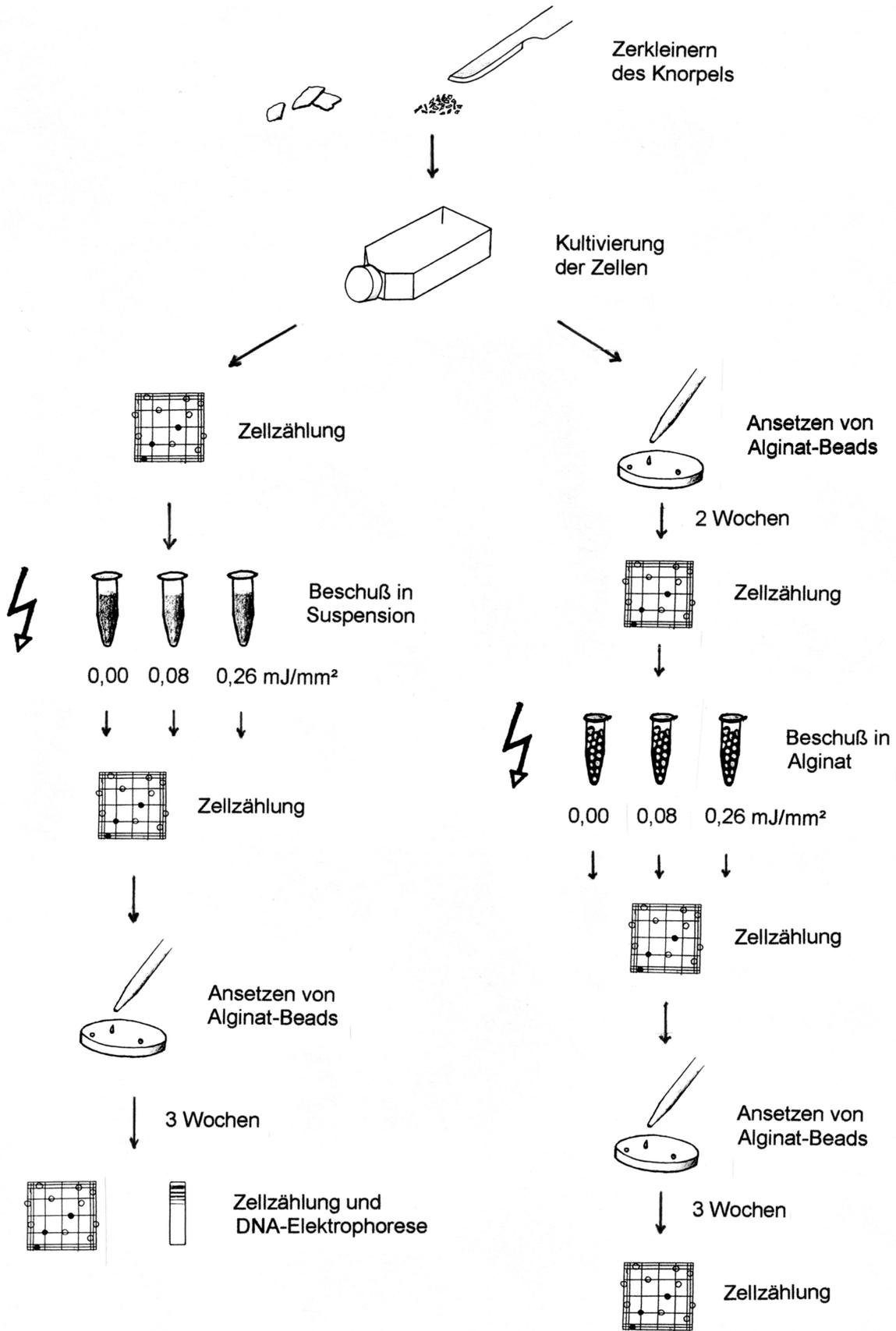


Abbildung 7: schematische Darstellung des gesamten Versuchsablaufs

Die Knorpelstückchen wurden dann in ein Falcon (OPTICUL-Polypropylen - 50ml, Becton Dickinson Labware and Company, USA) gegeben, in dem zuvor in DMEM (Dulbecco`s Mod Eagle Medium, 1000ml, Life Technologies Ltd., Paisley, Scotland) Hyaluronidase (4 mg) (SIGMA-Aldrich Chemie, Steinheim) und Collagenase (8mg) (Type CLSII, 204 U/mg, Biochrom KG, Berlin) gelöst worden war. Das Falcon wurde dann über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ (Messer Griesha m, Krefeld) zum Verdau in den Brutschrank (Queue Cell Culture Incubator, InterMed Nunc GmbH, Wiesbaden-Biebrich) gestellt.

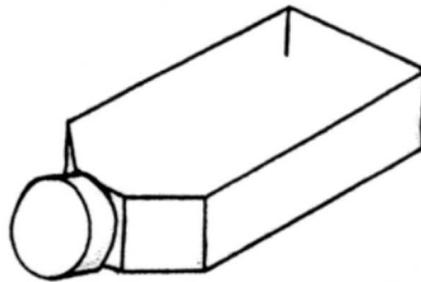


Abbildung 8: Falcon (vgl. auch Abb. 7)

Um reines Knorpelzellmaterial zu gewinnen, wurde am nächsten Tag das Falcon 5 min. lang bei 1000 U/min. zentrifugiert (Hettich Rotanta, Typ 3500, Tuttlingen) und danach der Überstand abgegossen, sobald sich das Pellet gut abgesetzt hatte.

Dieses wurde in 10 ml PBS resuspendiert und nochmals zentrifugiert, wie oben beschrieben. Die Resuspension erfolgte diesmal jedoch in 20 ml Medium (500 ml DMEM + 10 ml Penicillin-Streptomycin + 10 ml L-Glutamin + 50 ml FCS (10%) (alles Gibco BRL, Life Technologies, Scotland), und die Lösung wurde anschließend in eine Kulturflasche (Gewebekulturflaschen, 250 ml, Greiner Labortechnik, Frickenhausen) gegossen.

Diese wurden im Brutschrank inkubiert. Alle 4 Tage wurde das verbliebene Medium abgegossen und durch 20 ml frisches Medium ersetzt.

Auf diese Weise wurden von 12 verschiedenen Patientenpräparaten Zellkulturen angelegt.

3.3. Passage

Die Zellkulturen wurden regelmäßig mikroskopisch kontrolliert (Olympus CK2, Japan, 10er Objektiv). Sobald sich die Zellen in der Kulturflasche soweit vermehrt hatten, daß ein gleichmäßiger, durchgehender Zellrasen mit Zell-zu-Zell-Kontakten bestand, konnte eine Passage durchgeführt werden.

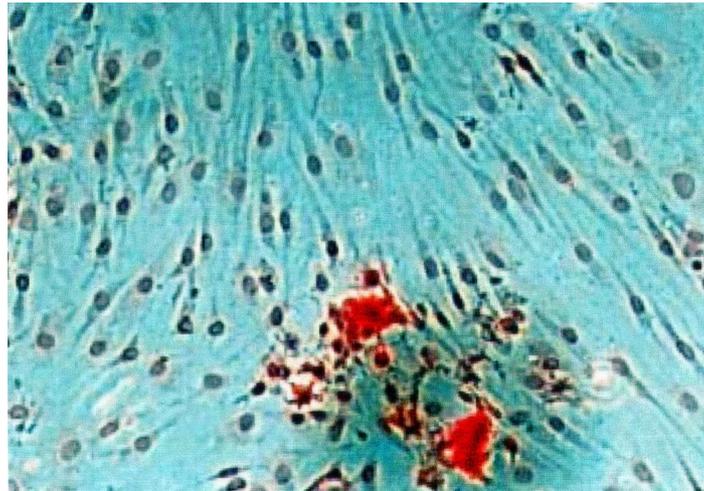


Abbildung 9: Chondrozytenkultur

(in der linken und rechten Bildhälfte entsteht bereits ein durchgehender Zellrasen, während in der Bildmitte noch größere „unbewachsene“ Flächen zu sehen sind)

Für die Passage wurde die Zellkultur zweimal mit PBS gespült (d.h. das Medium wurde abgegossen, 10 ml PBS dazugegeben, nach kurzem Schwenken wieder abgegossen und der Vorgang nochmals wiederholt).

Zum Ablösen der Chondrozyten vom Boden der Kulturflaschen wurden dann 10 ml Trypsin-EDTA (Gibco BRL, Life Technologies, Scotland) dazugegeben und die Kulturflasche anschließend wieder in den Brutschrank gestellt.

Nach 20 min. wurde unter dem Mikroskop beurteilt, ob die Zellen vollständig vom Flaschengrund gelöst waren. Eventuell noch fest haftende Zellen wurden durch Klopfen seitlich an der Kulturflasche gelöst.

Die Zellsuspension wurde dann in ein Falcon abgegossen, nochmals mit PBS gespült und die Spülflüssigkeit ebenfalls in ein Falcon gegeben, um zu gewährleisten, daß sämtliche Chondrozyten erhalten wurden. Dieses wurde dann 10 min. lang bei 1000 U/min. zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet in

10 ml PBS resuspendiert. Die Lösung wurde wiederum 10 min. zentrifugiert und der Überstand abgegossen.

Das Pellet wurde dann in 20 ml Medium resuspendiert und die Suspension auf 2 Kulturflaschen aufgeteilt, nochmals mit Medium gespült und die Spülflüssigkeit auch in die beiden Kulturflaschen gegossen.

Es erfolgte eine erneute Inkubation im Brutschrank mit einem alle 4 Tage durchgeführten Medienwechsel.

3.4. Beschuß in Suspension

Die Zellen aus 4 zugewachsenen Kulturflaschen wurden abgelöst (siehe 3.3!).

Nach dem 2. Zentrifugieren wurde das Pellet in 9 ml Medium resuspendiert und dann 100 µl davon mit einer Pipette (Pipette mit Spitze, Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen) abgezogen und in eine Farblösung aus 100 µl Trypanblau + 100µl PBS gegeben.

Nach gutem Durchmischen wurden 10 µl der Zell-Farbmischung in eine mit Ethanol gereinigte Neubauerkammer (Tiefe 0,100mm, 0,0025mm², E.A.Zintl, Bad Aibling) (Deckglas so aufgelegt, daß Newtonringe zu sehen sind) pipettiert.

Unter dem Mikroskop wurden dann darin mit dem 10er Objektiv die Zellen gezählt. Dabei wurden vier große Quadrate ausgewertet.

Die lebenden Zellen erschienen weiß bis durchsichtig, tote blau angefärbt.

Das Färbeverhalten von Trypanblau beruht auf dem Eindringen der Färbelösung durch Membrandefekte in die Zelle. Zellen mit intakter Zellmembran verbleiben ungefärbt.

Das Ergebnis der mikroskopischen Auswertung wurde in folgende Formel eingesetzt:

$x : 4 * 10000 * 3 * y = \text{Gesamtzellzahl};$

(dabei gilt : 4 => durchschnittliche Zellzahl pro Quadrat,

* 10000 => Zellkonzentration pro ml,

* 3 => Verdünnungsfaktor in der Farblösung,

* y => der Verdünnungsfaktor in der Suspension, hier z.B. 9).

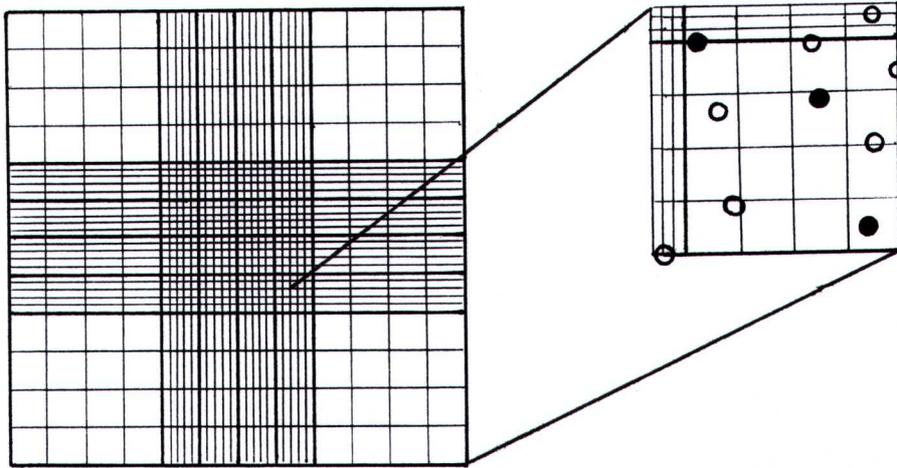


Abbildung 10: Neubauerkammer (vgl. auch Abb. 7)

Nun wurden 1,5 ml der Zellsuspension unter Vermeidung von Luftblasen in ein sterilisiertes Eppendorf-Gefäß (Micro tubes 1,5ml, 39 * 10mm, SARSTED, Nümbrecht) pipettiert und auf diese Weise mit insgesamt 3 Eppendorf-Gefäßen verfahren, in denen dann der Beschuß mit Stoßwellen erfolgte.

Aus den Zellsuspensionen der restlichen 4,5 ml wurden Alginat-Beads hergestellt (siehe unten!).

Der Beschuß wurde durchgeführt mit dem Piezoson 300 (Richard Wolf GmbH, Knittlingen) mit 200 Schuß bei 2 Hz und je 0,00 und 0,08 und 0,26 mJ/mm² (Leerprobe, niedrigenergetischer und mittlereenergetischer Bereich; vgl. auch Abb. 7.)

Dafür wurde das jeweilige Eppendorf-Gefäß in der eigens dafür vorgesehenen Halterung aus zwei Metallscheiben plziert (Richard Wolf GmbH, Knittlingen) und über auf 36°C erwärmtes Ultraschallgel an die Membran angekoppelt, um die normale Körpertemperatur zu imitieren.

Unter Ultraschallkontrolle (Kretztechnik AG, SonoAce 3200) konnte die genaue Plazierung des Gefäßes im Fokus überprüft und gegebenenfalls korrigiert werden.

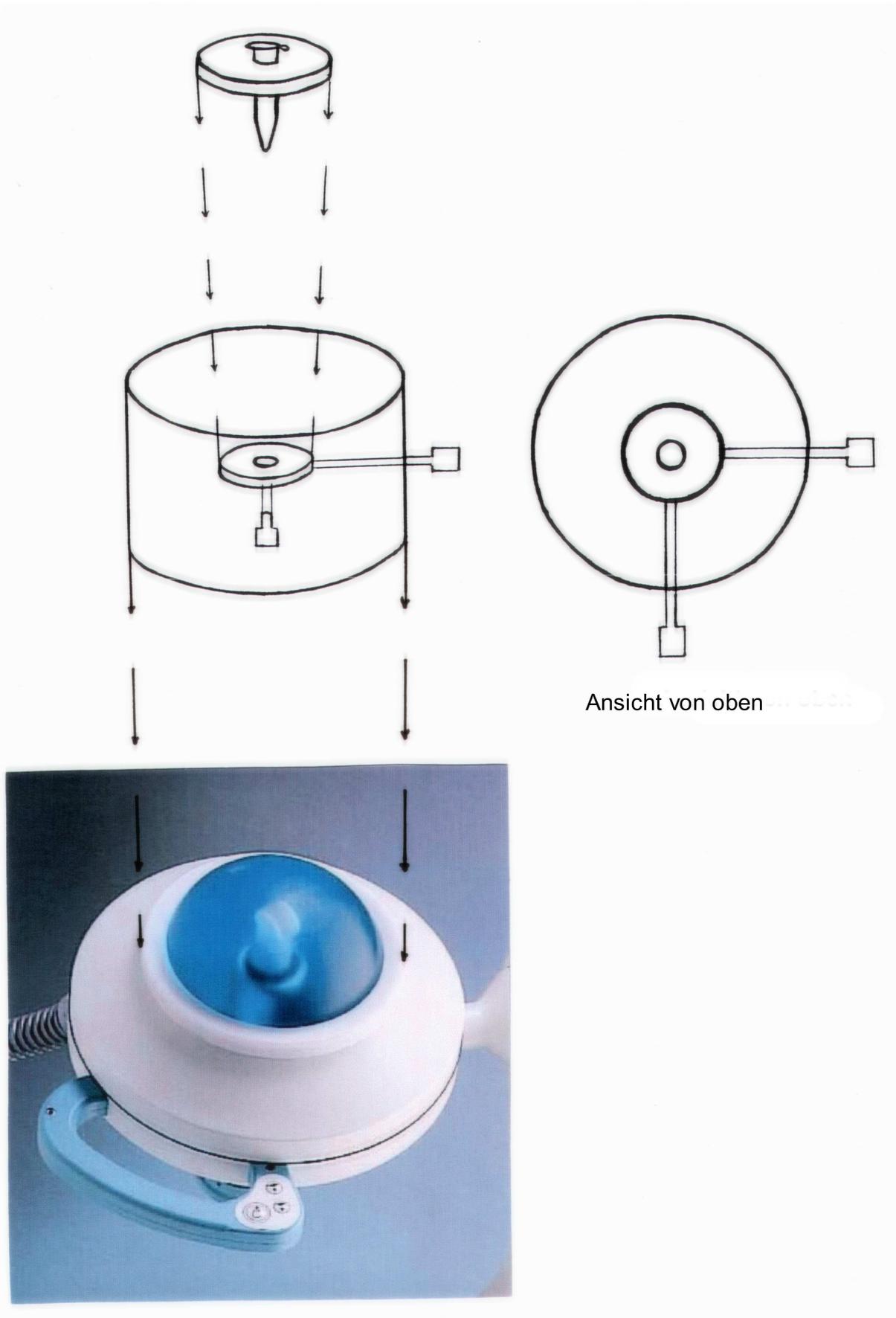


Abbildung 11: Halterung für den Beschuß der Chondrozyten in Eppendorf-Gefäßen



Abbildung 12: Piezoson 300

Nach dem Beschuß wurden 100 µl aus dem jeweiligen Eppendorf-Gefäß abgezogen und in die oben beschriebene Färbelösung pipettiert.

Es erfolgte eine Zellzählung nach dem beschriebenen Verfahren.

Die Eppendorf-Gefäße wurden dann 5 min. bei 1000 U/min. zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgegossen und das jeweilige Pellet mit je 1 ml sterilem Alginat (1,2% Keton (Alginic Acid, Sodium Salt, Medium Viscosity (2%)), SIGMA-Aldrich Chemie, Steinheim) in 0,9% NaCl (Merck); steril filtriert (Injektions-Flachfilter 0,22µ, Vigon, Achen)) vermischt.

Die Alginate-Zell-Mischung wurde dann mit einer 5 ml-Pipette tropfenweise in CaCl-Lösung eingetropft, um sie kurz zu Beads erhärten zu lassen, dann wurden die Beads mit einer sterilen Pinzette in jeweils eine Kammer einer Vierwellplatte (Heraeus Quadriperm, 76*26mm, Hanau) gegeben.

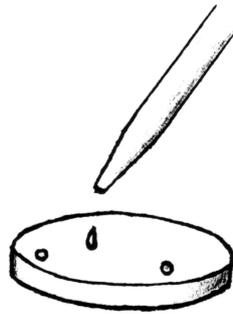


Abbildung 13: Ansetzen von Alginate-Beads – Tropfvorgang (vgl. auch Abb. 7)

Nun wurde Medium (+ Ascorbinsäure (10Mg/ml Endkonzentration)) zu den Beads in der Vierwellplatte pipettiert (15 ml für insgesamt drei besetzte Felder einer Vierwellplatte), und dieses alle 4 Tage gewechselt.

Die Kultivierung der Chondrozyten in Alginate-Beads erfolgte über einen Zeitraum von 21 Tagen, um die Zellen dem physiologischen Vorkommen so ähnlich wie möglich anwachsen und differenzieren zu lassen (vgl. Diskussion).

Ebenso verfahren wurde mit den vor Beschuß verbliebenen 4,5 ml Zellsuspension, die vor Beschuß in Form von Alginate-Beads bereits als solche 14 Tage lang kultiviert wurden.

3.5. Beschuß in Alginat

Zur Zellzählung vor Versuchsdurchführung wurden die Beads, die aus den 4,5 ml unbeschossener Suspension getropft worden waren, nach 2 Wochen Inkubation mit der Pinzette in ein Falcon gegeben und mit 6 ml Lysepuffer (1,6175g Na-Citrat 0,055M (Merck, Darmstadt) + 0,7448g EDTA 0,020M (Boehringer Mannheim) + 0,8766g NaCl 0,15M (Merck) auf 100ml mit Aqua dest (Delta-Pharma, Pfullingen) aufgefüllt und mit NaOH auf pH 6,8 eingestellt (Microprocessor pH Meter, WTW, Weilheim)) versehen. Dann wurden sie für 30 - 60 min. bei Raumtemperatur und regelmäßigem leichtem Schütteln aufgelöst.

Von der Lösung wurden 100 µl entnommen und in Färbelösung (siehe oben!) pipettiert, gemischt, davon wiederum 10 µl entnommen und die Zellen nach bekanntem Prinzip in der Neubauer-Kammer gezählt.

Anschließend wurde die Zellsuspension im Falcon-Gefäß bei 1000 U/min für 5 min. zentrifugiert, so daß sich ein Pellet absetzen konnte. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet mit 1 ml sterilem Alginat vermischt.

Aus der Alginat-Zell-Mischung wurden nach bekanntem Prinzip Beads in CaCl getropft und diese dann gleichmäßig auf drei sterile Eppendorf-Gefäße aufgeteilt.

Anschließend erfolgte ein Beschuß der Beads in den Eppendorf-Gefäßen nach gleichem Verfahren wie bei der Zellsuspension.

Dann wurden die Beads aus je einem Eppendorf-Gefäß in einem Falcon mit 3 ml Lysepuffer versehen und wie oben beschrieben aufgelöst. Es erfolgte eine Zellzählung nach oben erklärtem Verfahren.

Dann wurde die Lösung des Falcons zentrifugiert (1000 U/min. für 5 min.) und der Überstand wurde abpipettiert. Das Pellet wurde wieder mit 1 ml Alginat vermischt und daraus wurden in CaCl Beads getropft (siehe oben). Die Beads wurden mit der Pinzette in eine Vierwellplatte gegeben, anschließend wurde wiederum Medium (+Ascorbinsäure) dazupipettiert.

Es erfolgte eine Inkubation im Brutschrank bei regelmäßigem Medienwechsel alle 4 Tage über den Zeitraum von drei Wochen, um auch hier das Langzeitüberleben der Chondrozyten nach Beschuß beurteilen zu können.

3.6. Abschließende Zellzählung der Beads

Jeweils 3 Wochen nach Beschuß (sowohl bei Beschuß in Suspension, als auch in Alginat) wurden die Beads aus den jeweiligen Feldern der Vierwellplatte in Falcons umgefüllt. Die Beads wurden in je 3 ml Lysepuffer wie gehabt aufgelöst und eine Zellzählung durchgeführt.

Der verbleibende Inhalt des Falcons wurde anschließend für weitere Verfahren eingefroren (siehe Kap. 3.8.).

3.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte anhand des T-Test für gepaarte Stichproben mit einem Signifikanzniveau von 5%.

3.8. Untersuchung der DNA – in Zusammenarbeit mit dem Institut für Physiologie

Um eine möglicherweise bei Beschuß der Chondrozyten entstandene DNA-Fragmentierung zu erkennen, wurde die DNA der beschossenen Zellen isoliert und einer Gelelektrophorese unterzogen. Wir beschränkten uns dabei auf die Versuche in Suspension (angesichts der Ergebnisse der Zellzählung mittels Trypanblau-Färbung, vgl. Kap. 4.1.). Von drei Patienten wurden die Proben sämtlicher Beschußstärken untersucht, von den verbliebenen neun Zelllinien lediglich die Leerprobe und die im hochenergetischen Bereich beschossenen Probe.

Dazu wurden zunächst die in Lysepuffer gelösten, tiefgefrorenen Chondrozyten mehrmals mit PBS gewaschen.

3.8.1. Isolierung der genomischen DNA

Zur Isolierung der genomischen DNA aus Chondrozyten wurden zunächst Zellen und Zellkerne lysiert. Dies erfolgte mittels des QIAGEN Blood & Cell culture DNA Kit (Fima Qiagen, Hilden). Anschließend wurde die genomische DNA durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion von den Proteinen abgetrennt und nach AUSHUBEL et al. (1996) aufgereinigt.

3.8.2. DNA-Elektrophorese

Zum Nachweis intakter genomischer DNA wurden die DNA-Proben auf Agarosegele aufgetragen. Dabei wurde jeweils die gesamte vorhandene DNA einer Probe verwendet, da die Zellzahlen und damit der DNA-Gehalt nahe am Detektionslimit lagen (siehe auch Diskussion!).

Es wurden 1% (w/v) Agarosegele (Invitrogen, Karlsruhe) mit TAE-Puffer (Tris-HCl 2 M, Essigsäure 1 M (beides Roth, Karlsruhe) und EDTA 0,05 M (Sigma (Deisenhofen)) und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe) verwendet. Die DNA-Lösungen wurden vor Beladung der Geltaschen mit 2/10xVol. DNA-Ladepuffer (80% Glycerin (Roth, Karlsruhe), TAE, gesättigte Orange G Lösung und gesättigte Xylene Cyanid Lösung (beides Sigma, Deisenhofen)) gemischt und anschließend in TAE-Puffer bei maximal 80 mV in der Elektrophoresekammer DNA Pocket-BlocUV (Biozym Diagnostik, Hameln; Spannungsquelle LKB GPS 200/400 Amersham Biosciences Europe FmbH, Freiburg) aufgetrennt.

Die Bestimmung der Fragmentgröße erfolgte am UV-Tisch (Renner, Darmstadt) unter Licht der Wellenlänge $\lambda = 312$ nm in Bezug zum DNA-Längenstandard λ DNA / EcoRI Marker (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot).

Die Gele wurden dann zur Dokumentation mit der Polaroidkamera (Ormav, Padova, Italien) fotografiert.

Alle nicht genauer bezeichneten Substanzen wurden von der Apotheke der Universitätskliniken des Saarlandes bezogen.

4. Ergebnisse

4.1. Mikroskopische Zellzählung

Es wurden Proben von insgesamt 12 Patienten ausgewertet, und zwar jeweils vor Versuchsbeginn, nach Beschuß der Zellen mit je 0,00 mJ/mm² (Leerprobe), 0,08 mJ/mm² (niedrigenergetischer Bereich) und 0,26 mJ/mm² (hochenergetischer Bereich) und diese dann nochmal nach einer Kultivierung in Alginate über einen Zeitraum von 3 Wochen.

Bei einer Probe (KW, Beschuß mit 0,08 mJ/mm² in Alginate) trat in diesem letzten Zeitraum Fadenpilzbefall auf, weshalb sie nicht ausgewertet werden konnte.

4.1.1. Einzelmeßwerte

Nachfolgende Tabellen zeigen die absoluten Zellzahlen bei Beschuß von Suspension (Tabelle 2) bzw. Alginate (Tabelle 3).

In Tabelle 4 ist der prozentuale Anteil toter Zellen an der Gesamtzellzahl aufgeführt. Dabei sind die Ergebnisse der Versuche mit Beschuß von Suspension grün, die von Alginate rot aufgeführt.

	Suspension						
	vor Beschuß	sofort nach Beschuß			nach 3 Wo. in Alginate (nach Beschuß)		
	0,00mJ/mm ²	0,00mJ/mm ²	0,08mJ/mm ²	0,26mJ/mm ²	0,00mJ/mm ²	0,08mJ/mm ²	0,26mJ/mm ²
SH	570 000	585 000	547 500	330 000	307 500	225 000	255 000
BW	420 000	270 000	345 000	195 000	322 500	285 000	225 000
VH	450 000	405 000	472 500	292 500	382 500	472 500	157 500
KU	667 500	517 500	540 000	487 500	382 500	270 000	270 000
DG	420 000	442 500	577 500	247 500	270 000	292 500	315 000
PR	547 500	300 000	255 000	277 500	247 500	180 000	202 500
SA	630 000	435 000	405 000	360 000	202 500	180 000	180 000
KO	615 000	382 500	397 500	412 500	180 000	180 000	202 500
MU	510 000	315 000	262 500	300 000	225 000	180 000	202 500
KW	487 500	630 000	585 000	600 000	292 500	270 000	225 000
FP	607 500	450 000	412 500	405 000	180 000	270 000	202 500
HO	660 000	502 500	345 000	315 000	202 500	157 500	180 000

Tabelle 2: Suspension – absolute Anzahl lebender Zellen

	Alginate						
	vor Beschuß	sofort nach Beschuß			nach 3 Wo. in Alginate (nach Beschuß)		
	0,00mJ/mm ²	0,00mJ/mm ²	0,08mJ/mm ²	0,26mJ/mm ²	0,00mJ/mm ²	0,08mJ/mm ²	0,26mJ/mm ²
SH	292 500	412 500	600 000	1 050 000	277 500	210 000	165 000
BW	288 000	594 000	756 000	187 500	742 500	472 500	787 500
VH	735 000	495 000	360 000	585 000	180 000	180 000	157 500
KU	435 000	525 000	300 000	375 000	202 500	202 500	225 000
DG	480 000	412 500	675 000	375 000	180 000	202 500	180 000
PR	465 000	315 000	337 500	225 000	202 500	180 000	180 000
SA	300 000	495 000	315 000	225 000	157 500	157 500	157 500
KO	180 000	247 000	225 000	225 000	157 500	157 500	180 000
MU	165 000	202 500	205 500	180 000	157 500	157 500	135 000
KW	180 000	225 000	225 000	225 000	180 000	-	157 500
FP	210 000	157 500	180 000	180 000	202 500	180 000	180 000
HO	270 000	157 500	202 500	180 000	180 000	180 000	180 000

Tabelle 3: Alginate – absolute Anzahl lebender Zellen

	Suspension / Alginate						
	vor Beschuß	sofort nach Beschuß			nach 3 Wo. in Alginate (nach Beschuß)		
	0,00mJ/mm ²	0,00mJ/mm ²	0,08mJ/mm ²	0,26mJ/mm ²	0,00mJ/mm ²	0,08mJ/mm ²	0,26mJ/mm ²
SH	25 / 24	24 / 36	30 / 55	44 / 27	41 / 50	32 / 47	56 / 33
BW	32 / 30	20 / 30	37 / 53	51 / 56	26 / 30	16 / 25	19 / 37
VH	19 / 17	24 / 31	47 / 27	59 / 32	35 / 11	52 / 20	53 / 13
KU	30 / 21	6 / 33	23 / 50	44 / 47	35 / 18	30 / 25	37 / 23
DG	24 / 11	21 / 21	32 / 45	53 / 38	25 / 11	28 / 18	30 / 20
PR	20 / 34	27 / 22	37 / 38	45 / 41	21 / 18	27 / 20	36 / 27
SA	28 / 5	23 / 48	32 / 36	41 / 33	25 / 22	20 / 22	20 / 13
KO	25 / 25	32 / 27	37 / 23	47 / 23	27 / 13	27 / 13	31 / 11
MU	14 / 27	24 / 25	33 / 18	44 / 20	29 / 13	27 / 13	25 / 14
KW	17 / 25	16 / 17	22 / 17	34 / 23	24 / 11	29 / -	23 / 13
FP	26 / 18	32 / 13	36 / 11	42 / 11	20 / 18	25 / 20	25 / 20
HO	14 / 18	16 / 22	26 / 18	33 / 20	25 / 11	22 / 11	27 / 11

Tabelle 4: prozentualer Anteil toter Zellen an der Gesamtzellzahl

	N		Mittelwert	Median	Standardabweichung	Min.	Max.
	gültig	fehlend					
Susp. vor Beschuß	12	0	22,8333	24,5000	5,9975	14,00	32,00
Susp. sofort 0,00mJ/mm ²	12	0	22,0833	23,5000	7,2043	6,00	32,00
Susp. sofort 0,08mJ/mm ²	12	0	32,6667	32,5000	6,9588	22,00	47,00
Susp. sofort 0,26mJ/mm ²	12	0	44,7500	44,0000	7,3376	33,00	59,00
Susp. 3 Wo. 0,00mJ/mm ²	12	0	27,7500	25,5000	6,2395	20,00	41,00
Susp. 3 Wo. 0,08mJ/mm ²	12	0	27,9167	27,0000	8,8056	16,00	52,00
Susp. 3 Wo. 0,26mJ/mm ²	12	0	31,8333	28,5000	11,9836	19,00	56,00
Alg. vor Beschuß	12	0	21,2500	22,5000	8,0693	5,00	34,00
Alg. sofort 0,00mJ/mm ²	12	0	27,0833	26,0000	9,3853	13,00	48,00
Alg. sofort 0,08mJ/mm ²	12	0	32,5833	31,5000	15,5940	11,00	55,00
Alg. sofort 0,26mJ/mm ²	12	0	30,9167	29,5000	12,8662	11,00	56,00
Alg. 3 Wo. 0,00mJ/mm ²	12	0	18,8333	15,5000	11,3685	11,00	50,00
Alg. 3 Wo. 0,08mJ/mm ²	11	1	21,2727	20,0000	9,7375	11,00	47,00
Alg. 3 Wo. 0,26mJ/mm ²	12	0	19,5833	17,0000	8,8365	11,00	37,00

Tabelle 5: statistische Mittelwerte der Prozentzahlen

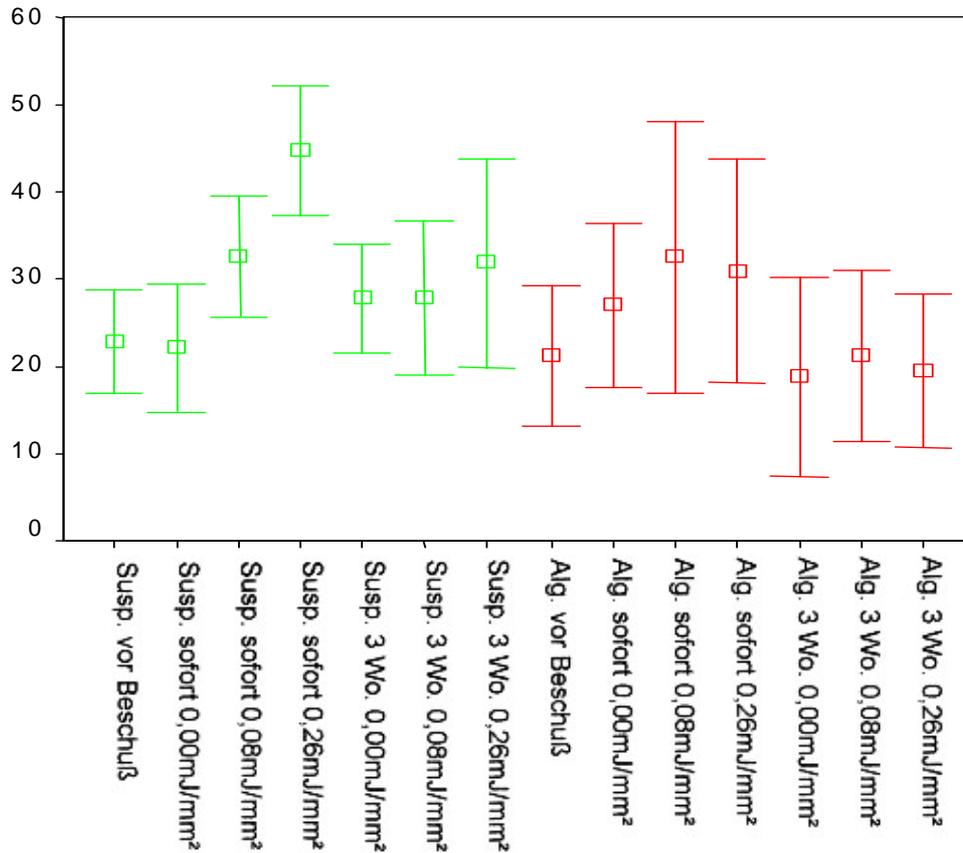


Tabelle 6: graphische Darstellung der Mittelwerte

4.1.2. Vergleich der Toxizität der beiden Testsubstanzen

Zunächst wurde die Substanz Alginat auf ihre zellschädigende Wirkung hin untersucht:

Dies geschah über die Analyse des prozentualen Anteils toter Zellen an der Gesamtzellzahl, und zwar bei Alginat im Vergleich zur Suspension. Es wurden hierzu die Mittelwerte jeweils vor Beschuß (Alginat 21,2500 und Suspension 22,8333) und in der Leerprobe (Alginat 27,0833 und Suspension 22,0833) ermittelt. Mit $p = 0,619$ (vor Beschuß) bzw. $p = 0,202$ (Leerprobe) ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Substanzen hinsichtlich einer möglichen zytotoxischen Wirkung.

4.1.3. Einfluß der verwendeten Medien auf den Stoßwelleneffekt

Als nächstes wurden die Mittelwerte des prozentualen Anteils toter Zellen an der Gesamtzellzahl von Suspension und Alginat in Abhängigkeit von der Beschußstärke miteinander verglichen:

In Suspension kam es zu einem signifikanten Anstieg des Mittelwertes von 22,0833 (0,00 mJ/mm²) auf 44,7500 (0,26 mJ/mm²). Das bedeutet also eine signifikante Zunahme toter Zellen mit steigender Beschußstärke ($p = 0,000$).

Dahingegen hatte bei Beschuß in Alginat die Beschußstärke mit $p = 0,270$ keine signifikante Auswirkung auf den Anteil toter Zellen an der Gesamtzellzahl. Der Mittelwert schwankte zwischen 27,0833 (0,00 mJ/mm²), 32,5833 (0,08 mJ/mm²) und 30,9167 (0,26 mJ/mm²).

Somit läßt sich ein signifikanter Einfluß des Aggregatzustandes der Chondrozyten auf die zytotoxische Wirkung der Stoßwellen ableiten:

Während in Suspension ein dosisabhängiger Effekt nachweisbar war, blieben die Zellen in Alginat weitgehend unbeeinträchtigt.

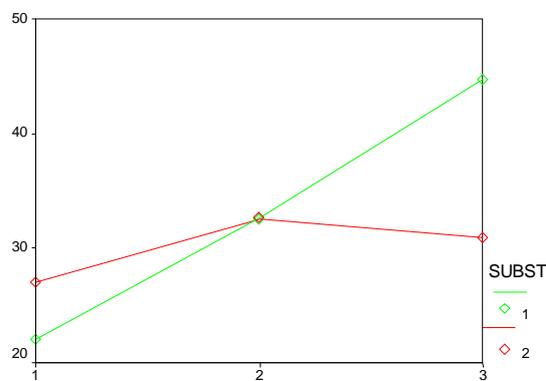


Abbildung 14: Anteil toter Zellen bei Suspension (1) und Alginat (2) in Abhängigkeit der Beschußstärke (1-3)

4.1.4. Werte drei Wochen nach Beschuß

Bei den Versuchen mit Suspension zeigte sich gleich nach Beschuß mit zunehmender Beschußstärke ein deutlich höherer Anteil toter Zellen, als nach 3 Wochen, wo die Werte unabhängig von der Beschußstärke stabil blieben.

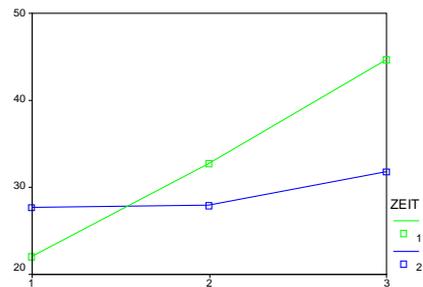


Abbildung 15: Anteil toter Zellen in Suspension in Abhängigkeit von Beschußstärke (1-3) und Zeit(1 sofort nach Beschuß bzw. 2 3 Wochen später)

Dagegen waren bei Alginat die Werte sowohl gleich nach Beschuß, als auch nach Kultivierung für weitere 3 Wochen unabhängig von der Beschußstärke (sichtbar am parallelen Kurvenverlauf). Hier ergaben sich zusätzlich nach der Kultivierung signifikant niedrigere Werte ($p = 0,003$) im Vergleich zu denen bei Versuchsbeginn.

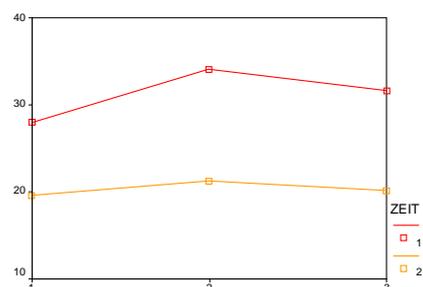


Abbildung 16: Anteil toter Zellen in Alginate in Abhängigkeit von Beschußstärke (1-3) und Zeit(1 sofort nach Beschuß bzw. 2 3 Wochen später)

Vergleicht man die Zahlen der beiden Medien nach Kultivierung für 3 Wochen nach Beschuß, so ergeben sich für Suspension mit $p = 0,018$ signifikant höhere Werte als für Alginat.

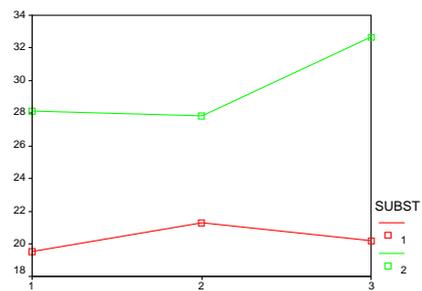
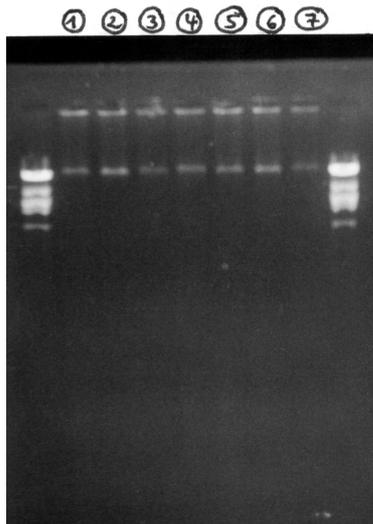


Abbildung 17: Vergleich des Anteils toter Zellen 3 Wochen nach Beschuß für Alginat (1) und Suspension (2) für Beschußstärke 1-3

4.2. Untersuchung der DNA

4.2.1. DNA-Elektrophorese – erste Proben

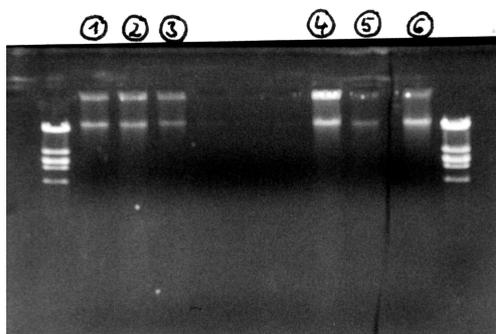
Es wurden zunächst drei Zellreihen (SH, KU und SA) der insgesamt 12 Probanden ausgewertet (vgl. Tab. 1), und zwar von sämtlichen Beschußstärken (0,00 mJ/mm² - 0,08 mJ/mm² - 0,26 mJ/mm²) in Suspension.



1. SH 0,00 mJ/mm²
2. SH 0,08 mJ/mm²
3. SH 0,26 mJ/mm²
4. SH 0,26 mJ/mm²
5. SH 0,00 mJ/mm²
6. SH 0,08 mJ/mm²
7. SH 0,26 mJ/mm²

Abbildung 18: Gel der Probe SH

(links und rechts außen im Bild: EcoRI-Marker, dazwischen, z.T. mehrfach nebeneinander aufgetragen, das Bandenverteilungsmuster der Proben unterschiedlicher Beschußstärke)



1. KU 0,00 mJ/mm²
2. KU 0,08 mJ/mm²
3. KU 0,26 mJ/mm²
4. SA 0,00 mJ/mm²
5. SA 0,08 mJ/mm²
6. SA 0,26 mJ/mm²

Abbildung 19: Gel der Proben KU und SA (links und rechts außen im Bild: EcoRI-Marker)

Würden durch den Einfluß der Stoßwellen DNA-Strangbrüche verursacht werden, so wäre – in Abhängigkeit von der Beschußstärke – ein verändertes Bandenverteilungsmuster zu erwarten. Dies zeigte sich hier jedoch nicht, es konnte kein DNA-Strangbruch nachgewiesen werden.

Da sich bei den ersten drei Proben (SH, KU und SA) kein signifikanter Unterschied der Banden der einzelnen Beschußstärken zeigte, wurde bei den übrigen 9 Zelllinien auf die Untersuchung der Probe nach Beschuß im niedrigenergetischen Bereich ($0,08 \text{ mJ/mm}^2$) verzichtet, und nur die nach $0,00 \text{ mJ/mm}^2$ (Leerprobe) und $0,26 \text{ mJ/mm}^2$ (hochenergetischer Bereich) untersucht.

Dabei mußte aber festgestellt werden, daß bei einigen Proben die Bande nur schwach oder gar nicht zu erkennen waren.

4.2.2. Ergänzungsversuch zur Bestimmung des DNA-Detektionslimits

Wegen der sich z.T. nur schwach abzeichnenden Banden wurde ein Testversuch mit Ratten-DNA durchgeführt, um das Detektionslimit der DNA festzulegen.

Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche Mengen ($2,5 \mu\text{g}$, $1 \mu\text{g}$, $0,5 \mu\text{g}$, 250 ng , 25 ng , $2,5 \text{ ng}$) Ratten-DNA elektrophoretisch aufgetrennt, von denen gerade noch die Spur mit $1 \mu\text{g}$, jedoch kaum noch die mit $0,5 \mu\text{g}$ sichtbar waren.

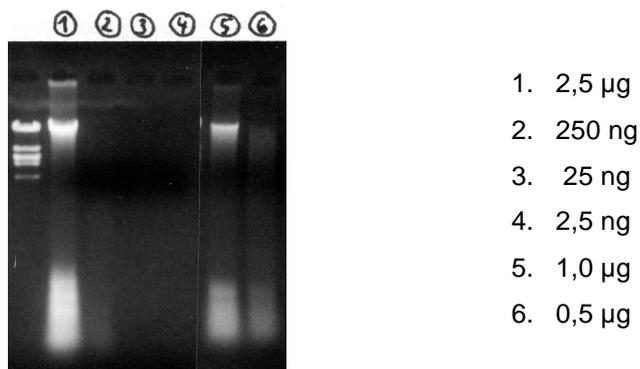


Abbildung 20: Gel der Ratten-DNA (links im Bild: EcoRI-Marker)

1 µg Säugetier-DNA entspricht etwa 167 000 Zellen (bei einem DNA-Gehalt von ca. 0,006 pg pro Zelle).

Die Zellmengen der untersuchten Proben lagen mit Werten zwischen 382 500 und 157 000 Zellen (vgl. Tabelle 2!) bis auf eine Ausnahme (VH, 0,26 mJ/mm²) also im erkennbaren Bereich.

In von zwei Zelllinien außerdem exemplarisch UV-spektrometrisch (bei 260 nm) gemessenen Proben konnten zwischen 0,56 µg und 4,14 µg DNA nachgewiesen werden. Damit lagen sie also gerade oberhalb des in Banden erkennbaren Bereiches.

4.2.3. DNA-Elektrophorese – restliche Proben

Bei allen 12 untersuchten Patientenproben zeigte sich keine Änderung der Bandenverteilung nach Beschuß mit Stoßwellen in Suspension im Vergleich zur Leerprobe (siehe Photos der Gele unten), wobei dabei die Probe BW bei äußerst schwachen Banden nicht zu verwerfen ist.

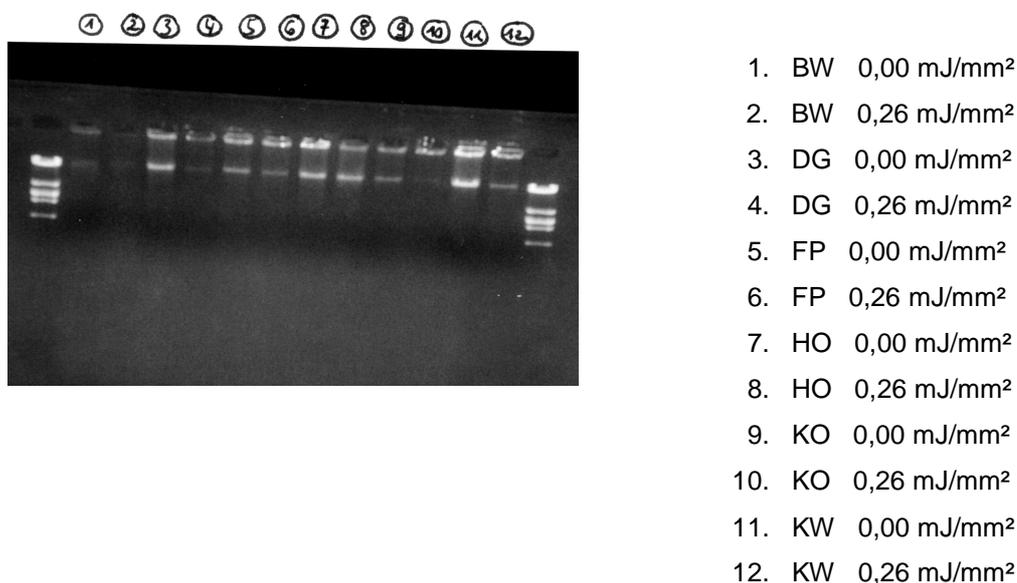


Abbildung 21: Gel der Proben BW, DG, FP, HO, KO und KW (links und rechts außen im Bild: EcoRI-Marker)



1. MU 0,00 mJ/mm²
2. MU 0,26 mJ/mm²
3. PR 0,00 mJ/mm²
4. PR 0,26 mJ/mm²
5. VH 0,00 mJ/mm²
6. VH 0,26 mJ/mm²

Abbildung 22: Gel der Proben MU, PR und VH (links und rechts außen im Bild: EcoRI-Marker)

Da in keinem der Versuche eine Änderung des Bandenverteilungsmusters nach Beschuß nachzuweisen ist, findet sich kein Anhalt für eine Schädigung der DNA durch Stoßwellen.

5. Diskussion

In der Urologie ist die ESWL seit geraumer Zeit als Standardmethode etabliert. Man hat versucht, das Verfahren in der Orthopädie auf unterschiedliche Indikationen zu übertragen. In verschiedenen Studien wurden Erfolgsraten unter ESWL von 50-90% in orthopädischen Bereichen (Enthesiopathien, chronischer Fersenschmerz, Tendinosis calcarea) nachgewiesen (LÖHR et al., 1996; HAMMER et al., 2000; CHEN et al., 2001; KO et al., 2001; ROMPE et al., 2001).

Trotzdem ist bis heute die Wirksamkeit umstritten, und die ESWL wird von den gesetzlichen Krankenkassen nicht als Leistung übernommen.

Dies liegt sicher auch am nach wie vor nicht exakt bekannten Wirkmechanismus. Während in der Urologie Kalkdepots fragmentiert und über natürliche, vorbestehende Eliminationswege „entsorgt“ werden, geht man bei den Indikationsgebieten in der Orthopädie davon aus, daß chronisch verändertes Gewebe durch Stoßwellen aufgebrochen wird, und es in Folge zur Neueinsprossung von Gefäßen und damit zu einer Begünstigung der Gewebsheilung, auch über die Erhöhung der Konzentration autologer Wachstumsfaktoren vor Ort, kommt (BOXBERG et al., 1996; LÖHR et al., 1996; RUPP et al., 1998; HELBIG et al., 2001; OGDEN et al., 2001).

In diesem Zusammenhang sind auch mögliche Nebenwirkungen der ESWL im orthopädischen Bereich näher zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurde hierfür ein spezielles Gewicht auf Knorpel gelegt:

Im Rahmen des Einsatzes von ESWL in der Orthopädie liegt oft Gelenkknorpel in direkter räumlicher Beziehung zum Fokusbereich. Die Auswirkungen von ESWL auf Knorpel sind zu klären, da hyaliner Knorpel hochdifferenziert und damit nicht zu einer Restitutio ad integrum in der Lage ist. Bereits geringe Verletzungen könnten somit große Langzeitfolgen haben. Besonders an der Knorpel-Knochen-Grenze mit ihrem akustischen Impedanzsprung könnte es durch Reflexion zu ausgeprägten Schäden durch Stoßwellen kommen.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, den Einfluß von Stoßwellen auf Chondrozyten in vitro zu untersuchen, um dann Rückschlüsse für die Situation in vivo ziehen zu können.

Es wurde hierfür ein niedrig- ($0,08 \text{ mJ/mm}^2$) bzw. mittelenergetischer ($0,26 \text{ mJ/mm}^2$) Bereich ausgewählt, wie auch in den gängigen klinischen Studien mit Erfolg untersucht:

So behandelte SEIL et al. (1999) Tendinitis calcarea der Rotatorenmanschette mit $0,04 - 0,12 \text{ mJ/mm}^2$ im niedrig- und $> 0,12 \text{ mJ/mm}^2$ im hochenergetischen Bereich, CHARRIN et al. (2001) verglich bei dem gleichen Einsatzgebiet Energieflußdichten von $< 0,1 \text{ mJ/mm}^2$ mit $0,2-0,4 \text{ mJ/mm}^2$ und PERLICK et al. (1999) verwendete bei Versuchen mit Schweineschultern $0,28 - 0,30 \text{ mJ/mm}^2$.

Bei Therapie der Epicondylitis humeri radialis setzte KO et al. (2001) $0,18 \text{ mJ/mm}^2$ ein, HELBIG et al. (2001) $0,08 \text{ mJ/mm}^2$ und PERLICK et al. (1999) $0,23 \text{ mJ/mm}^2$.

Pseudarthrosen wurden in verschiedenen Studien mit $0,25 - 0,62 \text{ mJ/mm}^2$ (OGDEN et al., 2001; ROMPE et al., 2001; SCHADEN et al., 2001; WANG et al., 2001) beschossen.

Zunächst wurde in dieser Arbeit der Einfluß der ESWL auf Chondrozyten in Suspension untersucht:

Es zeigte sich ein zellschädigender Einfluß, und zwar proportional zur verwendeten Energiedosis. Mit höherer Energie stieg der Anteil toter Zellen an der Gesamtzellzahl mit einer Signifikanz von $p = 0,001$ deutlich an.

Ähnliches war bereits von ROMPE (1996) beschrieben worden, nämlich ein praktisch linearer Anstieg von Untergängen nicht näher differenzierter Zellen im Verhältnis zur Impulszahl und Energiedichte.

Der zytotoxische Effekt der ESWL basiert auf Schädigungen der Zellmembran. Dies wurde durch die intrazelluläre Aufnahme von Trypanblau durch die defekte Membran der geschädigten Zellen sichtbar gemacht.

Daß sich die Zellen aufgrund einer nur vorübergehenden Membranpermeabilisation bei unbeeinträchtigtter Lebens- und Proliferationsfähigkeit anfärben ließen, ist praktisch auszuschließen, da das Zeitintervall zwischen Beschuß und mikroskopischer Auswertung mit einer Dauer von mehr als fünf Minuten in unserer Versuchsanordnung wohl zu lang für eine noch bestehende Permeabilitätserhöhung ist. Zumindest liegen die bisher exakt untersuchten Zeitabstände deutlich unter fünf

Minuten. GAMBIHLER et al. (1994) beobachtete bei L1210-Zellen während des Beschusses eine signifikant erhöhte Aufnahme von Fluoreszein-markierten Dextranen, nicht jedoch 2-3 min. nach Beschuß. Bei LEE et al. (1996) kam es zu einer Wiederherstellung der Barrierefunktion der Zellmembran bei Mäusebrustsarkomzellen ca. 80 Sekunden nach Beschuß, und MULHOLLAND et al. (1999) konnte bei Erythrozyten 15 Minuten nach Beschluß keine Permeabilität der Zellmembran mehr feststellen.

Während der Phase der vorübergehenden Permeabilitätsänderung erfolgt ein Ausgleich intra- und extrazellulär vorhandener Moleküle entlang des jeweiligen Konzentrationsgradienten (LEE et al., 1996).

Entscheidend ist dabei wohl die Anwesenheit funktionierender Kanäle, wie z.B. Aquaporine in der Zellmembran: In einer Untersuchung mit menschlichen bzw. Küken-Erythrozyten nach Applikation von Stoßwellen korrelierte die Dextran-Aufnahme mit der Präsenz von Aquaporinen. Erwähnenswert ist hierbei noch, daß Dextranmoleküle einen weitaus größeren Durchmesser als Aquaporine haben. Somit stellt sich also die Frage, ob Kanalproteine durch Stoßwellen vorübergehend denaturiert und vergrößert werden, um eine Diffusion der großen Moleküle ermöglichen zu können (LEE et al., 1997).

In unserer Arbeit fand sich jedoch keine vorübergehende Permeabilität, sondern es wurden dauerhafte Zellmembranschäden festgestellt, die mit dem Verlust der Zellvitalität gleichzusetzen sind.

Auch bei RAHMAN (1994) wurde in Abhängigkeit der Impulsrate der Stoßwellen eine Abnahme der Zellvitalität festgestellt. Der gemessene Anstieg verschiedener Serumwerte verdeutlichte den Stoßwellen-bedingten Zellmembrandefekt.

Bei GAMBIHLER et al. (1994) wurde übrigens eine von Stoßwellen unbeschadete Kernmembran festgestellt.

Die Destruktion der Chondrozyten erfolgte in unseren Versuchen nach dem „Alles-oder-nichts-Prinzip“, d.h., die Zellmembran war entweder gleich nach Beschluß defekt, oder die Zellen gehörten zu den offensichtlich völlig unbeschadet Überlebenden, bei denen auch nach einer gewissen Latenz (drei Wochen) kein Absterben zu beobachten war. Das ist wiederum nur bei intaktem DNA-Gehalt der Zellen möglich:

DNA-Schäden waren in unserer Versuchsanordnung nicht nachweisbar, wie das DNA-Laddering der in Suspension beschossenen Chondrozyten bestätigte. Es waren keine Strangbrüche zu detektieren.

Bei Beschuß von menschlicher Gallenblasenmucosa mit Stoßwellen ergaben sich vergleichbare Ergebnisse: Bei BIRD et al. (1995) und STEPHENSON (1996) zeigte sich kein Anhalt für eine Fragmentation der DNA. Allerdings wurde gleichzeitig eine ausgeprägte Fragmentationswirkung bei menschlichen Lymphoblasten in Suspension beschrieben, und zwar in Abhängigkeit der ESWL-Dosis. Dabei zeigten sich die Defekte nur bei den im Versuch angefallenen toten Zellen, bei den überlebenden fand sich kein DNA-Schaden. Demnach besteht also kein Anhalt für einen möglichen subletalen Keimlinienschaden durch Anwendung von ESWL. Auch BRÜMMER et al. (1989) konnte bei Mäuseleukämiezellen keine Langzeitauswirkungen auf deren Proliferationsverhalten feststellen.

Ein z.T. deutlicher DNA-Schaden bei unterschiedlichen Zelllinien wurde bei MILLER et al. (1996) bei Hamster-Ovarzellen festgestellt. Dies wurde jedoch mit der unterschiedlichen Art der Erzeugung der Stoßwellen erklärt: Die beobachteten Schäden unter Applikation von Ultraschall-Stoßwellen waren bei Lithotripter-Stoßwellen nicht nachweisbar. Und bei elektrohydraulischer Erzeugung kam es zwar zu einer signifikanten Zellyse, vermutlich aber aufgrund von Freisetzung von UV-Licht bei Zündkerzenentladung.

Bei wie in unserer Studie verwendeter piezoelektrischer Erzeugung der Stoßwellen besteht die Gefahr einer Schädigung der DNA durch UV-Licht nicht.

Die genauen Wirkungsprinzipien der Stoßwellen auf Gewebe sind nach wie vor nicht exakt bekannt, der Hauptmechanismus in Suspension scheint aber die Kavitation zu sein, also die Interaktion zwischen Stoßwellen und Gasblasen im Gewebe (BRÄUNER et al., 1989) (vgl. auch Kap. 2.2!).

In Messungen mit Membranhydrophonen wurde die Kavitation sichtbar gemacht als starke sekundäre Stoßwellenemission und Bildung von Mikroströmen (verursacht durch den Kollaps von Gasblasen) unmittelbar nach der sich ausbreitenden Lithotripter-Stoßwelle entlang deren Richtung (ZHONG et al., 1997). Sie ist abhängig von vielen Faktoren wie Zelltyp, Gewebeart und –viskosität, Temperatur und lokalem Druck (HUBER et al., 1999).

So läßt sich die Kavitation unter Überdruckverhältnissen abschwächen, wie Versuche zeigten, da dabei die Größe der in Flüssigkeit befindlichen Gasblasen deutlich verringert wird. Im Idealfall würden Stoßwellen unter Überdruck bei niedrigerem gewebsschädigenden Effekt noch die gleiche Fragmentationskraft erreichen, wie unter Normalbedingungen. Gleichzeitig fanden sich nach Hinzufügen zusätzlicher Gasblasen noch deutlich ausgeprägtere Gewebsschäden (DELIUS, 1997). Für den klinischen Gebrauch ist eine ESWL unter Überdruckverhältnissen viel zu aufwendig und damit nicht praktikabel.

Es besteht möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der Frequenz, mit der die Stoßwellen appliziert werden, und dem dadurch verursachten Gewebeschaden, zumindest bei Beschuß in Suspension, wie bei Versuchen mit Aluminiumfolie bzw. Erythrozyten untersucht (LIFSHITZ et al., 1997). Mit steigender Frequenz nehmen die Schäden nicht – wie zu erwarten – zu. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens ist das Entstehen einer Ansammlung von Gasblasen, die sich je nach Zeitintervall bis zum Eintreffen der nächsten Welle zerstreuen können, oder eben nicht. Im zweiten Fall, also bei einer hohen Frequenz, wird die darauf folgende Welle durch die Blasenansammlung gestreut und damit abgeschwächt (LIFSHITZ et al., 1997; DELIUS et al., 1998). Dies setzt natürlich voraus, daß überhaupt Gasblasen in der exponierten Substanz vorhanden sind bzw. gebildet werden (wie z.B. in Suspension).

Bei Versuchen, in denen Aluminiumfolien in verschiedenen flüssigen Medien beschossen wurden, zeigte sich ein stärker ausgeprägter Kavitationseffekt der Stoßwellen für normale, als für entgaste Ringerlösung, und hierbei wiederum mehr als für Rizinusöl, bei dem keinerlei Schaden auftrat, genauso wie in biologischen Flüssigkeiten. In letzteren ist noch weniger Gas enthalten (LIFSHITZ et al., 1997). Dies läßt vermuten, daß die Kavitation in vivo eine geringere Bedeutung hat als in vitro, und somit die in bisherigen Studien beobachteten Negativfolgen der Stoßwellen nicht unbedingt in vivo zu erwarten sind.

Eine Folge der Kavitation ist die Bildung von Radikalen über Lipidperoxidationsprodukte durch Stoßwellen, beschrieben in einem Versuch mit Schweinenieren. Hierbei wurden nach Beschuß deutlich erhöhte Werte freier Radikale gemessen. Diese könnten zu sekundären Schäden der Zellen führen, und zwar durch Degradierung von Kollagen, Inaktivierung von Enzymen, Änderung der Membranfunktion, Oxidation von Lipiden oder direktem Angreifen an der DNA mit

deren Fragmentierung (COHEN et al., 1998). Die in den durchgeführten Versuchen akustisch induzierten Radikale (laut LIFSHITZ et al. (1997) auch durch Kavitation entstehend) könnten dabei eine Wirkung entfalten, wie Radikale, die durch ionisierende Strahlung erzeugt wurden (HUBER et al., 1999).

Bei Zutreffen der Hypothese, daß Stoßwellen über Bildung von freien Radikalen ausgeprägte Effekt auf die Zelle, ihre Bestandteile und Funktionen haben, könnte der Einsatz von Antioxidantien das Ausmaß der negativen Effekte der ESWL verringern.

Neben der Stoßwellenwirkung per Kavitation beschrieben LOKHANDWALLA et al. (2000) und EINSENMENGER (2001) einen neuen Mechanismus der Fragmentationswirkung der Stoßwellen:

Ein Stein wird dabei durch zirkumferent wandernde Druckwellen statisch komprimiert. Der dadurch inhomogen aufgebaute Druck im Stein führt zu einer Spaltung parallel (im Zentrum des Steins) oder senkrecht (in der Peripherie) zur Ausbreitungsrichtung der Wellen, und zwar durch Entstehen und Zusammenwachsen mehrerer Mikrorisse („cohesive zone model“ nach CAMACHO und ORTIZ, 1996). Das Ausmaß der Spaltbildung ist dabei abhängig von der Energie der Stoßwellen und der Größe des Steins.

Außerdem kommt es zum sogenannten Hopkinson-Effekt (nach DELIUS, 1994), bei dem Stoßwellen an der distal gelegenen Grenzschicht zwischen Stein und Wasser mit einer Inversion des Drucks reflektiert werden. Der dadurch erzeugte Spannungstreiß zwischen primären Stoßwellen und sekundär reflektierten Inversionswellen führt dann letztendlich zur Abspaltung von Steinfragmenten.

Die Existenz dieser durch Reflexion der Stoßwellen verursachten Auswirkungen wurde durch Beschuß von Aluminiumfolie bzw. Erythrozyten in Kavitations-freiem Umfeld (Überdruck) in Anwesenheit eines Reflektors bewiesen. Trotz ausschließbarer Kavitation hatten die Stoßwellen auf der Aluminiumfolie Dellen und Falten hinterlassen bzw. zur Hämolyse der Erythrozyten geführt. Dabei zeigte sich ein direkter Zusammenhang zwischen Hämolyse und Stärke der Stoßwellen (LOKHANDWALLA et al., 2001). Der Autor geht dabei davon aus, daß der Anteil der nicht durch Kavitation verursachten Schäden nur einen Bruchteil der Gesamtdefekte darstellt. Da jedoch in vivo das Ausmaß der Kavitation je nach Gewebeart durchaus fraglich ist, sind die Reflexionsfolgen der Stoßwellen nicht außer Acht zu lassen. Und

gerade in der Orthopädie ist eine deutliche Reflexion an der Knorpel-Knochen-Grenze zu erwarten.

Dabei ist der oben beschriebene Spannungstreiß starken Schwankungen ausgesetzt: In der Regel handelt es sich bei den reflektierenden Flächen, also Grenzschichten zwischen zwei unterschiedlichen Gewebearten, nicht um ebene, sondern verwinkelte unregelmäßige Strukturen. Dadurch werden die Inversionswellen nicht in einem scharf abgegrenzten Punkt fokussiert, sondern führen zu einem inhomogenen, noch höheren Spannungstreiß. Durch Lücken und ungleichmäßige Zusammensetzung des Steininneren werden die Wellen aber auch rasch abgeschwächt (LOKHANDWALLA et al., 2000).

Diese Effekte wurden auch bei weiteren Zellen untersucht: Bei KODAMA et al. (1998) und MULHOLLAND et al. (1999) kam es proportional zum Impuls, also dem Druck im Verhältnis zur Zeit, zu einer steigenden Zellmembran-Permeabilisationsrate. Die Zellvitalität blieb dabei unbeeinträchtigt. Die Veränderung des Membranverhaltens wurde dabei erklärt mit Zellbestandteilen verschiedener Dichte, die durch die Wellen unterschiedlich in Schwingungen versetzt werden. Die Zellmembran reagierte dabei am empfindlichsten auf entsprechende Spannungskräfte. Je nach Zelltyp und -linie ergibt sich dabei ein ganz spezifisches Ansprechen auf Stoßwellen. In den Versuchen wurden Laser-generierte Stoßwellen verwendet, die als Breitbandwellen wohl keine Kavitation auslösen, sodaß eine dementsprechende Ursache der Effekte auszuschließen ist.

Da bei Versuchen in Suspension die Kavitation der Hauptmechanismus der Stoßwellen zu sein scheint, viele menschlichen Gewebe, wie z.B. Knorpel, jedoch nicht einem Suspensions-ähnlichen Zustand entsprechen, wurde nach Möglichkeiten gesucht, andere Versuchsanordnungen zu finden, um die Situation in vivo möglichst exakt zu imitieren.

WÖRLE et al. (1994) zentrifugierte Zellsuspensionen, um die Zellen im Pellet zu immobilisieren und damit die Effekte der Kavitation zu reduzieren und gleichzeitig interzelluläre Kollisionen zu vermeiden. Und auch MILLER et al. (1998) und WILLAMS et al. (1999) stellten mit zunehmender Zelldichte eine verringerte Kavitationswirkung fest.

Eine weitere Möglichkeit zur Vermeidung von Kavitation ist die Immobilisation der Zellen in Alginat-Beads.

In unserer Studie verwendeten wir deshalb Chondrozyten, die in Alginat eingebettet waren. Hierbei hatte ESWL einen deutlich geringeren schädigenden Effekt als in Suspension. Eine Dosis-Wirkungsbeziehung konnte nicht festgestellt werden ($p = 0,270$).

Dabei führte die Aufbereitung der Zellen in Alginat selbst im Vergleich zur normalen Zellsuspension zu keinem schädlichen Einfluß auf die Zellen. Das ist an den kaum differierenden Werten der Zellen beider Medien vor Beschuß ($p = 0,619$) bzw. in der Leerprobe ($p = 0,202$) zu sehen. Dieser geringe Unterschied ist nicht signifikant.

Der insgesamt festgestellte deutlich niedrigere Anteil toter Zellen bei den Versuchen mit Alginat im Vergleich zu denen mit Suspension geht vermutlich auf die ausgedehnteren Spülvorgänge bei den einzelnen Schritten des Alginat-Ansatzes zurück. Dabei gehen wohl Bestandteile bereits zerstörter Zellen verloren und werden so mikroskopisch und numerisch nicht mehr erfaßt.

Dies hat aber keinerlei Einfluß auf das entscheidende Resultat dieser Arbeit, nämlich, daß ESWL bei Chondrozyten in Alginat unabhängig von der verwendeten Energie keinen signifikant schädigenden Effekt hat, ganz im Gegensatz zu Chondrozyten in Suspension.

Dieses Ergebnis wird vermutlich durch die in festeren Strukturen wie Alginat wegfallenden Auswirkungen der Kavitation bedingt.

In Versuchen mit unterschiedlichen Zell-Typen wurde ebenfalls eine Abnahme der schädlichen Auswirkungen der Stoßwellen mit zunehmender Fixierung der Zellen beschrieben. BRÄUNER et al. (1989) untersuchte zu diesem Zweck Tumorzellen in Suspension, Multizellspheroide in Suspension und zuletzt deren Immobilisation in Agar bzw. Gelatine. BRÜMMER et al. (1989) beobachtete bei Mäuseleukämiezellen eine deutliche Bewegung der Zellen durch Stoßwellen in Suspension, wohingegen in Gelatine die Zellen immobilisiert waren. Dort blieben dementsprechend die durch Kavitation bedingten Sekundäreffekte aus. Und bei McCORMACK et al. (1993) wurden Tumorzellen MG-63 in Suspension bzw. Alginat-Beads untersucht. In der zuletzt genannten Studie zeigten sich zwar signifikant unempfindlichere Zellen bei

den Alginat-Beads, trotzdem war der Anteil vitaler Zellen mit steigender Energiedosis abnehmend – ganz im Gegensatz zu den Ergebnissen unserer Versuche.

Dies unterschiedliche Ansprechen der Zellen in Alginat auf Stoßwellen läßt sich am ehesten durch die verschiedenen Zellarten und ihre Eigenschaften erklären:

So ist bei Tumorzellen in der Regel von einem geringeren Grad der Differenzierung auszugehen, als bei hoch spezialisierten Zellen wie Chondrozyten. Mit Zunahme der Differenzierung kommt es gleichzeitig zu einer Abnahme der Teilungsraten. Also liegt bei Tumorzellen eine deutlich stärkere Proliferationstätigkeit vor. Werden nun durch ESWL einzelne Tumorzellen in Alginat geschädigt und nehmen nicht mehr an der Proliferation teil, kommt es in Folge zu einem deutlich höheren Anteil des Zellausfalles im Vergleich zu „unbeschossenen“ Alginat-Beads, bei denen sich alle Zellen teilen. Dieser Prozeß ist bei in Alginat hochdifferenzierten Chondrozyten nicht vorhanden, sodaß einzelne geschädigte Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl nicht so schwer ins Gewicht fallen.

Die Ergebnisse der gerade aufgezählten Studien lassen sich kurz zusammenfassen: In Zell-immobilisierenden Medien wie Alginat tritt der Stoßwellen-Wirkungsmechanismus der Kavitation nicht auf, und es kommt so auch zu keinen oder zumindest deutlich weniger Schäden der Zellen.

Alginat imitiert als dreidimensionale Struktur besser das Vorkommen von Zellen (hier: Chondrozyten) in vivo als Suspension, in der die Zellen ohne jegliche Beziehung zueinander frei im Raum schwimmen.

Der oben beschriebene Mechanismus der Kavitation würde also in menschlichem Gewebe völlig anders ausfallen, als in Versuchen mit Suspension beobachtet, da die Zellen im Gewebe dreidimensional fest eingebaut sind. Das Auftreten von Kavitation, das in den Versuchen mit Suspension dominiert, ist sicher nicht als Hauptwirkungsmechanismus der Stoßwellen im menschlichen Körper zu sehen, der nur einen limitierten Flüssigkeits-gefüllten Raum aufweisen kann (ZHONG et al., 1997).

Außerdem besitzt der menschliche Körper durch seine nichtlineare, anisotrope und inhomogene Beschaffenheit ganz andere physikalische Eigenschaften als Flüssigkeiten alleine.

Somit würde körperliches Gewebe (und hier besonders hyaliner Knorpel) eher dem Gelatine- oder Alginat-Modell, als der Suspension entsprechen.

Hinzu kommt die Redifferenzierung der Chondrozyten in den Alginat-Beads, nachdem bei Kultivierung in Monolayer-Kulturen eine Entdifferenzierung der Zellen stattgefunden hat. Dadurch würde das hier verwendete Versuchsmodell den wirklichen Zustand der Zellen in vivo noch besser imitieren.

Somit sind die Ergebnisse aller bisher in Suspension durchgeführten Versuche, was die positiven und negativen Effekte der ESWL auf Zellen anbelangt, nicht auf die Situation in vivo übertragbar; das Ausmaß der Gewebeschäden ist sicher weitaus weniger stark ausgeprägt, als darin beobachtet (LIQUN et al., 1996; KODAMA et al., 2000).

Die Zellsuspension ist also als Modell der Situation in vivo nicht geeignet. Die schädigenden Effekte der ESWL auf zellulärer Ebene werden überschätzt.

Allerdings lassen sich in Suspension nach wie vor mögliche Schädigungsmechanismen von Stoßwelle in vitro ermitteln.

Außerdem sind – wie oben geschrieben – inzwischen auch Möglichkeiten bekannt, um gerade die Effekte der Kavitation durch Gasblasen in Suspension zu unterdrücken (z.B. durch Applikation von Überdruck).

Zu den Folgen von Stoßwellen auf verschiedene Gewebe des Bewegungsapparates gibt es folgende Untersuchungen und Erkenntnisse:

Laut Theorie sind keine relevanten Schäden im Bereich des Bewegungsapparates zu erwarten, da ja der Beschuß von parenchymatösen Organen, wie z.B. Nieren, die ihrer Struktur und Beschaffenheit nach erwartungsgemäß viel verletzlicher und empfindlicher sind, relativ problemlos möglich ist.

Allerdings liegt speziell bei Knorpel ein Gewebe aus hochdifferenzierten Zellen vor, bei dem deshalb schon eine geringe Läsion große Langzeitauswirkungen haben könnte.

Im Tierversuch wurde bei Kaninchen neben intra- und perimuskulären Hämatomen eine metaplastische Knorpelbildung auf Stoßwellen-Applikation hin beschrieben (RUPP et al., 1998).

Stoßwellenfolgen am Muskel zeigten sich in einer anderen Untersuchung nicht:

Bei ESWL bei Copenhagen-Ratten mit Dunning-Prostatatumor wurde als Nebenbefund kernspintomographisch der Effekt auf die neben dem Fokus liegende Muskulatur beschrieben. Es wurde dabei keine signifikante Veränderung der Durchblutungsverhältnisse im Muskel beobachtet, im Gegensatz zu deren Beeinträchtigung in den beschossenen Tumoren.

Das kann einerseits am exakten Fokussieren auf die Tumoren liegen, so daß kein Muskelgewebe von Stoßwellen getroffen wurde, oder aber an den unterschiedlichen Gefäßverhältnissen in Tumor bzw. Muskel, und deren Ansprechen auf Stoßwellen:

Im Tumor wachsen Kapillaren ungeordnet und chaotisch, ganz im Gegensatz zu gesunden Geweben wie normaler Muskulatur (HUBER et al., 2001).

LIQUN et al. (1996) meint, daß physiologisches Gewebe in vivo weniger sensitiv auf Stoßwellen reagiert, als pathologische Tumorstrukturen (hier Heterograft-Tumoren bei Nacktmäusen, bei denen es übrigens unter ESWL auch nicht zu einer Metastasierung kam).

Auch Nervengewebe kann sich im Fokusgebiet befinden. Die Auswirkungen von Stoßwellen auf epidermale Nervenfasern wurde bei Ratten untersucht. Dabei fand sich eine fast vollständige Degeneration der Nervenfasern direkt nach Beschuß, mit thermaler Hypo- bzw. Hyperalgesie (auch als mögliche Erklärung des analgetischen Effektes von ESWL). Bereits zwei Wochen nach Applikation war die Epidermis aber wieder reinnerviert, der Effekt also nur vorübergehend (OHTORI et al., 2001).

Bei der Wirkung der Stoßwellen auf Knochen wurden dagegen diffuse Blutungen, Hämatome im Mark und multiple Frakturen von Knochenbälkchen beschrieben (DELIUS, 1995), und ähnliche Effekte, nämlich Mikrofrakturen des Zements und Unterbrechung der Knochen-Zement-Grenzschicht bei Beschuß von Femur-Knochen toter Kaninchen mit Metallimplantat (KARPMAN et al., 2001).

Dagegen berichtet KUSNIERCZAK et al. (1999) bei Versuchen mit Schafstibiae bzw. humanen Femur-Knochen von keinerlei morphologischen Knochenschäden trotz Verwendung hoher Energie.

Bei Versuchen mit Ratten wurden Veränderungen der Epiphysenfugen mit daraus resultierenden Wachstumsstörungen beobachtet (LOEW et al., 1995; ROMPE et al., 2001).

Und in Versuchen mit mineralisierten Gastrocnemiussehnen von Truthähnen kam es nach Beschuß mit hoher Energiedosis ($1,2 \text{ mJ/mm}^2$ - nicht bei $0,6 \text{ mJ/mm}^2$) zu einer Beeinträchtigung der Spannkraft der Sehne mit damit erhöhtem Risiko partieller oder sogar kompletter Rupturen (MAIER et al., 2001).

Ein Einzelfall einer Faszien-Ruptur nach ESWL bei Fasziiitis plantaris proximalis wurde bei Beschuß von 302 Patienten beschrieben, gleichzeitig lag die Erfolgsrate bei 48-73%. Die Ruptur geht aber vermutlich auf der Stoßwellentherapie vorausgegangene Cortison-Injektionen zurück (OGDEN et al., 2001).

Nach ESWL-Anwendung bei Tendinosis calcarea der Schulter beim Menschen konnten dagegen Schäden der Knochen- und Weichteilgewebe (hier besonders an Rotatorenmanschette und Knorpel bei Energieflußdichten bis zu $0,6 \text{ mJ/mm}^2$) ausgeschlossen werden. Es wurde lediglich im MRT ein intraossäres Ödem beobachtet.

Aber bei Ratten wurden nach Beschuß mit Stoßwellen Schäden des Knorpels an den Wachstumsfugen beobachtet, mit daraus resultierendem Minderwuchs (RUPP et al., 1998).

Insgesamt sind die eben beschriebenen Schäden im Einsatz von Stoßwellen bei Geweben des Bewegungsapparates eher zu vernachlässigen.

Die Ergebnisse, die im Alginatmodell gefunden wurden, erlauben die Hypothese, daß das Schädigungspotential der ESWL an hyalinem Knorpel für die getesteten Energieflußdichten gering ist.

Diese Hypothese muß in vivo überprüft werden.

Zusammenfassend lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen:

ESWL hat in Suspension einen schädigenden Einfluß auf Chondrozyten; dieser ist dosisabhängig. Der Effekt basiert auf Schädigungen der Zellmembran.

DNA-Schäden sind nicht nachweisbar.

Wesentliches physikalisches Wirkprinzip in Suspension scheint die Kavitation zu sein.

ESWL hat auf Chondrozyten, die in Alginat eingebettet sind, einen deutlich geringeren schädigenden Effekt als in Suspension. Eine Dosis-Wirkungsbeziehung besteht nicht.

Die Zellsuspension ist als Modell der in vivo-Situation nicht geeignet. Die schädigenden Effekte der ESWL auf zellulärer Ebene werden überschätzt.

Die Ergebnisse, die im Alginatmodell gefunden wurden, erlauben die Hypothese, daß das Schädigungspotential der ESWL an hyalinem Knorpel für die getesteten Energieflußdichten gering ist.

Diese Hypothese muß in vivo überprüft werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Aushubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidmann JG, Smith JA, Struhl K (1996) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, New York, USA
2. Bird NC, Stephenson TJ, Ross B, Johnson AG (1995) Effects of piezoelectric lithotripsy on human DNA. *Ultrasound Med Biol.* 21:399-403
3. Böddeker I, Haake M (2000) Die extrakorporale Stoßwellentherapie zur Behandlung der Epicondylitis humeri radialis. *Orthopäde* 29:463-469
4. Boxberg W, Perlick L, Giebel G (1996) Stoßwellenbehandlung bei therapieresistenten Weichteilschmerzen. *Chirurg* 67:1174-1178
5. Bräuner T, Brümmer F, Hülser DF (1989) Histopathology of shock wave treated tumor cell suspensions and multicell tumor spheroids. *Ultrasound Med Biol.* 15:451-460
6. Brümmer F, Brenner J, Bräuner T, Hülser DF (1989) Effect of shock waves on suspended and immobilized L1210 cells. *Ultrasound Med Biol.* 15:229-239
7. Cartledge JJ, Cross WR, Lloyd SN, Joyce AD (2001) The efficacy of a range of contact media as coupling agents in extracorporeal shockwave lithotripsy. *BJU Int.* 88:321-324
8. Charrin JE, Noel ER (2001) Shockwave therapy under ultrasonographic guidance in rotator cuff calcific tendinitis. *Joint Bone Spine* 68:241-244
9. Chen H-S, Chen L-M, Huang T-W (2001) Treatment of painful heel syndrome with shock waves. *Clin Orthop.* 387:41-46
10. Cohen TD, Durrani AF, Brown SA, Ferraro R, Preminger GM (1998) Lipid peroxidation induced by shockwave lithotripsy. *J Endourol.* 12:229-232
11. Delius M (1995) Biologische Wirkung von Stoßwellen – mehr als „nur“ Steinertrümmerung? *Zentralbl Chir.* 120:259-273
12. Delius M (1997) Minimal static excess pressure minimises the effect of extracorporeal shock waves on cells and reduces it on gallstones. *Ultrasound Med Biol.* 23:611-617

13. Delius M, Hofschneider P-H, Lauer U, Messmer K (1995) Extracorporeal shock waves for gene therapy? *Lancet* 345:1377
14. Delius M, Ueberle F, Eisenmenger W (1998) Extracorporeal shock waves act by shock wave-gas bubble interaction. *Ultrasound Med Biol.* 24:1055-1059
15. Eisenmenger W (2001) The mechanisms of stone fragmentation in ESWL. *Ultrasound Med Biol.:* 27:683-693
16. Gambihler S, Delius M, Ellwart JW (1994) Permeabilization of the plasma membrane of L1210 mouse leukemia cells using lithotripter shock waves. *J Membrane Biol.* 141:267-275
17. Hammer DS, Rupp S, Ensslin S, Kohn D, Seil R (2000) Extracorporeal shock wave therapy in patients with tennis elbow and painful heel. *Arch Orthop Trauma Surg.* 120:304-307
18. Helbig K, Herbert C, Schostok T, Brown M, Thiele R (2001) Correlations between the duration of pain and the success of shock wave therapy. *Clin Orthop.* 387:68-71
19. Huber PE, Debus J (2001) Tumor cytotoxicity in vivo and radical formation in vitro depend on the shock wave-induced cavitation dose. *Radiat Res.* 156: 301-309
20. Huber P, Peschke P, Brix G, Hahn EW, Lorenz A, Tiefenbacher U, Wannemacher M, Debus J (1999) Synergistic interaction of ultrasonic shock waves and hyperthermia in the dunning prostate tumor R3327-AT1. *Int J Cancer.* 82:84-91
21. Iwamoto I, Yonekawa S, Takeda T, Sakaguchi M, Ohno T, Tanaka H, Hasegawa H, Imada A, Horiuchi A, Umekawa T, Kurita T (1998) Anti-glomerular basement membrane nephritis after extracorporeal shock wave lithotripsy. *Am J Nephrol.* 18:534-537
22. Jaeger P, Redha F, Marquardt K, Uhlschmid G, Hauri D (1995) Morphological and functional changes in canine kidneys following extracorporeal shock-wave treatment. *Urol Int.* 54:48-58
23. Karpman R-R, Magee FP, Gruen TWS, Mobley T (2001) The lithotripter and its potential use in the revision of total hip arthroplasty. *Clin Orthop.* 387:4-7

24. Ko J-Y, Chen H-S, Chen L-M (2001) Treatment of lateral epicondylitis of the elbow with shock waves. *Clin Orthop.* 387:60-67
25. Kodama T, Hamblin MR, Doukas AG (2000) Cytoplasmic molecular delivery with shock waves: importance of impulse. *Biophys J.* 79:1821-1832
26. Kodama T, Takayama K (1998) Dynamic behavior of bubbles during extracorporeal shock-wave lithotripsy. *Ultrasound Med Biol.* 24:723-738
27. Kusnierczak D, Bracai DRC, Vettel U, Loew M (1999) Der Einfluß der extrakorporalen Stoßwellenapplikation (ESWA) auf das biologische Verhalten von Knochenzellen in vitro. *Z Orthop.* 137:1-11
28. Lee S, Anderson T, Zhang H, Flotte TJ, Doukas AG (1996) Alteration of cell membrane by stress waves in vitro. *Ultrasound Med Biol.* 22:1285-1293
29. Lee S, McAuliffe DJ, Zhang H, Xu Z, Taitelbaum J, Flotte TJ, Doukas AG (1997) Stress-wave-induced membrane permeation of red blood cells is facilitated by aquaporins. *Ultrasound Med Biol.* 23:1089-1094
30. Lifshitz DA, Williams JC, Sturtevant B, Connors BA, Evan AP, McAteer JA (1997) Quantitation of shock wave cavitation damage in vitro. *Ultrasound Med Biol.* 23:461-471
31. Liqun Z, Yinglu G (1996) In vivo effect of high energy shock waves on growth and metastasis of the heterografted tumors of nude mice. *Chin Med J* 109: 157-161
32. Löhr JF, Uthoff HK (1996) Tendinosis calcarea. *Orthopäde* 25:484-493
33. Loew M, Jurgowski W, Thomsen M (1995) Die Wirkung extrakorporaler Stoßwellen auf die Tendinosis calcarea der Schulter. *Urologe A.* 34:49-53
34. Lokhandwalla M, Sturtevant B (2000) Fracture mechanics model of stone comminution in ESWL and implications for tissue damage. *Phys Med Biol.* 45:1923-1940
35. Lokhandwalla M, McAteer JA, Williams JC, Sturtevant B (2001) Mechanical haemolysis in shock wave lithotripsy (SWL): II. In vitro cell lysis due to shear. *Phys Med Biol.* 46:1245-1264
36. Ludwig J, Lauber S, Lauber H-J, Dreisilker U, Raedel R, Hotzinger H (2001) High-energy shock wave treatment of femoral head necrosis in adults. *Clin Orthop.* 387:119-126

37. Maier M, Saisu T, Beckmann J, Delius M, Grimm F, Hupertz V, Milz S, Nerlich A, Refior HJ, Schmitz C, Ueberle F, Weiler C, Messmer K (2001) Impaired tensile strength after shock-wave application in an animal model of tendon calcification. *Ultrasound Med Biol.* 27:665-671
38. McCormack D, Jones B, McElwain J, McHale L, McHale AP (1993) The tumoricidal potential of extracorporeal shock wave therapy. *Eur J Surg* 19: 232-234
39. Miller DL, Thomas RM (1996) The role of cavitation in the induction of cellular DNA damage by ultrasound and lithotripter shock waves in vitro. *Ultrasound Med Biol.* 22:681-687
40. Miller DL, Thomas RM, Thrall BD (1996) The role of ultraviolet light in the induction of cellular DNA damage by a spark-gap lithotripter in vitro. *J Urol.* 156:286-290
41. Miller DL, Williams AR, Morris JE, William BC (1998) Sonoporation of erythrocytes by lithotripter shockwaves in vitro. *Ultrasonics* 36:947-952
42. Mulholland SE, Lee S, McAuliffe DJ, Doukas AG (1999) Cell loading with laser-generated stress waves: The role of the stress gradient. *Pharm Res.* 16:514-518
43. Ogden JA, Alvarez RR (2001) Editorial comment. *Clin Orthop.* 387:2-3
44. Ogden JA, Alvarez R, Levitt R, Cross GL, Marlow M (2001) Shock wave therapy for chronic proximal plantar fasciitis. *Clin Orthop.* 387:47-59
45. Ogden JA, Alvarez RG, Levitt R, Marlow M (2001) Shock wave therapy (orthotripsy) in musculoskeletal disorders. *Clin Orthop.* 387:22-40
46. Ogden JA, Toth-Kischkat A, Schultheiss R (2001) Principles of shock wave therapy. *Clin Orthop.* 387:8-17
47. Ohtori S, Inoue G, Mannoji C, Saisu T, Takahashi K, Mitsuhashi S, Wada Y, Takahashi K, Yamagata M, Moriya H (2001) Shock wave application to rat skin induces degeneration and reinnervation of sensory nerve fibres. *Neurosci Lett.* 315:57-60

48. Perlick L, Gassel F, Zander D, Schmitt O, Wallny T (1999) Vergleich der Ergebnisse der mittlereenergetischen ESWT und der operativen Therapie in der Technik nach Mittelmeier bei der therapieresistenten Epicondylitis humeri radialis. Z Orthop. 137:316-321
49. Perlick L, Korth O, Wallny T, Wagner U, Hesse A, Schmitt O (1999) Die Desintegrationswirkung der Stoßwellen bei der extrakorporalen Stoßwellenbehandlung der Tendinosis calcarea – ein in vitro Modell. Z Orthop. 137:10-16
50. Rahman M (1994) In vitro effects of high energy shock wave alone and combined with anticancer drugs on human bladder cancer cells. Urol Int. 53:12-17
51. Roessler W, Rothgangel B, Hofstaedter F, Wieland WF (1995) Treatment of human renal cell carcinoma with high-energy shock waves – a new in vivo/in vitro model. Urol Int. 55:1-5
52. Rompe J-D (1996) Stoßwellentherapie: Therapeutische Wirkung bei spekulativem Mechanismus. Z Orthop. 134:Oa13-19
53. Rompe J-D, Eysel P, Hopf C, Krischek O, Vogel J, Bürger R, Jage J, Heine J (1997) Extrakorporale Stoßwellentherapie in der Orthopädie. Fortschr Med. 115:26-33
54. Rompe JD, Rosendahl T, Schöllner C, Theis C (2001) High-energy extracorporeal shock wave treatment of nonunions. Clin Orthop. 387:102-111
55. Rompe JD, Zoellner J, Nafe B (2001) Shock wave therapy versus conventional surgery in the treatment of calcifying tendinitis of the shoulder. Clin Orthop. 387:72-82
56. Rupp S, Seil R, Gebhardt T, Kohn D (1998) Die extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWT) am Bewegungsapparat. Saarländisches Ärzteblatt 4/98:18-23
57. Schaden W, Fischer A, Sailer A (2001) Extracorporeal shock wave therapy of nonunion or delayed osseous union. Clin Orthop. 387:90-94
58. Seil R, Rupp S, Hammer DS, Enßlin S, Gebhardt T, Kohn D (1999) Extrakorporale Stoßwellentherapie bei der Tendinosis calcarea der Rotatorenmanschette: Vergleich verschiedener Behandlungsprotokolle. Z Orthop. 137:310-315

59. Stephenson TJ (1996) Extracorporeal gall bladder lithotripsy – a review of tissue and cellular effects. *J Pathol.* 179:4-9
60. Strohmaier WL, Carl AM, Wilbert DM, Bichler K-H (1996) Effects of extracorporeal shock wave lithotripsy on plasma concentrations of endothelin and renin in humans. *J Urol.* 155:48-51
61. Thiel M (2001) Application of shock waves in medicine. *Clin Orthop.* 387:18-21
62. Villanyi KK, Szekely JG, Farkas LM, Javor E, Pusztai C (2001) Short-term changes in renal function after extracorporeal shock wave lithotripsy in children. *J Urol.* 166:222-224
63. Wang C-J, Chen H-S, Chen C-E, Yang KD (2001) Treatment of nonunions of long bone fractures with shock waves. *Clin Orthop.* 387:95-101
64. Wang C-J, Huang HY, Chen H-HC, Pai C-H, Yang KD (2001) Effect of shock wave therapy on acute fractures of the tibia. *Clin Orthop.* 387:112-118
65. Wang C-J, Ko J-Y, Chen H-S (2001) Treatment of calcifying tendinitis of the shoulder with shock wave therapy. *Clin Orthop.* 387:83-89
66. Williams JC, Stonehill MA, Colmenares K, Evan APE, Andreoli SP, Cleveland RO, Bailey MR, Crum LA, McAteer JA (1999) Effect of macroscopic air bubbles on cell lysis by shock wave lithotripsy in vitro. *Ultrasound Med Biol.* 25:473-479
67. Wörle K, Steinbach P, Hofstädter F (1994) The combined effects of high-energy shock waves and cytostatic drugs or cytokins on human bladder cancer cells. *Br J Cancer* 69:58-65
68. Zhong P, Lin H, Xi X, Zhu S, Bhogte ES (1997) Shock wave-inertial microbubble interaction: Methodology, physical characterization, and bioeffect study. *J Acoust Soc Am.* 105:1997-2009
69. Zhong P, Zhou Y, Zhu S (2001) Dynamics of bubble oscillation in constrained media and mechanisms of vessel rupture in SWL. *Ultrasound Med Biol.* 27: 119-134

7. Dank

Zu besonderem Dank verpflichtet bin ich Herrn Prof. Dr. med. S. Rupp, ehemals geschäftsführender Oberarzt der Orthopädischen Universitätsklinik Homburg/Saar, jetzt Chefarzt der Klinik für Orthopädie der Bliedalkliniken in Blieskastel, für die Überlassung des Themas und die ständige Gesprächsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. med. D. Kohn, Chefarzt der Orthopädischen Universitätsklinik Homburg/Saar, danke ich für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten im Labor.

Frau Dr. I. Anderie, Institut für Physiologie der Universität des Saarlandes, danke ich herzlich für die Zusammenarbeit und die technische Assistenz bei der DNA-Aufarbeitung.

Herrn Dr. med. B. Müller schulde ich größten Dank für seine Betreuung und Unterstützung.

Herrn T. Gebhardt danke ich für die Einarbeitung in die Praxis der ESWL, und Herrn Dr. med. R. Seil und Herrn Dr. med. F. Hammer danke ich für die Beratung im technischen Bereich.

Herrn Dr. T. Georg, Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik, Homburg/Saar danke ich für die Beratung im statistischen Fragen.

8. Lebenslauf

Name:	Henrike Renz
Geburtsdatum:	20.01.1976
Geburtsort:	München
Eltern:	Dr. Horst Renz, Theologe Gisela Renz, Studienrätin
Geschwister:	Hartmut Renz, Jurist
Familienstand:	ledig
Nationalität:	deutsch
Ausbildung:	
1982-1986	Besuch der Eichenwald-Grundschule Neusäß
1986-1995	Besuch des Carl-von-Linde-Gymnasiums Kempten, Abitur
1995-2001	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes, Homburg
09/1997	Ärztliche Vorprüfung
1997-1998	Einjähriges Studium an der Universität Oslo im Rahmen des ECTS-Programmes
04/1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2001	Viermonatiges Chirurgie-Tertial des Praktischen Jahres am Southland Hospital Invercargill, NewZealand
10/2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002-2004	Ärztliche Tätigkeit in der Medizinischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Lindau
9/2003	Approbation
4/2004	Wechsel in die Abteilung für Kardiologie des Klinikums Kempten
7/2008	Anerkennung zur Fachärztin für Innere Medizin