

Aus dem Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin
der Deutschen Sporthochschule Köln
Geschäftsführender Leiter: Universitätsprofessor Dr. med. W. Bloch

Extrakorporale Stoßwellentherapie für die Regeneration der Skelettmuskulatur

Von der Deutschen Sporthochschule Köln
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Sportwissenschaft

angenommene Dissertation

vorgelegt von

Björn Haiduk

aus

Cagliari

Köln 2021

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. W. Bloch
Zweiter Gutachter: PD Dr. Dr. Schiffer
Vorsitzende/r des Promotionsausschusses: Univ.-Prof. Dr. M. Thevis
Datum der Disputation: 29.08.2022

Eidesstattliche Versicherungen gem. § 7 Abs. 2 Nr. 4 und 5 der Promotionsordnung der Deutschen Sporthochschule Köln, 20.02.2013:

Hierdurch versichere ich:

Ich habe diese Arbeit selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und technischen Hilfen angefertigt; sie hat noch keiner anderen Stelle zur Prüfung vorgelegen. Wörtlich übernommene Textstellen, auch Einzelsätze oder Teile davon, sind als Zitate kenntlich gemacht worden.

Hierdurch erkläre ich, dass ich die „Leitlinien guter wissenschaftlicher Praxis“ der Deutschen Sporthochschule Köln eingehalten habe.

29.08.2022, Unterschrift

PROJEKTLEITUNG



- Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Bloch, Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin der Sporthochschule Köln, Am Sportpark Müngersdorf 6, 50933 Köln.

- Dr. rer. nat. Marijke Grau, Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin der Sporthochschule Köln, Am Sportpark Müngersdorf 6, 50933 Köln.

- PD Dr. Dr. med. Thorsten Schiffer, Ambulanz für Sporttraumatologie und Gesundheitsberatung DSHS, Am Sportpark Müngersdorf 6, 50933 Köln.

DANKSAGUNG

Ich möchte die Gelegenheit nutzen mich bei denjenigen zu bedanken, die mich in dieser herausfordernden, aber auch ungemein lohnenden Phase meiner akademischen Laufbahn begleitet haben. Zu besonderem Dank bin ich Herrn Professor Wilhelm Bloch, für die Überlassung des Themas und die gute Betreuung meiner Promotion, verpflichtet. Als erster Gutachter hat er mich stets mit seinen Anregungen unterstützt. Doch auch Frau Dr. Marijke Grau bin ich für ihr unermüdliches Engagement und ihre wertvollen Ratschläge, mit denen sie mich in der Zeit begleitet hat, zu großem Dank verpflichtet.

Ebenso geht mein Dank an meine ehemaligen Kommilitonin Beatrix Nagel und den Mitarbeitern der beteiligten Institute, die mir jederzeit hilfsbereit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Abschließend möchte ich mich noch bei allen Probanden bedanken, ohne welche die wesentlichen Erkenntnisse dieser Arbeit gar nicht entstanden wären.

KURZZUSAMMENFASSUNG



Hintergrund: Die extrakorporale Stoßwellentherapie wird u.a. zur Behandlung von Skelettmuskel- und Knochenverletzungen angewendet. Die grundlegenden Mechanismen der meisten positiven Effekte sind jedoch unbekannt. Ziel dieser Studie ist es den Einfluss von Stoßwellen auf die Sauerstoffversorgung der Muskulatur, die im Zusammenhang mit der Erythrozytenverformbarkeit (RBC-Verformbarkeit) und Stickstoffmonoxid-Konzentration (NO) steht, zu untersuchen.

Methode: 10.000 Stoßwellen (5 MPa-Fokus, 0.702 mJ/mm², 8Hz) wurden auf den M. quadriceps femoris von 4 (n = 4, Pilotstudie), bzw. 13 (n = 13, Hauptstudie) unverletzten, männlichen Probanden appliziert. Weiter wurden Stoßwellen mit den Konditionen 0 (Kontrolle), 500, 1000 und 1500 über eine Schweinehaut auf die Blutproben (Heparin) von 8 männlichen Probanden appliziert (n = 8, In-Vitro-Studie). Die Sauerstoffversorgung wurde mittels NIRS Pre und Post (Pilotstudie), bzw. Pre, Post 0', Post 10', Post 20' und Post 30' (Hauptstudie) gemessen und die Blutproben Pre, 0h, 2h, 6h und 24h nach der Behandlung entnommen. Die RBC-Verformbarkeit wurde mittels Ektazytometrie und die NO-Konzentration in Plasma und RBC - als Marker für RBC-NO Produktion - mittels CLD bestimmt. Die RBC-Populationen wurden in-vitro mit einer Percoll-Lösung nach 0h/6h ermittelt und anschließend deren Verformbarkeit, Gewicht sowie deren Volumen bestimmt.

Ergebnis: Die RBC- und Plasma-NO-Konzentrationen verminderten sich nach der Behandlung mit Tiefstwerten bei 2h, erreichten allerdings nach 24h wieder den Ausgangswert. Die RBC-Verformbarkeit war ebenfalls mit Minimalwerten bei 6h vermindert, erholte sich allerdings nach 24h wieder. In-vitro zeigt sich, dass die Stoßwellen die RBC-Populationen, RBC-Struktur und deren Funktion nicht negativ beeinflussen. Das angewandte Stoßwellenprotokoll wirkt sich anscheinend negativ auf die NO-Verfügbarkeit in den RBCs aus und führt somit zu einer reduzierten RBC-Verformbarkeit. Es beeinflusst aber nicht die Sauerstoffversorgung der Muskulatur. Allerdings sind weiterführende Studien dazu notwendig.

ABSTRACT



Background: Extracorporeal shockwave therapy inter alia is applied to treat skeletal-muscle- and bone-traumatism. The underlying mechanisms of most positive effects are unknown so far. The aim of the study was to investigate whether shockwaves affect muscle oxygen supply which may be related to RBC-deformability and associated NO levels.

Method: 10.000 Shockwaves were applied (5 MPa-focus and 0.702 mJ/mm², 8Hz) on the muscle quadriceps femoris of 4 (n = 4, pilot-study), respectively 13 (n = 13, main-study) healthy male subjects. Further, shockwaves were applied over pork-skin roofed blood-samples from 8 male subjects with condition 0 (control), 500, 1.000, 1.500 (n = 8, in-vitro-study).

Oxygen supply was measured Pre and Post (pilot-study), respectively Pre, Post 0', Post 10', Post 20' and Post 30' (main-study), by NIRS and venous blood was sampled Pre and 0h, 2h, 6h and 24h post intervention. RBC-deformability was determined by ektacytometry and nitrite concentrations in plasma and RBC, as a marker of RBC-NO production, by CLD, respectively. RBC-populations were determined 0h/6h post (in-vitro), by a percoll-solution. Afterwards, thus deformability, weight and volume were determined.

Results: RBC and plasma nitrite levels decreased post intervention with lowest values measured 2h but increased back to pre-level 24h. RBC-deformability decreased with minimum values measured 6h and increased again 24h. In-vitro, shockwaves might not negatively affect RBC-populations and -structure and thus function. The tested shockwave protocol might negatively affect NO availability in RBC leading to reduced RBC-deformability but did not affect oxygenation of the muscles. Admittedly, further studies are needed.

INHALTSVERZEICHNIS

LITERATUR
HINWEIS

1. EINLEITUNG	1
2. GRUNDLAGEN	4
2.1. Extrazelluläre Matrix - Basalmembran – Angiogenese	4
2.2. Erythrozytenverformbarkeit - NO und Erythrozyten	6
2.3. Mechanotransduktion	8
3. SKELETTMUSKELREGENERATION	9
3.1. Ablauf der Skelettmuskelregeneration	9
3.1.1. <i>Inflammation</i>	10
3.1.2. <i>Regeneration</i>	10
3.2. Die Sauerstoffversorgung als Faktor für die Skelettmuskelregeneration	11
4. EXTRAKORPORALE STOßWELLEN	12
4.1. Stoßwellen in der Medizin	13
4.2. Die piezoelektrische Stoßwellenerzeugung	14
4.3. Ausbreitung von Stoßwellen	16
4.4. Stoßwellenparameter	18
4.5. Physikalische Effekte von Stoßwellen	24
4.6. Kavitationsblasen	25
4.7. Funktion extrakorporaler Stoßwellen in der Medizin	26
5. FORSCHUNGSSTAND	27
5.1. Auswirkungen der Mechanotransduktion auf die Erythrozytenverformbarkeit	27
5.2. Auswirkungen der Mechanotransduktion auf die ECM	29
5.3. Auswirkung extrakorporaler Stoßwellen auf Regenerationsfaktoren	30



6. FRAGESTELLUNG	33
6.1. Extrakorporale Stoßwellentherapie für die Regeneration der Skelettmuskulatur	33
6.2. Hypothesen	34
7. METHODEN	35
7.1. Material	35
7.1.1. Verbrauchsmaterial	35
7.1.2. Verwendete Geräte	36
7.2. Personenstichprobe	36
7.3. Technologie der Durchführung	37
7.3.1. Das Stoßwellengerät	37
7.3.2. LORCA	38
7.3.3. Nahinfrarotspektroskopie (NIRS)	43
7.3.4. Chemiluminiszenzverfahren (CLD)	46
7.4. Statistische Auswertung	49
8. PILOTSTUDIE	50
8.1. Personenstichprobe	50
8.2. Untersuchungsablauf	50
8.3. Ergebnisse	52
8.3.1. Ergebnisse NIRS-Messung	52
8.3.2. Ergebnisse der Erythrozytenverformbarkeit (RBC-Verformbarkeit)	53
8.3.3. Ergebnisse der NO-Messungen	55
9. HAUPTSTUDIE	56
9.1. Personenstichprobe	56
9.2. Untersuchungsablauf	56
9.3. Ergebnisse	58
9.3.1. Ergebnisse NIRS-Messung	58
9.3.2. Ergebnisse der Erythrozytenverformbarkeit (RBC-Verformbarkeit)	63
9.3.3. Ergebnisse der NO-Messungen	67

10. IN-VITRO-STUDIE	70
10.1. Personenstichprobe	70
10.2. Untersuchungsablauf	70
10.3. Ergebnisse	703
11. DISKUSSION	90
11.1. Auswirkungen extrakorporaler Stoßwellen auf den Blutfluss	90
11.2. Auswirkungen extrakorporaler Stoßwellen auf die Erythrozytenverformbarkeit	90
11.3. Auswirkungen extrakorporaler Stoßwellen auf die NO-Verfügbarkeit	93
11.4. Fazit	94
11.5. Relevanz der Sauerstoffversorgung für die Skelettmuskelregeneration	96
11.6. Relevanz der ESWT für die Skelettmuskelregeneration	97
12. AUSBLICK	98
12.1. Bestimmung weiterer zellulärer Faktoren in der ESWT	98
12.2. Weiterführende Hypothesen	99
13. LITERATUR	100



KAPITEL 1: EINLEITUNG

1. EINLEITUNG

Die extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWT) wird seit 1980 ursprünglich erfolgreich zur Behandlung von Nierensteinen angewandt (Lithotripsie) und seit 1989 auch zur Behandlung von Pseudoarthrosen (nicht heilende Knochenbrüche) eingesetzt. Seither wird das Einsatzspektrum der ESWT stetig erweitert und findet mittlerweile bei einer Vielzahl von verschiedenen Indikationen ihre Anwendung. Obwohl die Stoßwellenbehandlung eine große Bandbreite von Applikationen bietet, sind die zellularen und subzellularen Mechanismen, die durch ihre Anwendung aktiviert werden und zur Regeneration bzw. Heilung des verletzten Gewebes führen weitgehend unbekannt. Grundsätzlich erzeugen Stoßwellen einen mechanischen Reiz, der auf die Zellen wirkt und diese aktiviert (Mechanotransduktion). Die mechanisch induzierten Reize der ESWT stehen im Zusammenhang mit Veränderungen des Blutflusses und der Sauerstoffversorgung im regenerierenden Gewebe sowie mit einer veränderten Regulation der Kapillarneubildung. Dabei werden das regenerierende Gewebe und dessen Zellen durch eine Reihe von Prozessen sowohl im Bereich der extrazellulären Matrix (ECM), als auch in der dazugehörigen Basalmembran (BM) aktiviert. Es stellt sich also die Frage, ob die mechanisch induzierten Reize der Stoßwellen - insbesondere der extrakorporalen Stoßwellen - ausreichen, um Regenerationsprozesse in der Skelettmuskulatur auszulösen und/oder zu beschleunigen.

Im Anschluss von Muskelverletzungen jedweder Art, setzt der Körper einen Reparaturmechanismus mit verschiedenen Phasen in Gang, der sich wie folgt unterteilen lässt: *Degeneration*, *Inflammation*, *Regeneration* und *Fibrose* (Bloch, 2010; Gharaibeh et al, 2012; Hotfiel et al, 2017; Bloch et al, 2017 und Bloch, 2019). Der Ablauf der Phasen und die zeitliche Dauer der einzelnen Phasen, ist von dem Schweregrad der Verletzung sowie von weiteren Einflussfaktoren abhängig (Mackey et al, 2012). Während der einzelnen Phasen der Skelettmuskelregeneration finden auf zellulärer Ebene eine Reihe von biologi-

schen Veränderungen statt. Faktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren und Zytokine, werden in einer spezifischen zeitlichen Folge freigesetzt bzw. aktiviert (Smith et al, 2008; Gharaibeh et al, 2012), die für die Muskelregeneration von wesentlicher Bedeutung sind. Das zentrale Anliegen dieser Studie ist daher die frühen Reaktionen der zellularen und subzellularen Faktoren der Skelettmuskulatur durch die ausgelöste mechanische Belastung der extrakorporalen Stoßwellen, ihren zeitlichen Verlauf und deren Wechselwirkungen zu untersuchen. Folglich lassen sich aus den Ergebnissen Rückschlüsse auf die mögliche Beeinflussung des Regenerationsprozesses in der Skelettmuskulatur ableiten. Dies wäre besonderes für die letzte Phase der Muskelregeneration von Bedeutung. Denn hier besteht die Gefahr der Entstehung von Bindegewebe (Fibrose), wodurch die Heilung des Muskels verzögert und eine vollständige strukturelle und funktionelle Wiederherstellung der Muskulatur verhindert wird (Li & Huard, 2002 und Moyer & Wagner, 2011).

Um die Regeneration der der Skelettmuskulatur nach einer Verletzung zu beschleunigen und um einer Fibrose entgegenzuwirken, werden derzeit eine Reihe von physikalischen (u.a. körperliche Belastungen, Kryotherapie, körperliche Ruhe, etc.) und medikamentösen Behandlungsmethoden eingesetzt. Beide Behandlungsmethoden zeigen jedoch nur einen eingeschränkten Effizienzgrad bzw. sind von dem Grad der Muskelverletzung abhängig (Almekinders, 1993 & Jarvinen; Lehto, 1993 und Diong & Kamper, 2014).

Zur Verbesserung und Beschleunigung der Regeneration nach Muskelverletzungen, werden aber auch eine Reihe von neuen Therapieansätzen getestet, wie z.B. die Injektion von Wachstumsfaktoren und von gentherapeutischen Behandlungen (Gharaibeh et al, 2012). Alle diese Methoden haben jedoch gewisse Einschränkungen. So sind beispielsweise sehr hohe Mengen von Wachstumsfaktoren und eine Stammzellentherapie notwendig, um den gewünschten therapeutischen Effekt zu erreichen (Gharaibeh et al, 2012). Aktuell wird zur Verbesserung der Muskelregeneration der Einsatz von mesenchymalen Progenitorzellen zur Entwicklung zell-basierter Therapien untersucht und dabei der

zeitliche Verlauf der Muskelheilung in Abhängigkeit des Schweregrades, in Bezug auf die strukturelle und funktionelle Wiederherstellung des verletzten Gewebes analysiert (Qazi et al, 2015; Pumberger et al, 2016; Qazi et al, 2017). Die extrakorporale Stoßwellentherapie könnte - in Abhängigkeit des Schweregrades der Muskelverletzung - eine praktische Alternative zur Regenerationsverbesserung bei Skelettmuskelverletzungen darstellen und eine strukturelle und funktionelle Wiederherstellung des Muskelgewebes, ohne Narbenbildung unter Berücksichtigung der verschiedenen Phasen der Muskelregeneration fördern. Die Annahme ist, dass bei Verletzungen der Skelettmuskulatur, extrakorporale Stoßwellen zu einer Reihe von strukturellen und funktionellen Veränderungen in der Skelettmuskulatur führen können. Die Reparatur des geschädigten Gewebes ist abhängig von Kaskaden von De- und Regenerationsprozessen deren Ablauf letztlich über den Heilungsverlauf und die Wiederherstellung des geschädigten Muskels entscheiden (Bloch, 2010). Eine Beeinflussung des Heilungsverlaufs bedarf genauer Kenntnisse der Phasen und der durch die Behandlungen ausgelösten Regenerationsprozesse. Dies gilt auch für einen möglichen Einsatz der extrakorporalen Stoßwelle, die über mechanische Reize zu einer verbesserten Regeneration des Gewebes führen könnte. Es erscheint daher notwendig die Auswirkungen von extrakorporalen Stoßwellen auf die gesunde Skelettmuskulatur zu testen, um so die Folgen der Aktivierung des Gewebes durch die Behandlung – in diesem Fall die extrakorporalen Stoßwellen – zu verstehen. Aus diesem Grunde sollte die Wirkung der extrakorporalen Stoßwellentherapie auf die Sauerstoffversorgung, bei unverletzter Skelettmuskulatur, genauer untersucht werden.

KAPITEL 2: GRUNDLAGEN

2. GRUNDLAGEN

2.1. EXTRAZELLULARE MATRIX -BASALMEMBRAN -ANGIOGENESE

2.1. Extrazelluläre Matrix - Basalmembran – Angiogenese

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist der Gewebsteil außerhalb der Zellen in der unter anderem Blutgefäße, Bindegewebe und Nerven (Abb. 1) mit eingebettet sind (Gillies & Lieberr, 2011). Die ECM umfasst nach heutiger Sicht die Gesamtheit der Makromoleküle, die sich außerhalb der Plasmamembran von Zellen in Geweben und Organen befinden (vgl. Ayad et al, 1998). Die extrazelluläre Matrix setzt sich aus diversen Komponenten zusammen, die in zwei große Gruppen, der Grundsubstanz - der ungeformte Teil der extrazellulären Matrix - und den kollagenen Fasern einteilt werden. Das Verhältnis von Grundsubstanz zum Faseranteil schwankt je nach Lokalisation ebenso wie der Anteil der extrazellulären Matrix am Gewebe insgesamt, bedingt durch dessen jeweilige Funktion (vgl. Ayad et al, 1998). Die ECM besteht aus faserigen Bestandteilen und Flüssigkeit mit den darin gelösten Substanzen. Den mengenmäßig größten Anteil stellen dabei - neben Wasser - verschiedene Glykoproteine und Polysaccharide. Daneben kommen Nährstoffe (z.B. Aminosäuren, Glukose), Gewebshormone sowie Elektrolyte vor (vgl. Ayad et al, 1998).

Zwischen der ECM und den Zellen gibt nach Ayad et al, (1998) eine wechselseitige Interaktion, die nicht statisch ist, sondern - auf molekularer Ebene - als im Fließgleichgewicht verstanden werden kann. Durch die Bindung an bestimmte Komponenten der ECM durch Zellrezeptoren wird die Expression von Genen in den Zellen reguliert. Dabei resultieren Zelladhäsion, Zellmigration, Zellproliferation sowie der Aufbau, Umbau und Abbau von Gewebe aus der wechselseitigen Beeinflussung der ECM und den Zellen (vgl. Ayad et al, 1998). So können z. B. Moleküle, die als strukturgebende Proteine vorliegen, unter anderen Bedingungen Botenstoffe darstellen. Als Makroskopische Beispiele können die mineralisierte Matrix des Knochens, die druckelastische Substanz des Knorpels oder die straffen Fasern der Sehnen. Mikroskopisch betrachtet ist die ECM im gesamten Körper, in fast jedem Gewebe des Körpers,

in Muskelfasern und in Fettzellen von retikulären Fasern vorhanden (vgl. Ayad et al, 1998).

Damit das Genexpressionsmuster der Zelle transformiert werden kann, ist es notwendig, dass extrazelluläre Informationen von den Zelloberflächenrezeptoren erfasst, in die Zelle weitergeleitet und in eine intrazelluläre Antwort translatiert werden. Dieser Prozess wird als Signaltransduktion bezeichnet, enthält ein komplexes Netzwerk von Signalkaskaden (Cooper, 1995; Schmidt, 2004) und spielt eine sehr wichtige Rolle für das Aufrechterhalten der Zellen und für die Regeneration des Gewebes unter normalen und unter pathologischen Bedingungen. Suhr et al, (2009) konnten zeigen, dass Spaltprodukte der ECM einen wichtigen Einfluss auf die Angiogenese (Kapillarneubildung) und darüber wiederum erheblichen Einfluss auf die Geweberegeneration haben.

Aus den Eigenschaften der ECM resultieren nach Ayad et al (1998) unter anderem folgende Funktionen oder Wechselwirkungen in verschiedenen Geweben und Organen:

- Formgebung von Geweben und Organen
- Wassergehalt der Gewebe
- Elastizität der Gewebe
- Zugfestigkeit und Stabilität der Knochen, Sehnen und Bänder
- Zytokinreservoir
- Signaltransduktion in Geweben
- Verankerung und Polaritätsvorgabe für Zellen
- Beeinflussung von Wundheilungsprozessen
- Filterleistung der Niere aufgrund ihrer speziellen Basalmembranen

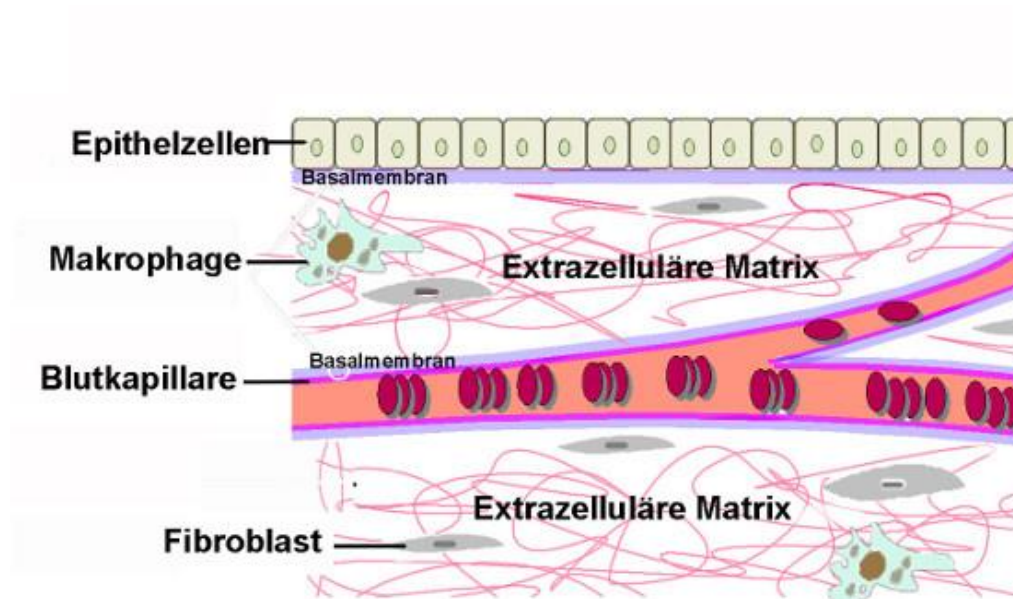


Abbildung 1: Darstellung der Extrazellulären Matrix – Basalmembran (vgl. Wick, 2012)

Neben einer Übersichtsarbeit der Forschungsgruppe Suhr et al (2009) liefern mit den Beiträgen von Gillies & Lieherr (2011) sowie von Moyer & Wagner (2011) auch andere Autoren eine aktuelle Übersicht über die ECM und die Basalmembran, ihre Struktur, Komponenten und Eigenschaften, sowie über ihre wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase und bei der Geweberegeneration.

2.2. Erythrozytenverformbarkeit - NO und Erythrozyten

Erythrozyten (rote Blutkörperchen) sind etwa 7 μm (Durchmesser) große, konkavgeformte Zellen mit einer Dicke von 2 μm am Rand sowie 1 μm im Zentrum und bestehen zu 90 % der Trockenmasse aus dem Sauerstoff bindenden Protein Hämoglobin (vgl. Moyes et al, 2008).

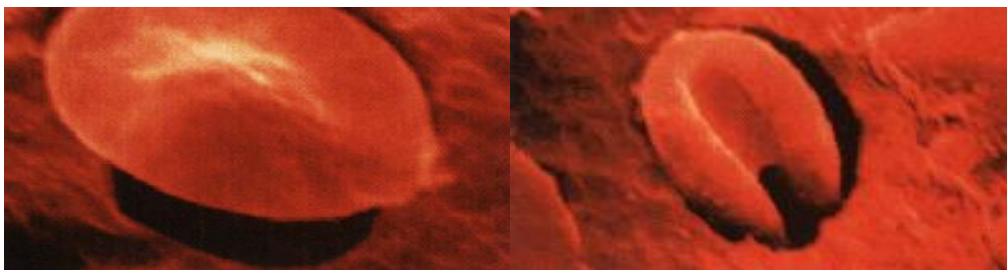


Abbildung 2: (li.) nicht deformierter und (re.) verformter Erythrozyt (Hardemann, 2001)

Die wichtigste Funktion der Erythrozyten ist der Transport und die Abgabe von Sauerstoff an die Zellen sowie die Abnahme von Kohlendioxid und verschiedenen Stoffwechselprodukten. Da der Durchmesser der Erythrozyten viel größer ist als derjenige der Kapillaren (etwa 4 μm) ist es notwendig, dass die Erythrozyten ihre Form verändern, um durch die Kapillaren fließen zu können (Abb. 2). Dieses Phänomen ist bekannt als Erythrozytenverformbarkeit oder Verformbarkeit (Kleinbongard et al, 2006 und Wan et al, 2011). Es gibt eine Reihe von Faktoren, die die Verformbarkeit der Erythrozyten verändern können. Die Bedeutsamkeit der Erythrozytenverformbarkeit wurde bereits in mehreren Studien belegt (Driessen et al, 1982; Driessen et al, 1984 und Stamler et al, 1993). Die Erythrozytenverformbarkeit stellt eine Grundvoraussetzung für die adäquate Durchblutung des Kapillarnetzes dar (Mohandas et al, 1993; Recchia et al, 2002 und Grau et al, 2013).

Für eine hohe Erythrozytenverformbarkeit sind im Wesentlichen eine niedrige Zytoplasmaviskosität, ein großes Oberflächen-Volumen-Verhältnis sowie die viskoelastischen Eigenschaften der Erythrozytenmembran maßgebend (Stuart et al, 1984). Die Erythrozytenmembran besteht aus einer Lipiddoppelschicht mit darin verankerten Proteinen, die mit einem Zytoskelett verbunden sind (Oonishi et al, 1997; Tsuda et al, 2000 und van Dort et al, 2001). Das Membranskelett setzt sich aus einem flächigen Netz aus dehnbaren Spektrinfilamenten zusammen, die durch kurze Aktinfilamente zusammengehalten werden.

Neben den genannten Faktoren konnten Studien von Bobrowska-Hagerstrand (1998), Tsuda et al (2000), Korbut et al (2002) und Bor-Kucukatay et al (2003) zeigen, dass Stickstoffmonoxid (NO) die erythrozytäre Verformbarkeit beeinflusst. Weitere Studien konnten beweisen, dass Erythrozyten NO synthetisieren (Deliconstantinos et al, 1995; Chen et al, 1998; Kleinbongard et al, 2006 und Cortese-Krott et al, 2012). In diesem Zusammenhang wurde in einigen Studien eine NOS in Erythrozyten postuliert (Chen et al, 1998), allerdings wurde diese sehr lange als inaktiv beschrieben (Kang et al, 2000). Dies änderte sich durch den Nachweis dieses Enzyms und seiner Aktivität im Erythrozyten. Es gelang, die RBC-NOS genau zu lokalisieren, indem das Enzym an Knockout-Mäusen

sowohl an der inneren Plasmamembran als auch im Zytoplasma der Erythrozyten dargestellt werden konnte (Kleinbongard et al, 2006 und Cortese-Krott et al, 2012). Zudem wurde die Aktivität des Enzyms über den Umsatz von L-Arginin in L-Citrullin sowie die Nitritbildung im Erythrozyten gemessen. Nitrit gilt als primäres NO-Oxidationsprodukt und somit als spezifischer Marker für die NO-Produktion (Grau et al, 2007). So konnte eine erythrozytäre NOS (red blood cell-NOS = RBC-NOS) definiert werden. NO (Stickstoffmonoxid) dient als Botenstoff im menschlichen Organismus, der als eNOS und nNOS ständig im Organismus vorhanden ist und zahlreiche physiologische Regulationsprozesse steuert. So tritt es auch in Interaktion mit den Erythrozyten. Cantu-Medellin et al (2011) zeigten, dass NO nicht nur von Erythrozyten aufgenommen und gespeichert, sondern auch freigesetzt werden kann. Zudem kann NO auch durch die RBC-NOS produziert werden (Deliconstantinos et al, 1995; Chen et al, 1998 und Kleinbongard et al, 2006). Dieses von der RBC-NOS produzierte NO ist bei der Regulation der Erythrozytenverformbarkeit entscheidend (Kleinbongard et al, 2006). Die Auswirkungen der extrakorporalen Stoßwellen auf die NO-Aktivierung für diese Arbeit werden in Kapitel „6. Fragestellung“ beschrieben.

2.3. Mechanotransduktion

Die Mechanotransduktion beschreibt den Prozess bei dem physikalische Kräfte in biochemische Signale konvertiert werden (Huang et al, 2004). Dabei können die physikalischen Kräfte sowohl durch Druck- und Zugbelastungen, durch Bewegung – sowohl Wasser als auch Luft – ausgelöst werden (Frairia et al, 2012). Darüber hinaus stellt die Mechanotransduktion einen entscheidenden Faktor bei Regenerationsprozessen z.B. Signaltransduktion über die ECM oder NO-Aktivierung dar (Frairia et al, 2012). Besonders Muskelzellen scheinen sensitiv auf diesen Effekt reagieren (Tidball, 2002 und Hornberger et al, 2004). Die physikalischen Effekte der Mechanotransduktion können unterschiedliche Prozesse auslösen. Der relevante Mechanismus für diese Arbeit wird in dem Kapitel „5. Forschungsstand“ beschrieben.

KAPITEL 3: SKELETTMUSKELREGENERATION

3. SKELETTMUSKELREGENERATION

3.1. ABLAUF DER SKELETTMUSKEL-REGENERATION

3.1. Ablauf der Skelettmuskelregeneration

Nach einer muskulären Verletzung, die unterschiedliche Ursachen haben kann, folgen die unterschiedlichen Phasen der Skelettmuskelreparatur (Abb. 3): Degeneration, Inflammation, Regeneration und Fibrose (Bloch, 2010 und Gharai-beh et al, 2012). Der zeitliche Verlauf dieser Phasen ist nicht einheitlich und kann in Abhängigkeit vom Schweregrad der Verletzung und weiteren Einflussfaktoren variieren (Mackey et al, 2012). Da für die vorliegende Arbeit Phasen der Inflammation und Regeneration von Bedeutung sind erfolgt dazu eine detaillierte Darstellung.

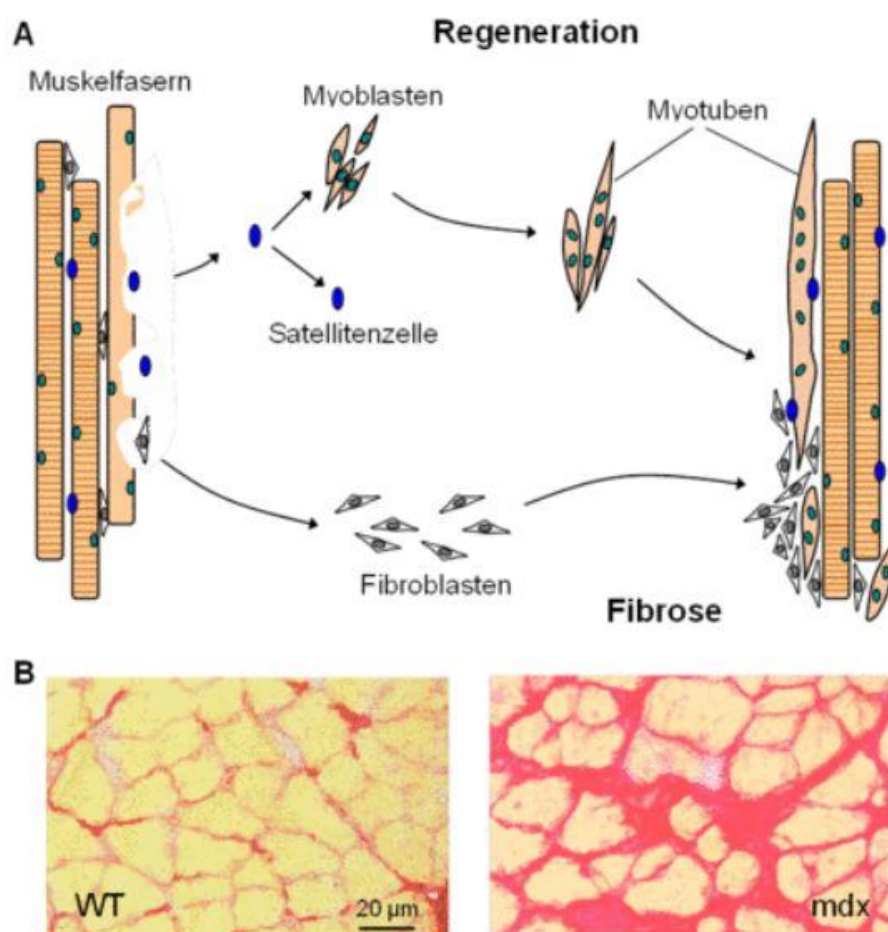


Abbildung 3: Regeneration und Fibrose im Skelettmuskel (Brinkmeier, 2014)

3.1.1. Inflammation

In der Phase der Inflammation erfolgt die Infiltration von Makrophagen in traumatisierte Muskelregionen, die zu einer Aktivierung (Vierck et al, 2000) von Satellitenzellen führt. Diese Satellitenzellen sind wichtige Faktoren in der muskulären Regeneration, Reparatur und Hypertrophie der Skelettmuskulatur. Die SZ-Aktivierung kann durch eine Reihe von Stimuli, wie der Mechanotransduktion, ausgelöst werden (Cameron-Smith, 2002). Muskuläre Traumata werden als einer der wesentlichen Faktoren für die Aktivierung der Satellitenzellen angesehen (Schultz et al, 1986). Nach der Aktivierung der Stammzellen erfolgt die Migration in die Muskelzellen und die Proliferation und Differenzierung in Myoblasten (Schultz et al, 1985 ebd. 1994).

3.1.2. Regeneration

Regeneration dient als wichtige Phase der muskulären Anpassung an Mechanotransduktionseffekte. Eine fehlende oder gestörte Aktivierung der Satellitenzellen könnte zur Verzögerung oder Verlangsamung oder Unvollständigkeit muskulärer Regeneration führen. (Liu et al, 2007). Die Verschmelzung von Myoblasten zu Myotuben ist einer der entscheidenden Schritte der Skelettmuskelentwicklung (Myogenese). Der Fusion geht die Spezifikation einer myogenen Linie (mesodermale Vorläufer) voraus, die sich in Myoblasten differenziert und es folgt die Spezifikation des Myofasertyps und die Bildung der neuromuskulären Verbindungen. Ähnlich wie andere Prozesse der Myogenese, erfordert die Fusion eine sehr genaue räumliche und zeitliche Regulation, die bei der Regeneration und Reparatur des Muskels stattfindet (Lehka et al, 2020). Dabei ist eine Reihe von Genen - und dessen Produkten - bei der Regulation der Myoblastenfusion beteiligt. Ein präzises Zusammenspiel auf mehreren Ebenen zwischen den Genen und den Produkten ist für die Fusion myogener Zellen entscheidend (vgl. Lehka et al, 2020). Im ungünstigen Fall entsteht nach einer Muskelverletzung Bindegewebe, welches die Heilung des Muskels verzögert und eine vollständige strukturelle und funktionelle Wiederherstellung der Muskulatur verhindert (Li & Huard, 2002; Moyer & Wagner, 2011).

3.2. Die Sauerstoffversorgung als Faktor für die Skelettmuskelregeneration

3.2. DIE SAUERSTOFFVERSORGUNG ALS FAKTOR FÜR DIE SKELETTMUSKELREGENERATION

Die Sauerstoffversorgung wird im Wesentlichen durch die Kapillarisation und dem Blutfluss bestimmt (Goertz et al, 2012). Die Blutgefäße des Skelettmuskels wiesen ein hohes Maß an Plastizität auf (Holloszy, 1976; Holloszy & Coyle, 1984). Der Aufbau eines vaskulären Netzwerks im Skelettmuskel führt zu Kapillarwachstum (Risau, 1997). Hauptsächlich fungiert das Kapillarnetz im Skelettmuskel als Sauerstoffversorger (Hudlická, 1985). Weiterhin bilden die Kapillaren einen wesentlichen Teil des Gefäßsystems für den Stoffaustausch in den Geweben. Die Erhöhung der Durchblutung im Skelettmuskel z.B. durch Training, gilt als eine wesentliche Adaptation an körperliche Belastung (Laughlin et al., 2006). Die Kapazität der Durchblutung im Skelettmuskel wird durch körperliches Training aufgrund einer Gefäßneubildung und geänderter Gefäßplastizität erhöht (Laughlin & Roseguini, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass ein trainierter Muskel eine hohe Kapillanzahl aufweist (Nelissen-Vrancken et al., 1993). Darüber hinaus ist VEGF (vascular endothelial growth factor) ein wesentlicher Regulator der Angiogenese im Skelettmuskel (Smith et al, 2008 und Gharaibeh et al, 2012). Neben der Kapillarisation und des Blutflusses, wird die Sauerstoffversorgung auch von der Erythrozytenverformbarkeit und der NO-Verfügbarkeit bestimmt (vgl. Kapitel 2). Die möglichen Auswirkungen der extrakorporalen Stoßwellen auf Sauerstoffversorgung werden in Kapitel „6. Fragestellung“ dargestellt.

KAPITEL 4: EXTRAKORPORALE STOßWELLEN

4. EXTRAKORPORALE STOßWELLEN

Stoßwellen sind eine Form von mechanischer Energie, die bei medizinischer Anwendung durch elektrohydraulische, piezoelektrische oder elektromagnetische Verfahren erzeugt werden. Ihr Vorteil besteht darin, dass diese ohne Verletzung der Körperoberfläche durch die Haut in den Körper eingeleitet und in vorherbestimmten Tiefen zur Wirkung gebracht werden können (Wess, 2004). Die mechanische Energie der Stoßwellen wird mittels akustischer Linsen oder Reflektoren fokussiert und mit Unterstützung bildgebender Verfahren auf die Applikationsgebiete im Körper gerichtet. Um die Krafteinwirkung der Stoßwellenfelder zu charakterisieren, werden die Parameter *Druck*, *Energie* und *Energieflussdichte* sowie verschiedene Definitionen für die Fokus- und Behandlungszone verwendet (Wess, 2004). Neben der primär erzeugten mechanischen Kraftentfaltung an den akustischen Grenzflächen, wird im Gewebe sekundär Kavitation erzeugt. Die Kavitationseffekte wirken dabei wie nadelstichartige Belastungen an den Grenzflächen. Diese beiden Krafteinwirkungen aus primär akustisch erzeugter mechanischer Energie und sekundär erzeugten Kavitationskräften, lösen einerseits Fragmentationseffekte aus, die auf spröde Materialien wie Nierensteine wirken. Andererseits werden Stimulationseffekte der Zellen, wie die Erzeugung von Aktionspotentialen an Nervenzellen und biologische Reaktionen durch Freisetzung verschiedener Stoffe ausgelöst. Die extrakorporale Stoßwellentherapie wird erfolgreich zur Steigerung der Blutversorgung sowie von Stoffwechselprozessen und zur dauerhaften Anregung von Heilungsprozessen eingesetzt. In der medizinischen Anwendung steht mit der extrakorporalen Stoßwellentherapie ein therapeutisch wirksames Verfahren zur Verfügung, die Energien der Stoßwellen gezielt und lokalisiert auf den Körper des Patienten einzubringen (nicht-invasiv), ohne den Patienten zu verletzen (Wess, 2004).

4.1. Stoßwellen in der Medizin

In der medizinischen Anwendung werden die Stoßwellen außerhalb des Körpers erzeugt und ohne Verletzung der Haut in den Körper eingeleitet. Damit bei dem Übergang in den Körper Reflexionsverluste weitgehend vermieden werden, wird die Stoßwelle mittels eines Mediums, mit ähnlichen akustischen Eigenschaften des menschlichen Gewebes übertragen (z.B. über Gelkissen, Wasserbad mit Koppelmembran), welches direkt mit der Haut des Patienten in Kontakt gebracht wird. Dieses Verfahren ist dem des Ultraschallverfahrens sehr ähnlich. Trotz ihrer Ähnlichkeit zum Ultraschall unterscheiden sich Stoßwellen vom Ultraschall im Wesentlichen dadurch, dass die Druckamplituden in einem sehr hohen Bereich liegen. Dabei müssen insbesondere „*Aufsteilungseffekte berücksichtigt werden, die in Folge von Nichtlinearitäten des Ausbreitungsmediums (Wasser, menschliches Gewebe) entstehen*“ (Wess, 2004, 7). Während Ultraschall meist über periodische Schwingungen mit limitierter Bandbreite verfügt, können Stoßwellen durch einen einzigen überwiegend positiven Druckpuls, mit Frequenzen von einigen Kilohertz bis mehr als 10 Megahertz, dargestellt werden. Zudem folgen Stoßwellen vergleichsweise geringe Zuganteile (Abb. 4 & Abb. 5).

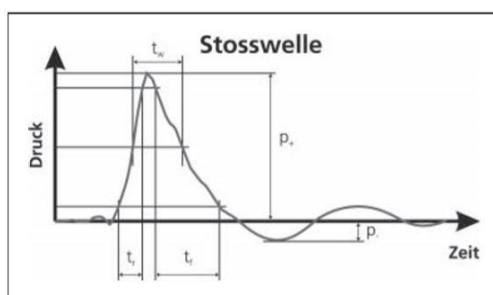


Abbildung 4: Zeit-Druck-Profil einer Stoßwelle. Der Anstieg auf den Spitzendruck (p_+) erfolgt in wenigen Nanosekunden (ns). Die Spitzendrücke liegen bei ca. 10–150 Megapascal (MPa). Die Pulsdauer beträgt ca. 500 ns. Charakteristisch ist der geringe Zuganteil (p_-), der auf ca. 10% des Spitzendruckes beschränkt ist (Wess, 2004)

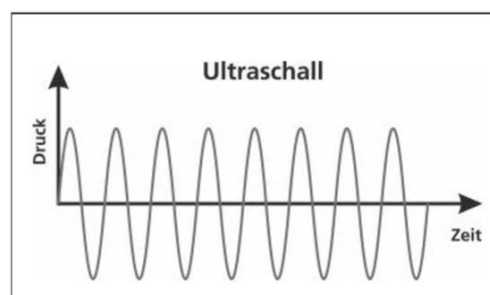


Abbildung 5: Im Vergleich zur Stoßwelle ist Ultraschall durch eine periodische Schwingung mit begrenzter Dauer dargestellt (Wess, 2004)

4.2. Die piezoelektrische Stoßwellenerzeugung

4.2. DIE PIEZOELEKTRISCHE STOßWELLEN- ERZEUGUNG

Die piezoelektrische Stoßwellenerzeugung gilt für die therapeutische Anwendung als besonders geeignet. Dies liegt in der Genauigkeit, des geringen Aufwandes und der guten Dosierbarkeit begründet (Wess, 2004). Da bei dieser Studie die piezoelektrische Stoßwellenerzeugung angewendet wurde, soll auf die anderen Arten der Stoßwellenerzeugung hier nicht weiter eingegangen werden.

Piezoelektrizität

Die Piezoelektrizität beschreibt die Änderung der elektrischen Polarisierung und somit das Auftreten einer elektrischen Spannung an Festkörpern, wenn sie elastisch verformt werden (Wess, 2004).

Die piezoelektrische Stoßwellenerzeugung ist aus der Ultraschalltechnik bekannt. Dabei wird unter Verwendung elektroakustischer Schallwandler der Piezo-Effekt erzeugt, der eine stoßförmige Auslenkung erfährt, wenn ein Spannungspuls von einigen Kilovolt (kV) appliziert wird. Die Auslenkung erfolgt über eine Kugelkalotte, auf der eine Vielzahl piezoelektrischer Elemente angeordnet sind. Somit wird eine konvergente sphärische Welle erzeugt, die sich auf dem Weg in das Zentrum (Fokuszone) ausbreitet. Die so erzeugten piezoelektrischen Druckamplituden erzeugen Stoßwellen, die therapeutisch wirksam sind. Darüber hinaus besitzen piezoelektrische Systeme, im Gegensatz zu den bereits erwähnten elektromagnetischen und elektrohydraulischen Systemen für die Stoßwellenerzeugung, eine hohe Wiederholgenauigkeit und eine gute Dosierbarkeit auch in niedrigen Energiebereichen. Piezoelektrische Stoßwellen können Drücke bis 150 MPa (1500 bar) auf sehr kleinem Raum erreichen. Die piezoelektrischen Verfahren der Stoßwellenerzeugung sind auch deshalb für die Therapie geeignet, da die Stoßwellen im physikalischen Sinne erst in der Fokuszone erzeugt werden, wenn die Druckamplituden so hoch geworden sind, dass *Aufsteilungseffekte* durch nichtlineare Ausbreitung wirksam werden. Eine Aufsteilung einer Welle zu einer Stoßwelle ist in Abbildung 6 dargestellt.

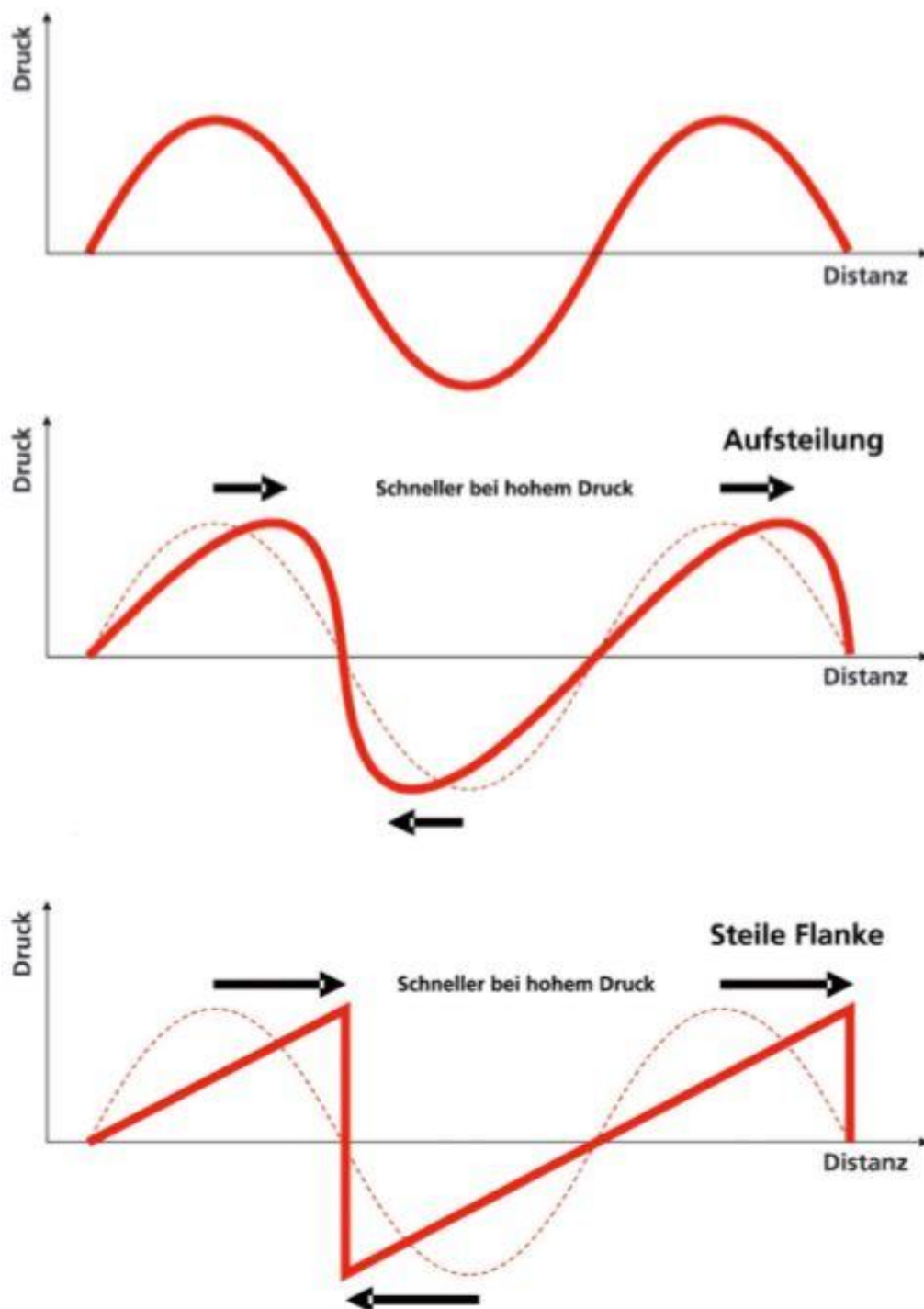


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Aufsteilung einer Wellenfront auf Grund von Nichtlinearitäten des Ausbreitungsmediums. In Zonen höheren Drucks läuft die Welle schneller und steilt sich damit zu einer Stoßwellenfront auf (Wess, 2004)

4.3. Ausbreitung von Stoßwellen

4.3. AUSBREITUNG DER STOßWELLEN

Akustisch erzeugte Stoßwellen benötigen zur Ausbreitung ein Medium, das in der Medizin in aller Regel durch Wasser und biologisches Gewebe oder durch ein Gelkissen dargestellt wird. Die Stoßwellen werden außerhalb des Körpers erzeugt und durch das biologische Gewebe oder das Gelkissen eingekoppelt. Mit der Einkopplung kommt es zu einer Verschiebung von Masseteilchen, wodurch eine Druckübertragung stattfindet (Abb. 7).

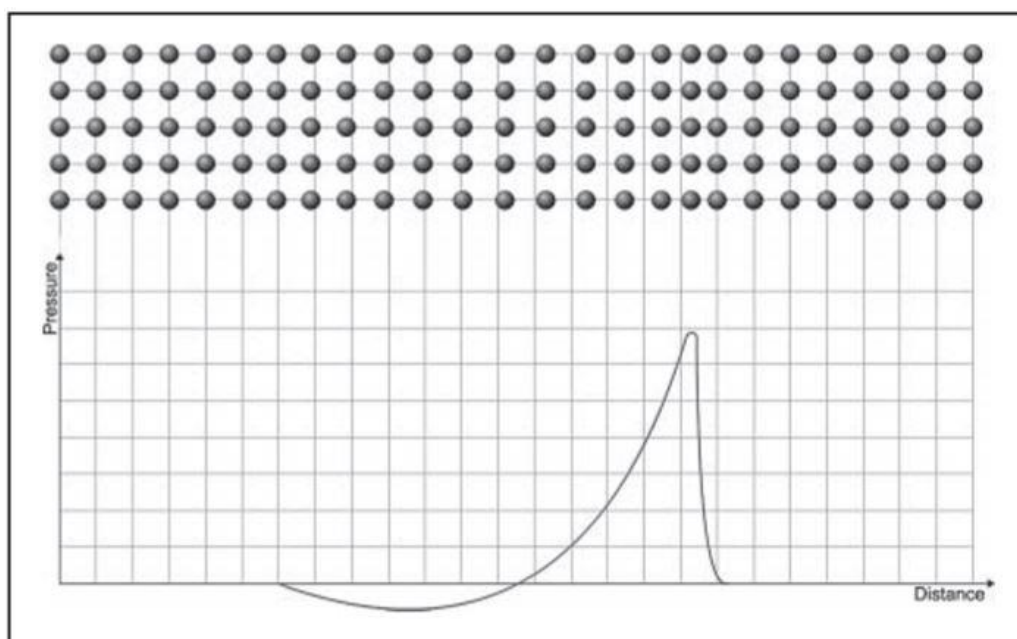


Abbildung 7: Ausbreitung einer Stoßwelle (schematisch) durch Verschiebung von Teilchen aus der Ruhelage und Zurückfedern in die Ruhelage. Der Unterdruckanteil der Welle erzeugt ein Überspringen der Teilchen (Wess, 2004).

Das Wasserbad verhindert dabei eine signifikante Änderung der akustischen Impedanz bei dem Übergang der Stoßwellen in das Körpergewebe (akustische Grenzflächen). Bei einem Gelkissen ist das Ausbreitungsmedium (Wasser und biologisches Gewebe) kombiniert worden, wodurch der Aufwand minimiert wird.

Akustische Grenzflächen

Als akustische Grenzflächen können Widerstände beschrieben werden, die der Ausbreitung von Schwingungen in einem bestimmten Umfeld entgegenwirken (Wess, 2004).

Dabei sind die akustischen Eigenschaften, wie Dichte (ρ) und Schallgeschwindigkeit (c) von wesentlicher Bedeutung. Wenn sich an den akustischen Grenzflächen die akustischen Eigenschaften ändern, kommt es zu Abweichungen der geraden Ausbreitung der Stoßwellen in Form von Brechung, Reflexion, Streuung und Beugung. Dieser Effekt ist bereits aus der Optik bekannt (Abb. 8 & 9).

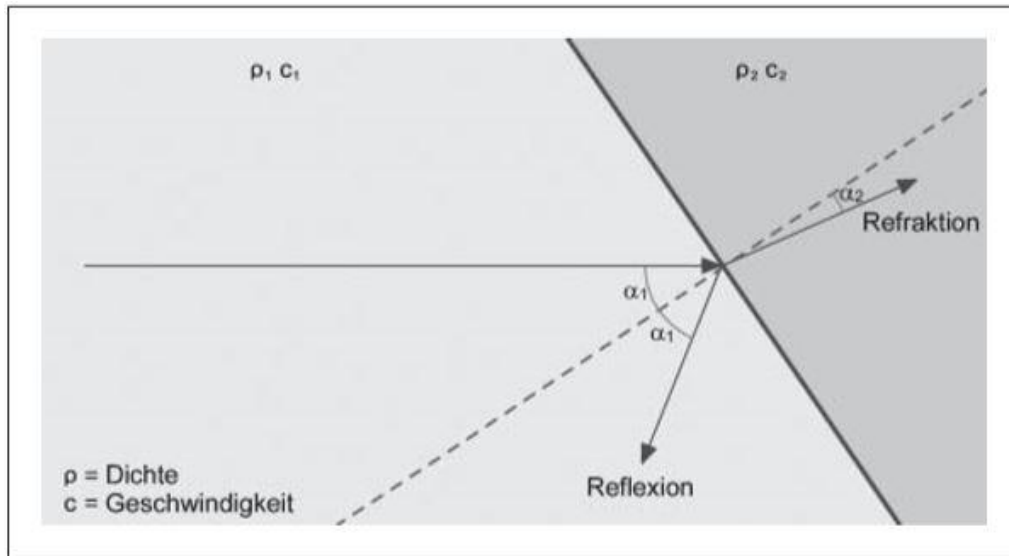


Abbildung 8: Reflexion und Brechung von Stoßwellen an Grenzflächen mit unterschiedlicher akustischer Impedanz (Dichte ρ x Schallgeschwindigkeit c) (Wess, 2004).

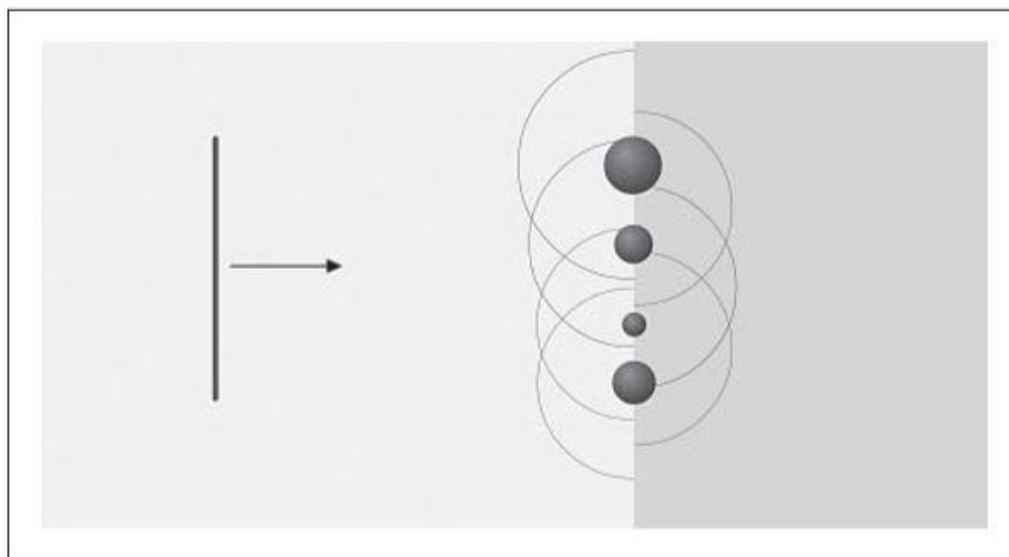


Abbildung 9: Stoßwellen werden an Hindernissen wie Rippenknochen und Gasblasen gestreut (Wess, 2004).

Diese Effekte müssen bei der Anwendung von Stoßwellen am Menschen berücksichtigt werden, wenn die Stoßwelle in der Fokus- oder Behandlungszone appliziert werden soll. Um diesen Effekt zu minimieren ist ein gewebeähnliches Medium entscheidend dafür, dass nicht bereits bei der Einkopplung in den Körper ein großer Teil der Energie durch Reflexion verloren geht. Da auch Weichgewebe (Haut, Fett, Muskeln, Sehnen etc.) nicht akustisch homogen sind muss davon ausgegangen werden, dass es an den akustischen Grenzflächen dennoch zu Abweichungen kommt. Allerdings sind die Unterschiede in den akustischen Eigenschaften dabei deutlich geringer als beim Übergang von Wasser zu Luft und umgekehrt. Neben Absorption und Reflexion treten hier wenig kontrollierbare Brechungseffekte auf, die zu geringfügigen Abweichungen von der geradlinigen Ausbreitung von Stoßwellen im Körper führen können (Wess, 2004).

4.4. Stoßwellenparameter

Stoßwellendruck

Stoßwellen werden vorwiegend durch die Messung mittels Drucksonden charakterisiert (Wess et al, 1997). Eine Einzelmessung des Stoßwellenfeldes besteht aus einer Vielzahl von Punktmessungen an verschiedenen Stellen im Stoßwellenfeld (Abb. 10). Dabei werden neben dem Spitzendruck weitere Faktoren gemessen: das zeitliche Druckprofil mit Anstieg, die Pulsdauer und die Unterdruckphase, woraus weitere Parameter des Stoßwellenfeldes berechnet werden.

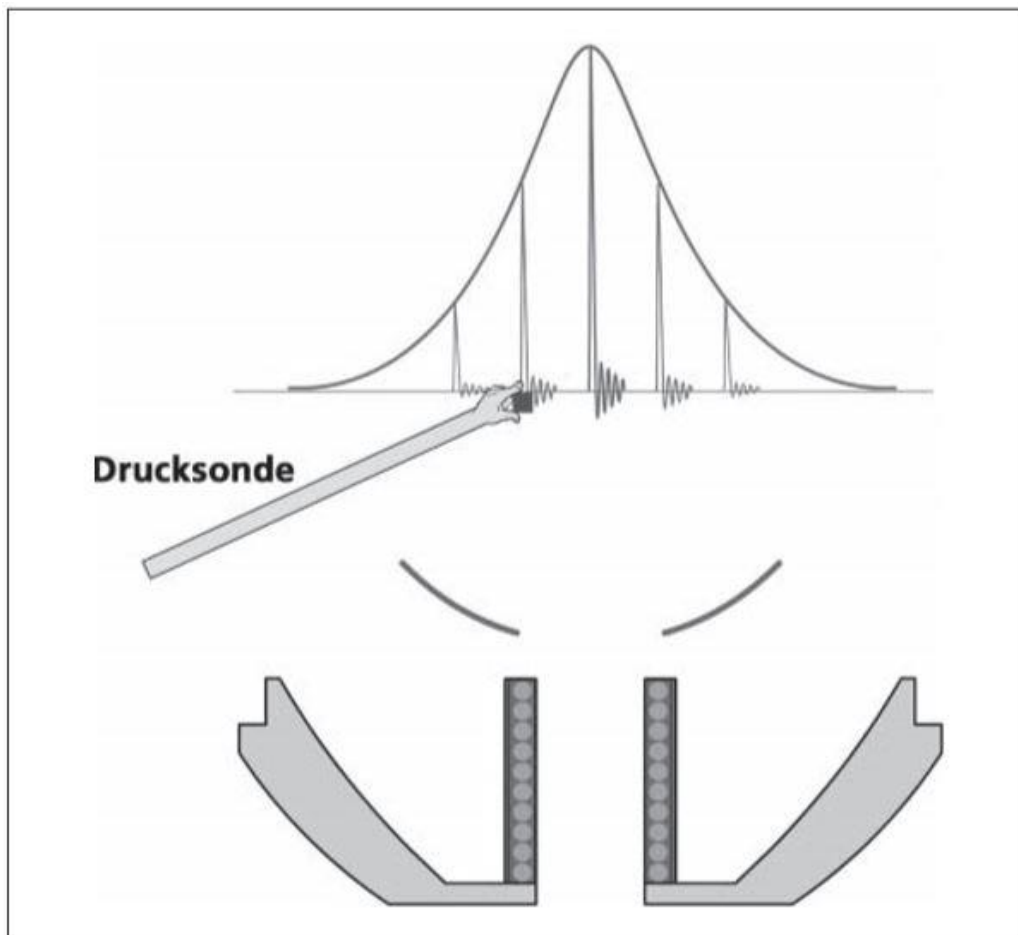


Abbildung 10: Stoßwellenfelder werden mit einer Drucksonde vermessen, in dem die zeitlichen Druckkurven an verschiedenen Stellen im Feld aufgenommen werden. Alle weiteren Parameter werden aus den Druckwerten berechnet (Wess, 2004, 15).

-6 dB-Stoßwellenfokus

Um die gewünschten Effekte eingrenzen zu können, werden Stoßwellen gebündelt. Dies dient der gezielten Behandlung lokal begrenzter Ziele und in tieferen Gewebeschichten der Behandlung von Pseudarthrosen, Hüftkopfnekrosen oder Nierensteinen. Während in der Verdichtungszone die höchsten Druckwerte gemessen werden, fallen die Druckwerte kontinuierlich ab, je weiter man sich mit der Drucksonde vom Zentrum der Verdichtung entfernt. Dies führt allerdings zu einem Problem. Die physikalischen Eigenschaften machen es nicht möglich, eine scharfe Grenze zu bestimmen, außerhalb derer die Drücke abrupt

auf null fallen. Eine scharf abgegrenzte Kontur in der Wirkungszone der Stoßwelle lässt sich daher nicht bestimmen.

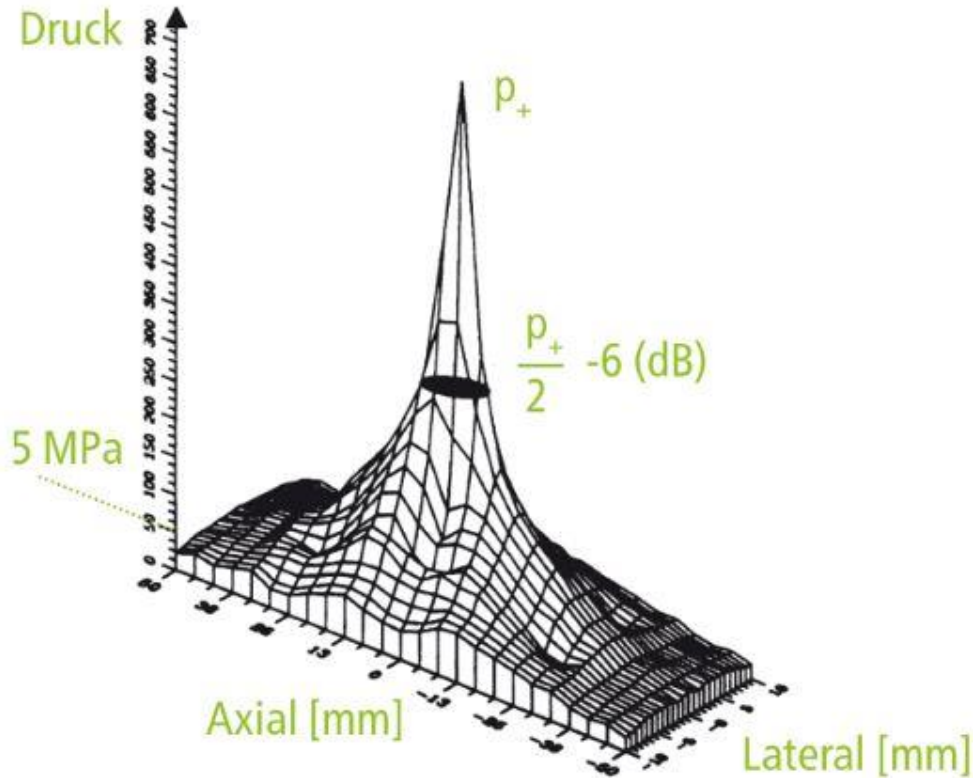


Abbildung 11: Druckgebirge in einer Ebene des Stoßwellenfeldes, axial in Richtung der Ausbreitung der Stoßwelle und einer lateralen Richtung dazu (Wess, 2004)

Fokuszone

Physikalisch wird die Fokuszone als der Bereich eines Stoßwellenfeldes definiert, in dem die gemessenen Drücke größer oder gleich der Hälfte des im Zentrum gemessenen Spitzendruckes sind (Wess, 2004, 15).

-6dB-Fokus

Der so definierte Bereich wird auch als -6dB-Fokus bezeichnet oder mit der Abkürzung FWHM (**F**ull **W**idth **a**t **H**alf **M**aximum) beschrieben. Es handelt sich also um einen auf den Spitzendruck bezogenen räumlichen Bereich, der allerdings keine Aussage über die darin enthaltene Energie oder die biologische Wirkung beinhaltet (Wess, 2004, 15).

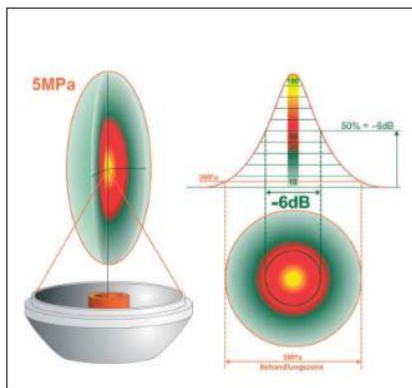


Abbildung 12: Darstellung des -6 dB-Fokus (definiert durch den Bereich oberhalb des halben Spitzendrucks) und der 5 MPa-Behandlungszone (definiert durch Spitzendrücke größer als 5 MPa), (Wess, 2004, 15)

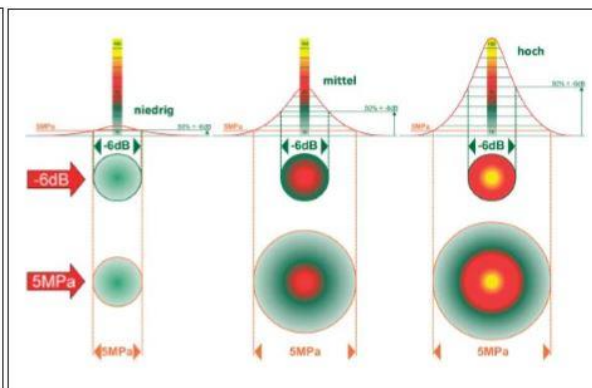


Abbildung 13: -6 dB-Fokus im Vergleich zur 5 MPa-Therapiezone bei verschiedenen Energieeinstellungen niedrig, mittel und hoch. Trotz unterschiedlicher Energieinhalte bleibt der -6 dB-Fokus nahezu unverändert. Der 5 MPa-Therapiefokus wächst mit der Energiestufe und verdeutlicht damit den erweiterten Wirkungsbereich der Stoßwellen (Wess, 2004, 15)

5 MPa-Therapiezone

Erst die Kombination aus dem Spitzendruck und der Energieangabe kann einen Eindruck vermitteln, in welchem Bereich die Stoßwelle ihre biologische Wirkung entfaltet. Der -6dB-Fokus einer Stoßwelle eines Therapiebereichs im Körper kann in seiner Größe variieren und würde somit lediglich eine Relativgröße darstellen. Um einen engeren Bezug zur Therapiezone zu erhalten, wurde eine weitere Größe definiert, die nicht auf Relativgrößen, sondern auf einer absoluten Größe, nämlich auf dem Druck von 50 Bar (5 MPa) basiert (Guter-sohn, Caspari & Marlinghaus, 2004).

5 MPa-Therapiezone

Der 5 MPa-Fokus ist als die räumliche Zone definiert, in der der Stoßwellendruck größer oder gleich 5 MPa beträgt. Unterstellt man, dass es eine gewisse Grenze des Druckes gibt, unterhalb derer eine Stoßwelle nicht oder nur geringfügig therapeutisch wirksam ist, so wird diese als Maß genommen und hier mit einer gewissen Willkür als 5 MPa angenommen. Selbst wenn dieser Wert in Zukunft indikationsabhängig korrigiert werden müsste, hat diese Definition den Vorteil, dass sie die Veränderung der Therapiezone mit der gewählten Energieeinstellung widerspiegelt (Wess, 2004, 15).

Die unterschiedlichen Zonen und deren Veränderung mit den gewählten Energiestufen sind in Abbildung 13 schematisch dargestellt.

Dargestellt ist, dass die -6dB -Fokuszone trotz unterschiedlicher Energieeinstellungen unverändert bleibt. Es ist aber davon auszugehen, dass bei wachsender Energie die Wirkungszone der Stoßwellen größer wird. Dies kommt in der wachsenden Größe der 5 MPa Zone zum Ausdruck (Wess, 2004).

Energie (E): Für die praktische Anwendung ist die Energie der applizierten Stoßwelle ein wichtiger Parameter (Gutersohn, Caspari & Marlinghaus, 2004). Es wird davon ausgegangen, dass die Wirkungen der Stoßwelle im Gewebe nur auftreten können, wenn gewisse Energieschwellen überschritten werden.

Druckwelle $p(t)$: Neben dem zeitlichen Verlauf der Stoßwelle (siehe Abb. 4) ist auch die Fläche (A) entscheidend, in der der Druck gemessen werden kann. Unter Verwendung der akustischen Parameter des Ausbreitungsmediums *Dichte* (ρ) und *Schallgeschwindigkeit* (c) ergibt sich für die Energie die folgende Formel:

$$\text{Stoßwellenenergie (E): } E = A/\rho c \int p(t)dt$$

Wess (2004) unterscheidet, ob die Integration des Drucks über die Zeit nur die positiven Druckanteile (E_+) oder auch die negativen (Zug-) Anteile (E_{gesamt}) erfasst, da üblicherweise die Gesamtenergie mit E (ohne Index) angegeben wird. Da die akustische Energie eines Stoßwellenpulses in Millijoule (mJ) angegeben wird, werden in der Regel pro Behandlung einige Hundert oder Tausend Stoßwellenpulse abgegeben. Die insgesamt abgegebene Energie ergibt sich dann durch Multiplikation mit der Pulszahl.

Energieflussdichte (ED): Gutersohn, Caspari & Marlinghaus (2004) und Wess (2004) erwähnen, dass es bezüglich der therapeutischen Wirkung von Stoßwellen von Bedeutung ist, ob sich die Energie der Stoßwelle über eine große Fläche verteilt oder ob sie auf eine enge Therapiezone konzentriert wird. Um

diesbezüglich ein Maß für die Konzentration der Energie zu erhalten, wird rechnerisch die Energie pro Fläche (E/A) und somit die Energieflussdichte ermittelt:

$$\text{Energieflussdichte (ED): } ED = E/A = 1/\rho c \int p(t)dt$$

Die Angabe der Energieflussdichte (ED) erfolgt in Millijoule pro Quadratmillimeter (mJ/mm^2). Auch für die Energieflussdichte gilt, dass zwischen der Integration über den positiven Teil der Druckkurve oder auch den negativen Teil unterschieden wird, da ohne Angabe der ED üblicherweise nur die Druckkurve einschließlich der negativen Zuganteile berücksichtigt wird (Gutersohn, Caspari & Marlinghaus, 2004).

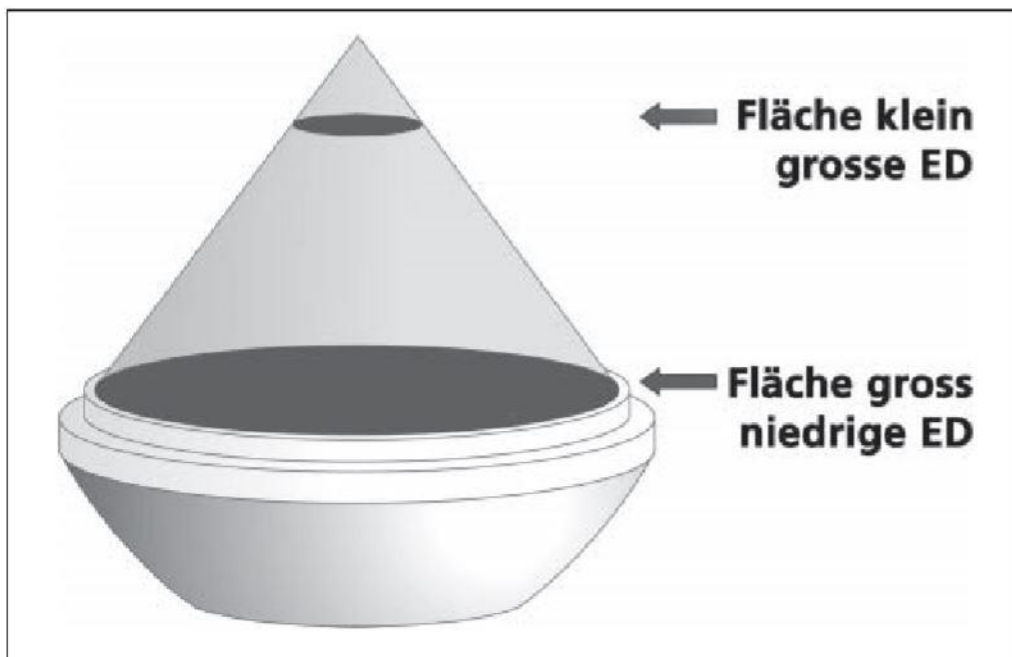


Abbildung 14: Bei gleicher Gesamtenergie erhöht sich die Energieflussdichte durch Fokussierung. Die Verkleinerung der Fläche bewirkt eine Konzentration der Energie und erhöht damit die Wirkung der Stoßwelle (Wess, 2004, 16)

Mit den genannten Parametern aus Kapitel 4.1.4 ist in aller Regel ein extrakorporal erzeugtes Stoßwellenfeld für die medizinische Anwendungen ausreichend gut charakterisiert. Stoßwellengeräte, die mit unterschiedlichen Erzeugungsprinzipien arbeiten, können sich bezüglich der aufgelisteten Parameter unterscheiden. Wess (2004) erwähnt, dass die „Qualität“ der verwendeten Stoßwellen in der Therapiezone, unabhängig vom Erzeugungsprinzip, gleichbleibend sein dürfte. Die gemessenen Parameter in der Therapiezone lassen demnach primär keine Rückschlüsse auf die Art der Erzeugung zu (z.B. elektrohydraulisch oder piezoelektrisch). Unter Anbetracht der sekundären Parameter, wie Wiederholgenauigkeit, Dosierbarkeit, Energiebereich, Betriebskosten durch Verbrauchsmaterial etc. können Qualitätsunterschiede festgestellt werden.

4.5. Physikalische Effekte von Stoßwellen

Stoßwellen haben gegenüber Ultraschall bei der direkten Wirkung auf Grenzflächen eine unterschiedliche Charakteristik. Der Ultraschall basiert auf einer hochfrequenten Wechselbelastung (vgl. Abb. 5) von einigen Megahertz, die bei hohen Amplituden zu Erwärmung, Gewebeerreißungen und Kavitationsbildung im Bereich des Gewebes führen. Die Wirkung von Stoßwellen basiert u.a. auf einer vorwärts gerichteten Kraftwirkung. Da diese Kraftwirkungen im Wesentlichen an Grenzflächen mit einem Sprung des akustischen Widerstandes, kaum aber in homogenem Medium (Gewebe, Wasser), auftreten ist laut Wess (2004, 16) *„die Stoßwelle das ideale Mittel, Wirkungen in der Tiefe des Gewebes zu erzeugen, ohne das vorgelagerte Gewebe zu beeinträchtigen.“* Eine geringe Kraftwirkung durch Stoßwellen ist aber auch innerhalb weicher Gewebestrukturen mit weniger stark ausgeprägten Grenzflächen feststellbar. Forssman & Hepp (1980) und Delius, Draenert, Diek & Draenert (1995) diskutierten in diesem Zusammenhang die mechanische Zerstörung von Zellen, Membranen und z.B. Knochentrabekel, aber auch die Zellstimulation durch reversible Deformation der Zellmembran (z.B. bei Erythrozyten).

Für die extrakorporal erzeugten Stoßwellen ergeben sich daraus unterschiedliche Wirkungen im Gewebe. Einerseits kann die Fokussierung primär zu einer Zerstörung oder Reizung im Gewebe führen. Andererseits kann durch die Fokussierung das Gewebe stimuliert werden und zu Heilungsprozessen führen, die speziell bei orthopädischen Anwendungen zu beobachten sind. Letztere sind für die vorliegende Arbeit essenziell. Mit der extrakorporalen Stoßwellentherapie werden meist eine gesteigerte Durchblutung und ein intensivierter Stoffwechsel beobachtet, den man für die einsetzende Heilung verantwortlich machen kann (Wess, 2004).

4.6. Kavitationsblasen

Neben der direkten Kraftwirkung von Stoßwellen auf Grenzflächen kommt es in gewissen Medien wie Wasser und teilweise auch im Gewebe zu der sog. Kavitation (Church, 1989). Kavitationsblasen entstehen unmittelbar, nachdem die Druck/Zug-Wechselbelastung der Stoßwelle das Medium passiert hat. Ein großer Teil der Blasen wächst bis ca. 100 μ s (Mikrosekunden) nach Durchlauf der Welle an, um dann unter Aussendung sekundärer sphärischer Stoßwellen heftig zu kollabieren (siehe Abb. 15).

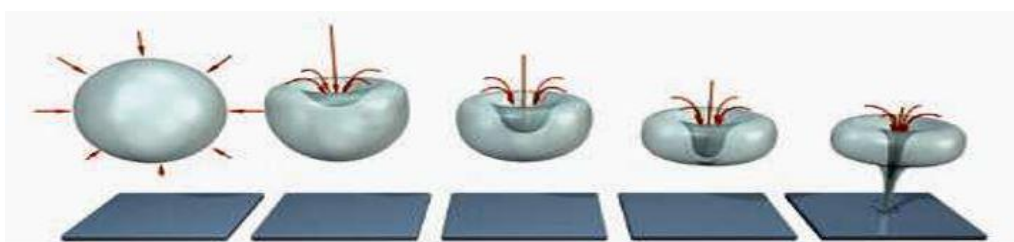


Abbildung 15: Schematische Darstellung von Kavitationsblasen an Grenzflächen und Ausbildung so genannter Mikrojets (Crum, 1988 und Church, 1989)

Kavitationsblasen können nicht mehr ungestört in der Nähe von Grenzflächen kollabieren. Church (1989) konnte in seinen Experimenten nachweisen, dass das in die Blase zurückströmende Medium (Wasser, Körperflüssigkeit) nicht mehr ungehindert nachströmen kann, so dass die Blase asymmetrisch unter Ausprägung eines Microjets kollabiert.

Die Energie und Durchschlagskraft der Jets sind in der Lage harte Grenzflächen zu erodieren und Wände von kleinen Gefäßen zu durchstoßen, wodurch letzteres Mikroblutungen oder Membranperforationen zur Folge haben kann. Die Kavitation ist an der Fokuszone besonders ausgeprägt, jedoch nicht ausschließlich auf diese beschränkt. „*Mit der Kavitation steht ein weiterer biologisch wirksamer Mechanismus der Stoßwelle zur Verfügung, der gezielt in lokalisierten Bereichen auch in tieferen Gewebeschichten eingesetzt werden kann.*“ (Wess, 2004, 17). Wess (2004) betont, dass die physikalisch eingebrachte Energie dabei über verschiedene Wirkungsmechanismen biologische Reaktionen hervorrufen kann, die zunächst häufig zu einer verbesserten Durchblutung führen und in der Folge Reparaturmechanismen anstoßen. Neben direkten mechanischen Effekten im Gewebe konnte er auch Stimulationseffekte im Nervensystem nachweisen, die möglicherweise pathologische Reflexmuster korrigieren und darüber zu einer nachhaltigen Heilung führen.

4.7. Funktion extrakorporaler Stoßwellen in der Medizin

Stoßwellen stellen ein Mittel dar therapeutisch wirksame Energien auf nicht-invasivem Wege an lokal begrenzte Orte im Körper zu bringen. Von daher sind diese aus heutiger Sicht aus der Medizin nicht mehr wegzudenken. Von medizinischer Bedeutung ist die Tatsache, dass Stoßwellen selektiv auf akustische Grenzflächen wirken und homogenes elastisches Gewebe weitgehend schädigungsfrei durchlaufen. Die Energiekonzentration durch Fokussierung ermöglicht die Vermeidung von Gewebeschäden außerhalb der Therapiezone, während innerhalb der Behandlungszone die therapeutische Wirkung signifikant verstärkt wird. Allerdings sind auch moderate Nebenwirkungen (Hämatome) nicht ganz ausgeschlossen, wenn besonders hohe Energien wie bei der Nierensteinzertrümmerung (Lithotripsie) verwendet werden.

KAPITEL 5: FORSCHUNGSSTAND

5. FORSCHUNGSSTAND

5.1. Auswirkungen der Mechanotransduktion auf die Erythrozytenverformbarkeit

5.1. AUSWIRKUNGEN DER MECHANO- TRANSDUKTION AUF DIE ERYTHROZYTEN- VERFORMBARKEIT

Die Erythrozytenverformbarkeit ist ein reversibler Prozess der von verschiedenen strukturellen Faktoren inklusive Oberflächenvolumenverhältnis, mechanischen Eigenschaften der Membranen oder NO-Gehalt, abhängig ist (Chien, 1987; Mohandas & Chasis, 1993 und Grau et al, 2013). Zusätzlich wird beschrieben, dass die Erythrozytenverformbarkeit intern durch zelluläre Mechanismen und/oder Veränderungen der Struktur der Erythrozyten (RBC) beeinflusst wird (Grau et al, 2013). Aber auch externe Faktoren und Stimulationen werden als Gründe herangeführt. So stellten Suhr et al (2012), Mairbäurl (2013), Koliyamitra et al (2017) und Tomschi et al (2018) dar, dass moderates Ausdauertraining die Erythrozytenverformbarkeit positiv beeinflusst. Ebenso konnten Filipovic et al (2015) bei Untersuchungen mit Ganzkörper-Elektro(myo)stimulation (EMS) positive Einflüsse der Verformbarkeit feststellen, da sportliche Aktivität als Scherstress und das EMS-Training als mechanischer Reiz auf die Erythrozyten einwirken. Im Gegenzug konnten Flotte et al (1991) in einer In-Vitro-Studie mit unterschiedlichen Gewebeprobe nachweisen, dass laserinduzierte Stoßwellen die Erythrozyten beeinträchtigen können. Es scheint also, als ob mechanischer oder Spannungs- bzw. Druck- und Zugstress (Scherstress) die Verformbarkeit beeinflusst. Die Erythrozytenverformbarkeit wird allerdings auch von der Verfügbarkeit interzellulärem Stickstoffmonoxids (NO) beeinflusst. So führt ein hoher NO-Gehalt zu einer Steigerung der Verformbarkeit, während ein geringer NO-Gehalt diese senkt (Bor-Kucukatay et al, 2003 und Kleinbongard et al, 2006). Da Stickstoffmonoxid (NO) ein freies Radikal mit einer kurzen Halbwertszeit von Millisekunden im Blut ist, reagiert es mit anderen Radikalen, Proteinen oder Rückständen innerhalb der Erythrozyten (RBC) oder oxidiert zu Nitrit und schließlich zu Nitrat (Özüyaman et al, 2008).

Eine sinkende Verformbarkeit der Erythrozyten lässt sich auch durch die Hemmung der RBC-NOS-Aktivität erklären. Denn es wurde mehrfach belegt, dass eine verminderte Aktivität des Enzyms die erythrozytäre Verformbarkeit hemmt (Bobrowska-Hagerstrand et al, 1998; Tsuda et al, 2000; Korbut et al, 2002 und Bor-Kucukatay et al, 2003).

Die Forschungsgruppen Suhr et al (2012) und Wahl et al (2012) haben gezeigt, dass Faktoren wie körperliche Belastung in Kombination mit Kompression der Beine (Wahl et al, 2012), zur positiven Veränderung der Verformbarkeit der Erythrozyten geführt haben (Ludolph et al, 2007).

Studien von Suhr et al (2012) und Grau et al (2013) konnten zeigen, dass bei akuter körperlicher Aktivität eine Aktivierung der eNOS in den Erythrozyten stattfindet und das NO in den Erythrozyten zu einer Nitrosylierung der Spektine führt und darüber die Verformbarkeit der Erythrozyten beeinflusst wird. Insgesamt bringen eine Reihe von Studien NO und die NOS Aktivierung der roten Blutkörperchen (RBC) im Zusammenhang mit weiteren molekularen und zellularen Veränderungen in Verbindung mit ihrer Verformbarkeit (Kleinbongard et al, 2006; Fischer et al, 2007; Ludolph et al, 2007; Suhr et al, 2009; Rieckeheer et al, 2011; Ladage et al, 2012; Suhr et al, 2012 und Wahl et al, 2012). Innerhalb der Erythrozyten wird durch die Umwandlung von L-arginine zu L-citruline NO (RBC-NO) synthetisiert, welches für die Verformbarkeit verantwortlich ist. RBC-NOS bedingt die NO-Produktion.

Die Forschungsgruppe Filipovic et al (2016) konnte bei dem Einfluss von Ganzkörperelektromyostimulation (EMS) bei Fußballspielern ebenfalls eine positive Veränderung der Verformbarkeit nachweisen.

Tomschi (2018) konnte in seiner Arbeit feststellen, dass die Verformbarkeit positiv mit der Ausdauerleistungsfähigkeit korreliert. Dabei konnte auch festgestellt werden, dass akute Laufbelastungen zu keinen Veränderungen in der Verformbarkeit führen, wohl aber eine mehrwöchige Laufintervention.

5.2. Auswirkungen der Mechanotransduktion auf die ECM

5.2. AUSWIRKUNG DER MECHANOTRANSDUKTION AUF DIE ECM

Studien von Gillies & Lieber (2011) und Moyer & Wagner (2011) konnten zeigen, dass die Mechanotransduktion einen entscheidenden Faktor der Regenerations- bzw. Heilungsprozesse darstellt und auch mit der Angiogenese (Kapillarneubildung) in Verbindung gebracht wird (Suhr et al, 2009). Insbesondere für die Herzmuskulatur konnte in den letzten Jahren auch von Bloch et al (2012) die Rolle der ECM für Anpassungsreaktionen des Herzmuskels an verschiedene Reize, wie z.B. körperliche Aktivität gezeigt werden. In Zusammenhang mit den Veränderungsprozessen in der ECM konnte nachgewiesen werden, dass eine verbesserte Heilung der Skelettmuskulatur und eine Reduktion der Entstehung von Narben / fibrotischem Gewebe mit einer Erhöhung der Angiogenese einhergeht (Ota et al, 2011). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass auch körperliche Belastung zu akuten und chronischen Veränderungen der ECM führen kann (Suhr et al, 2010).

Neben den ECM-Veränderungen kommt es häufig zu einer erhöhten Freisetzung von vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF), die mit einer verbesserter Vaskularisierung und Muskelregeneration sowie mit einer höheren Muskelkraft (Ota et al, 2011) einhergehen kann. Da Wachstumsfaktoren teilweise in der ECM gespeichert werden und ihre Bindung an die Zellen von der ECM abhängig ist, müssen solche Veränderungen der Wachstumsfaktorfreisetzung auch unter dem Aspekt der ECM-Veränderungen betrachtet werden (Suhr et al, 2009).

Bachl et al, (2017) konnten in Ihren Studien feststellen, dass es bei steigendem Belastungsreiz - neben akuten - auch zu chronischen, post-translatorischen Anpassungen der Proteine der ECM kommt.

5.3. Auswirkung extrakorporaler Stoßwellen auf Regenerationsfaktoren

5.3. AUSWIRKUNG EXTRAKORPORALER STOßWELLEN AUF REGENERATIONS- FAKTOREN

Sims et al (1992) konnten nachweisen, dass Stoßwellenbehandlungen mit 0,5 Bar (50.000 Pa) und 0,077 mJ/mm² zu temporär differenten Ergebnissen der Zellverformungen führten. Mott & Helmke (2007) wiesen bei Studien mit unterschiedlichen Stoßwellen aber gleichen Parametern nach, dass sich zytoskelettäre Veränderungen zelldichteabhängig zeigen. Dabei bewirkten die einwirkenden Reize zelldichteabhängig unterschiedliche Effekte.

Stoßwellen verändern die viskoelastischen Eigenschaften der Zellmembranen der Erythrozyten (RBC) und / oder beeinflussen die Proteinstruktur so, dass hier die NO Produktion und in der Folge die Verformbarkeit sinkt. Rychly et al (1998) zeigten, dass mechanische Stimulationen die Akkumulationen von mechanosensitiven zytoskelettassozierten Proteinen am Applikationsort erhöhen, wobei die Anzahl der fokalen Adhäsionen erhöht wird, so dass eine stärkere Bindung an die extrazelluläre Matrix entsteht (Meazzini et al, 1998). Zusätzlich konnten weitere Studien zeigen, dass die ESWT weitere Effekte, wie IGF und FGF im Gewebe regulieren und folglich für die Regeneration von Bedeutung sind (Chen et al, 2004; Ciampa et al, 2005 und Mariotto et al, 2005).

Park et al (2004) konnten bei Untersuchungen zu humanen mesenchymalen Stammzellen feststellen, dass diese mechanosensitiv und divergent auf verschiedene Stoßwellenapplikationen reagieren. Calcagni et al, (2011) konnte in tierexperimentellen Studien zeigen, dass extrakorporale Stoßwellen auch zu einem erhöhten kapillaren Blutfluss in den quergestreiften Hautmuskeln führen können. Des Weiteren können Stoßwellen bei Osteonekrose angewendet werden, mit dem Ziel, die Angiogenese zu stimulieren und dadurch der Nekrose der Knochen entgegenzuwirken (Alves et al, 2009). Mariotto et al. (2009), konnten bereits in einer klinischen Studie zur Osteonekrose feststellen, dass nach der Anwendung von extrakorporalen Stoßwellen anti-inflammatorische Effekte aufgetreten sind. Als Ursache wurde angenommen, dass die Stoßwellen

die NO-Produktion erhöht haben. Auch nach einem akuten Herzinfarkt geht die Transplantation der aus dem Knochenmark stammenden mononukleären Zellen (bone marrow-derived mononuclear cells, BMDCs), die vorher mit Stoßwellen behandelt wurden mit einer verbesserten linksventrikulären Funktion einher (Sheu et al, 2010). Die Vorbehandlung sowohl von nicht ischämischem als auch von chronisch ischämischem Gewebe im Bereich der Hinterläufe von Ratten mit Stoßwellen führte zu einer erhöhten Rekrutierung von zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen (circulating endothelial progenitor cells cEPC). Hierdurch kommt es zu einer fördernden Wirkung auf die Kapillarneubildung. Dies ist von besonderer Bedeutung für Patienten mit chronischer Gewebeschämie, wie sie bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit auftritt (Aicher et al, 2006). Experimentelle Studien zeigten bereits, dass die einfache Anwendung der Stoßwellen im Fall einer kritischen Hinterlaufischämie (critical limb ischemia) bei Ratten zur Verbesserung des Blutflusses führt (Calcagni et al, 2011). Diese Verbesserung ist vergleichbar mit derjenigen die durch eine Transplantation von knochenmarkabgeleiteten endothelialen Vorläuferzellen (bone marrow-derived endothelial progenitor cells) induziert wird (Yeh et al, 2012). Die Kombination beider Behandlungen führt zu einer größeren Blutflusserhöhung als die Anwendung nur einer der beiden Methoden (Yeh et al, 2012). Diese Verbesserung des Blutflusses, die mittels Laserdoppler untersucht wurde, geht mit einer Induktion der Angiogenese einher. Den Autoren nach ist der wichtigste Befund dieser Studie, dass die beiden Methoden für die Behandlung von Patienten kombiniert werden können (Yeh et al, 2012). Weitere tierexperimentelle Studien weisen ähnliche Befunde für den Herzmuskel nach. Behandlung mit Stoßwellen bei chronischer Myokardischämie führt zur Kapillarneubildung und geht mit einer Normalisierung des regionalen myokardialen Blutflusses sowie der myokardialen Funktion einher (Nishida et al, 2004). Den Autoren nach ist der wichtigste Befund dieser Studie, dass die beiden Methoden für die Behandlung von Patienten kombiniert werden können (Yeh et al, 2012). Speziell in den Anwendungsbereichen von Haut- (Wundheilung), Sehnen- (van Leeuwen et al, 2009; Huisstede et al, 2011 und Lee et al, 2011), Skelettmuskulatur- (Wang, 2012) und Knochenverletzungen sowie Os-

teoarthritis (Wang et al, 2011), peripheren Gefäßerkrankungen (Yeh et al, 2012), chronischer Myokardischämie (Nishida et al, 2004) und bei der Behandlung erektiler Dysfunktion (Vardi et al, 2012), waren positive Effekte nach Anwendung der ESWT nachweisbar. Zum Beispiel bei Hautverbrennungen wird die Stoßwellentherapie mit Kapillarneubildung in Verbindung gebracht, die mit einer verbesserten Wundheilung einhergeht (Goertz et al, 2012). Die Bedeutung der Stoßwellentherapie für die Wundheilung und die Regulation der Angiogenese wird bei Mittermayr et al (2012) ausführlich diskutiert. Neueste Erkenntnisse von Zissler et al (2017) konnten bereits in einer Studie nachweisen, dass extrakorporale Stoßwellen die Muskelregeneration des Gewebes signifikant beschleunigen können.

5.3. AUSWIRKUNG EXTRAKORPORALER STOßWELLEN AUF REGENERATIONS- FAKTOREN

KAPITEL 6: FRAGESTELLUNG

6. FRAGESTELLUNG

6.1. Extrakorporale Stoßwellentherapie für die Regeneration der Skelettmuskulatur

6.1. EXTRAKORPORALE STOßWELLEN- THERAPIE FÜR DIE REGENERATION DER SKELETTMUSKULATUR

Ziel dieser Studie ist es die Auswirkungen von extrakorporalen Stoßwellen auf die Skelettmuskulatur zu untersuchen und ob die Ergebnisse Rückschlüsse auf eine verbesserte Regeneration der Skelettmuskulatur zulassen. Bei den vorgestellten Untersuchungen zeigte sich, dass die Sauerstoffversorgung im Gewebe von den Parametern Blutflussmenge (Calcagni et al, 2011), Erythrozytenverformbarkeit und Stickstoffmonoxid-(NO)-Verfügbarkeit (Suhr et al, 2012) und Grau et al, 2013) abhängt. Die Faktoren der Erythrozytenverformbarkeit wurden bereits in dem Kapitel 2.2 dargestellt. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass der Mechanismus der Mechanotransduktion diese Parameter signifikant beeinflussen kann (Frairia et al, 2012), in der Mittels einer Signaltransduktion über die extrazelluläre Matrix (ECM) und der Basalmembran (BM) das NO u.a. aus dem Endothel (eNOS) und den Erythrozyten (RBC-NOS) freigesetzt wird (Kleinbongard et al, 2006; Fischer et al, 2007; Ludolph et al, 2007; Suhr et al, 2009; Rieckeheer et al, 2011; Ladage et al, 2012; Suhr et al, 2012 und Wahl et al, 2012). Die Untersuchung der frühen Reaktion dieser zellulären und subzellulären Faktoren, auf den Mechanismus der Mechanotransduktion der ESWT, ihr zeitlicher Verlauf und deren Wechselwirkungen ist zentrales Anliegen dieser Studie. Die Mechanotransduktion stellt dabei den entscheidenden Faktor dar (Frairia et al, 2012), da besonders Muskelzellen sensitiv auf diesen Effekt reagieren (Tidball, 2002 und Hornberger et al, 2004). Die vielfältigen Wirkungen von Mechanotransduktion auf zellulärer und subzellulärer Ebene sind bereits in der Übersicht in Bloch et al (2012) ausführlich beschrieben. Da die Gewebeversorgung mit Sauerstoff bei der Regeneration der Skelettmuskulatur eine wesentliche Bedeutung darstellt (Goertz et al, 2012), stehen die Parameter Blutfluss, Erythrozytenverformbarkeit und NO-Verfügbarkeit in der Verbin-

dung mit der ESWT im Fokus der Studie. Neueste Erkenntnisse von Zissler et al (2017) konnten bereits in einer ähnlichen Studie nachweisen, dass extrakorporale Stoßwellen die Muskelregeneration signifikant beschleunigen kann. Dabei wurde in der Studie ebenfalls der M. quadriceps femoris untersucht. Der Unterschied zur vorliegenden Studie bestand allerdings darin, dass Zissler et al (2017) die Stoßwellenapplikation 4-7 Tage nach einer Muskelverletzung durchgeführt hatten. Damit Rückschlüsse der ESWT auf die mögliche Beeinflussung des Regenerationsprozesses in der Skelettmuskulatur abgeleitet werden können, werden Probanden ohne Muskelverletzung, auf die deren Auswirkungen auf abhängigen Parameter untersucht. Wenn die Sauerstoffversorgung und somit die Regeneration der Skelettmuskulatur durch den Einfluss der ESWT signifikant verbessert wird, müsste sich das einem erhöhten Blutfluss, einer erhöhten Erythrozytenverformbarkeit und einer erhöhten NO-Verfügbarkeit auch bei Probanden ohne Muskelverletzung nachweisen lassen.

6.2. Hypothesen

In diesem Zusammenhang werden für die Studie folgende Hypothesen generiert:

H1: Die extrakorporalen Stoßwellen führen zu einem signifikant erhöhten Blutfluss und somit zu einer signifikant erhöhten Sauerstoffversorgung in der Skelettmuskulatur.

H1.1: Die extrakorporalen Stoßwellen führen zu einer signifikant erhöhten Erythrozytenverformbarkeit.

H1.2: Die extrakorporalen Stoßwellen führen zu einer signifikant erhöhten NO-Verfügbarkeit

H0: Die extrakorporalen Stoßwellen haben keinen signifikanten Einfluss auf die untersuchten Parameter.

KAPITEL 7: METHODEN

7. METHODEN

Alle Untersuchungen, Messungen, Probennahmen und Auswertungen wurden an der Deutschen Sporthochschule an folgenden Instituten durchgeführt:

Ambulanz für Sporttraumatologie

Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin

- **Molekulare und zelluläre Sportmedizin**
- **Präventive und rehabilitative Sport- und Leistungsmedizin**

Institut für Trainingswissenschaft und Sportinformatik

7.1. Material

7.1.1. Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
BD Vacutainer NH (Heparin) BD Vacutainer NH (Serum) BD Vacutainer NH (EDTA)	BD Diagnostics Germany, Heidelberg
Deckgläser	Carl Roth, Karlsruhe
Pipetten (0,1µl – 100µl, 100µl – 500µl, 100µl – 1000µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pur-Zellin® Zellstofftupfer	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Polyvinylpyrrolidon-Lösung (PVP-Lösung)	Mechantronics Medical Center, University of Amsterdam, Niederlande
Sterican® Einmal-Injektions-Kanüle	Braun, Melsungen

7.1.2. Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
NO-Analyse CLD88e	EcoPhyisics, Schweiz
Kleinzentrifuge EBA20	Hettich LAB Technology, Stuttgart
Leica Mikroskop (DXC-1850P)	Sony (Deutschland)
Lorca, Version 2.1	RR Mechatronics, Niederlande
NIRS NIRO 200NX	Hamamatsu Photonics K.K. System Division, Japan
Stoßwellengerät PIEZOWAVE2	Richard Wolf GmbH, Knittlingen, Deutschland
Großzentrifuge Rotanta 460R	Hettich, Mühlheim
Blutanalyse Sysmex-KX N21	Sigma-Aldrich, Steinheim

7.2. Personenstichprobe

Es werden insgesamt 36 ($n = 36$) gesunde Männer im Alter 18 – 35 Jahre untersucht, die keine Verletzungen der Skelettmuskulatur, insbesondere des M. quadriceps femoris haben. Die Personenstichprobe ($n = 36$) verteilt sich auf die Pilotstudie ($n = 4$), die Hauptstudie ($n = 24$) und die In-vitro-Studie ($n = 8$). Um die akute Wirkung von körperlicher Aktivität auszuschließen, sollten die Probanden 24 Stunden vor den Untersuchungen keine sportliche Aktivität unternehmen.

7.3. Technologie der Durchführung

7.3.1. Das Stoßwellengerät

Für die Studien wurde das Stoßwellengerät, PIEZOWAVE², FBL10x5G2 von der Firma Richard Wolf GmbH, Knittlingen, Deutschland verwendet (Abb. 16).

Technische Daten:

- Stromversorgung 220-240 VAC / 50 – 60 Hz
- Frequenz 1 – 8 Hz
- Geräuschpegel 65 dB(A)
- Klassifikation 93/42 EWG Klasse IIb
- Energieflussdichte 0.018 – 0.702 mJ/mm²
- Intensitätsstufen 20 Stufen
- Eindringtiefe bis zu 20mm (fokuszentral)
- Eindringtiefe bis zu 30mm (5MPa Zone distal)

Mittels konkav gewölbter Träger werden die angeordneten Piezokeramikelemente durch einen Hochspannungsimpuls kurzzeitig, zeitgleich im Mikrometerbereich ausgedehnt und erzeugen somit einen Druckimpuls. Die Piezoelemente sind exakt zum Therapiefokus ausgerichtet. Die Piezo-Stoßwelle ermöglicht eine „Direct Focusing“ (schmerzarme) Technologie und kommt ohne zusätzlichen Reflektor aus. Dieses Modell ist kompakt, präzise und ermöglicht eine gut definierte Fokuszone. Des Weiteren gilt dieses Modell als schmerzarm in der Anwendung und erlaubt eine freie Intensitätsdosierung, nahezu ohne unerwünschten Einfluss auf die Fokusgröße.



Abbildung 16: Das Stoßwellengerät der Firma Richard WOLF GmbH, Knittlingen, Deutschland (2020)

7.3.2. LORCA

Der *Laser-Assisted-Optical-Rotational-Cell-Analyzer* (LORCA) von RR Mechatronics, Niederlande, ist ein auf Optik basierendes Instrument zur Bestimmung der Zellverformbarkeit roter Blutkörperchen (RBC) durch Ektazytometrie (Abb. 17). Dieses Verfahren gilt als standardisiert und ist aufgrund der vollständig computerkontrollierten Mess- und Auswertungsmethodik leicht bedienbar.

Technische Daten:

- Stromversorgung 220-240 VAC / 50 – 60 Hz
- 5 mW Laserdiode
- Scherrate von 0 – 3500 s⁻¹ (Pa)
- Temperaturkontrolle
- 20 µl Blut pro Messung



Abbildung 17: Laser-Assisted-Rotational-Cell-Analyser (LORCA) von RR Mechatronics, Niederlande (2003), eigene Darstellung

Bei der Messung wird die zu untersuchende Probe in einen Spalt zwischen einem rotierenden Zylinder (Cup) und einem statischen Zylinder (Bob) pipettiert (Abb. 18). Durch den Rotationsvorgang wird eine Scherkraft, die computergesteuert zwischen 0,3 und 50 Pa liegen kann, auf die in der Probe befindlichen Erythrozyten ausgeübt, die zu charakteristischen Verformungen der Erythrozyten führt. Im ruhenden Zustand haben die Erythrozyten eine runde, bikonkave

Form. Mit zunehmender Einwirkung der Scherkräfte, kommt es aber zunehmend zu einer elliptischen Verformung.

Oberhalb des Zylinders befindet sich ein Helium-Neon-Laser, der auf einen Spiegel gerichtet ist, welcher das Licht der ausgesendeten Laserstrahlen reflektiert, so dass diese die Erythrozyten in der Blutprobe durchdringen. Das Licht wird entsprechend der Form der Erythrozyten gebrochen, so dass sich ein spezifisches Diffraktionsmuster ergibt, welches auf einer Projektionsfläche erfasst und sichtbar gemacht wird. Eine an die Fläche angeschlossene Millimeter-Kalibrationsleiste erlaubt über die Messung der Länge der horizontalen und vertikalen Achse eines Erythrozyten die Bestimmung des Elongationsindex (EI) samt Standardabweichung als Maß für die Verformung der Erythrozyten. Hier gilt, dass bei gegebener Scherrate ein hoher Elongationsindex eine hohe Verformbarkeit abbildet.

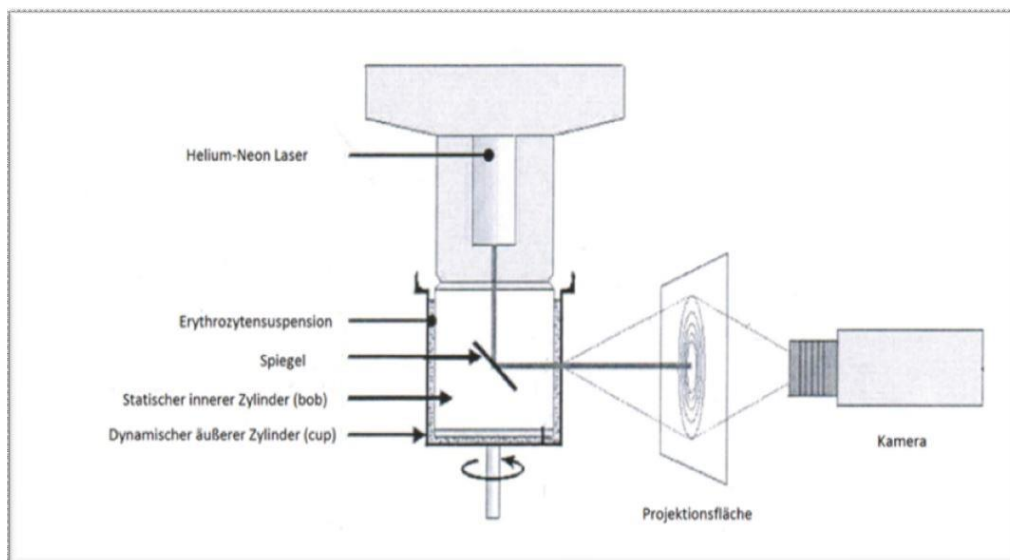


Abbildung 18: Schematische Abbildung des Verformbarkeits-Messprinzips nach Grau (2010)

Probenaufarbeitung und Messung

Für jede Blutprobe wurden 20 µl Heparin-Blut mit 5 ml einer Polyvinylpyrrolidone-Lösung (Viskosität 30 cP) (PVP-Lösung) gemischt. Die PVP-Lösung dient dazu, die Viskosität der Blutprobe unter Einwirkung der Scherkräfte konstant zu halten. Anschließend wurde nacheinander aus jeder Probe je 1000 µl luftblasenfrei zwischen den rotierenden Cup und den statischen Bob pipettiert und wieder abgesaugt. So wurde gewährleistet, dass kein Wasser und keine vorherige Probe die zu untersuchende Probe verunreinigte. Für die eigentliche Messung wurden anschließend erneut 1000 µl derselben Probe eingefüllt und das Messprogramm gestartet. Um die in-vivo-Bedingungen zu simulieren, erwärmte das Gerät zuerst die Lösung auf 37 °C. Nach jeder Messung wurde die Probe durch eine angeschlossene Pumpe abgesaugt und die Zylinder mit destilliertem Wasser (Aqua-Dest.) gereinigt.

Der Elongationsindex wurde dann bei neun verschiedenen Scherraten (0,3 Pa, 0,57 Pa, 1,08 Pa, 2,04 Pa, 3,87 Pa, 7,34 Pa, 13,92 Pa, 26,38 Pa und 50 Pa) gemessen, wobei die Scherraten stufenlos aufeinander folgten (vgl. Baskurt et al, 2009 und Baskurt et al, 2013). Hierbei wurden für jede Scherrate 50 Aufnahmen gemacht, aus denen das Computerprogramm dann über den horizontalen und vertikalen Radius des Diffraktionsmusters den Elongationsindex (EI) mit folgender Formel berechnet hat (Abb. 19):

$$EI = \frac{a-b}{a+b}$$

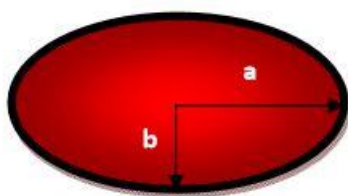


Abbildung 19: Bestimmung des Elongationsindex a) lange Achse, b) kurze Achse (Hardemann, 2001)

Während der Elongationsindex bei kreisförmigen Erythrozyten bei $EI = 0$ liegt, kann unter Einwirkung der Scherkraft mit elliptischer Verformung ein Maximalwert von $EI = 1$ erreicht werden. In Abhängigkeit von der Scherkraft können die Elongationsindizes als Verformbarkeitskurve dargestellt werden (Abb. 20).

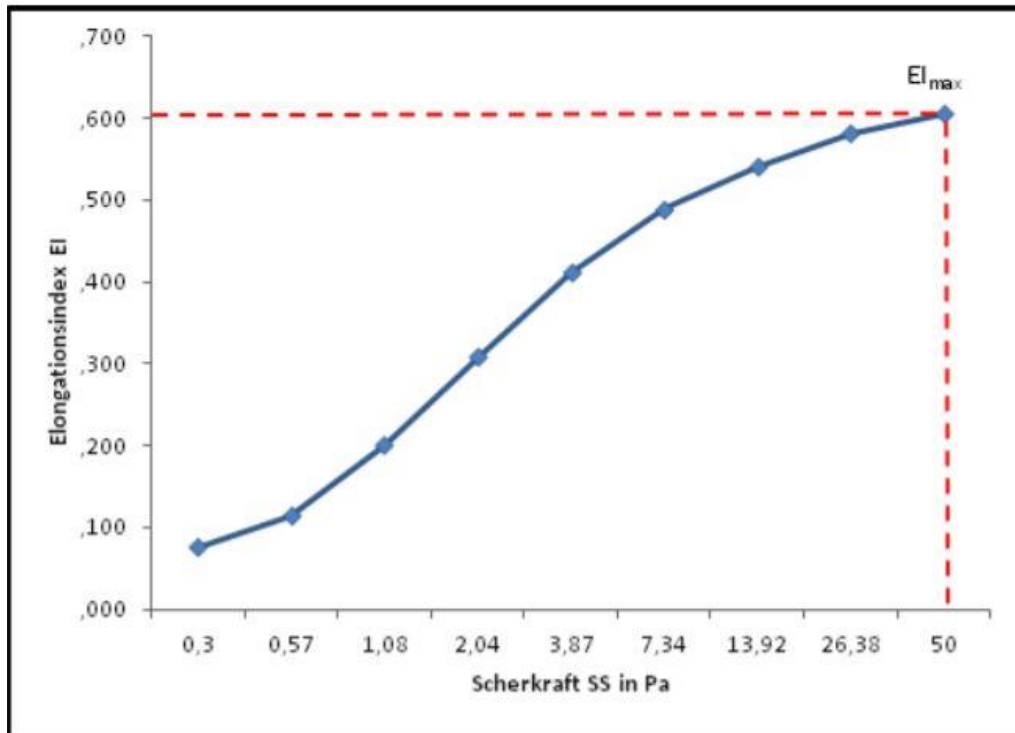


Abbildung 20: Darstellung des Elongationsindex nach Hardemann (2001). Schematische Darstellung der Erythrozytenverformbarkeit in Abhängigkeit von der Scherkraft. Der EI_{max} wird bei 50 Pa ermittelt.

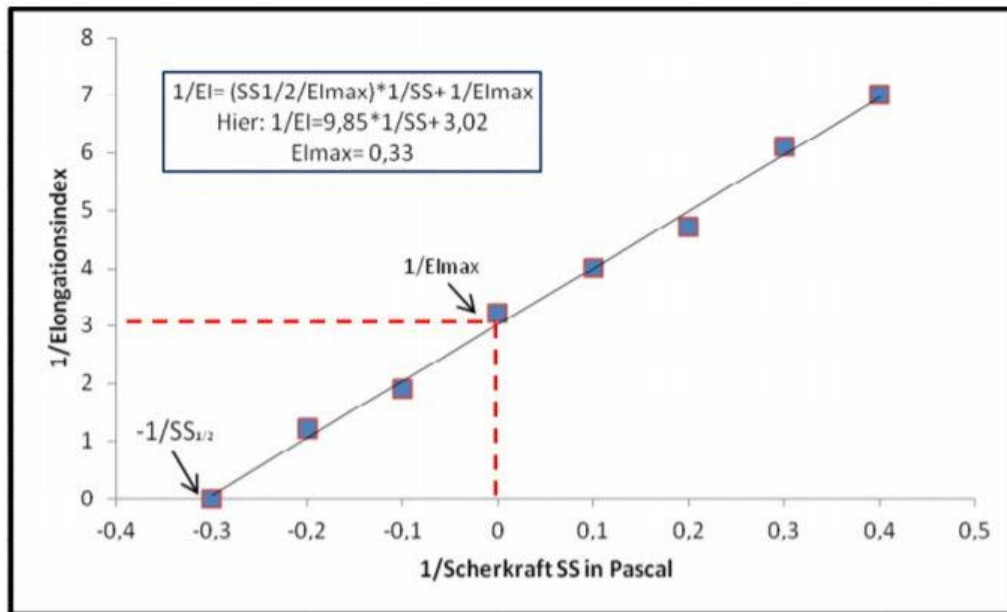


Abbildung 21: Lineweaver-Burk-Diagramm. Die doppelt reziproke Darstellung erlaubt die Berechnung einer Regressionsgeraden. Dabei ist $SS_{1/2}/E_{\text{Imax}}$ die Steigung der Geraden. $1/E_{\text{Imax}}$ bildet den Schnittpunkt mit der Ordinate ab, während $-1/SS_{1/2}$ die Abszisse schneidet (nach Baskurt & Meiselman, 2013)

$SS_{1/2}/E_{\text{Imax}}$ Ratio (Formel):

$$1/EI = (SS_{1/2}/E_{\text{Imax}}) \times 1/SS + 1/E_{\text{Imax}}$$

Es gilt: je geringer der Druck (Pa), desto höher die Verformbarkeit

Zur Berechnung der maximalen Verformbarkeit wurde die von Baskurt und Meiselman (2013) doppeltreziproke Darstellung nach Lineweaver-Burke angewandt. Dabei werden die Kehrwerte der ermittelten Elongationsindizes als Funktion der Kehrwerte der Scherkräfte aufgetragen. Im Anschluss wurden aus der Regressionsgeraden die Steigung sowie der Schnittpunkt mit der y-Achse zur Berechnung der maximalen Verformbarkeit (E_{Imax}) herangezogen. Dabei ist $E_{\text{Imax}} = 1/\text{Schnittpunkt y-Achse}$ (Abb. 21).

7.3.3. Nahinfrarotspektroskopie (NIRS)

Um die eng mit der Sauerstoffversorgung des Gewebes verbundene Blutversorgung genauer zu bestimmen, ist die Messung des Blutflusses in den zuführenden arteriellen Gefäßen der Skelettmuskulatur von Bedeutung. Mittels Nahinfrarotspektroskop kann der kontinuierliche Blutfluss in einer bestimmten Region des Körpers, wie der Skelettmuskulatur und in der Haut, in Ruheposition gemessen werden (Rådegran et al, 1999 und Sowa et al, 2016).

Für die vorliegende Studie wurde das *Nahinfrarotspektroskop* (NIRS) NIRO-200NX der Firma Hamamatsu Photonics K.K., System Division, Japan, verwendet (Abb. 22 & Abb. 23). Mittels dieses Instruments ist es möglich den Sauerstoffgehalt im Gewebe in Echtzeit zu messen. Darüber hinaus können weitere Parameter bestimmt werden: „*Tissue Oxygenation Index*“ (TOI), zur Bestimmung der totalen Oxygenierung, den normalen „*Tissue Haemoglobin Index*“ (nTHI), zur Bestimmung der prozentualen Veränderung des basalen Hämoglobins sowie die Veränderungen der Konzentration des oxygenierten Hämoglobins „*concentration of oxygenated haemoglobin*“ ($\Delta\text{O}_2\text{Hb}$), des desoxygenierten Hämoglobins „*desoxygenated haemoglobin*“

(ΔHHb) und des totalen Hämoglobins „*total haemoglobin*“ (ΔcHb). Die Messzeit betrug 30 Minuten (pre und post).



Abbildung 22: NIRO 200NX der Firma Hamamatsu Photonics K.K. System Division, Japan (2020)

7. METHODEN

Measurement items	Tissue oxygenation index, TOI (%) Normalized tissue hemoglobin index, nTHI (absolute value in arbitrary unit) Oxygenated hemoglobin change, $\Delta\text{O}_2\text{Hb}$ ($\mu\text{mol/L}$) Deoxygenated hemoglobin change, ΔHHb ($\mu\text{mol/L}$) Total hemoglobin change, ΔcHb ($\mu\text{mol/L}$)
Sample interval	0.05 s, 0.2 s, 0.5 s, 1 s, 2 s, 5 s, 10 s, 20 s, 30 s
Light source	LED (735 nm, 810 nm, 850 nm: nominal values)
Output power	Less than 2 mW
Light detector	Photodiode
Measurement method	SRS method (Spatially Resolved Spectroscopy) and MBL method (Modified Beer-Lambert)
Data memory	Internal backup memory for more than 10 data files. (Maximum number of data samples for each file is 50 000.)
Saving data to a USB device	Measured data can be saved to an external USB memory device using the USB connector.
Output signal	Digital output (RS-232C) / Analog output / Philips Vuelink format
Measurement probes	Approx. 2.5 m cable length (for emission and detection probes)
Battery	Operating time of about 30 min. (fully charged)
External Event Input	TTL, "L" with a duration longer than 100 ms
Display Unit	Size: approx. 264 mm(W) \times 279 mm(H) \times 190 mm(D) Weight: approx. 6.0 kg
AMP Unit	Size: 91 mm(W) \times 55 mm(H) \times 156 mm(D) Weight: approx. 0.7 kg Cable length: approx. 4 m
Power consumption	Less than 90 VA

7.3. TECHNOLOGIE DER DURCHFÜHRUNG

Abbildung 23: Technische Daten der Firma Hamamatsu Photonics K.K. System Division, Japan (2020)

Zur Bestimmung der Parameter wurden die Optoden mit einem Emitter-Detektor-Abstand von mehr als 2,5 cm mittig auf dem M. Quadriceps Femoris fixiert (Abb. 24). Der unterschiedliche Abstand erzeugt dadurch zwei Emitter-Fenster, mit unterschiedlichem Abstand zum Detektorfenster sowie Lichtwege mit unterschiedlicher Eindringtiefe. Das absorbierte Licht, das weniger tief in



Abbildung 24: Platzierung der Optoden (eigene Darstellung)

das Gewebe und den M. Quadriceps Femoris vordringt, kann bei der Ermittlung der Absorption von dem tiefer in das Gewebe und den M. Quadriceps Femoris eingedrungene Licht, berücksichtigt werden (Abb. 25). Die Veränderungen können somit direkt per NIRS erfasst werden, da das totale Hämoglobin (tHb), als Summe von oxygeniertem (O_2Hb) und reduziertem (HHb) Hämoglobin, sich direkt proportional dazu verändert. Eine absolute Quantifizierung ist möglich, wenn man die Reaktion der Konzentration von O_2Hb ($[\text{O}_2\text{Hb}]$) und HHb ($[\text{HHb}]$) bei geringen Veränderungen der arteriellen Sauerstoffsättigung beobachtet (Wyatt et al, 1990).

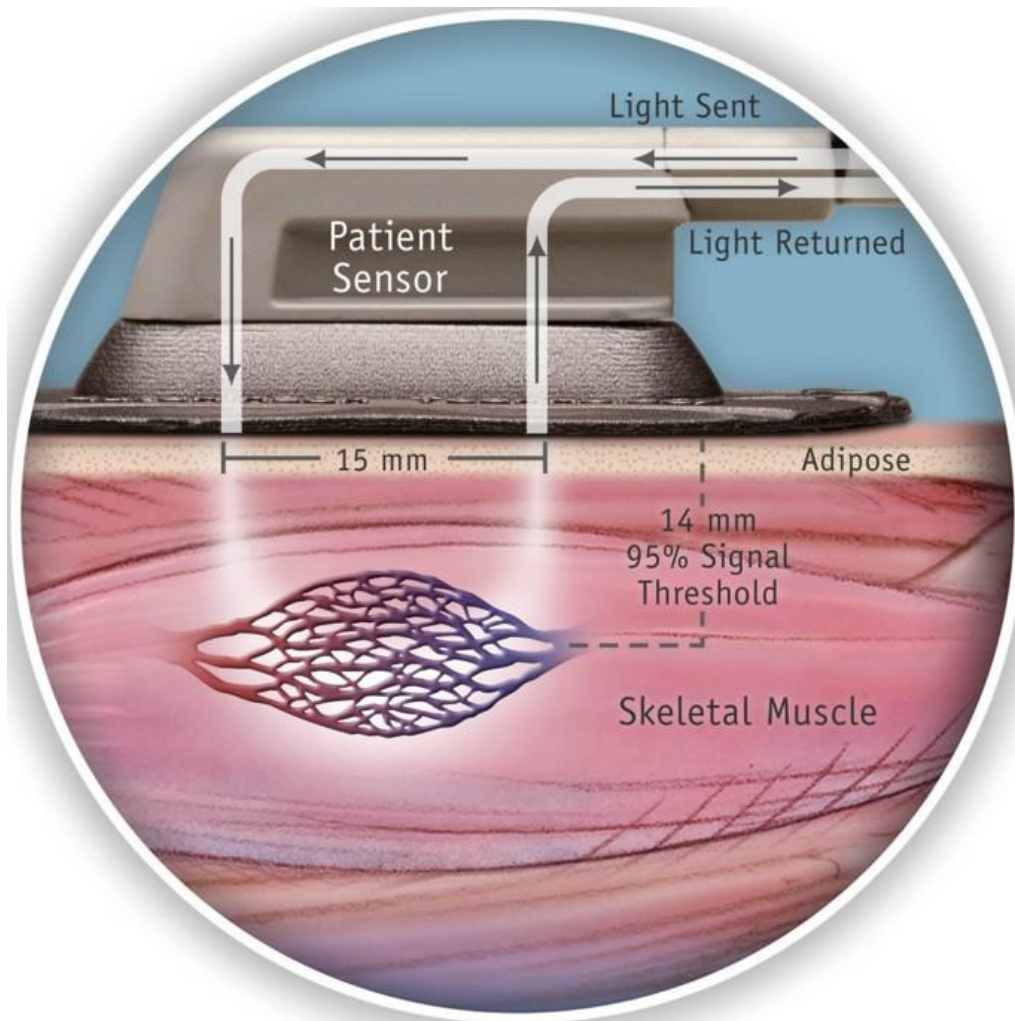


Abbildung 25: Darstellung der NIRS-Messungen (nach Myers et al, 2005)

Aufgrund der Bedeutung einer ausreichenden Blut- und Sauerstoffversorgung für den Regenerationsprozess in der Muskulatur, kann NIRS wichtige Informationen über die Muskelversorgung während des Heilungs- bzw. Regenerationsprozess des Gewebes liefern. NIRS wird seit einigen Jahrzehnten verwendet, um die Sauerstoffversorgung im Gewebe zu bestimmen. Die technische Verbesserung der NIRS-Analysetechnik erlaubt es mittlerweile auch tiefere Gewebe (Muskelschichten) zu messen. Dies wurde in einer Studie zum Effekt von hyperämisierenden Salben gezeigt (Warnecke et al, 2011). Bisher gibt es jedoch keine Untersuchungen die NIRS nach Stoßwellenbehandlung angewendet haben, weder unter Kontroll- (z.B. bei gesunden Menschen) noch unter pathologischen Bedingungen (z.B. nach Verletzungen der Skelettmuskulatur). Deswegen ist die kombinierte Anwendung dieser Methode besonders wichtig, um

grundlegende Erkenntnisse über die Wirkung der Stoßwellenbehandlung auf die Regenerationsprozesse der Muskulatur zu erhalten.

7.3.4. Chemiluminiszenzverfahren (CLD)

Die Bestimmung der Stickstoffkonzentration (NO) im Blut erfolgte durch den Chemiluminiszenz-Detektor CLD 88e von der Firma EcoPhysics, Schweiz (Abb. 26 & Abb. 27).



Abbildung 26: Chemiluminiszenzdetektor (CLD 88e) der Firma EcoPhysics, Schweiz (2020)

Measuring ranges	four freely selectable ranges from 5–5000 ppb	Analog output	4–20 mA into 500 Ω max.; 0–1 V; 0–10 V
Min. detectable concentration	0.05 ppb*	Dimensions	height: 133 mm (5¼") width: 450 mm (19") with moulding: 495 mm depth: 545 mm
Noise at zero point (1 σ)	0.025 ppb*	Weight	24 kg
Lagtime	<1 sec	Delivery includes	CLD 88 p analyzer, power cable, analog signal cable, manual
Rise time (0–90%)	<30 sec	Standard	CLD 88 Y p pre-chamber PLC 860 photolytic converter
Temperature range	5–40 °C		
Humidity tolerance	5–95% rel. h (non-condensing, ambient air and sample gas)	* depending on filter setting	
Sample flow rate	0.3 l/min		
Input pressure	ambient		
Dry air use for O ₂ generator	internally generated (no external supply gas required)		
Power required	400 VA (incl. membrane pump and ozone scrubber)		
Supply voltage	100–230 V/50–60 Hz		
Interface	RS 232		

Abbildung 27: Technische Daten (CLD 88e), EcoPhysics, Schweiz (2020)

Das CLD 88e ist ein Gasphasen-Chemilumineszenz-Detektor (CLD), welcher NO in flüssigen und gasförmigen Proben bestimmen kann. Diese Methode gilt als Maß der höchsten Sensitivität (Cox, 1980) und Spezifität (HAMPL et al, 1996) für NO. Da NO aufgrund der hohen Reaktivität nicht direkt gemessen werden kann, wird daher Nitrit als valider Marker herangezogen. Durch die Entwicklung einer geeigneten Reaktionslösung sowie die Schaffung von geeigneten Reaktionsbedingungen, kann aus Nitrit und Nitrosothiolen NO stöchiometrisch freigesetzt werden. Durch die Reaktion von NO mit Ozon werden Lichtquanten in stöchiometrischen Mengen freigesetzt. Die Methode beruht auf einer Messung dieser Lichtquanten durch die Chemilumineszenzdetektions-Anlage.

Probenaufarbeitung und Messung

Für die Messung wurden die Proben gemäß der Vorgaben nach Pelletier et al (2006) und Hendgen-Cotta et al (2008) vorbereitet. Nach der Entnahme wurde das Blut zentrifugiert. Das Plasma wurde in Eppis überführt und direkt bei -80 °C gelagert (bis zur Messung). Die RBC-Proben wurden 1:5 in eine Nitrit-Stabilisierungslösung überführt, gemischt und dann ebenfalls bis zur Messung bei -80 °C gelagert. Die Plasma-Nitrit Proben wurden auf Eis aufgetaut und unmittelbar gemessen. Für die RBC-Nitrit Messung wurden die Proben mit kaltem Methanol (4 °C) in einem Verhältnis von 1:2 gemischt und anschließend bei 21.000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde für die RBC-Nitrit Messung verwendet. Das Nitrit jeder Probe aus RBC und Plasma wurde anschließend gemessen. Die flüssige $100\text{ }\mu\text{l}$ Probe wurde je 3-fach mittels einer gasdichten Glasspritze durch eine Kunststoffmembran in die Reaktionskammer injiziert (Abb. 28). Diese enthält eine iodhaltige, reduktive Reaktionslösung zur Freisetzung von NO aus Nitrit und Nitrosothiolen. Da NO durch den hohen Löslichkeitskoeffizienten (~ 20) von einem flüssigen in einen gasförmigen Zustand übergeht, wurde die Probe bei einem konstanten Systemdruck ($\sim 0\text{ bar}$) mittels des Inertgases Helium durchströmt. Das Helium diente

dazu den Übergang von NO in den gasförmigen Zustand zu erleichtern und eine direkte Reaktion mit Sauerstoff zu verhindern (Aoki, 1990). Zum Schutz der Anlage durchströmt der Gasstrom ein 4 °C kaltes Wasserbad sowie eine 1-molare Natriumhydroxidlösung (NaOH). Die „Säurefalle“ wird auch als NaOH-Falle bezeichnet. Im Anschluss erreicht das Gas die Reaktionskammer des NO-Analysators, wo auch die Messung des NO mittels Photoreaktion stattfindet (Fontijn et al, 1970; Aicher et al, 1993 und Hampl et al, 1996). Zur Kalibrierung wurde eine wässrige Lösung nach Kelm et al, (1990) verwendet, mit der jede Probe berechnet werden konnte. Bei der Analyse jeder Probe wurden diese Werte mit der Nitrit-Konzentration der wässrigen Lösung verrechnet. Die Auswertung erfolgte mittels eDAQ Chart Software (EcoPhysics, Schweiz).

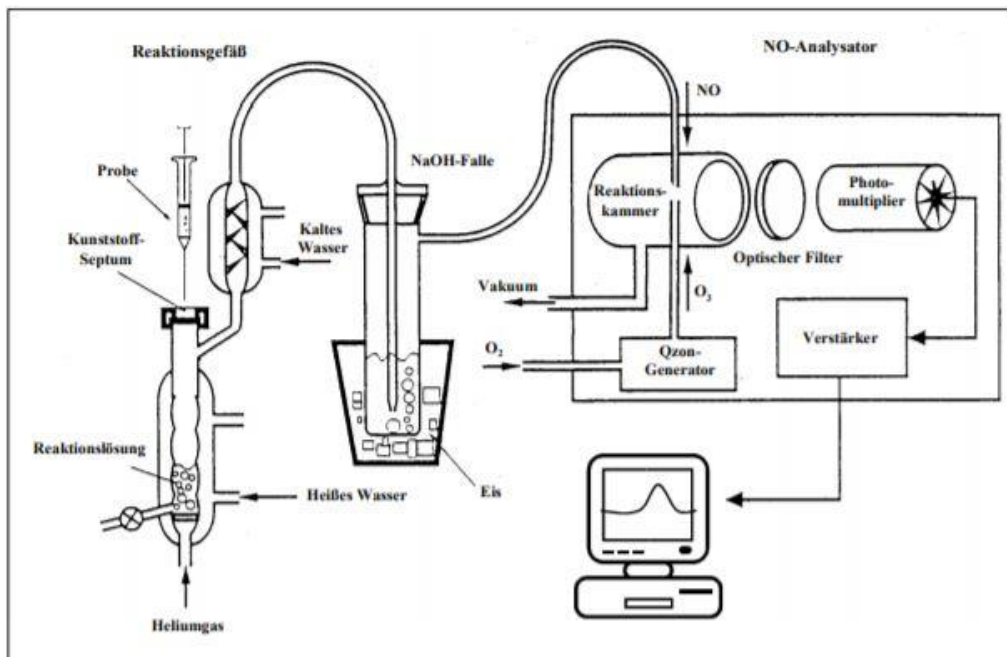


Abbildung 28: Aufbau der Gasphasen-Chemilumineszenz-Anlage. Die zu untersuchende Probe wird in ein Reaktionsgefäß injiziert. Durch die reduktive I³-Lösung tritt NO in die Gasphase über und gelangt mit dem Heliumgasfluss in die Reaktionskammer des NO-Analysators. Die Datenaufnahme erfolgt mit dem angeschlossenen Rechner.

7.4. Statistische Auswertung

7.4. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Rohdaten bzw. errechneten Daten jeder Messung wurden von der Software automatisch gespeichert und in eine Tabelle (Excel 2003) übertragen. Die statistische Auswertung geschah mit Hilfe des Programms SPSS. Zur Ermittlung der Mediane in den Konzentrationen wurden die ermittelten Daten mittels Box-Whisker-Plot-Verfahren (Min-Q1-Med-Q3-Max) in eine Ordinalskala überführt. Von allen Daten wurde der Mittelwert \pm Standardfehler (M+SD) angegeben. Die aufgeführten Messgrößen wurden mittels Varianzanalysen (ANOVA) geprüft. Eine Fehlerwahrscheinlichkeit von 1% ($p < 0,01$) wurde mit zwei ** und eine Fehlerwahrscheinlichkeit von 0,1% ($p < 0,001$) mit drei *** gekennzeichnet. Zusätzlich wurden Effektstärken (ES_{Post}) mittels Cohen's d bestimmt, um die praktische Relevanz der statistisch signifikanten Ergebnisse zu verdeutlichen. Die Darstellung der Diagramme und Tabellen erfolgte in Excel 2007.

KAPITEL 8: PILOTSTUDIE

8. PILOTSTUDIE

8.1. Personenstichprobe

An der Pilotstudie nahmen vier ($n = 4$) gesunde, männliche, unverletzte Probanden ($MW \pm SD$) Alter: 26.6 ± 4.0 Jahre, Gewicht: 79.3 ± 8.4 kg, Größe: 179.3 ± 4.7 cm teil. Der Studie wurde von der Ethikkommission der Deutschen Sporthochschule Köln mit Datum vom [20.02.2014] zugestimmt. Alle Probanden wurden über den Verlauf der Studie und mögliche Risiken aufgeklärt und gaben zu der Studie ihr schriftliches Einverständnis.

8.2. Untersuchungsablauf

Jeder Proband wurde darüber aufgeklärt 24 Stunden vor der Studie keine körperlichen Anstrengungen zu tätigen. An dem Studientag selbst mussten die Probanden 20 Minuten vor der Messung in Rückenlage verbringen und durften sich während der Messung selbst nicht bewegen. Die Optoden zur NIRS Messung wurden mit einem Emitter-Detektor-Abstand von mehr als 2,5 cm mittig auf dem M. Quadriceps Femoris (Area III) fixiert (Abb. 29).

Die Stoßwellenapplikation erfolgte mit einer Gesamtmenge von 10.000 Stoßwellen auf dem M. Quadrizeps Femoris. Während der gesamten Untersuchungen und Applikation befanden sich die Probanden in Rückenlage.

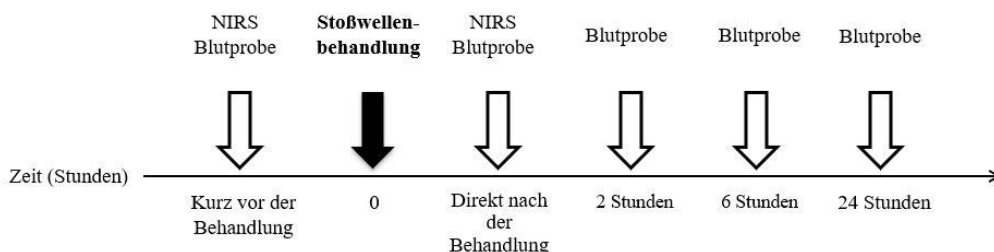


Abbildung 29: Darstellung des Untersuchungsablaufs der Pilotstudie

Die Stoßwellen wurden mit einem 5 MPa-Fokus (50 Bar) und einer Intensität von 0.702 mJ/mm^2 bei 8Hz appliziert. Insgesamt wurden 10.000 Stoßwellen auf fünf Areale mit einer Größe von $5 \times 5 \text{ cm}$ verteilt. Im Detail wurden 2.000 Stoßwellen auf jeweils zwei Areale und abschließend 2.000 Stoßwellen über alle Areale verteilt: I-II, II-III, III-IV and IV-V (Abb. 30). Die Applikationszeit betrug 25 Minuten.



Abbildung 30: Originalfoto der Applikation der Stoßwellen mit den Arealen I-V (eigene Darstellung).

Die NIRS-Messungen wurden im Kapitel 7.3.3 beschrieben. Die Messdauer betrug jeweils 30 Minuten vor und unmittelbar nach der Stoßwellenapplikation (Pre and 0h). Dabei wurden der *Total Saturation Index* (TSI%) als NIRS-Parameter bestimmt.

Für die Messung des Plasma-Nitrit, RBC-Nitrit und der RBC-Verformbarkeit wurde venöses Blut an den Messzeitpunkten Pre, 0h, 2h, 6h and 24h in Heparin-Vacutainer entnommen und wie in Kapitel 7.3.2 beschrieben entsprechend aufgearbeitet.

8.3. Ergebnisse

8.3.1. Ergebnisse NIRS-Messung

Die Ergebnisse der NIRS-Messung zeigen unmittelbar nach der Stoßwellenapplikation einen höheren Post-Wert (Abb. 31). Allerdings ist die Änderung nicht signifikant.

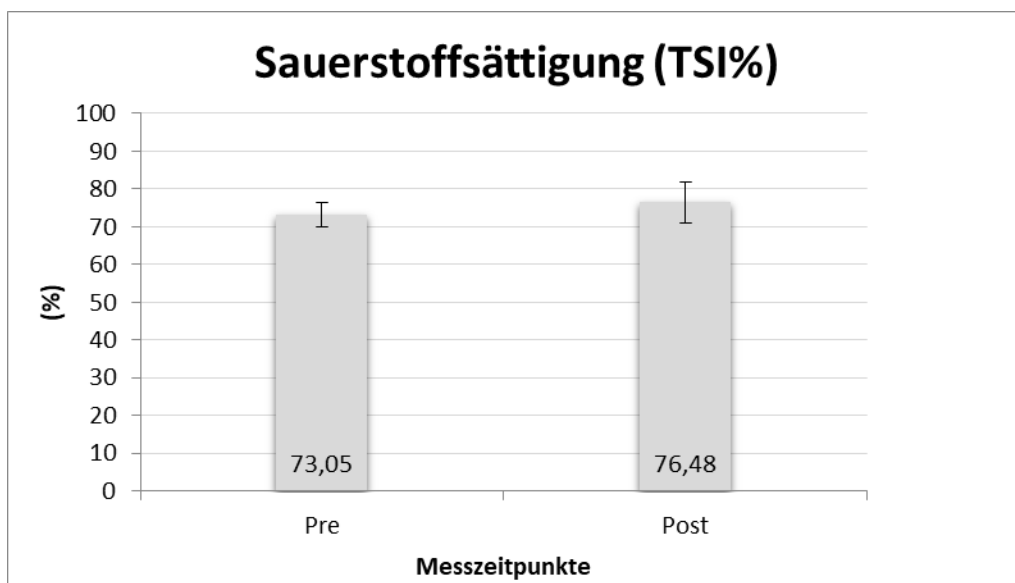


Abbildung 31: Ergebnisse der Messung der Sauerstoffsättigung (TSI%) vor und nach der Stoßwellenapplikation

8.3.2. Ergebnisse der Erythrozytenverformbarkeit (RBC-Verformbarkeit)

Die Ergebnisse zeigen, dass sich der EImax (maximale Verformbarkeit) von Pre zu 2h signifikant ($p = .002$) vermindert und nach 24h wieder ansteigt (Abb. 32).

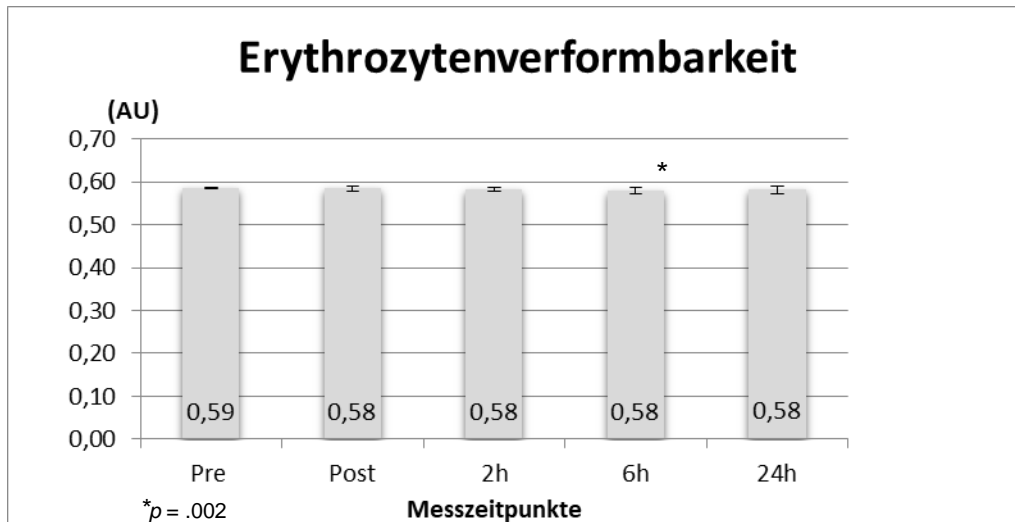


Abbildung 32: Ergebnisse der EImax (maximale Verformbarkeit) Berechnung vor und nach der Stoßwellenapplikation gemessen in AU = willkürliche Einheit

Die Ergebnisse SS1/2 (Abb. 33) zeigen zunächst eine Verminderung der Verformbarkeit während der Intervention mit Maximalwerten bei 2h. Bei 6h entspricht der Wert wieder dem Ausgangswert Pre. Bei 24h nimmt die Verformbarkeit gegenüber dem Pre-Wert nicht signifikant zu. In Anlehnung dazu steigt der SS1/2/EImax Ratio von Pre zu 2h an und fällt bei 6h und 24h unter das Ausgangsniveau Pre wieder ab (Abb. 34).

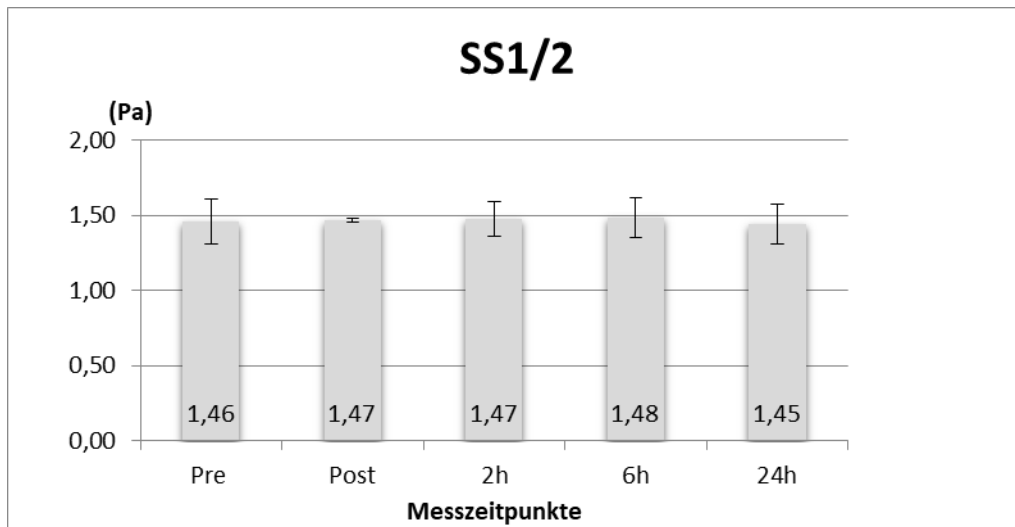


Abbildung 33: Ergebnisse der SS1/2 (Scherstress bei ½ Maximum) vor und nach der Stoßwellenapplikation, gemessen in Pascal

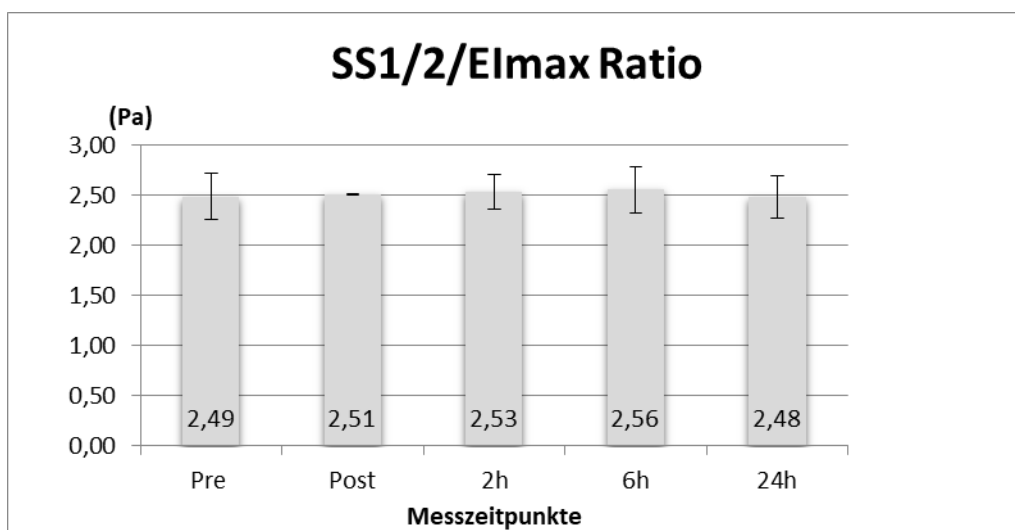


Abbildung 34: Ergebnisse der Berechnung des SS1/2/EImax Ratio vor und nach der Stoßwellenapplikation.

8.3.3. Ergebnisse der NO-Messungen

Die Ergebnisse der NO-Messungen zeigen eine signifikante Verringerung des RBC-Nitrits bei 2h ($p = .010$) und einer Rückkehr zum Ausgangsniveau (Pre) nach 24h (Abb. 35). Das Plasma-Nitrit zeigte keine Veränderung durch die Intervention (Abb. 36).

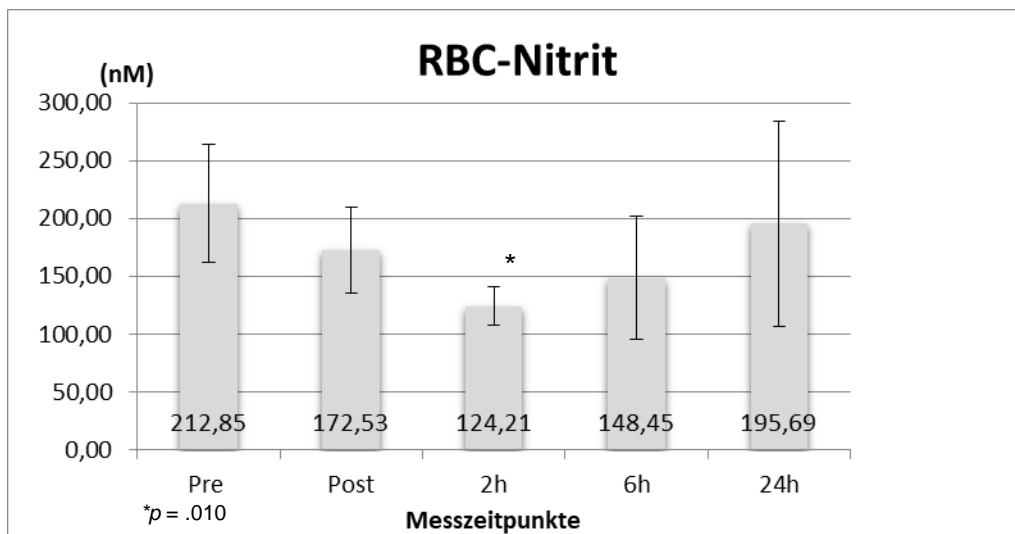


Abbildung 35: Ergebnisse des RBC-Nitrits vor und nach der Stoßwellenapplikation

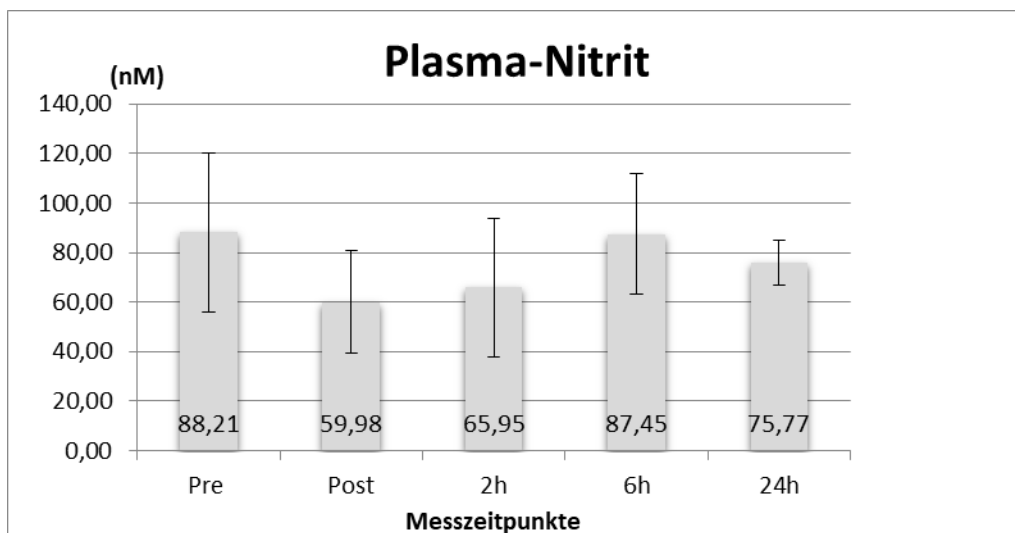


Abbildung 36: Ergebnisse des Plasma-Nitrit vor und nach der Stoßwellenapplikation.

KAPITEL 6: HAUPTSTUDIE

9. HAUPTSTUDIE

9.2. UNTERSUCHUNGS- ABLAUF

Um die Effekte und Einflüsse der Stoßwellen auf die Sauerstoffversorgung, Erythrozytenverformbarkeit (Verformbarkeit) und der Stickstoffproduktion (NO-Produktion) detaillierter erfassen zu können, wurde für die Hauptstudie sowohl eine Versuchs-, als auch eine Kontrollgruppe festgelegt.

9.1. Personenstichprobe

An der Hauptstudie nahmen in der Versuchsgruppe 24 ($n = 24$) gesunde, männliche, unverletzte Probanden teil. Die Hauptstudie wurde in eine Versuchsgruppe mit 13 ($n = 13$) Probanden (MW \pm SD) Alter: 26 ± 4.0 Jahre, Gewicht: 78.9 ± 8.6 kg, Größe: 179.6 ± 5.8 cm und in eine Kontrollgruppe mit 11 ($n = 11$) Probanden (MW \pm SD) Alter: 25.4 ± 2.8 Jahre, Gewicht: 79.1 ± 9.0 kg, Größe: 182.2 ± 6.2 cm unterteilt. Der Studie wurde von der Ethikkommission der Deutschen Sporthochschule Köln mit Datum vom [20.02.2014] zugestimmt. Alle Probanden wurden über den Verlauf der Studie und mögliche Risiken aufgeklärt und gaben zu der Studie ihr schriftliches Einverständnis.

9.2. Untersuchungsablauf

Genau wie bei der Pilot-Studie wurde jeder Proband darüber aufgeklärt 24 Stunden vor der Studie keine körperlichen Anstrengungen zu tätigen. An dem Studientag selbst mussten die Probanden dieses Mal 30 Minuten vor der Messung in Rückenlage verbringen und durften sich während der Messung selbst nicht bewegen. Das Anbringen der Optoden sowie die NIRS Messung erfolgte entsprechend der Pilotstudie mit einen Emitter-Detektor-Abstand von mehr als 2,5 cm mittig auf dem M. Quadriceps Femoris (Abb. 24).

Die Stoßwellenapplikation erfolgte bei der Versuchsgruppe mit einer Gesamtmenge von 10.000 Stoßwellen auf dem M. Quadrizeps Femoris. Während der gesamten Untersuchungen und Applikation befanden sich die Probanden in Rückenlage. Die Kontrollgruppe erhielt hingegen keine Stoßwellenapplikation. Der zeitliche Ablauf war mit dem der Pilotstudie identisch (Abb. 29).

Die Stoßwellen wurden mit einem 5 MPa-Fokus (50 Bar) und einer Intensität von 0.702 mJ/mm² bei 8Hz appliziert. Insgesamt wurden 10.000 Stoßwellen auf fünf Areale mit einer Größe von 5x5 cm verteilt. Im Detail wurden 2.000 Stoßwellen auf jeweils zwei Areale und abschließend 2.000 Stoßwellen über alle Areale verteilt: I-II, II-III, III-IV and IV-V (Abb. 30). Die Applikationszeit betrug 25 Minuten.

Die NIRS-Messungen wurden im Kapitel 7.3.3 beschrieben. Die Messdauer betrug jeweils 30 Minuten vor und unmittelbar nach der Stoßwellenapplikation (Versuchsgruppe). Bei der Kontrollgruppe erfolgte die Messung in zeitlicher Anlehnung (Pre und 0h). Dabei wurden der *Tissue Oxygenation Index* (TOI) (vormals: *Total Saturation Index* (TSI%)), zur Bestimmung der totalen Oxygenierung, der normale *Tissue Haemoglobin Index* (nTHI), zur Bestimmung der prozentualen Veränderung des basalen Hämoglobins sowie die Veränderungen der Konzentration des oxygenierten Hämoglobins *concentration of oxygenated haemoglobin* ($\Delta\text{O}_2\text{Hb}$) und des desoxygenierten Hämoglobins *desoxygenated haemoglobin* (ΔHHb) als NIRS-Parameter bestimmt.

Für die Messung des Plasma-Nitrit, RBC-Nitrit und der Erythrozytenverformbarkeit wurde bei beiden Gruppen venöses Blut an den Messzeitpunkten Pre, 0h, 2h, 6h und 24h in Heparin-Vakutainer entnommen und wie in Kapitel 7.3.2 beschrieben entsprechend aufgearbeitet.

9.3. Ergebnisse

9.3.1. Ergebnisse NIRS-Messung

Um einen detaillierten Überblick der NIRS-Messungen zu bekommen, wurden die Messzeitpunkte Pre, Post 0', Post 10', Post 20' und Post 30' festgehalten. Mittels dieser Differenzierung kann der Einfluss der Stoßwellenapplikation auf die Parameter leichter erkannt und die Unterschiede zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe dargestellt werden.

Die Ergebnisse der NIRS-Messung zeigen, dass unmittelbar nach der Stoßwellenapplikation keine signifikanten Unterschiede festzustellen waren. Die Werte des *Tissue Oxygenation Index* (TOI), des *Tissue Haemoglobin Index* (nTHI), des *concentration of oxygenated haemoglobin* ($\Delta\text{O}_2\text{Hb}$) und des *desoxygenated haemoglobin* (ΔHHb) blieben sogar, gegenüber der Kontrollgruppe, bis zu der dritten Kommastelle unverändert. Für eine optimale Darstellung wurden die Abbildungen der Versuchsgruppe und Kontrollgruppe gegenübergestellt.

Versuchsgruppe

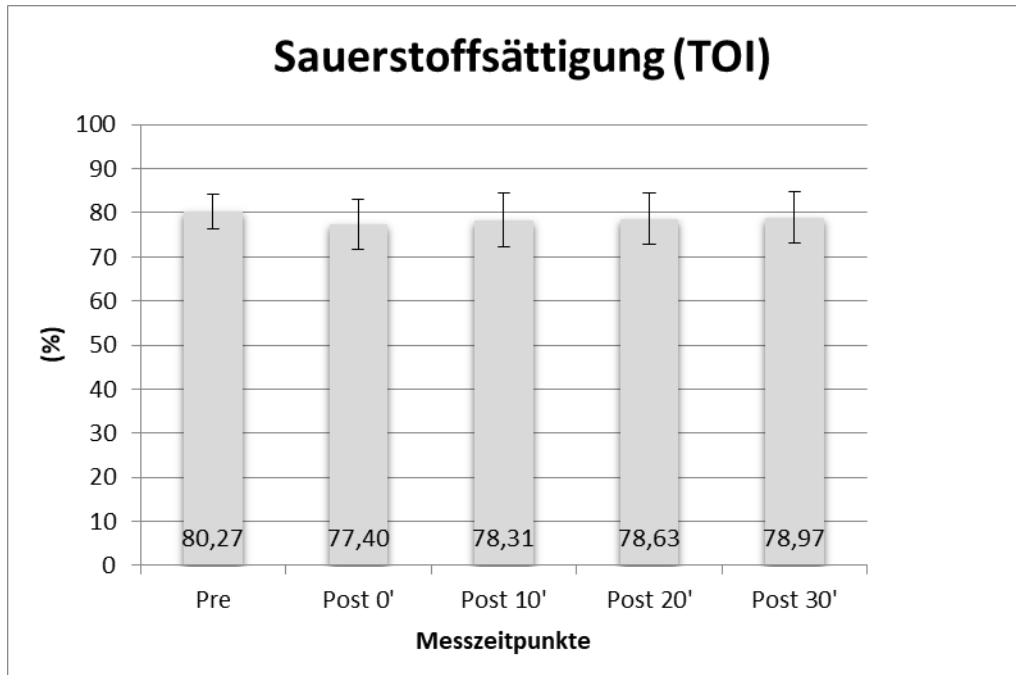


Abbildung 37: Ergebnisse der Messung der Sauerstoffsättigung vor und nach der Stoßwellenapplikation (Versuchsgruppe)

Kontrollgruppe

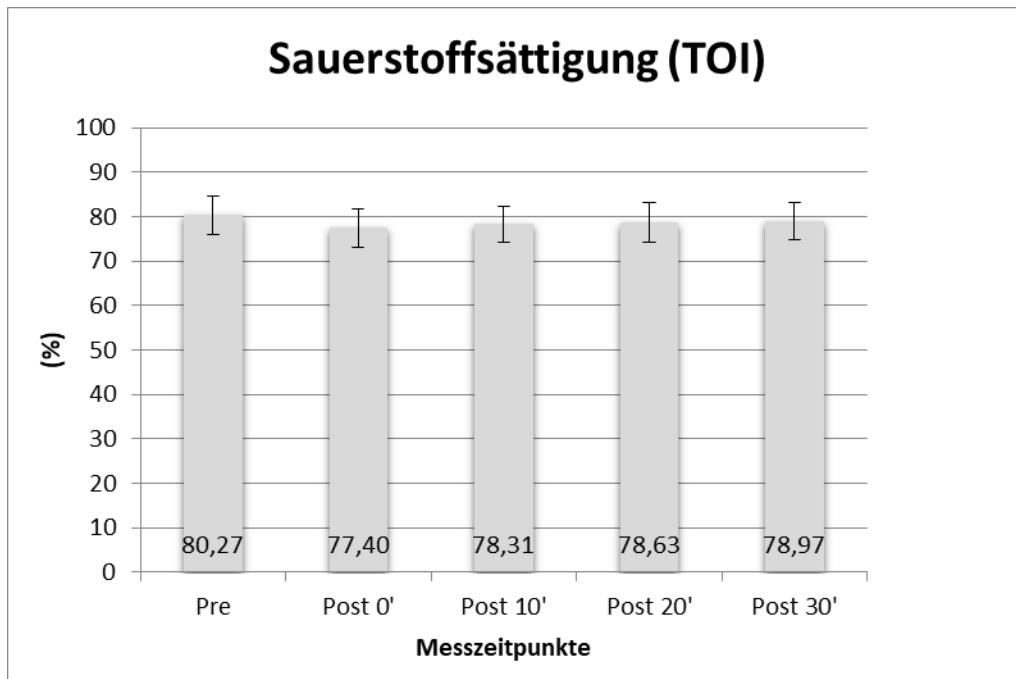


Abbildung 38: Ergebnisse der Messung des Sauerstoffsättigung ohne Stoßwellenapplikation (Kontrollgruppe)

Versuchsgruppe

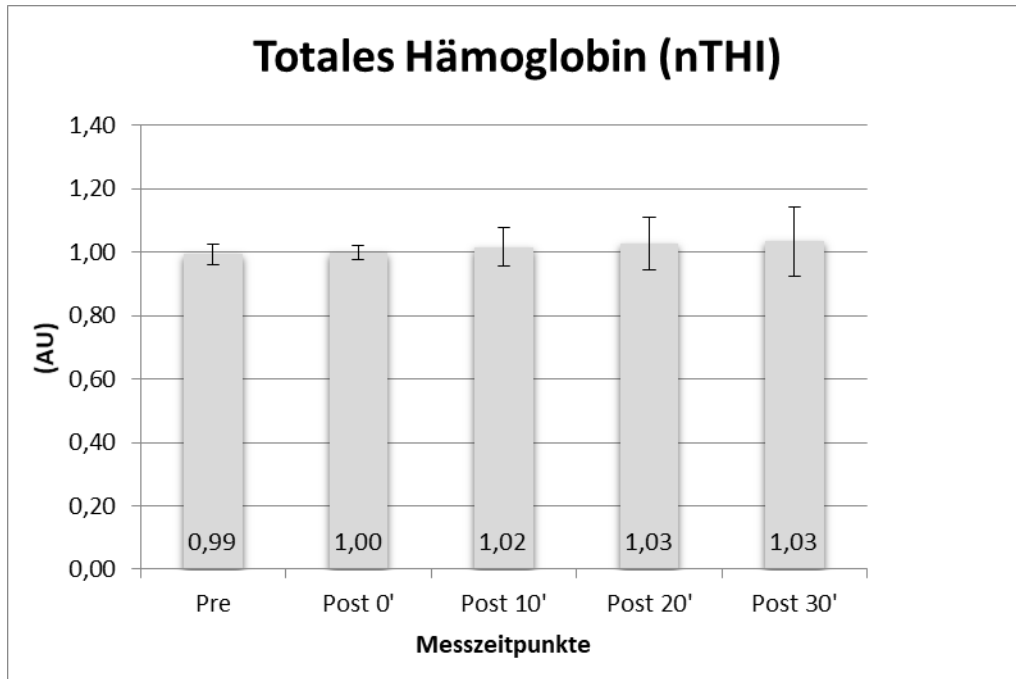


Abbildung 39: Ergebnisse der Messung des totalen Hämoglobins (nTHI) vor und nach der Stoßwellenapplikation (Versuchsgruppe)

Kontrollgruppe

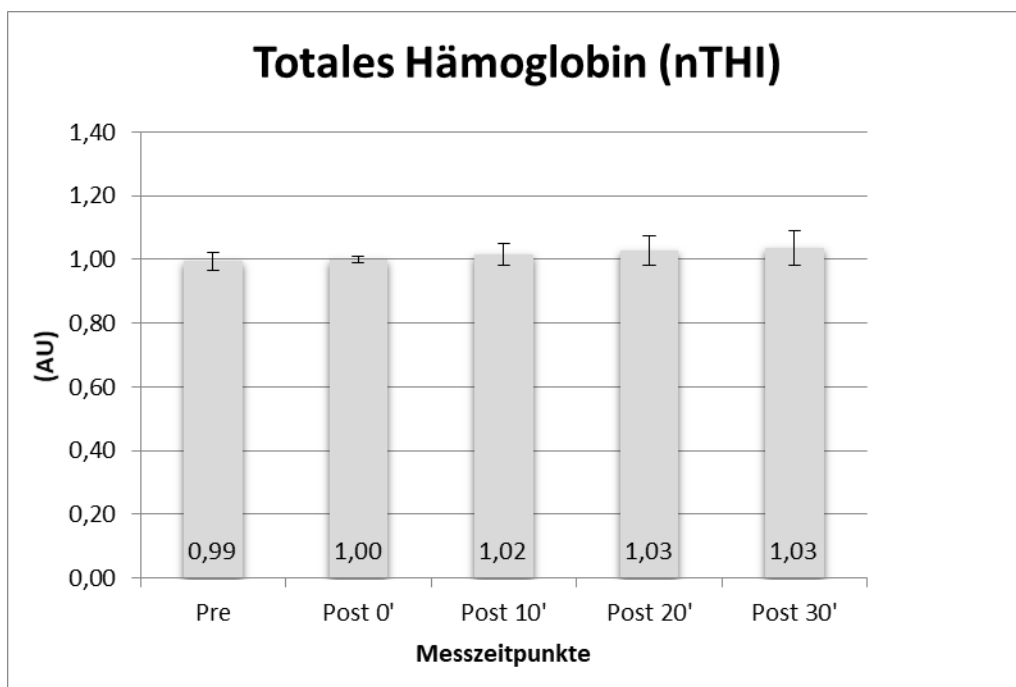


Abbildung 40: Ergebnisse der Messung des totalen Hämoglobins (nTHI) ohne Stoßwellenapplikation (Kontrollgruppe)

Versuchsgruppe

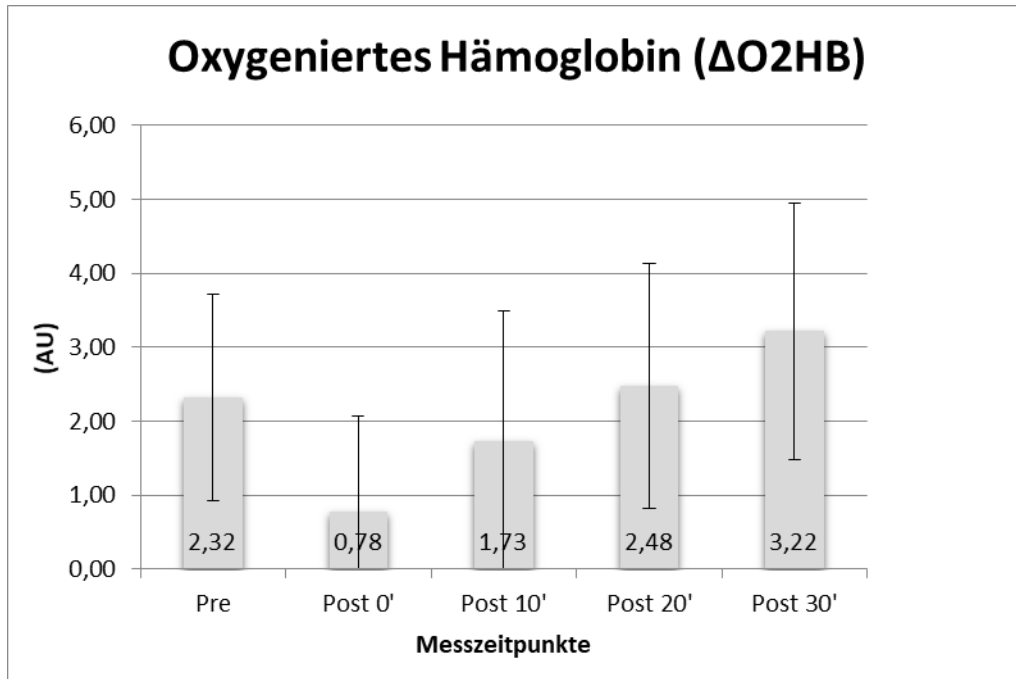


Abbildung 41: Ergebnisse der Messung des oxygenierten Hämoglobins (ΔO₂Hb) vor und nach der Stoßwellenapplikation (Versuchsgruppe)

Kontrollgruppe

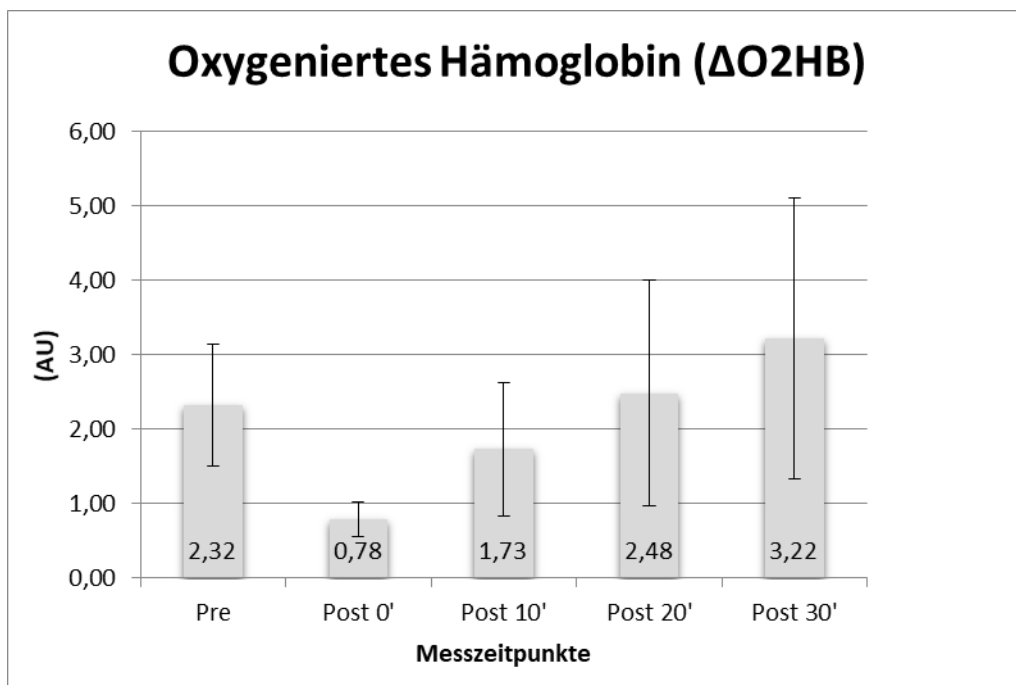


Abbildung 42: Ergebnisse der Messung des oxygenierten Hämoglobins (ΔO₂Hb) ohne Stoßwellenapplikation (Kontrollgruppe)

Versuchsgruppe

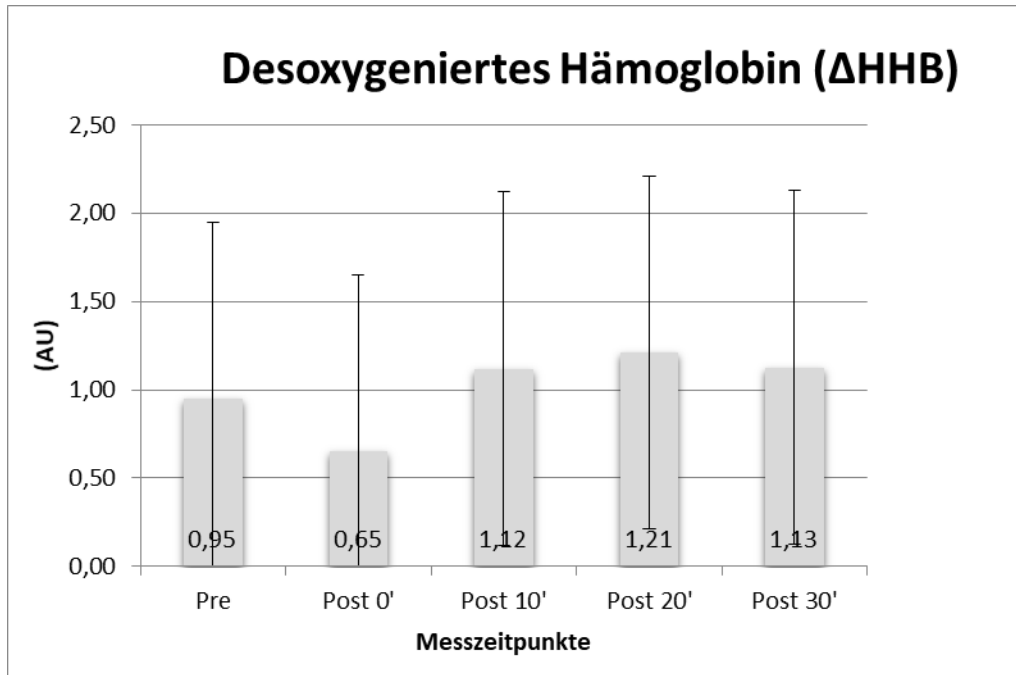


Abbildung 43: Ergebnisse der Messung des deoxygenated haemoglobin (ΔHHb) vor und nach der Stoßwellenapplikation (Versuchsgruppe)

Kontrollgruppe

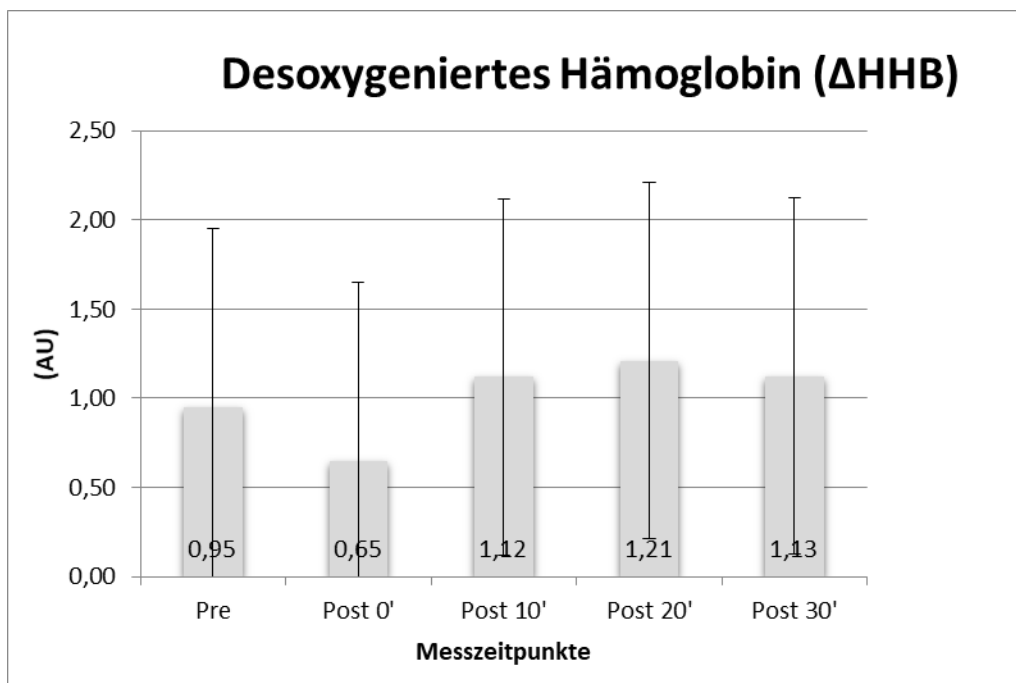


Abbildung 44: Ergebnisse der Messung des deoxygenated haemoglobin (ΔHHb) ohne Stoßwellenapplikation (Kontrollgruppe)

9.3.2. Ergebnisse der Erythrozytenverformbarkeit (RBC-Verformbarkeit)

Die Ergebnisse der Erythrozytenverformbarkeit (RBC-Verformbarkeit) aus der Hauptstudie geben eine differenzierte Darstellung wieder. Die Ergebnisse zeigen, dass der EImax (maximale Verformbarkeit) bei der Versuchsgruppe nach der Stoßwellenapplikation unverändert blieb (Abb. 45). Dies zeigt sich auch im Vergleich mit der Kontrollgruppe (Abb. 46). Allerdings zeigen die Ergebnisse des SS1/2 (Abb. 47), dass innerhalb der Versuchsgruppe die Verformbarkeit 6h nach der Stoßwellenapplikation signifikant vermindert ist ($p = .007$). Bei 24h nimmt die Verformbarkeit zwar zu (n.s.), erreicht jedoch nicht wieder Pre-Wert. Gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 48) ist die Verformbarkeit nach der Stoßwellenapplikation zwar vermindert, allerdings ist der Vergleich nicht signifikant. Dies zeigt sich auch in Anlehnung an den SS1/2/EImax Ratio der Versuchsgruppe (Abb. 49) und der Kontrollgruppe (Abb. 50). Genau wie bei SS1/2, zeigt der SS1/2/EImax Ratio der Versuchsgruppe eine signifikante Verminderung der Verformbarkeit 6h nach der Stoßwellenapplikation. Diese Signifikanz ist in dem Vergleich mit der Kontrollgruppe nicht festzustellen.

Versuchsgruppe

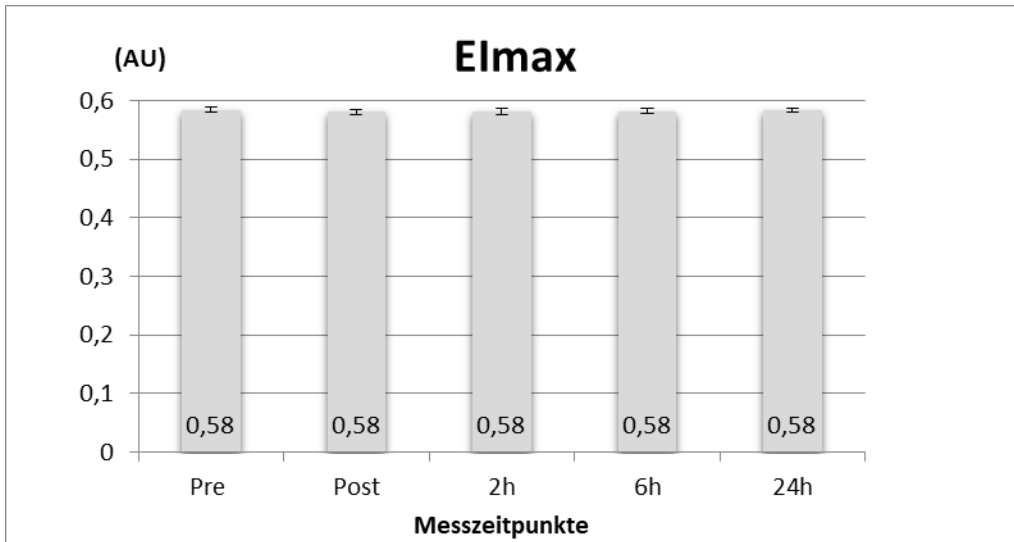


Abbildung 45: Ergebnisse der EImax (maximale Verformbarkeit) Berechnung vor und nach der Stoßwellenapplikation gemessen in AU (Versuchsgruppe)

Kontrollgruppe

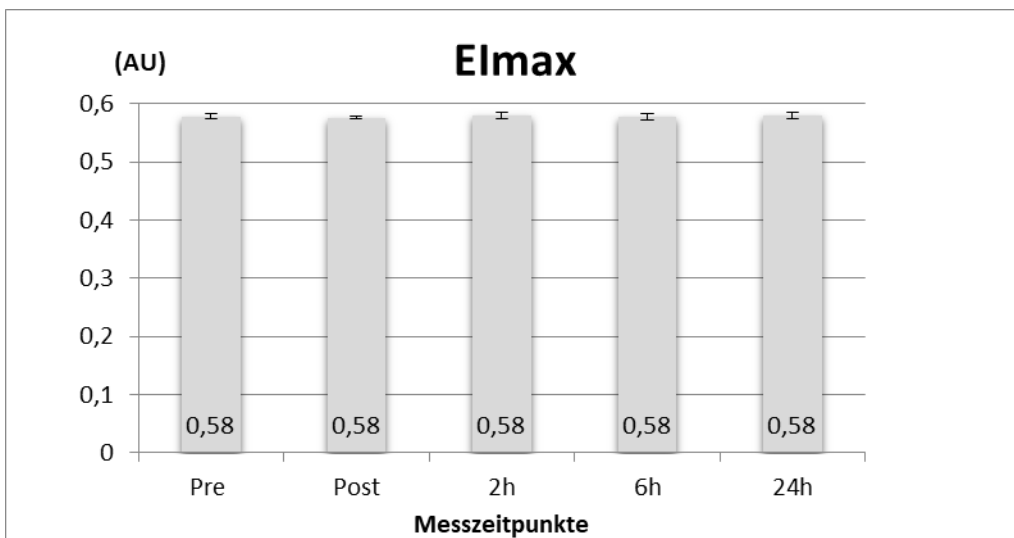


Abbildung 46: Ergebnisse der EImax (maximale Verformbarkeit) Berechnung ohne Stoßwellenapplikation gemessen in AU (Kontrollgruppe)

Versuchsgruppe

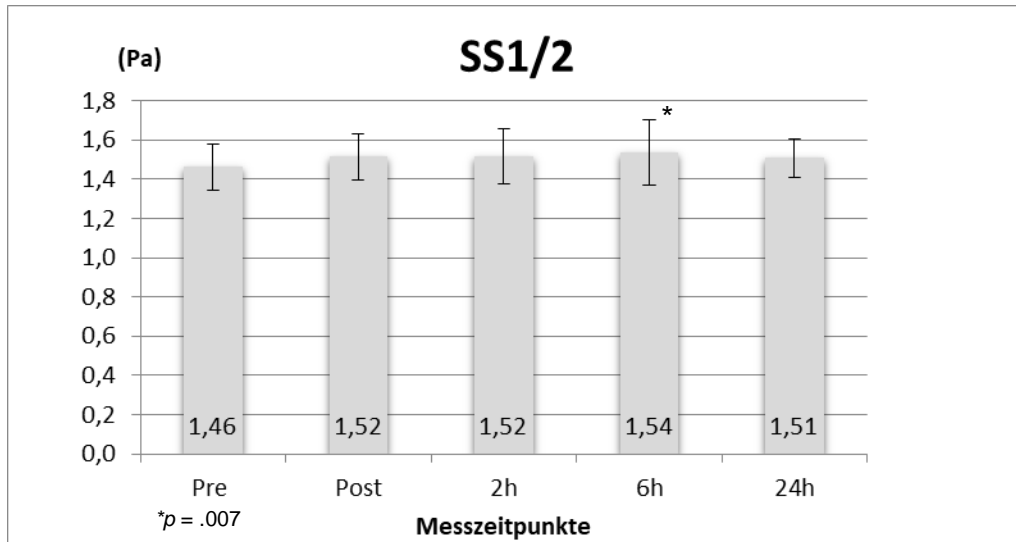


Abbildung 47: Ergebnisse der SS1/2 (Scherstress bei ½ Maximum) vor und nach der Stoßwellenapplikation, gemessen in Pa (Versuchsgruppe)

Kontrollgruppe

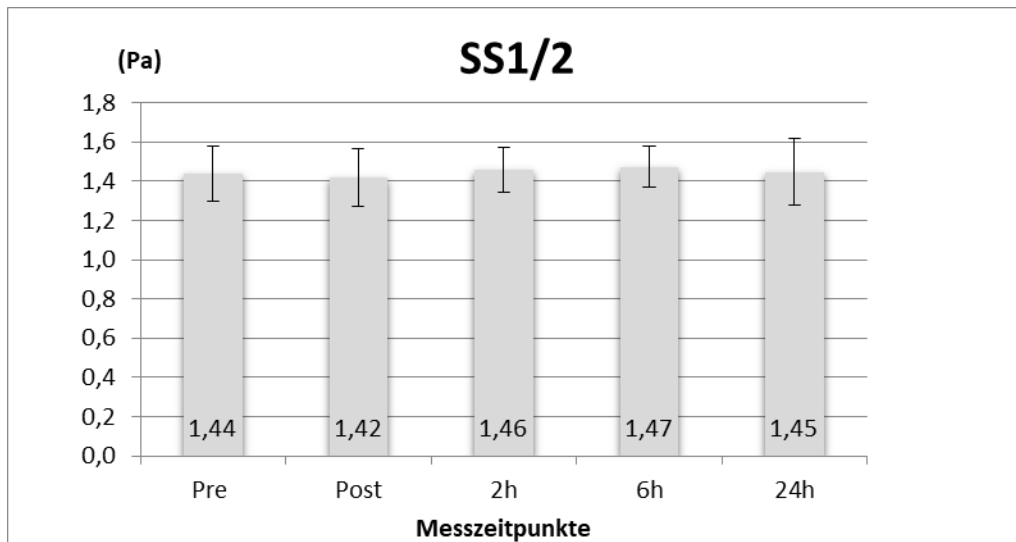


Abbildung 48: Ergebnisse der SS1/2 (Scherstress bei ½ Maximum) ohne Stoßwellenapplikation, gemessen in Pa (Kontrollgruppe)

Versuchsgruppe

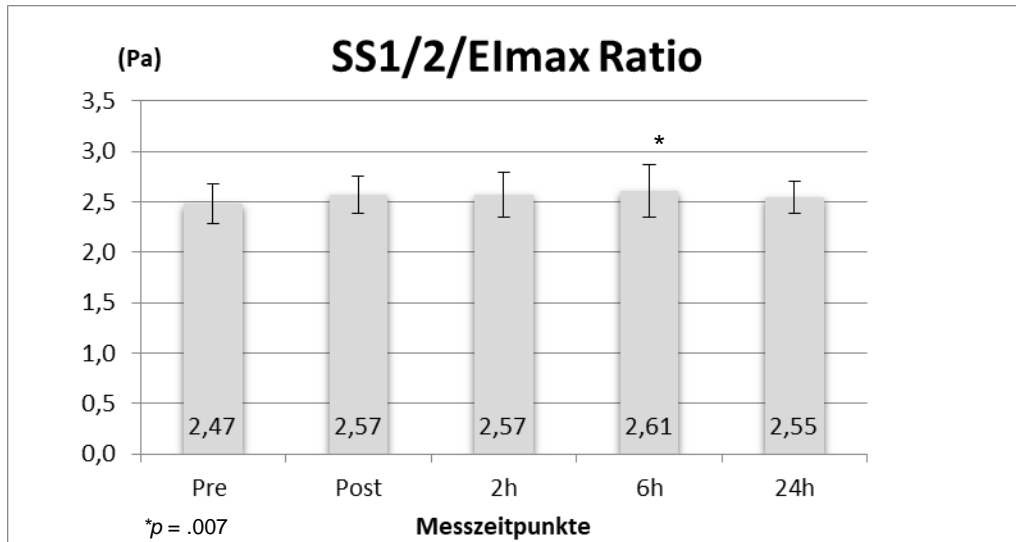


Abbildung 49: Ergebnisse der Berechnung des SS1/2/EImax Ratio vor und nach der Stoßwellenapplikation (Versuchsgruppe)

Kontrollgruppe

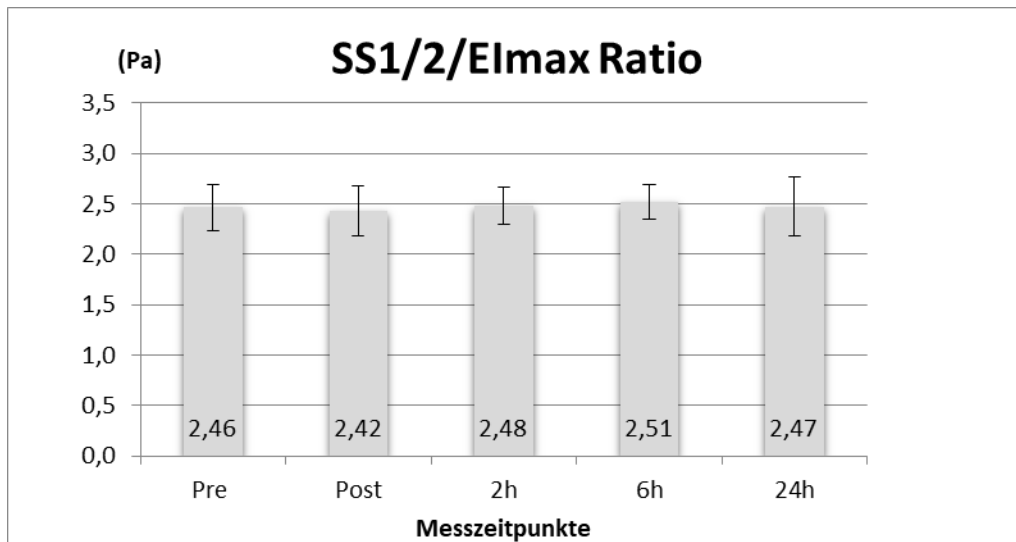


Abbildung 50: Ergebnisse der Berechnung des SS1/2/EImax Ratio ohne Stoßwellenapplikation (Kontrollgruppe)

9.3.3. Ergebnisse der NO-Messungen

Die Ergebnisse der NO-Messungen zeigen eine Verringerung (n.s.) des RBC-Nitrits in der Versuchsgruppe (Abb. 51). Die Minimalwerte sind unmittelbar nach der Stoßwellenapplikation festzustellen. Nach 2h überschreiten die Werte das Ausgangsniveau (Pre) und kehren nach 6h wieder zurück. Nach 24h kommt es zu einer erneuten Überschreitung des Ausgangsniveau (Pre). Diese Schwankungen sind in der Kontrollgruppe nicht festzustellen (Abb. 52). Das Plasma-Nitrit der Versuchsgruppe zeigte in den Mittelwerten eine Erhöhung bei 6h durch die Intervention und eine Annäherung an das Ausgangsniveau (Pre) nach 24h (Abb. 53). Aufgrund der hohen Standardabweichung in bei 6h ist dieser Werte jedoch nicht signifikant. Im Vergleich dazu zeigen die Versuchsgruppe (Abb. 53) und die Kontrollgruppe (Abb. 54) unterschiedliche Verläufe.

Anmerkung:

Die Ergebnisse der RBC-Nitrit-Messungen der Versuchsgruppe weisen vermutlich einen Messfehler in der Höhe der Messwerte auf, welcher sich jedoch nicht auf den Verlauf der Messwerte auswirkt.

Versuchsgruppe

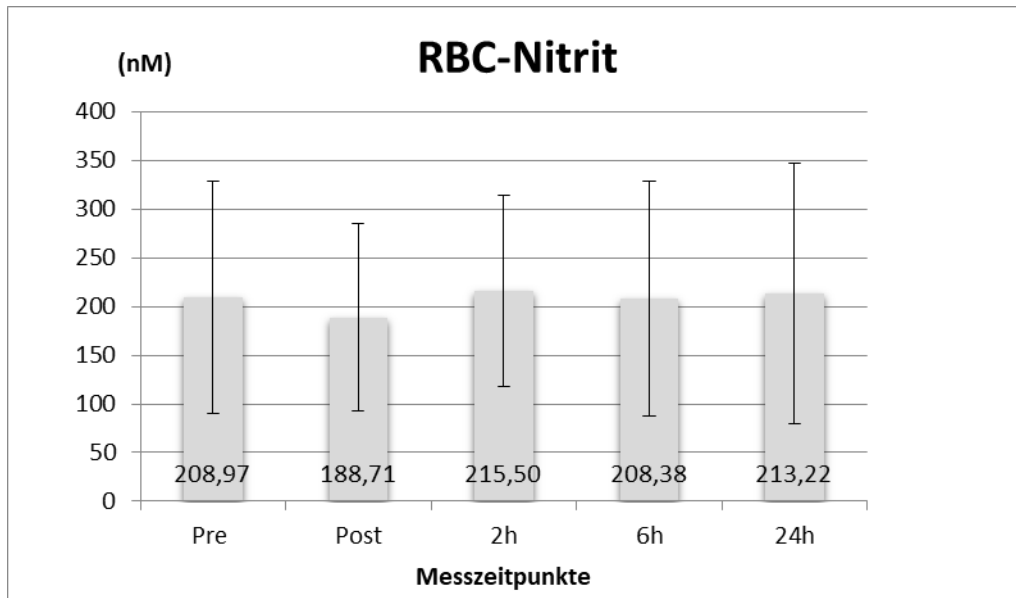


Abbildung 51: Ergebnisse des RBC-Nitrits vor und nach der Stoßwellenapplikation (Versuchsgruppe)

Kontrollgruppe

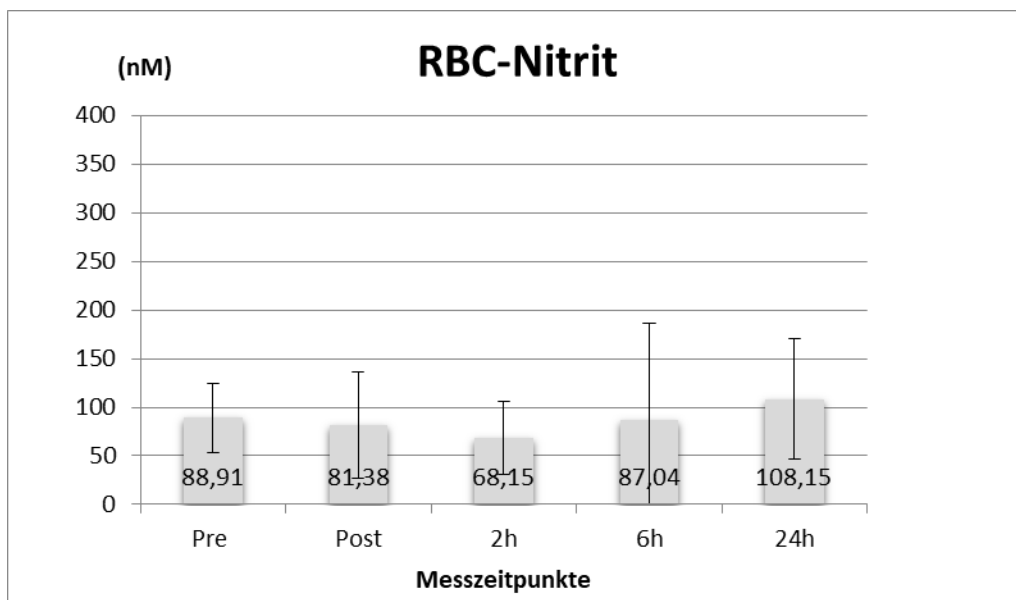


Abbildung 52: Ergebnisse des RBC-Nitrits ohne Stoßwellenapplikation (Kontrollgruppe)

Versuchsgruppe

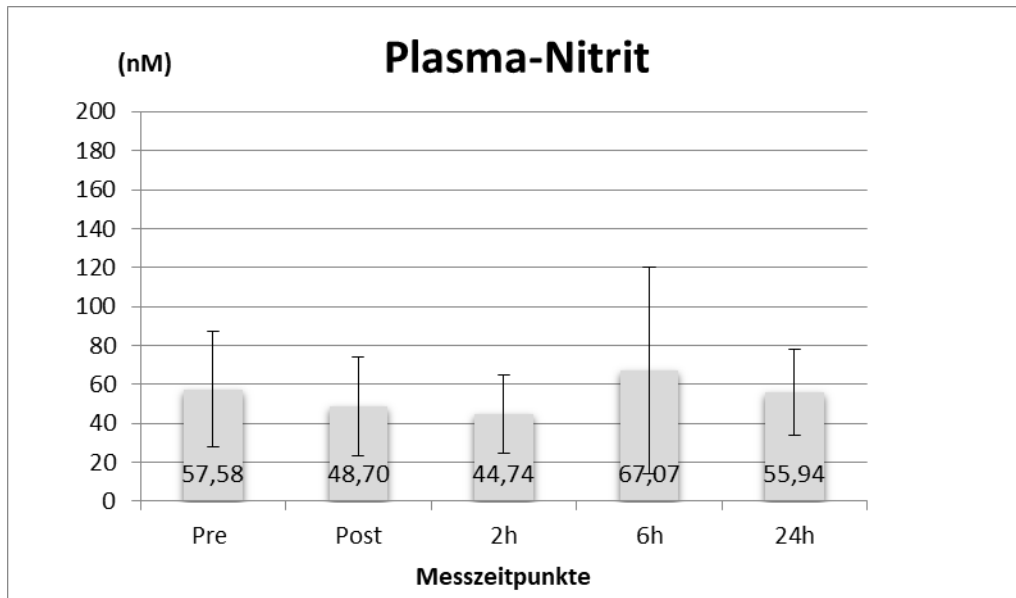


Abbildung 53: Ergebnisse des Plasma-Nitrit vor und nach der Stoßwellenapplikation (Versuchsgruppe)

Kontrollgruppe

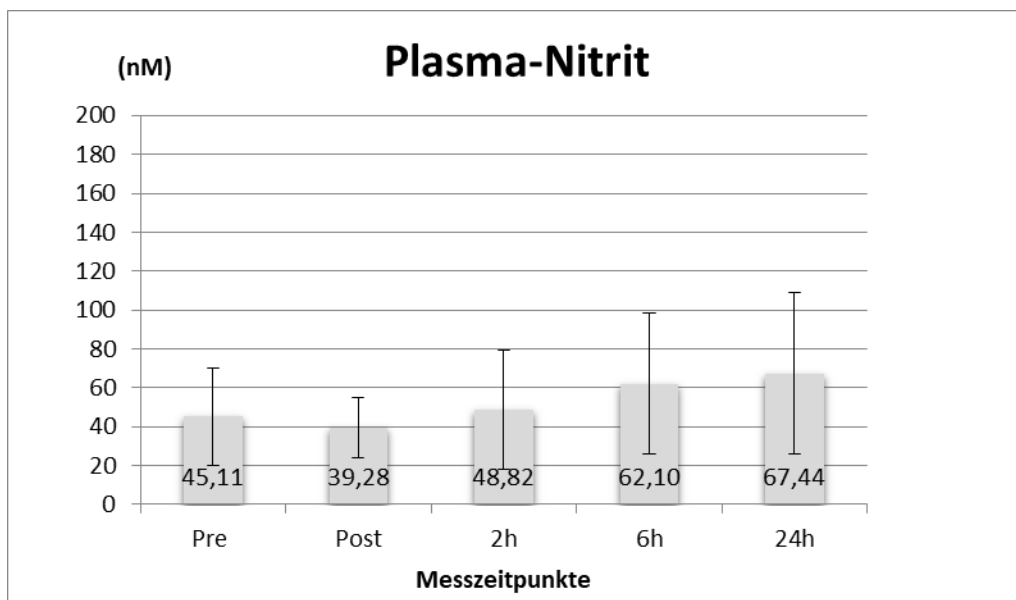


Abbildung 54: Ergebnisse des Plasma-Nitrit ohne Stoßwellenapplikation (Kontrollgruppe)

KAPITEL 10: IN-VITRO-STUDIE

10. IN-VITRO-STUDIE

10.2. UNTERSUCHUNGS- ABLAUF

In der In-Vitro-Studie soll die Annahme überprüft werden, ob die applizierten Stoßwellen als mechanischer Stress auf die Erythrozyten wirken, dessen Proteine schädigen, die für die NO-Produktion verantwortlich sind und somit die Verformbarkeit limitieren. In der vorliegenden Studie soll herausgefunden werden, ab welchem Zeitpunkt und ab welcher Applikationsmenge die Erythrozyten geschädigt werden.

10.1. Personenstichprobe

An der In-Vitro-Studie nahmen acht ($n = 8$) gesunde, männliche, unverletzte Probanden ($MW \pm SD$) Alter: 26.6 ± 4.0 Jahre, Gewicht: 79.3 ± 8.4 kg, Größe: 179.3 ± 4.6 cm teil. Die Studie entsprach den Vorgaben der Ethikkommission der Deutschen Sporthochschule Köln und wurde mit Datum vom [20.02.2014] genehmigt. Alle Probanden wurden über den Verlauf der Studie und mögliche Risiken aufgeklärt und gaben zu der Studie ihr schriftliches Einverständnis. Alle Probanden wurden pro Zeitpunkt und Applikationsmenge untersucht.

10.2. Untersuchungsablauf

Für die Untersuchung wurde den Probanden 2 x 7,5 ml Blut (Heparin) pro Zeitpunkt (0h/6h) und Applikationsmenge (Kondition 0, 500, 1000, 1500) entnommen. Die Kondition 0 stellt dabei die Kontrolle dar. Anschließend wurden die Proben zur Untersuchung in eine FluoroDish® Petri-Schale gegeben und mit Schweinehaut abgedeckt. Die Stoßwellenapplikation erfolgte bei allen Proben mit einem 5 MPa-Fokus (50 Bar) und einer Intensität von 0.702 mJ/mm^2 bei 8Hz, durch die Schweinehaut auf die Petri-Schale (Abb. 56).

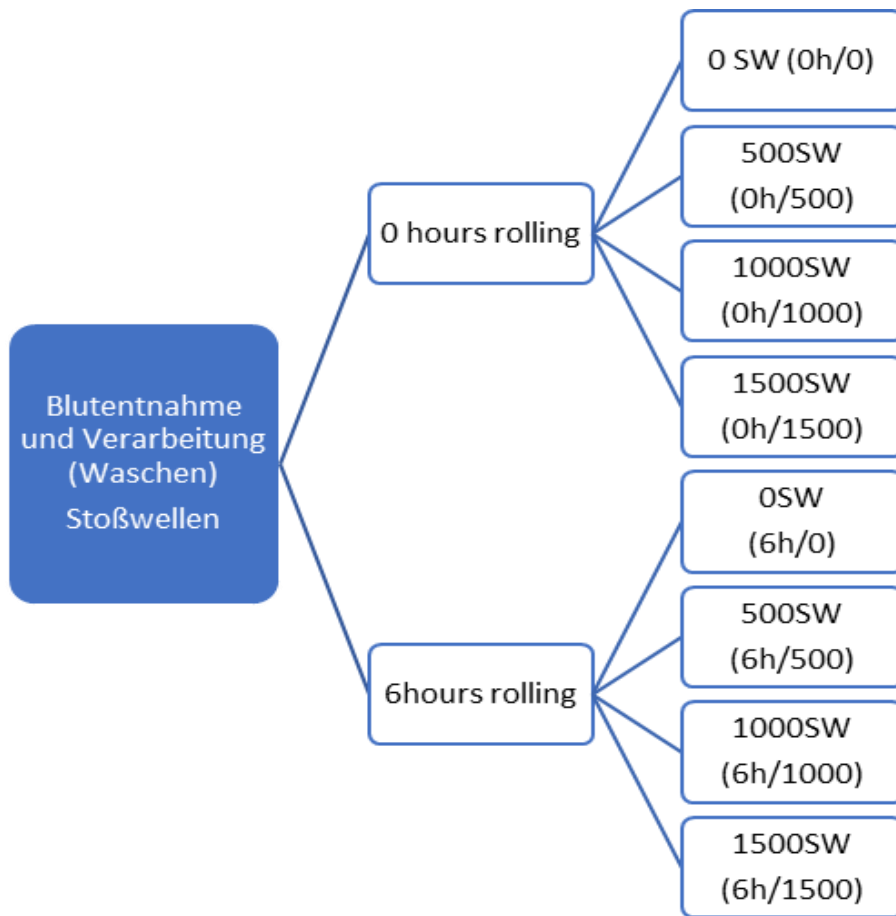


Abbildung 55: Darstellung des Untersuchungsablaufs der In-Vitro-Studie



Abbildung 56: Petri-Schale mit Heparinblut (links) mit Applikation durch die Schweinehaut (rechts), eigene Darstellung

10.2. UNTERSUCHUNGS- ABLAUF

Die Applikationszeit betrug je nach Applikationsmenge (Kondition) zwischen 0 - 25 Minuten. Nach der Stoßwellenapplikation wurde die Probe in einen Falcon-Behälter (Falcon) mit einer Percoll-Lösung zur Bestimmung der Erythrozytenpopulationen (Populationen) gegeben (vgl. Bizjak et al, 2015). Während die 0h Probe direkt weiterverarbeitet wurde, wurde die 6h Probe zunächst für 6 Stunden auf den Roller gelegt und erst danach weiterverarbeitet.

Die Verarbeitung zur Bestimmung der Erythrozytenpopulationen erfolgte nach dem Protokoll von Bizjak et al (2015). Es wurden „junge“ (44 ng/ml), „mittelalte“ (45-48 ng/ml) und „alte“ (52-56 ng/ml) Populationen pro Zeitpunkt (0h/6h) und Kondition bestimmt (Abb. 57). Zusätzlich wurde das Gewicht und das Volumen aus dem gesamten Blut und aus den einzelnen Populationen bestimmt, um die Mengenverhältnisse pro Zeitpunkt und Kondition festzuhalten. Anschließend wurden die Proben für die Messung der RBC-Verformbarkeit weiterverarbeitet (vgl. Kapitel 7.3.2).

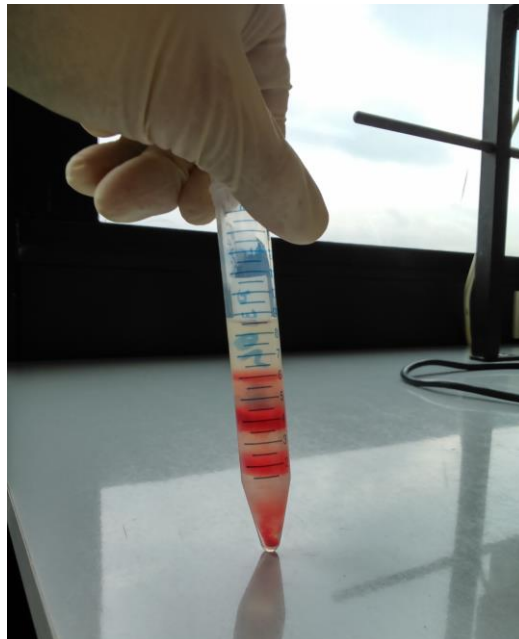


Abbildung 57: Darstellung der Percoll-Lösung mit den einzelnen Erythrozytenpopulationen (Fraktionen) "jung" (Oben), "mittelalt" (Mitte) und "alt" (Unten), eigene Darstellung.

10.3. Ergebnisse

10.3. ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Gesamtpopulation sowie der einzelnen Populationen (Fraktionen) zeigen im Bereich der Verformbarkeit keine signifikanten Veränderungen zwischen 0h und 6h (Abb. 58 & Abb. 59).

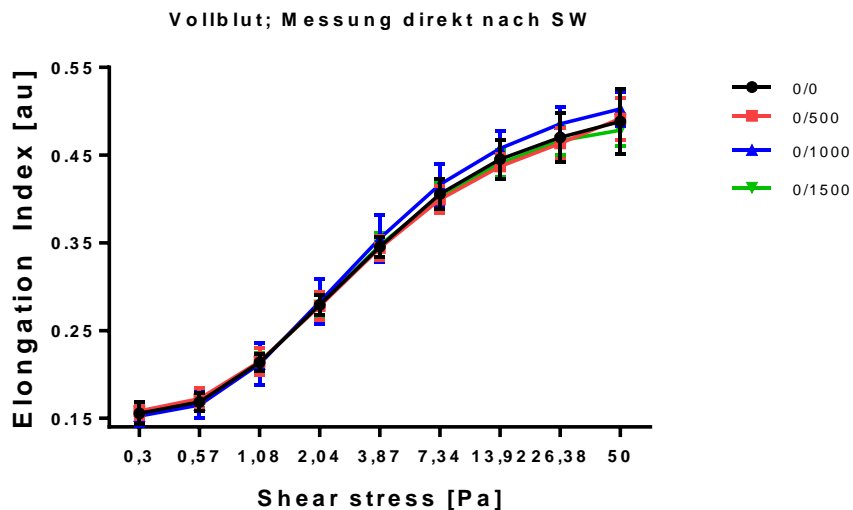


Abbildung 58: Ergebnisse der Verformbarkeitsmessung RBC aller Konditionen 0h nach der Stoßwellenapplikation.

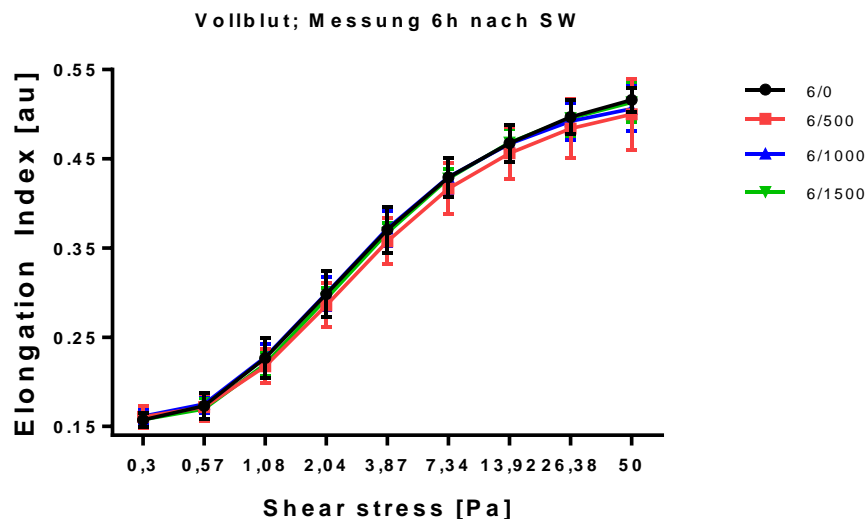


Abbildung 59: Ergebnisse der Verformbarkeitsmessung RBC aller Konditionen 6h nach der Stoßwellenapplikation.

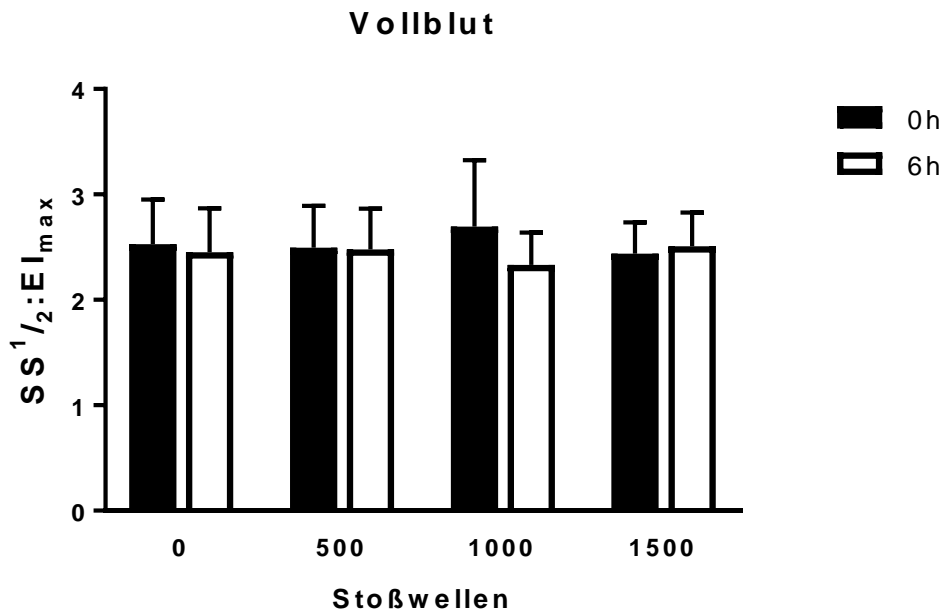


Abbildung 60: Ergebnisse des SS1/2 EI_{max} aller Konditionen 0h/6h nach der Stoßwellenapplikation.

Im Folgenden werden die Verformbarkeit der RBC der einzelnen Konditionen und 0h/6h im Direktvergleich dargestellt. Der Direktvergleich zwischen 0h und 6h zeigt, dass die Verformbarkeit aller RBC 6h nach den Applikationen und des Rollens nicht signifikant erhöht ist (Abb. 61ff.). Die Ergebnisse der zeigen, dass bei den Konditionen 1000, 6h nach der Stoßwellenapplikation die prozentuale Anzahl der „jungen“ (niedrige Dichte) RBC-Populationen signifikant ($p = .036$) abnimmt (Abb. 67). Bei Kondition 1500 zeigt sich eine signifikante ($p = .046$), prozentuale Zunahme 6h nach der Applikation der „alten“ (hohe Dichte) RBC-Populationen (Abb. 68). Im Anschluss dazu wird die Verteilung der einzelnen Populationen innerhalb der gesamten RBCs in den Konditionen dargestellt (Abb. 65ff.).

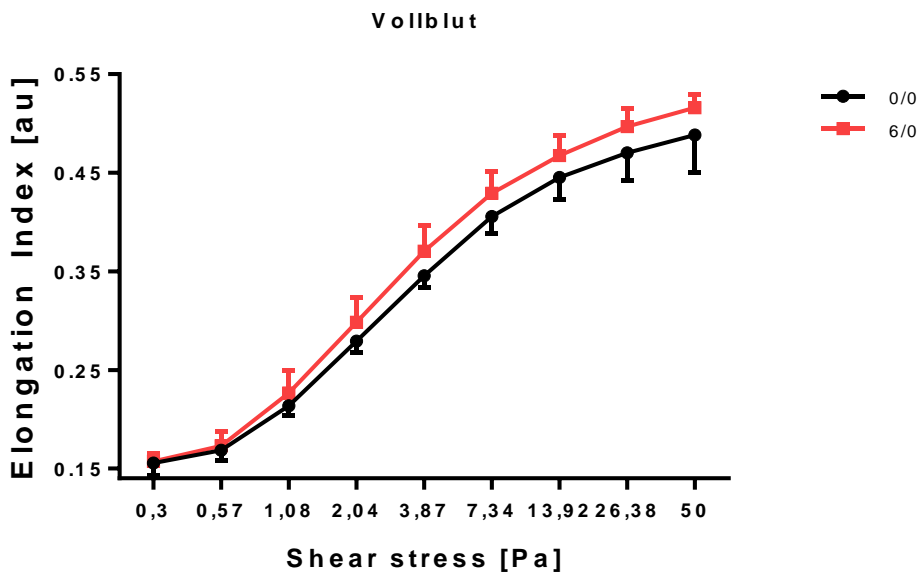


Abbildung 61: Verformbarkeit aller RBC im Direktvergleich 0h/6h bei Kondition 0.

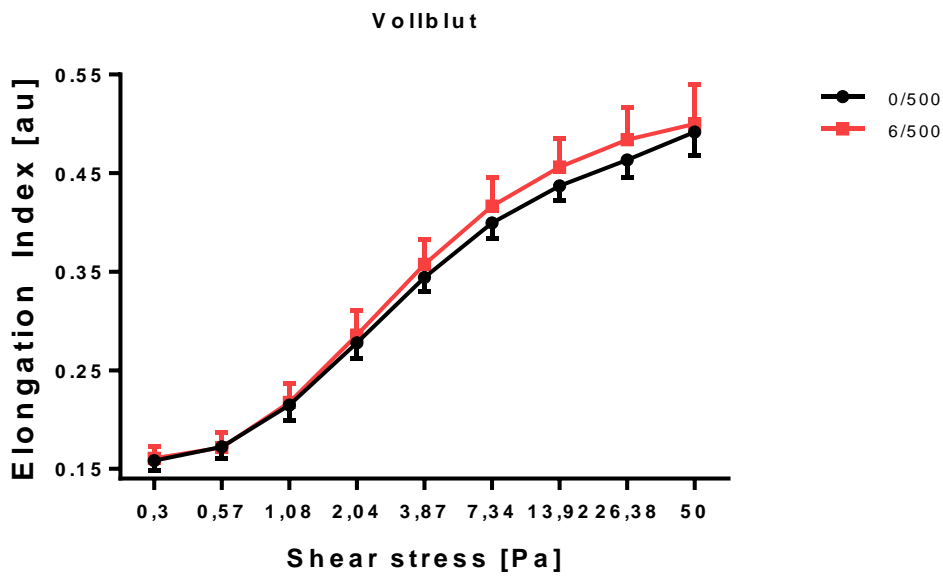


Abbildung 62: Verformbarkeit aller RBC im Direktvergleich 0h/6h bei Kondition 500.

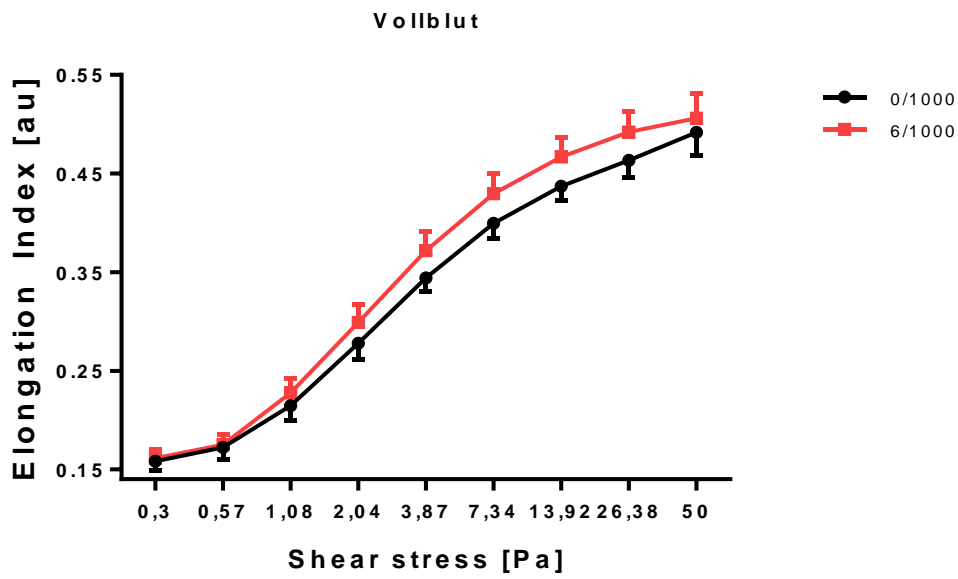


Abbildung 63: Verformbarkeit aller RBC im Direktvergleich 0h/6h bei Kondition 1000.

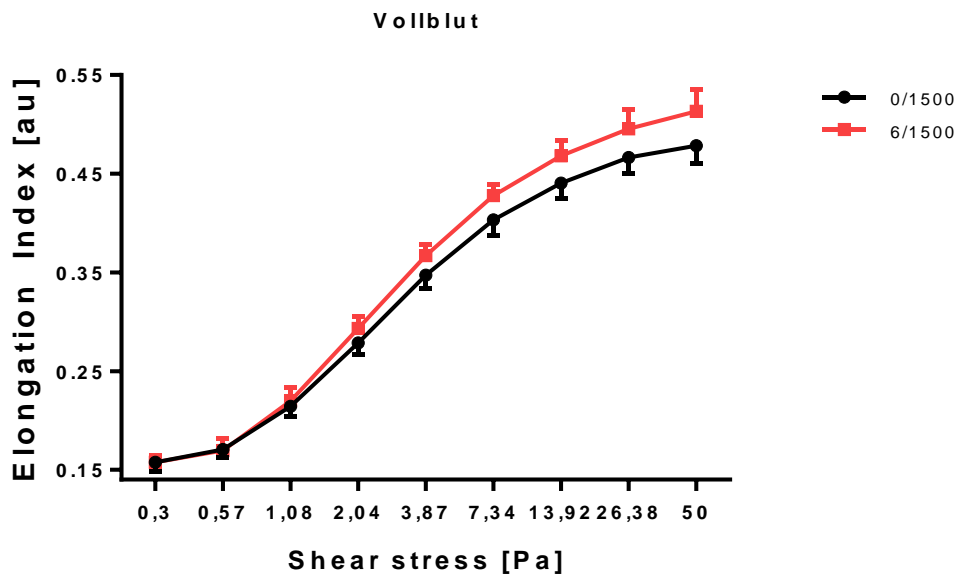


Abbildung 64: Verformbarkeit aller RBC im Direktvergleich 0h/6h bei Kondition 1500.

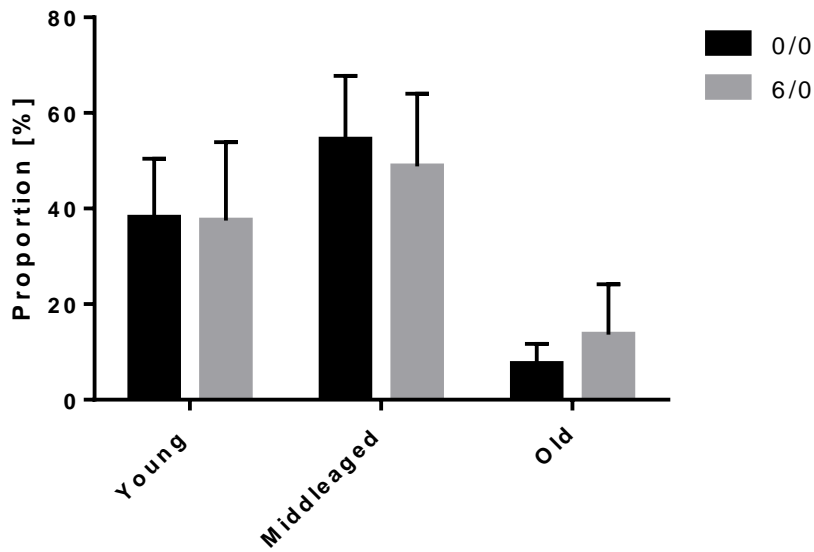


Abbildung 65: Prozentuale Verteilung der RBC Fraktionen bei Kondition 0 und 0h/6h.

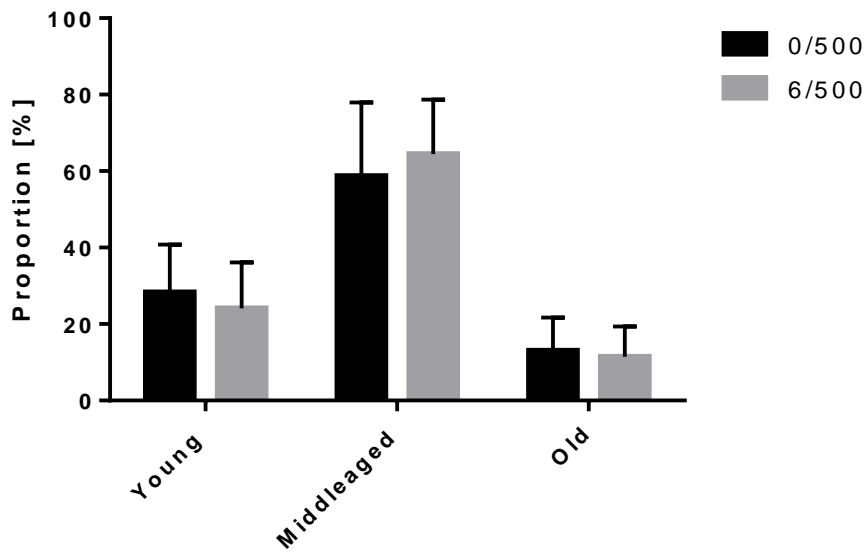


Abbildung 66: Prozentuale Verteilung der RBC Fraktionen bei Kondition 500 und 0h/6h.

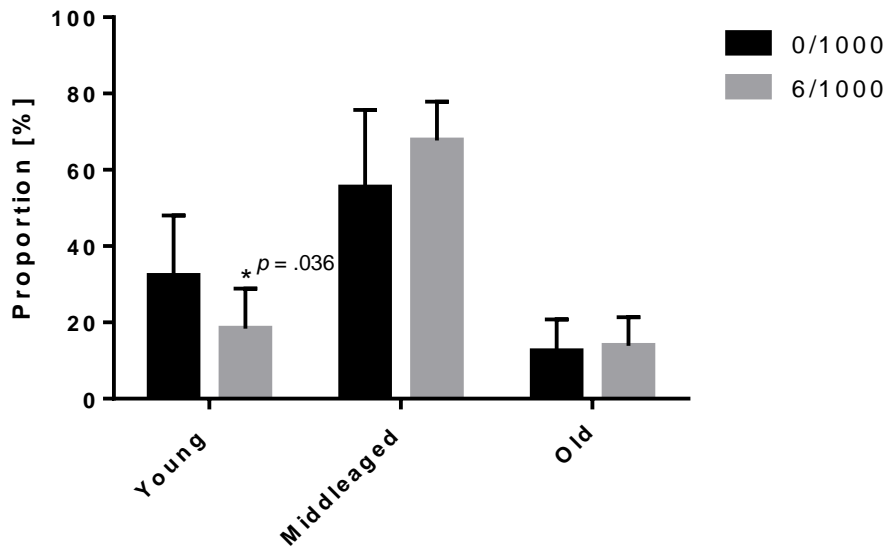


Abbildung 67: Prozentuale Verteilung der RBC Fraktionen bei Kondition 1000 und 0h/6h.

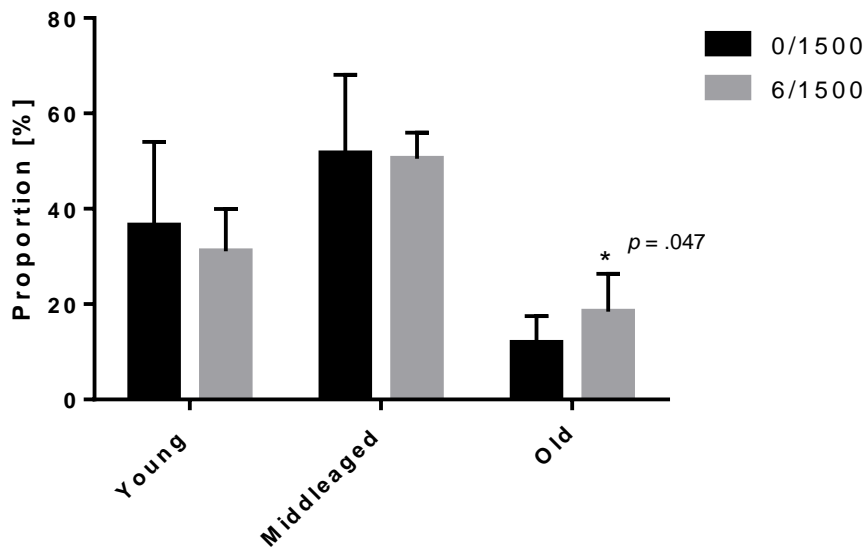


Abbildung 68: Prozentuale Verteilung der RBC Fraktionen bei Kondition 1500 und 0h/6h.

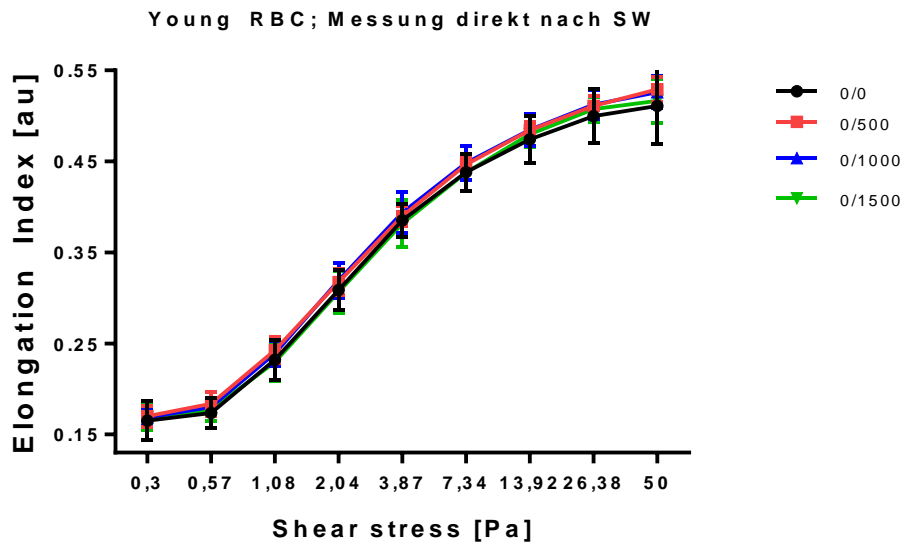


Abbildung 69: Verformbarkeit der jungen RBC Fraktionen (niedrige Dichte) aller Konditionen bei 0h.

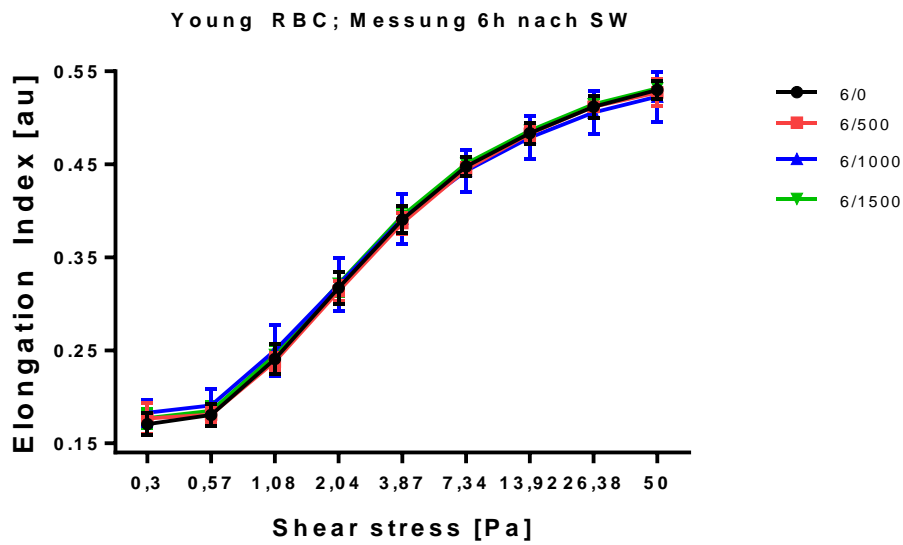


Abbildung 70: Verformbarkeit der jungen RBC Fraktionen (niedrige Dichte) aller Konditionen bei 6h.

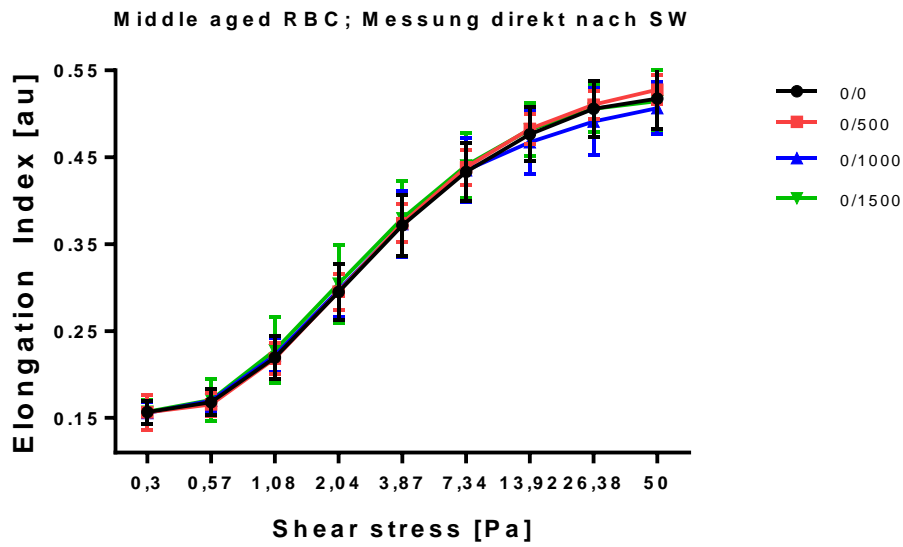


Abbildung 71: Verformbarkeit der mittelalten RBC Fraktionen (mittlere Dichte) aller Konditionen bei 0h.

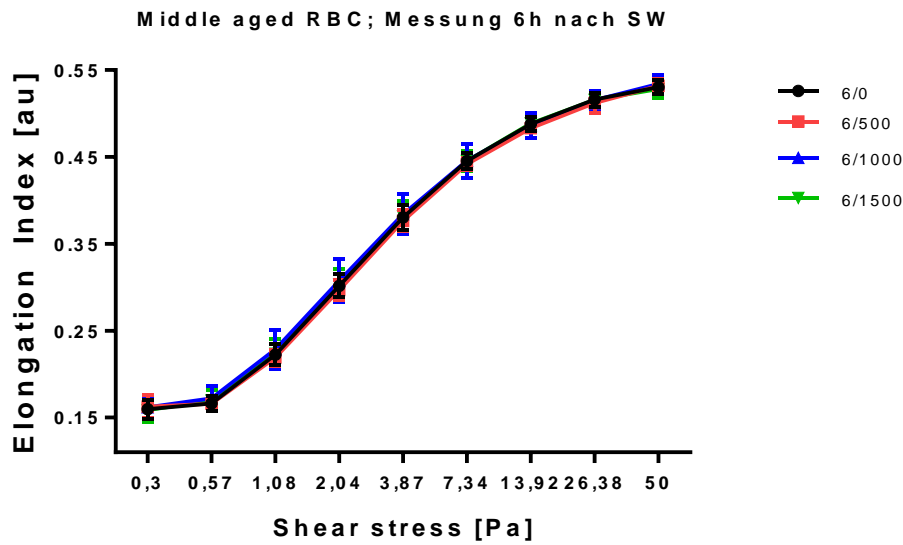


Abbildung 72: Verformbarkeit der mittelalten RBC Fraktionen (mittlere Dichte) aller Konditionen bei 6h.

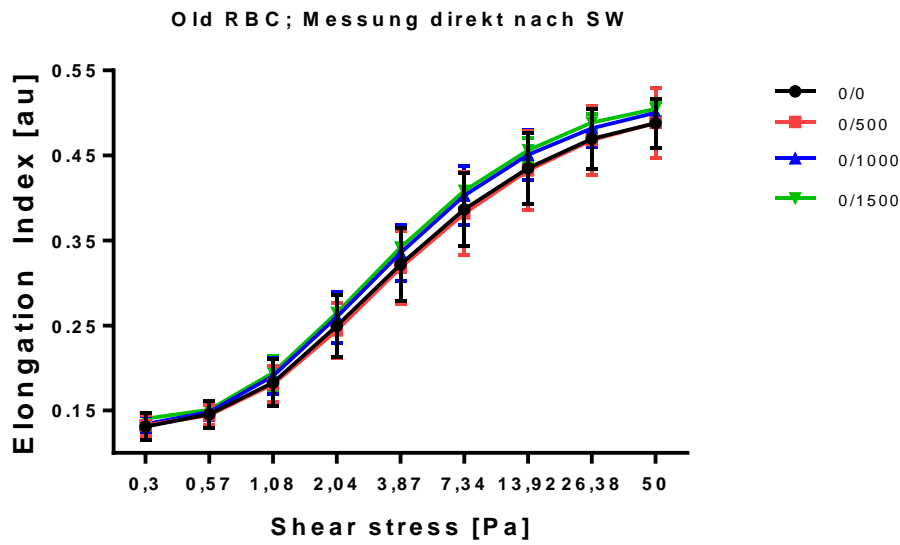


Abbildung 73: Verformbarkeit der alten RBC Fraktionen (hohe Dichte) aller Konditionen bei 0h.

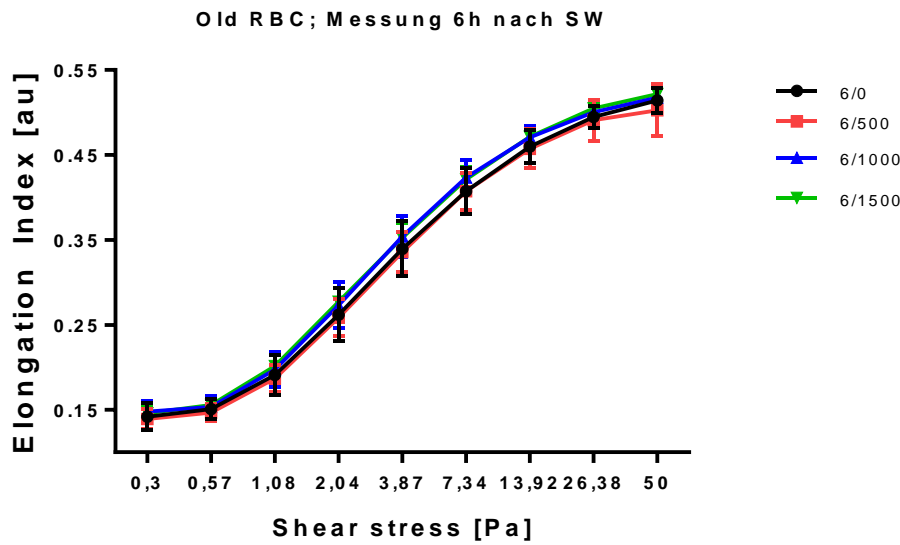


Abbildung 74: Verformbarkeit der alten RBC Fraktionen (hohe Dichte) aller Konditionen bei 6h.

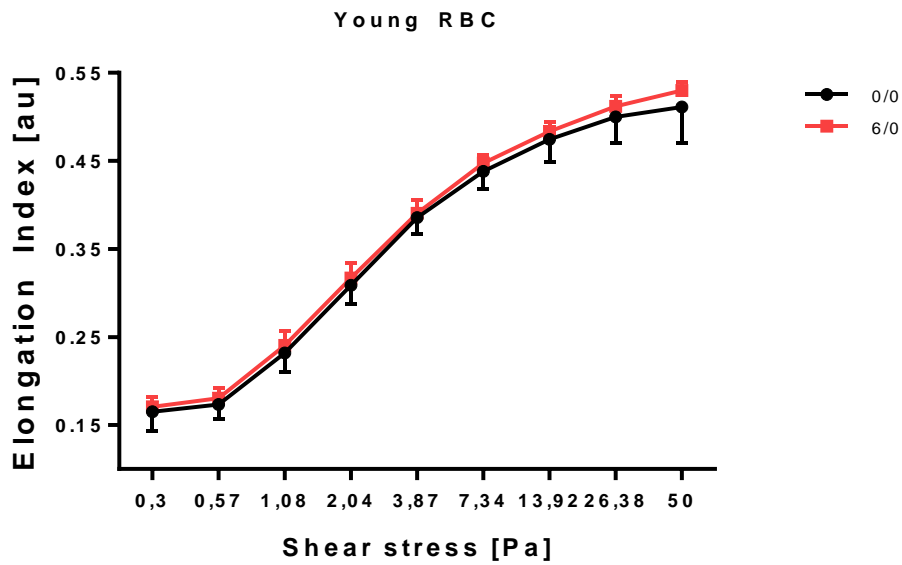


Abbildung 75: Verformbarkeit der jungen RBC Fraktionen (niedrige Dichte) im Direktvergleich 0h/6h bei Kondition 0.

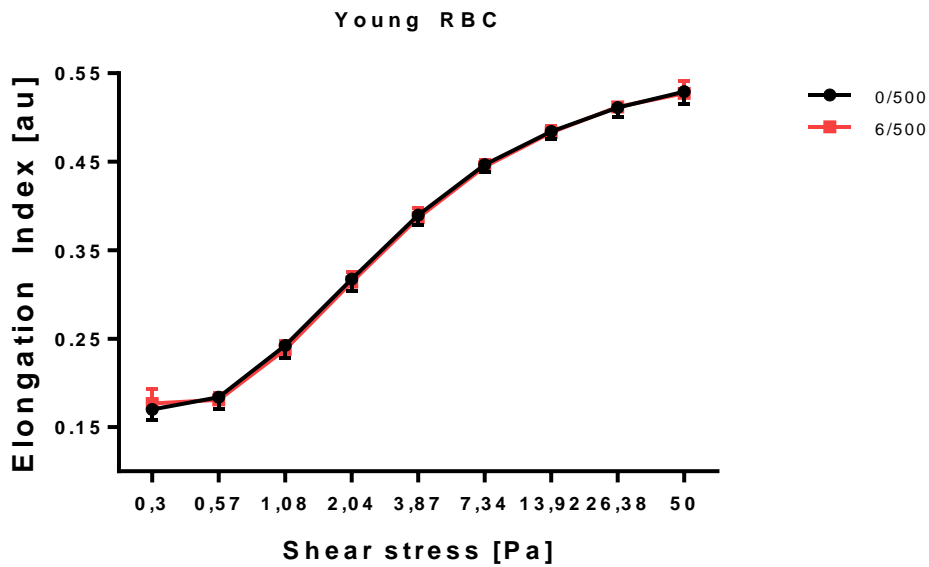


Abbildung 76: Verformbarkeit der jungen RBC Fraktionen (niedrige Dichte) im Direktvergleich 0h/6h bei Kondition 500.

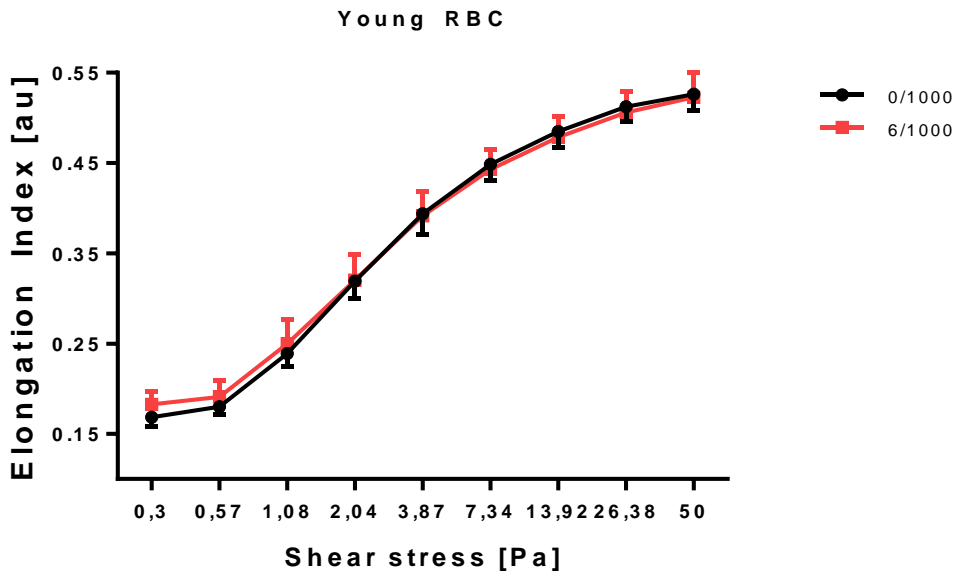


Abbildung 77: Verformbarkeit der jungen RBC Fraktionen (niedrige Dichte) im Direktvergleich 0h/6h bei Kondition 1000.

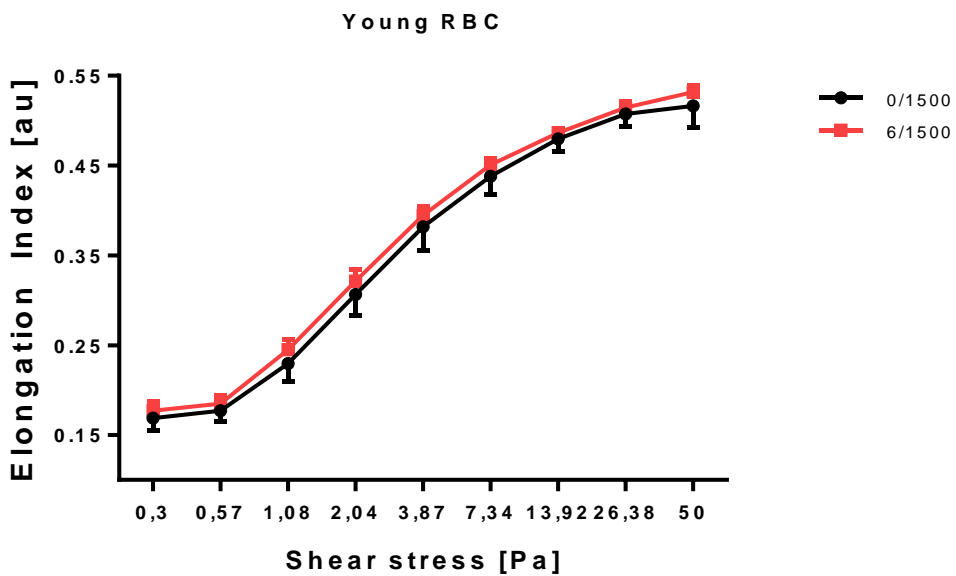


Abbildung 78: Verformbarkeit der jungen RBC Fraktionen (niedrige Dichte) im Direktvergleich 0h/6h bei Kondition 1500.

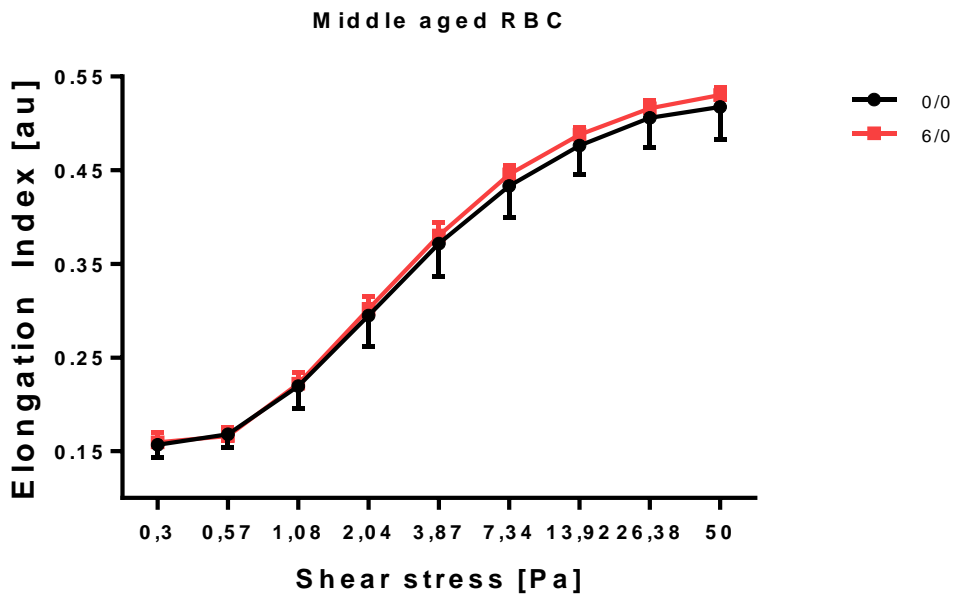


Abbildung 79: Verformbarkeit der mittelalten RBC Fraktionen (mittlere Dichte) im Direktvergleich 0h/6h bei Kondition 0.

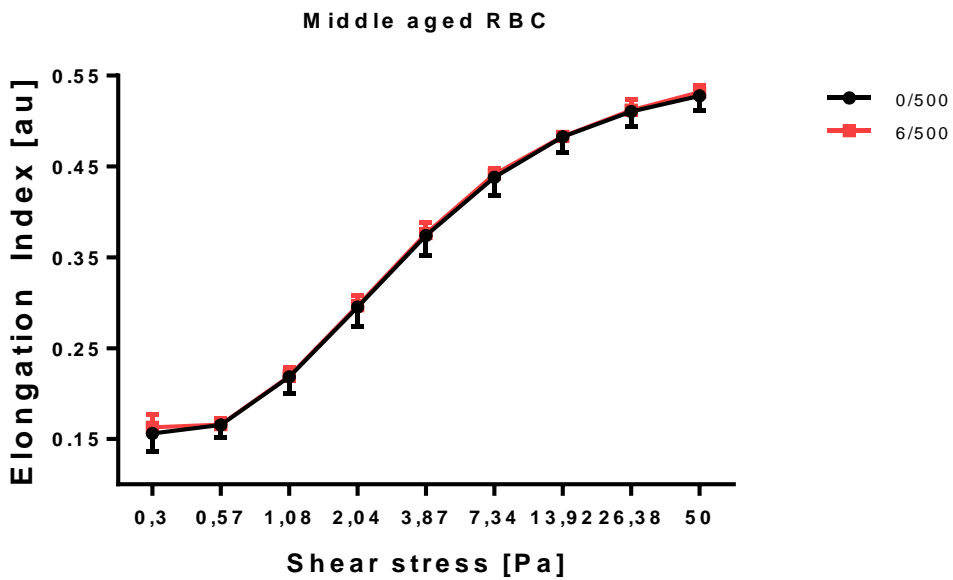


Abbildung 80: Verformbarkeit der mittelalten RBC Fraktionen (mittlere Dichte) im Direktvergleich 0h/6h bei Kondition 500.

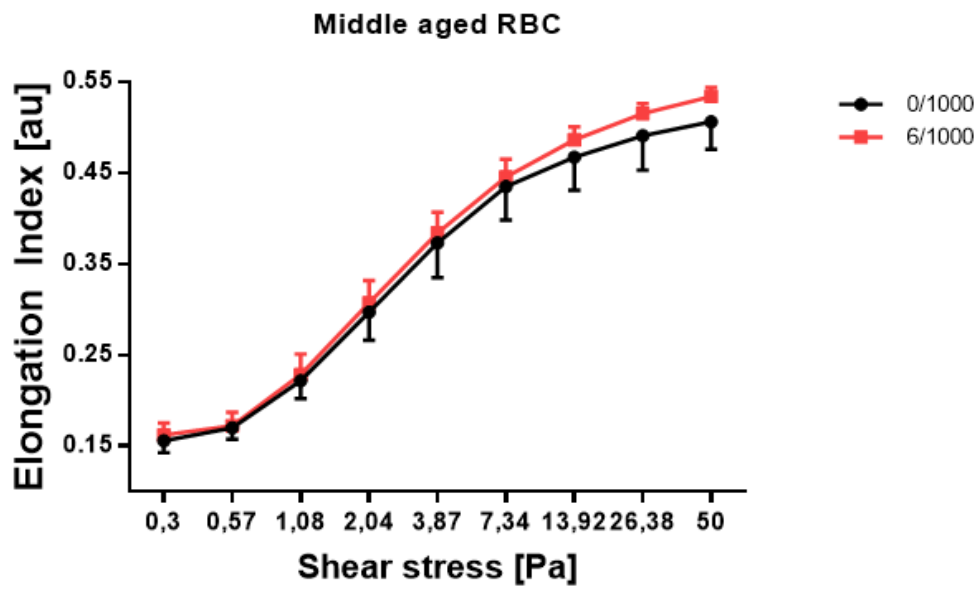


Abbildung 81: Verformbarkeit der mittelalten RBC Fraktionen (mittlere Dichte) im Direktvergleich 0h/6h bei Kondition 1000.

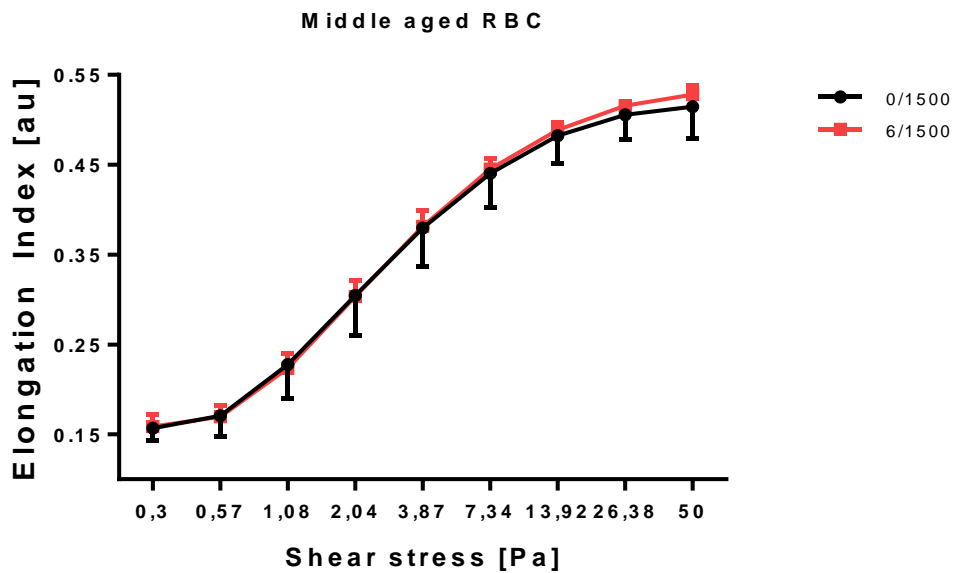


Abbildung 82: Verformbarkeit der mittelalten RBC Fraktionen (mittlere Dichte) im Direktvergleich 0h/6h bei Kondition 1500.

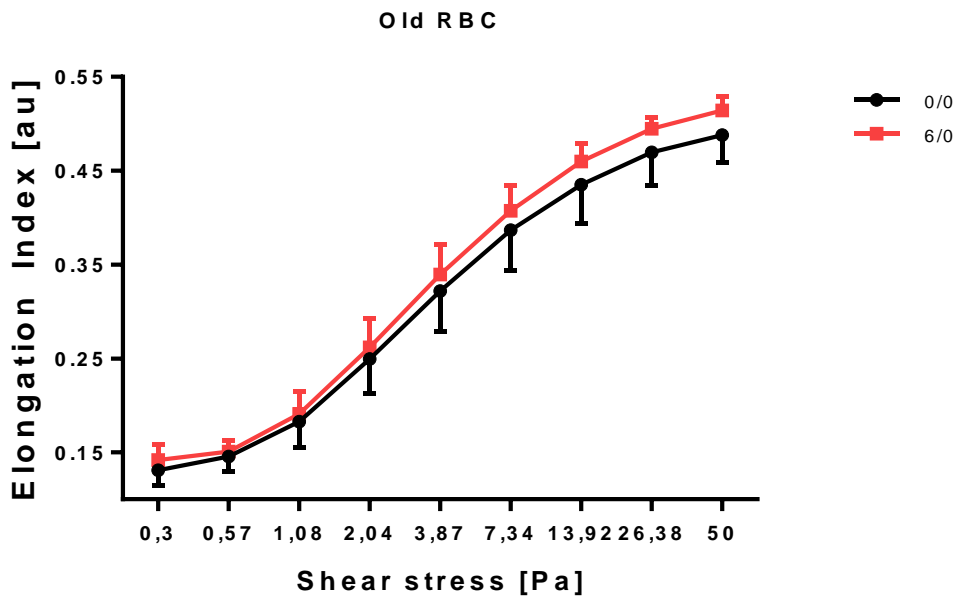


Abbildung 83: Verformbarkeit der alten RBC Fraktionen (hohe Dichte) im Direktvergleich 0h/6h bei Kondition 0.

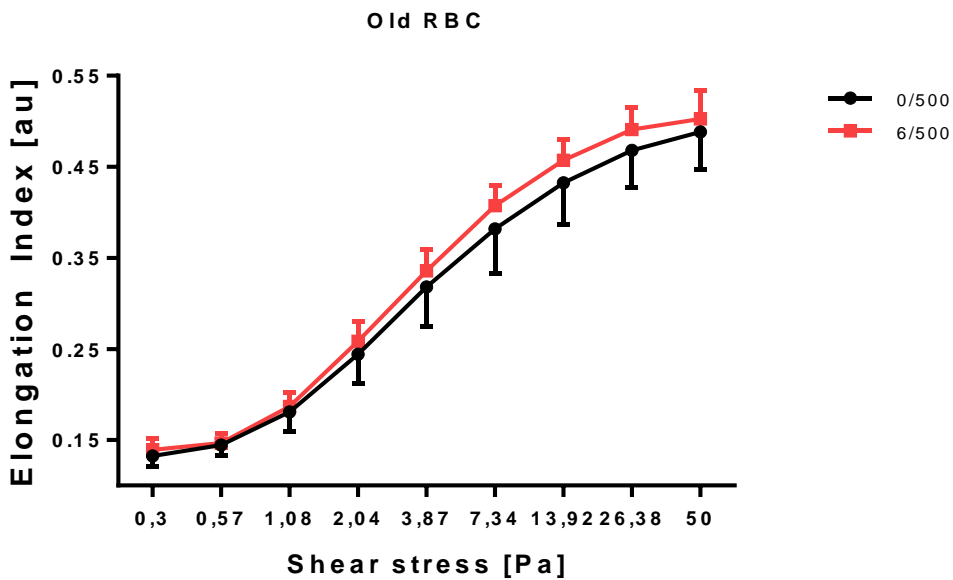


Abbildung 84: Verformbarkeit der alten RBC Fraktionen (hohe Dichte) im Direktvergleich 0h/6h bei Kondition 500.

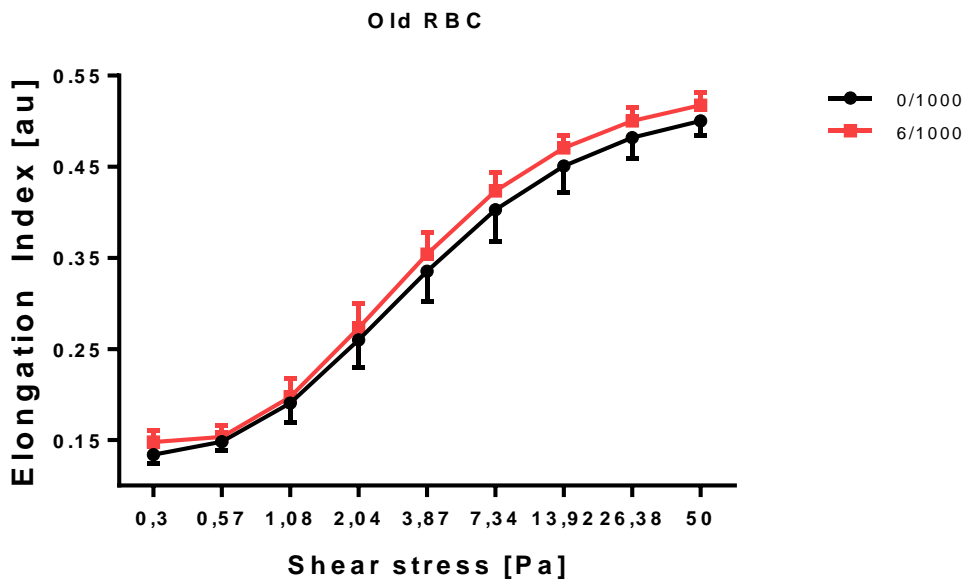


Abbildung 85: Verformbarkeit der alten RBC Fraktionen (hohe Dichte) im Direktvergleich 0h/6h bei Kondition 1000.

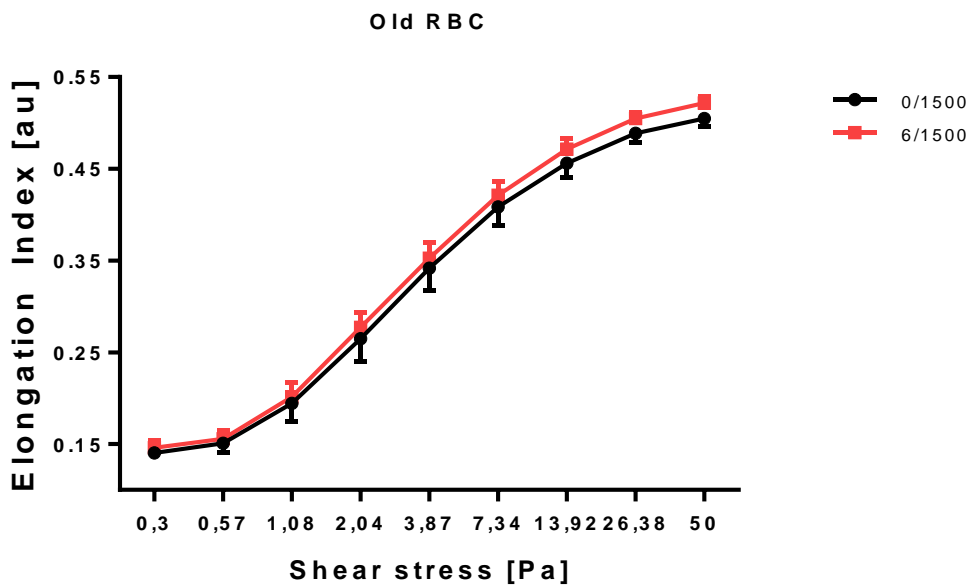


Abbildung 86: Verformbarkeit der alten RBC Fraktionen (hohe Dichte) im Direktvergleich 0h/6h bei Kondition 1500.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der SS1/2 EImax der einzelnen RBC-Fraktionen dargestellt. Die Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Effekt der Stoßwellenapplikation auf die Verformbarkeit der einzelnen Konditionen bei 0h/6h.

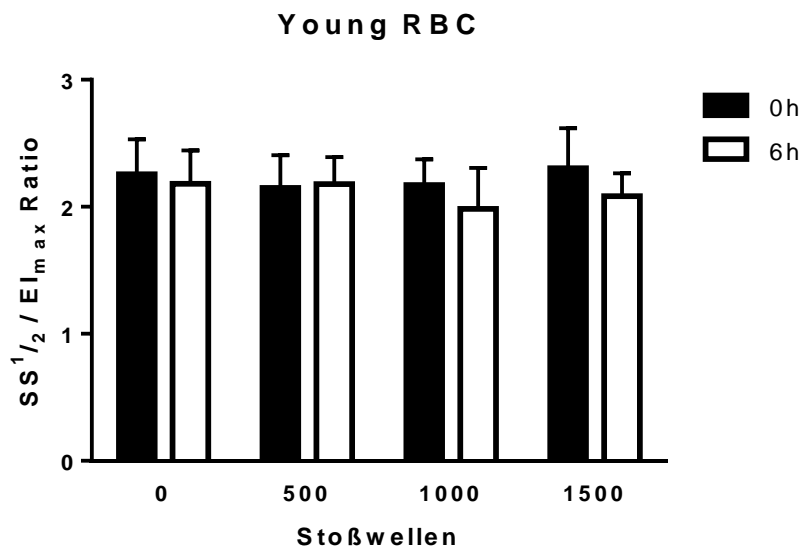


Abbildung 87: Ergebnisse des SS1/2 EImax der jungen RBC Fraktionen (niedrige Dichte) aller Konditionen und 0h/6h nach der Stoßwellenapplikation im Direktvergleich.

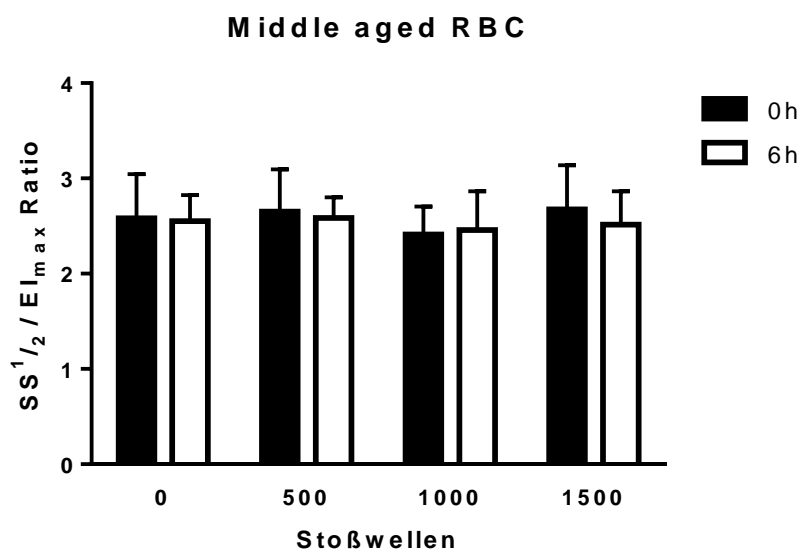


Abbildung 88: Ergebnisse des SS1/2 EImax der mittelalten RBC Fraktionen (mittlere Dichte) aller Konditionen und 0h/6h nach der Stoßwellenapplikation im Direktvergleich.

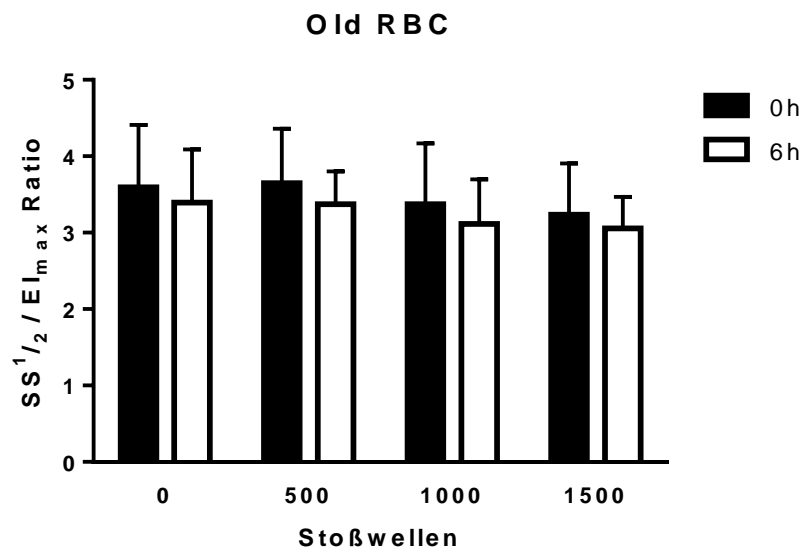


Abbildung 89: Ergebnisse des SS^{1/2} / EI_{max} der alten RBC Fraktionen (hohe Dichte) aller Konditionen und 0h/6h nach der Stoßwellenapplikation im Direktvergleich.

KAPITEL 11: DISKUSSION

11. DISKUSSION

11.2. AUSWIRKUNGEN EXTRAKORPORALER STOßWELLEN AUF DIE ERYTHROZYTEN- VERFORMBARKEIT

Ziel dieser Studie ist es die Auswirkungen von extrakorporalen Stoßwellen auf die Skelettmuskulatur zu untersuchen und ob die Ergebnisse Rückschlüsse auf eine verbesserte Skelettmuskelregeneration zulassen. Um zu evaluieren, inwiefern die Probanden durch die extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWT) dem Interventionsreiz ausgesetzt sind, wurden die Veränderungen des Blutflusses und der Sauerstoffversorgung im regenerierenden Gewebe erhoben.

11.1. Auswirkungen extrakorporaler Stoßwellen auf den Blutfluss

Die Ergebnisse der NIRS-Messung (Pilotstudie) zeigen zwar unmittelbar nach der Stoßwellenapplikation einen höheren Post-Wert (Abb. 31). Allerdings ist die Änderung nicht signifikant. Dieser Verlauf zeigt sich auch in der Hauptstudie. Als Grund dafür werden die interindividuellen Unterschiede in Bezug auf die prozentualen Schwankungen zwischen 72%-83% in der Versuchsgruppe und 65%-78% in der Kontrollgruppe vermutet. Des Weiteren könnten eine unterschiedliche Kapillarisation der Probanden als Ursache differenzierter Ergebnisse zu Calcagni et al (2011) und Frairia et al, 2012 herangezogen werden.

11.2. Auswirkungen extrakorporaler Stoßwellen auf die Erythrozytenverformbarkeit

Die Ergebnisse der Pilotstudie zeigen eine signifikante Veränderung ($p = .002$) der Erythrozytenverformbarkeit (EImax) 2h nach der Stoßwellenapplikation (Abb. 32). Demnach hat die Stoßwellenapplikation einen unmittelbaren Effekt auf die Zellmembranen. Da die Teilnehmer innerhalb der 24 Stunden nach der Stoßwellenapplikation keine sportlichen Aktivitäten durchgeführt haben, können externe Faktoren für die schädigenden Prozesse ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der Erythrozytenverformbarkeit (RBC-Verformbarkeit) aus der Hauptstudie geben eine differenzierte Darstellung wieder. Die Ergebnisse zeigen, dass der EImax (maximale Verformbarkeit) bei der Versuchsgruppe nach

der Stoßwellenapplikation unverändert blieb (Abb. 45). Dies zeigt sich sowohl im zeitlichen Verlauf des Innergruppenvergleichs als auch im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse stehen somit im Gegensatz zu der Pilotstudie. Die Gründe dafür könnten in den interindividuellen Unterschieden der Probanden liegen. Wie in Kapitel 2.2. erwähnt, sind für eine hohe Erythrozytenverformbarkeit im Wesentlichen eine niedrige Zytoplasmaviskosität, ein großes Oberflächen-Volumen-Verhältnis, die viskoelastischen Eigenschaften der Erythrozytenmembran (Stuart et al, 1984), sowie die Eigenschaften des Zytoskeletts (Oonishi et al, 1997; Tsuda et al, 2000 und van Dort et al, 2001) maßgebend. Es ist davon auszugehen, dass diese wesentlichen Eigenschaften zu heterogen ausgeprägt waren und somit zu differenzierten Ergebnissen geführt haben.

Die Ergebnisse SS1/2 der Pilotstudie zeigen zunächst eine Verminderung der Verformbarkeit während der Intervention mit Maximalwerten bei 2h. Bei 6h entspricht der Wert wieder dem Ausgangswert Pre. Bei 24h nimmt die Verformbarkeit gegenüber dem Pre-Wert ab. Diese Ergebnisse sind jedoch nicht signifikant (Abb. 33). Die Ergebnisse SS1/2 (Hauptstudie) zeigen innerhalb der Versuchsgruppe eine signifikante Verminderung der Verformbarkeit ($p = .007$) 6h nach der Stoßwellenapplikation (Abb. 47). Im Vergleich mit der Kontrollgruppe ist diese signifikante Veränderung nicht festzustellen.

Der SS1/2/EI_{max} Ratio (Pilotstudie) steigt von Pre zu 2h an und fällt bei 6h und 24h unter das Ausgangsniveau Pre wieder ab (Abb. 34). Auch hier zeigen sich keine signifikanten Einflüsse durch die ESWT. Anders verhält es sich bei der Hauptstudie. In Anlehnung an den SS1/2 kommt es bei dem SS1/2/EI_{max} Ratio in dem Innergruppenvergleich der Versuchsgruppe, zu einer signifikanten Verminderung der Verformbarkeit ($p = .007$) 6h nach der Stoßwellenapplikation. Gegenüber der Kontrollgruppe ist die Verformbarkeit nach der Stoßwellenapplikation jedoch nicht signifikant vermindert. In beiden Gruppen steigen die Werte, mit Ausnahme der Kontrollgruppe, mit Maximalwerten bei 6h an und fallen bei 24h wieder ab. Die Gründe für die Unterschiede zwischen der Pilotstudie und der Hauptstudie werden wieder in den zuvor beschriebenen interindividuellen Unterschieden der Probanden vermutet.

Da sich die Werte sowohl in der Pilotstudie als auch in der Hauptstudie nach 24h wieder verbessern, wird spekuliert, ob die extrakorporalen Stoßwellen nur bestimmte Erythrozytenpopulationen „schädigen“. So könnten „sehr alte“ Erythrozyten wesentlich sensibler auf die mechanischen Reize der Stoßwelle reagieren als „jüngere“ (Kasper et al, 2009). Die Ergebnisse der In-Vitro-Studie zeigen, dass die applizierten Stoßwellen die Erythrozytenpopulationen, die für die NO-Produktion verantwortlich sind und somit die Verformbarkeit limitieren, nicht schädigen. Es konnte gezeigt werden, dass sich mit zunehmender Stoßwellenapplikation (Kondition 1500), die Anzahl der „alten“/dichteren Erythrozyten erhöht. Dies zeigt sich sowohl in den unterschiedlichen Applikationsmengen (Konditionen) im Vollblut, als auch in den unterschiedlichen Fraktionen. Somit können destruktive Kavitationseffekte, die auf die Zellstrukturen der Erythrozyten wirken ausgeschlossen werden.

Allerdings zeigen sich Unterschiede im zeitlichen Direktvergleich bei 0h/6h. Die Proben zeigten nach 6h Rollern eine erhöhte Verformbarkeit, als die Proben nach 0h. So scheint das 6h Rollern die Verformbarkeit positiv zu beeinflussen. Der Unterschied könnte sich allerdings auch mit dem sinkenden Sauerstoffgehalt in dem Falcon-Röhrchen erklären lassen. Das NO wird dabei nicht aus der Neubildung durch die RBC-NOS, sondern aus dem bestehenden NO-Metabolismus der Erythrozyten gebildet (Grau et al, 2013). Als mögliche Quelle dient RBC-Nitrit, dass durch Desoxyhämoglobin zu NO reduziert werden kann. Da durch den sinkenden Sauerstoffgehalt der Anteil des Desoxyhämoglobin steigt, ist die vermehrte NO-Bildung aus Nitrit eine denkbare Erklärung (Bor-Kucukatay et al, 2003; Kleinbongard et al, 2006; Özüyaman et al, 2008 und Grau et al, 2013).

11.3. Auswirkungen extrakorporaler Stoßwellen auf die NO-Verfügbarkeit

11.3. AUSWIRKUNGEN EXTRAKORPORALER STOßWELLEN AUF DIE NO-VERFÜGBARKEIT

Die Ergebnisse der NO-Messungen der Pilotstudie zeigen eine signifikante Verringerung des RBC-Nitrits ($p = .010$) 2h nach der Stoßwellenapplikation und einer Rückkehr zum Ausgangsniveau (Pre) nach 24h (Abb. 35). Im Gegensatz zur Pilotstudie zeigen die Ergebnisse des RBC-Nitrits in der Hauptstudie keine signifikante Verringerung in der Versuchsgruppe (Abb. 51). Darüber hinaus sind auch unterschiedliche Verläufe des RBC-Nitrits zwischen Pilotstudie und Hauptstudie festzustellen. Das gilt auch im Vergleich zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe in der Hauptstudie. In der Versuchsgruppe überschreiten die Werte 2h nach der Stoßwellenapplikation das Ausgangsniveau (Pre) und kehren nach 6h wieder zurück. Nach 24h kommt es zu einer erneuten Überschreitung des Ausgangsniveau (Pre). Diese Schwankungen sind in der Kontrollgruppe nicht festzustellen (Abb. 52). Von daher besteht die Vermutung, dass die Stoßwellen das RBC-Nitrit beeinflussen können. Bei der Betrachtung der interindividuellen Daten zeigen sich jedoch schon Unterschiede in den Ausgangsdaten. Ob die Ergebnisse der RBC-Nitrit-Messungen der Versuchsgruppe einen Messfehler aufweisen oder ob tatsächlich eine Varianz vorliegt, konnte im Nachgang nicht mehr geklärt werden.

Auch bei den Ergebnissen des Plasma-Nitrits in der Pilotstudie ist eine nicht signifikante Veränderung zu beobachten. Hier erfolgt die Verringerung unmittelbar nach der Stoßwellenapplikation (Abb. 36). Das Plasma-Nitrit der Versuchsgruppe in der Hauptstudie zeigt eine nicht signifikante Erhöhung bei 6h durch die Intervention und eine Annäherung an das Ausgangsniveau (Pre) bei 24h (Abb. 53). Im Vergleich zeigen die Versuchsgruppe (Abb. 53) und die Kontrollgruppe (Abb. 54) unterschiedliche Verläufe. Damit zeigen die Ergebnisse der Hauptstudie und die der Pilotstudie unterschiedliche Verläufe nach der Intervention. Die Gründe dafür lassen sich auch hier in den interindividuellen Unterschieden vermuten.

11.4. Fazit

11.4. FAZIT

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass extrakorporale Stoßwellen die Skelettmuskelregeneration verbessern können (vgl. Zissler et al, 2017). Die Mechanotransduktion, als Mechanismus, stellt dabei den entscheidenden Faktor dar (Frairia et al, 2012), da besonders Muskelzellen sensitiv auf diesen Effekt reagieren (Tidball, 2002 und Hornberger et al, 2004). Die vielfältigen Wirkungen der Mechanotransduktion auf zellulärer und subzellulärer Ebene sind bereits in der Übersicht von Bloch et al (2012) ausführlich beschrieben. Beiträge von Gillies & Lieherr, (2011) und Moyer & Wagner, (2011) präsentieren weitere Aspekte der Regenerations- bzw. Heilungsprozesse über diesen Mechanismus. Bereits Calcagni et al (2011) hatten in tierexperimentellen Studien gezeigt, dass extrakorporale Stoßwellen auch zu einem erhöhten kapillaren Blutfluss in den quergestreiften Hautmuskeln führen können. Experimentelle Studien zeigen, dass die einfache Anwendung der Stoßwellen im Fall einer kritischen Hinterlaufischämie (critical limb ischemia) bei Ratten, zur Verbesserung des Blutflusses führt. Da die Teilnehmer dieser Studie, wie bei Calcagni et al (2011), einmalig einer Stoßwellenapplikation unterzogen wurden, könnten die Faktoren Reizart, Reizdauer, Reizintensität, Reizhäufigkeit und Reizdichte Gründe für die Unterschiede zu den bereits bekannten Studien darstellen. Park et al (2004) konnten bei Untersuchungen zu humanen mesenchymalen Stammzellen feststellen, dass diese mechanosensitiv und divergent auf verschiedene Stoßwellenapplikationen reagieren.

In dieser Studie konnte kein klarer positiver Einfluss der extrakorporalen Stoßwellentherapie auf die Skelettmuskulatur in Bezug der untersuchten Parameter festgestellt werden (Null-Hypothese). Die Ergebnisse der Hauptstudie zeigen nur im Innergruppenvergleich der Versuchsgruppe signifikante Unterschiede, jedoch nicht im Vergleich mit den Kontrollgruppen. Dies ist jedoch Voraussetzung für die Darstellung eines Effektes. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse der Pilot- und der Hauptstudie unterschiedliche Reaktionen auf die Stoßwellenapplikation. Die Gründe dafür lassen sich in den interindividuellen Unterschieden der Probanden in Bezug auf die Kapillarisation, der wesentli-

chen Eigenschaften der Erythrozytenverformbarkeit (Stuart et al, 1984), sowie in den Eigenschaften des Zytoskeletts (Oonishi et al, 1997; Tsuda et al, 2000, van Dort et al, 2001 und Grau et al, 2013) und in der NO-Verfügbarkeit vermuten. Da bei dieser Studie gesunde und unverletzte Probanden teilgenommen haben wird vermutet, dass für einen Ausgleich der interindividuellen Unterschiede wesentlich höhere Stoßwellenintensitäten notwendig sind. Denn in der In-Vitro-Studie zeigte sich der Einfluss der Stoßwellen erst bei einer höheren Applikationsmenge (Kondition 1000 und 1500). Darüber hinaus wird angenommen, dass die interindividuellen Unterschiede bei verletzten Probanden wie bei Zissler et al, (2017) auf einem niedrigeren Skalenniveau liegen und deshalb geringere Stoßwellenintensitäten für einen Effekt ausgereicht haben. Als Begründung wird angeführt, dass bei verletzten Probanden die wesentlichen Eigenschaften für die Erythrozytenverformbarkeit verringert sowie deren Zytoskelett signifikant „steifer“ sind (van Dort, 2001). Das Gleiche wird auch in Bezug auf die ECM des verletzten Gewebes angenommen. Da sich mechanische Wellen (Stoßwellen) in einem festen Medium stärker ausbreiten können (vgl. Kapitel 4) wäre die Folge, dass geringere Stoßwellenintensitäten notwendig wären, um Effekte auf die untersuchten Parameter auszulösen (vgl. Mott & Helmke, 2007). In diesem Zusammenhang kann vermutet werden, dass die interindividuellen Unterschiede in Bezug auf den Blutfluss, die Erythrozyten und die NO-Verfügbarkeit ignoriert werden können. Aufgrund der komplexen Faktoren, die durch die ESWT in der Skelettmuskelregeneration ausgelöst werden, sind weiterführende Studien notwendig. Abschließend wird aber davon ausgegangen, dass die Stoßwellenenergien hier nicht ausgereicht haben, bzw. zu gering waren, um signifikante Mechanotransduktionseffekte auszulösen (vgl. Jaalouk & Lammerding, 2009). Somit kommt es zu einer Verzerrung der Ergebnisse (Bias) in Bezug auf vergleichbare Studien (Calcagni et al, 2011; Frairia et al. 2012 und Zissler et al, 2017).

11.5. Relevanz der Sauerstoffversorgung für die Skelettmuskelregeneration

11.5. RELEVANZ DER SAUERSTOFFVERSORGUNG FÜR DIE SKELETTMUSKELREGENERATION

Die Gewebeversorgung mit Sauerstoff stellt, wie bereits mehrfach angeführt, bei der Regeneration der Skelettmuskulatur eine wesentliche Bedeutung dar (Goertz et al 2012). Mechanotransduktionseffekte, durch extrakorporale Stoßwellen, können auch zu chronischen Anpassungen der Kapillaren (Angiogenese) führen, wodurch die Wundheilung verbessert wird (Mittermayr et al, 2012 und Frairia et al, 2012). Dabei konnte gezeigt werden, dass auch Spaltprodukte der ECM einen wichtigen Einfluss auf die Angiogenese (Kapillarneubildung) und darüber wiederum erheblichen Einfluss auf die Geweberegeneration haben (Suhr et al, 2009). Während der einzelnen Phasen der Skelettmuskelregeneration finden eine Reihe von biologischen Veränderungen statt. Faktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren und Zytokine, werden in einer spezifischen zeitlichen Folge freigesetzt bzw. aktiviert (Smith et al, 2008 und Gharaibeh et al, 2012), die für die Muskelregeneration von wesentlicher Bedeutung sind. Inwieweit die extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWT) eine Regenerationsförderung durch Veränderung der ECM und der Wachstumsfaktorenfreisetzung in der Skelettmuskulatur hervorruft, ist bisher nicht bekannt. Hier könnte die Stoßwellenbehandlung jedoch eine wichtige Rolle spielen (Abd Ellah et al, 2010). Einer der wichtigsten Vorteile der Stoßwellentherapie ist, dass sie nicht invasiv ist und dass sie kaum Nebenwirkungen hat (Nishida et al, 2004 und Ito et al, 2011). Daher ist sie gut steuerbar und mehrfach anwendbar. Sie könnte eine sehr nützliche Methode für die Induktion der Angiogenese darstellen (Ito et al, 2011), da es bei steigendem Belastungsreiz - neben akuten - auch zu chronischen, post-translatorischen Anpassungen der Proteine der ECM kommt.

11.6. Relevanz der ESWT für die Skelettmuskelregeneration

11.6. RELEVANZ DER ESWT FÜR DIE SKELETTMUSKEL-REGENERATION

Die pragmatischen Behandlungsmethoden (körperliche Ruhe, Eis etc.) zeigen nur eingeschränkte Effizienz für die Hemmung der Fibrose nach einer Muskelverletzung und auch medikamentöse Behandlungen haben insgesamt nur einen geringen Effizienzgrad (Almekinders, 1993 und Jarvinen & Lehto, 1993). Aktuell wird zur Verbesserung der Muskelregeneration der Einsatz von mesenchymalen Progenitorzellen zur Entwicklung zell-basierter Therapien untersucht und dabei der zeitliche Verlauf der Muskelheilung in Abhängigkeit des Schweregrades, in Bezug auf die strukturelle und funktionelle Wiederherstellung des verletzten Gewebes analysiert (Qazi et al, 2015; Pumberger et al, 2016; Qazi et al, 2017). Dabei erscheint es wichtig die verschiedenen Phasen der Muskelregeneration zu berücksichtigen. Liu et al (2018) beschreiben weitere ähnliche Methoden. Es stellt sich die Frage nach neuen Therapieansätzen, die wie weniger aufwendig sind, die die Muskelregeneration unterstützen und vor allem eine strukturelle und funktionelle Wiederherstellung des Muskelgewebes ohne Narbenbildung fördern. Die extrakorporale Stoßwellentherapie könnte einen solchen, nicht-invasiven Therapieansatz darstellen. Die Studie von Zissler et al, (2017) zeigt hier einen konkreten Ansatz. Während der Phasen der Skelettmuskelregeneration finden eine Reihe von biologischen Veränderungen statt, die für die Muskelregeneration von wesentlicher Bedeutung sind. Unter anderem werden Faktoren wie z.B. Wachstumsfaktoren und Zytokine in einer spezifischen zeitlichen Folge freigesetzt bzw. aktiviert (Smith et al, 2008 und Gharai-beh et al, 2012). Diese Prozesse könnten bei richtiger Anwendung mit der ESWT beschleunigt werden. Es erscheint jedoch zum jetzigen Zeitpunkt notwendig die Mechanismen aufzuklären, über welche Faktoren die extrakorporale Stoßwellentherapie die Regeneration der Skelettmuskulatur verbessern kann. Die bisherigen Forschungserkenntnisse machen es schwer, die Relevanz des Stoßwelleneffektes für die Muskelregeneration einzuordnen und gegenüber anderen Methoden (z.B. Kompression) abzugrenzen. Hinzu kommt, dass die meisten Forschungserkenntnisse auf tierexperimentellen Studien beruhen und/oder unter experimentellen Bedingungen untersucht wurden und nicht zwangsläufig auf den Menschen übertragbar sind.

KAPITEL 12: AUSBLICK

12. AUSBLICK

12.1 BESTIMMUNG WEITERER ZELLULARER FAKTOREN IN DER ESWT

Die Ergebnisse der Studie lassen vermuten, dass Grenzwerte bzw. Grenzbereiche in Bezug der Stoßwellenintensitäten, wie z.B. Energie- bzw. Reizintensität und/oder auch eine Reizdichte, Reizdauer sowie eine Reizhäufigkeit existieren, ab denen Regenerationseffekte ausgelöst werden (Abb. 65 & Abb. 66). Jaalouk & Lammerding (2009) konnten bereits nachweisen, dass unterschiedliche Stoßwellenintensitäten zu unterschiedlichen Zellreaktionen führen. Bei der Ermittlung der Grenzwerte sollte auch die jeweilige Wundheilungsphase mitberücksichtigt werden. Denn es ist davon auszugehen, dass die Grenzwerte mit steigendem Heilungsverlauf zunehmen (vgl. Zissler et al, 2017). Für weitere Untersuchungen bieten sich daher experimentelle Designs mit Gruppen unterschiedlicher Wundheilungsphasen und unverletzten Probanden an. Dabei sollen die Grenzwerte bzw. Grenzbereiche für die entsprechenden Wundheilungsphasen ermittelt werden, ab denen die Mechanotransduktionseffekte die jeweiligen Regenerationseffekte auslösen. Neben der Bestimmung mechanischer Faktoren, sollten gleichzeitig weitere zelluläre Faktoren untersucht werden. Dabei ist vorab zu beachten, dass die einwirkenden Stoßwellenreize zelldichteabhängig, unterschiedliche Effekte bewirken (Mott & Helmke, 2007) und dass sich zytoskelettäre Veränderungen zelldichteabhängig zeigen. Das bedeutet, dass zur Bestimmung der Regenerationseffekte sowohl die Dichotomie zwischen den Grenzwerten bzw. Grenzbereichen und den zellulären Faktoren berücksichtigt werden müssen. Dabei sollte der Zusammenhang zwischen der Stoßwellenintensität, den Proteinen und der extrazellulären Matrix (ECM) untersucht werden (vgl. Meazzini et al, 1998), da die ECM bei der Regeneration des Gewebes und der Zellen eine Schlüsselrolle einnimmt (Bloch, 2012). Dabei sollte auch die Menge des Desoxyhämoglobins betrachtet werden (Crawford et al, 2006). Sims et al (1992) konnten diesbezüglich Zellverformungen bei Behandlungen mit 0,5 Bar (50.000 Pa) und 0,077 mJ/mm² nachweisen, die zu temporär differierenden Ergebnissen führten.

12.2. Weiterführende Hypothesen

12.2.
WEITERFÜHRENDE
HYPOTHESEN

Zur Bestimmung weiterer zellulärer Faktoren in der ESWT, werden folgende Hypothesen aufgestellt:

H1: Die Skelettmuskelregeneration wird maßgeblich über die extrazelluläre Matrix ausgelöst.

H2: Die Wundheilungsphase der Skelettmuskelregeneration beeinflusst die Stoßwellenintensitäten.

H3: Es existieren Grenzwerte bzw. Grenzbereiche in Bezug der Stoßwellenintensitäten und der jeweiligen Wundheilungsphase, ab denen die extrazelluläre Matrix die Skelettmuskelregeneration ausgelöst.

KAPITEL 13: LITARATUR

13. LITERATUR



ABD ELLAH, M., KREMSER, C., PALLWEIN, L., AIGNER, F., SCHOCKE, M., PESCHEL, R., PEDROSS, F., PINGGERA, G. M., WOLF, C., ALSHARKAWY, M. A., JASCHKE, W., & FRAUSCHER, F. (2010). *Changes of renal blood flow after ESWL: assessment by ASL MR imaging, contrast enhanced MR imaging, and renal resistive index.* *European journal of radiology*, 76(1), 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2009.05.016>

AICHER, A., HEESCHEN, C., SASAKI, K., URBICH, C., ZEIHNER, A. M., & DIMMELER, S. (2006). *Low-energy shock wave for enhancing recruitment of endothelial progenitor cells: a new modality to increase efficacy of cell therapy in chronic hind limb ischemia.* *Circulation*, 114(25), 2823–2830. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.628623>

AOKI T. (1990). *Continuous flow determination of nitrite with membrane separation/chemiluminescence detection.* *Biomedical chromatography: BMC*, 4(3), 128–130. <https://doi.org/10.1002/bmc.1130040311>

ALMEKINDERS L. C. (1993). *Anti-inflammatory treatment of muscular injuries in sports.* *Sports medicine (Auck-land, N.Z.)*, 15(3), 139–145. <https://doi.org/10.2165/00007256-199315030-00001>

ALVES, E. M., ANGRISANI, A. T., & SANTIAGO, M. B. (2009). *The use of extracorporeal shock waves in the treatment of osteonecrosis of the femoral head: a systematic review.* *Clinical rheumatology*, 28(11), 1247–1251. <https://doi.org/10.1007/s10067-009-1231-y>

AYAD S, BOOT-HANFORD RP, HUMPHRIES M.J., KADLER KE, SHUTTLEWORTH CA. (1998). *The Extracellular Matrix (Facts Book).* Academic Press (Harcourt Brace & Company, Publishers), Printed in Great Britain, S. 3 ff, ISBN 0-12-068911-1.

BACHL N, LÖLLGEN H, TSCHAN H, WACKERHAGE H, WESSNER B. (2017). *Molekulare Sport- und Leistungsphysiologie: Molekulare, zellbiologische und genetische Aspekte der körperlichen Leistungsfähigkeit.* Springer 2017, 120

BANES, A. J., TSUZAKI, M., YAMAMOTO, J., FISCHER, T., BRIGMAN, B., BROWN, T., & MILLER, L. (1995). *Mechanoreception at the cellular level: the detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical signals.* *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 73(7-8), 349–365. <https://doi.org/10.1139/o95-043>

BANSI, J., BLOCH, W., GAMPER, U., & KESSELRING, J. (2013). *Training in MS: influence of two different endurance training protocols (aquatic versus overland) on cytokine and neurotrophin concentrations during three week randomized controlled trial.* *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 19(5), 613–621. <https://doi.org/10.1177/1352458512458605>

BASKURT, O. K., HARDEMAN, M. R., UYUKLU, M., ULKER, P., CENGIZ, M., NEMETH, N., SHIN, S., ALEXY, T., & MEISELMAN, H. J. (2009). *Parameterization of red blood cell elongation index-shear stress curves obtained.* *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 69(7), 777–788. <https://doi.org/10.3109/00365510903266069>

BASKURT, O. K., & MEISELMAN, H. J. (2013). *Red blood cell mechanical stability test.* *Clinical hemorheology and microcirculation*, 55(1), 55–62. <https://doi.org/10.3233/CH-131689>

BASKURT, O. K., & MEISELMAN, H. J. (2013). *Data reduction methods for ektacytometry in clinical hemorheology.* *Clinical hemorheology and microcirculation*, 54(1), 99–107. <https://doi.org/10.3233/CH-2012-1616>

BIZJAK, D. A., BRINKMANN, C., BLOCH, W., & GRAU, M. (2015). *Increase in Red Blood Cell-Nitric Oxide Synthase Dependent Nitric Oxide Production during Red Blood Cell Aging in Health and Disease: A Study on Age Dependent Changes of Rheologic and Enzymatic Properties in Red Blood Cells.* *PloS one*, 10(4), e0125206. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125206>

BLOCH W. (2010). *Physiologische Muskelheilung und Störfaktoren.* In: **MÜLLER-WOHLFAHRT HW, UEBLACKER P, HÄNSEL L (HRSG.).** *Muskelverletzungen im Sport.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart – New York, 2010, S. 103-23.

BLOCH W., SUHR F., ZIMMER P. (2012). *Molekulare Mechanismen der Herz- und Gefäßanpassung durch Sport. Einfluss von Epigenetik, Mechanotransduktion und freien Radikalen.* [Molecular mechanisms of exercise-induced cardiovascular adaptations: Influence of epigenetics, mechanotransduction and free radicals] *Herz*. 2012; 37(5): 508-17.

BLOCH W. (2017). *Muskelverletzungen – Von ultrastrukturell bis strukturell* In: *Orthopädie & Rheuma.* Ausgabe 6. 2017; 36-39 Springer Verlag.

BLOCH W, ENGELHARDT M, HOTFIEL T ET AL. (2017). *Anatomie/Physiologie der Muskelheilung.* In: *Muskel- und Sehnenverletzungen.* Verlags-Comptoir Rolle; 2017; 59–73.

BLOCH W. (2019). *Entzündungen und Geweberegeneration / eine wechselnde Wirkung.* In: *Sports Orthopaedics and Traumatology.* Volume 35. Issue 4. December 2019. Pages 364-371.

BOBROWSKA-HÄGERSTRAND, M., HÄGERSTRAND, H., & IGLIC, A. (1998). *Membrane skeleton and red blood cell vesiculation at low pH.* *Biochimica et biophysica acta*, 1371(1), 123–128. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(98\)00011-x](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(98)00011-x)

BOR-KUCUKATAY, M., WENBY, R. B., MEISELMAN, H. J., & BASKURT, O. K. (2003). *Effects of nitric oxide on red blood cell deformability.* *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 284(5), H1577–H1584. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00665.2002>

BRINKMEIER H. (2014). *Zum Pathomechanismus der Duchenne-Muskeldystrophie: Neue Erkenntnisse zur Muskelfaserdegeneration und Fibrose.* In. *Elektronischer Forschungs-Newsletter für die Universitätsmedizin Greifswald* Ausgabe 3/2014

BRUCKDORFER R. (2005). *The basics about nitric oxide.* *Molecular aspects of medicine*, 26(1-2), 3–31. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.09.002>

CALCAGNI, M., CHEN, F., HÖGGER, D. C., LINDENBLATT, N., KEEL, M., GIOVANOLI, P., & CONTALDO, C. (2011). *Microvascular response to shock wave application in striated skin muscle.* *The Journal of surgical research*, 171(1), 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2009.12.011>

CAMERON-SMITH D. (2002). *Exercise and skeletal muscle gene expression.* *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 29(3), 209–213. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2002.03621.x>

CANTU-MEDELLIN, N., VITTURI, D. A., RODRIGUEZ, C., MURPHY, S., DORMAN, S., SHIVA, S., ZHOU, Y., JIA, Y., PALMER, A. F., & PATEL, R. P. (2011). *Effects of T- and R-state stabilization on deoxyhemoglobin-nitrite reactions and stimulation of nitric oxide signaling.* Nitric oxide: biology and chemistry, 25(2), 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2011.01.006>

CHEN, L. Y., & MEHTA, J. L. (1998). *Evidence for the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function.* Journal of cardiovascular pharmacology, 32(1), 57–61. <https://doi.org/10.1097/00005344-199807000-00009>

CHEN, Y. J., WANG, C. J., YANG, K. D., KUO, Y. R., HUANG, H. C., HUANG, Y. T., SUN, Y. C., & WANG, F. S. (2004). *Extracorporeal shock waves promote healing of collagenase-induced Achilles tendinitis and increase TGF-beta1 and IGF-I expression.* Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society, 22(4), 854–861. <https://doi.org/10.1016/j.orthres.2003.10.013>

CHIEN S. (1987). *Red cell deformability and its relevance to blood flow.* Annual review of physiology, 49, 177–192. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.49.030187.001141>

CHURCH C. C. (1989). *A theoretical study of cavitation generated by an extracorporeal shock wave lithotripter.* The Journal of the Acoustical Society of America, 86(1), 215–227. <https://doi.org/10.1121/1.398328>

CIAMPA, A. R., DE PRATI, A. C., AMELIO, E., CAVALIERI, E., PERSICHINI, T., COLASANTI, M., MUSCI, G., MARLINGHAUS, E., SUZUKI, H., & MARIOTTO, S. (2005). *Nitric oxide mediates anti-inflammatory action of extracorporeal shock waves.* FEBS letters, 579(30), 6839–6845. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.11.023>

COOPER, G.M. (1995) *Oncogenes.* Jones and Bartlett Publishers, Boston.1995

CORTESE-KROTT, M. M., RODRIGUEZ-MATEOS, A., SANSONE, R., KUHNLE, G. G., THASIAN-SIVARAJAH, S., KRENZ, T., HORN, P., KRISP, C., WOLTERS, D., HEIB, C., KRÖNCKE, K. D., HOGG, N., FEELISCH, M., & KELM, M. (2012). *Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease.* Blood, 120(20), 4229–4237. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-442277>

COSBY, K., PARTOVI, K. S., CRAWFORD, J. H., PATEL, R. P., REITER, C. D., MARTYR, S., YANG, B. K., WACLAWIW, M. A., ZALOS, G., XU, X., HUANG, K. T., SHIELDS, H., KIM-SHAPIRO, D. B., SCHECHTER, A. N., CANNON, R. O., 3RD, & GLADWIN, M. T. (2003). *Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation.* Nature medicine, 9(12), 1498–1505. <https://doi.org/10.1038/nm954>

COX R.D. (1980). *Determination of nitrate and nitrite at the parts per billion level by chemiluminescence.* Anal Chem. 52, 332-335 (1980).

CRAWFORD, J. H., ISBELL, T. S., HUANG, Z., SHIVA, S., CHACKO, B. K., SCHECHTER, A. N., DARLEY-USMAR, V. M., KERBY, J. D., LANG, J. D., JR, KRAUS, D., HO, C., GLADWIN, M. T., & PATEL, R. P. (2006). *Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation.* Blood, 107(2), 566–574. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2668>

CRUM L. A. (1988). *Cavitation microjets as a contributory mechanism for renal calculi disintegration in ESWL.* The Journal of urology, 140(6), 1587–1590. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)42132-x](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)42132-x)



DELICONSTANTINOS, G., VILLIOTOU, V., STAVRIDES, J. C., SALEMES, N., & GOGAS, J. (1995). *Nitric oxide and peroxynitrite production by human erythrocytes: a causative factor of toxic anemia in breast cancer patients.* *Anticancer research*, 15(4), 1435–1446.

DELIUS, M., DRAENERT, K., AL DIEK, Y., & DRAENERT, Y. (1995). *Biological effects of shock waves: in vivo effect of high energy pulses on rabbit bone.* *Ultrasound in medicine & biology*, 21(9), 1219–1225. [https://doi.org/10.1016/0301-5629\(95\)00030-5](https://doi.org/10.1016/0301-5629(95)00030-5)

DE BLEYE, C., CHAVEZ, P. F., MANTANUS, J., MARINI, R., HUBERT, P., ROZET, E., & ZIEMONS, E. (2012). *Critical review of near-infrared spectroscopic methods validations in pharmaceutical applications.* *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 69, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.02.003>

DIONG, J., & KAMPER, S. J. (2014). *Cold water immersion (cryotherapy) for preventing muscle soreness after exercise.* *British journal of sports medicine*, 48(18), 1388–1389. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2013-092433>

DRIESSEN, G. K., SCHEIDT-BLEICHERT, H., SOBOTA, A., INHOFFEN, W., HEIDTMANN, H., HAEST, C. W., KAMP, D., & SCHMID-SCHÖNBEIN, H. (1982). *Capillary resistance to flow of hardened (diamide treated) red blood cells (RBC).* *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 392(3), 261–267. <https://doi.org/10.1007/BF00584307>

DRIESSEN, G. K., FISCHER, T. M., HAEST, C. W., INHOFFEN, W., & SCHMID-SCHÖNBEIN, H. (1984). *Flow behaviour of rigid red blood cells in the microcirculation.* *International journal of microcirculation, clinical and experimental*, 3(2), 197–210.

FRAIRIA, R., & BERTA, L. (2012). *Biological effects of extracorporeal shock waves on fibroblasts.* A review. *Muscles, ligaments and tendons journal*, 1(4), 138–147.

FERRARI, M., & QUARESIMA, V. (2012). *A brief review on the history of human functional near-infrared spectroscopy (fNIRS) development and fields of application.* *NeuroImage*, 63(2), 921–935. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.03.049>

FILIPOVIC, A., KLEINÖDER, H., PLÜCK, D., HOLLMANN, W., BLOCH, W., & GRAU, M. (2015). *Influence of Whole-Body Electrostimulation on Human Red Blood Cell Deformability.* *Journal of strength and conditioning research*, 29(9), 2570–2578. <https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000000916>

FILIPOVIC, A., GRAU, M., KLEINÖDER, H., ZIMMER, P., HOLLMANN, W., & BLOCH, W. (2016). *Effects of a Whole-Body Electrostimulation Program on Strength, Sprinting, Jumping, and Kicking Capacity in Elite Soccer Players.* *Journal of sports science & medicine*, 15(4), 639–648.

FLOTTE T.J, FRISOLI J.K, GOETSCHKES M, DOUKAS A.G. (1991). *Laser-induced shock wave effects on red blood cells.* *Proceedings Volume 1427, Laser-Tissue Interaction II; (1991)* <https://doi.org/10.1117/12.44087>

FONTIJN A., SABADELL A.J., & RONCO R.J. (1970). *Homogenous chemiluminescent measurement of nitric oxide with ozone. Implications for continuous selective monitoring of gaseous air pollutants.* *Anal Chem.* 42, 579 (1970).

FORSSMAN B, HEPP W. (1980). *Stoßwellen in der Medizin.* *Medizin in unserer Zeit*; 4: 10.

GHARAIBEH, B., CHUN-LANSINGER, Y., HAGEN, T., INGHAM, S. J., WRIGHT, V., FU, F., & HUARD, J. (2012). *Biological approaches to improve skeletal muscle healing after injury and disease.* Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews, 96(1), 82–94. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21005>

GOERTZ, O., LAUER, H., HIRSCH, T., RING, A., LEHNHARDT, M., LANGER, S., STEINAU, H. U., & HAUSER, J. (2012). *Extracorporeal shock waves improve angiogenesis after full thickness burn.* Burns: journal of the International Society for Burn Injuries, 38(7), 1010–1018. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2012.02.018>

GOLDSPINK G. (1999). *Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload.* Journal of anatomy, 194 (Pt 3), 323–334. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1999.19430323.x>

GRAU, M., HENDGEN-COTTA, U. B., BROUZOS, P., DREXHAGE, C., RASSAF, T., LAUER, T., DEJAM, A., KELM, M., & KLEINBONGARD, P. (2007). *Recent methodological advances in the analysis of nitrite in the human circulation: nitrite as a biochemical parameter of the L-arginine/NO pathway.* Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences, 851(1-2), 106–123. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.02.002>

GRAU, M. (2010). *Relevanz des enzymatischen NO*-Synthese im Erythrozyten: Protektion gegen reaktive Sauerstoffspezies.* Dissertation an der RWTH Aachen University. 2010

GRAU, M., PAULY, S., ALL, J., WALPURGIS, K., THEVIS, M., BLOCH, W., & SUHR, F. (2013). *RBC-NOS-dependent S-nitrosylation of cytoskeletal proteins improves RBC deformability.* PloS one, 8(2), e56759. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056759>

GUTERSOHN A., CASPARI G., MARLINGHAUS E. (2004). *Autoangiogenesis induced by cardiac shock wave therapy (CSWT) increases myocardial perfusion in endstage CAD patients.* 70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz und Kreislaufforschung, Mannheim, 15.–17. April 2004; Abstract.

HAMPL V., WALTERS C.L., & ARCHER S.L. (1996). *Determination of nitric oxide by the chemiluminescence reaction with ozone.* In: Methods in nitric oxide research. Feelisch M.; Stamler J.S.; eds. John Wiley & Sons Ltd., Chichester (1996).

HARDEMAN, M. R., DOBBE, J. G., & INCE, C. (2001). *The Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer.* Clinical hemorheology and microcirculation, 25(1), 1–11.

HOLLOSZY J. O. (1976). *Adaptations of muscular tissue to training.* Progress in cardiovascular diseases, 18(6), 445–458. [https://doi.org/10.1016/0033-0620\(76\)90011-6](https://doi.org/10.1016/0033-0620(76)90011-6)

HOLLOSZY, J. O., & COYLE, E. F. (1984). *Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences.* Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology, 56(4), 831–838. <https://doi.org/10.1152/jappl.1984.56.4.831>

HORNBERGER, T. A., & ESSER, K. A. (2004). *Mechanotransduction and the regulation of protein synthesis in skeletal muscle.* The Proceedings of the Nutrition Society, 63(2), 331–335. <https://doi.org/10.1079/PNS2004357>

HOTFIEL T., BILY W., BLOCH W., GOKELERD A., KRIFTER R.M., MAYER F., WEISSKOPF L., ENGELHARDT M. (2017). *Konservative Therapie von Sehnenverletzungen.* Sports Orthopedics and Traumatology. Volume 33, Issue 3, September 2017, Pages 258-269.

HUANG, H., KAMM, R. D., & LEE, R. T. (2004). *Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology.* American journal of physiology. Cell physiology, 287(1), C1–C11. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00559.2003>

HUANG, Z., SHIVA, S., KIM-SHAPIRO, D. B., PATEL, R. P., RINGWOOD, L. A., IRBY, C. E., HUANG, K. T., HO, C., HOGG, N., SCHECHTER, A. N., & GLADWIN, M. T. (2005). *Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control.* The Journal of clinical investigation, 115(8), 2099–2107. <https://doi.org/10.1172/JCI24650>

HUDLICKÁ O. (1985). *Development and adaptability of microvasculature in skeletal muscle.* The Journal of experimental biology, 115, 215–228. <https://doi.org/10.1242/jeb.115.1.215>

HUISSTEDE, B. M., GEBREMARIAM, L., VAN DER SANDE, R., HAY, E. M., & KOES, B. W. (2011). *Evidence for effectiveness of Extracorporeal Shock-Wave Therapy (ESWT) to treat calcific and non-calcific rotator cuff tendinosis--a systematic review.* Manual therapy, 16(5), 419–433. <https://doi.org/10.1016/j.math.2011.02.005>

ITO, K., FUKUMOTO, Y., & SHIMOKAWA, H. (2011). *Extracorporeal shock wave therapy for ischemic cardiovascular disorders.* American journal of cardiovascular drugs: drugs, devices, and other interventions, 11(5), 295–302. <https://doi.org/10.2165/11592760-000000000-00000>

JAALOUK, D. E., & LAMMERDING, J. (2009). *Mechanotransduction gone awry.* Nature reviews. Molecular cell biology, 10(1), 63–73. <https://doi.org/10.1038/nrm2597>

JÄRVINEN, M. J., & LEHTO, M. U. (1993). *The effects of early mobilisation and immobilisation on the healing process following muscle injuries.* Sports medicine (Auckland, N.Z.), 15(2), 78–89. <https://doi.org/10.2165/00007256-199315020-00002>

JONES, D., LEIVSETH, G., & TENBOSCH, J. (1995). *Mechano-reception in osteoblast-like cells.* Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire, 73(7-8), 525–534. <https://doi.org/10.1139/o95-058>

KANG, E. S., FORD, K., GROKULSKY, G., WANG, Y. B., CHIANG, T. M., & ACCIARDO, S. R. (2000). *Normal circulating adult human red blood cells contain inactive NOS proteins.* The Journal of laboratory and clinical medicine, 135(6), 444–451. <https://doi.org/10.1067/mlc.2000.106805>

KASPER, G., MAO, L., GEISSLER, S., DRAYCHEVA, A., TRIPPENS, J., KÜHNISCH, J., TSCHIRSCHMANN, M., KASPAR, K., PERKA, C., DUDA, G. N., & KLOSE, J. (2009). *Insights into mesenchymal stem cell aging: involvement of antioxidant defense and actin cytoskeleton.* Stem cells (Dayton, Ohio), 27(6), 1288–1297. <https://doi.org/10.1002/stem.49>

KELM, M., & SCHRADER, J. (1990). *Control of coronary vascular tone by nitric oxide.* Circulation research, 66(6), 1561–1575. <https://doi.org/10.1161/01.res.66.6.1561>

KELM M. (1999). *Nitric oxide metabolism and breakdown.* Biochimica et biophysica acta, 1411(2-3), 273–289. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(99\)00020-1](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(99)00020-1)

KLEINBONGARD, P., SCHULZ, R., RASSAF, T., LAUER, T., DEJAM, A., JAX, T., KUMARA, I., GHARINI, P., KABANOVA, S., OZÜYAMAN, B., SCHNÜRCH, H. G., GÖDECKE, A., WEBER, A. A., ROBENEK, M., ROBENEK, H., BLOCH, W., RÖSEN, P., & KELM, M. (2006). *Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase.* *Blood*, 107(7), 2943–2951. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-3992>

KOLIAMITRA, C., HOLTKAMP, B., ZIMMER, P., BLOCH, W., & GRAU, M. (2017). *Impact of training volume and intensity on RBC-NOS/NO pathway and endurance capacity.* *Biorheology*, 54(1), 37–50. <https://doi.org/10.3233/BIR-16121>

KORBUT, R. A., ADAMEK-GUZYK, T., MADEJ, J., & KORBUT, R. (2002). *Endothelial secretagogues and deformability of erythrocytes.* *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, 53(4 Pt 1), 655–665.

LEE, S. Y., CHENG, B., & GRIMMER-SOMERS, K. (2011). *The midterm effectiveness of extracorporeal shockwave therapy in the management of chronic calcific shoulder tendinitis.* *Journal of shoulder and elbow surgery*, 20(5), 845–854. <https://doi.org/10.1016/j.jse.2010.10.024>

LEHKA, L., & RĘDOWICZ, M. J. (2020). *Mechanisms regulating myoblast fusion: A multilevel interplay.* *Seminars in cell & developmental biology*, 104, 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.02.004>

LI, Y., & HUARD, J. (2002). *Differentiation of muscle-derived cells into myofibroblasts in injured skeletal muscle.* *The American journal of pathology*, 161(3), 895–907. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64250-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64250-2)

LIFSHITZ, D. A., WILLIAMS, J. C., JR, STURTEVANT, B., CONNORS, B. A., EVAN, A. P., & MCATEER, J. A. (1997). *Quantitation of shock wave cavitation damage in vitro.* *Ultrasound in medicine & biology*, 23(3), 461–471. [https://doi.org/10.1016/s0301-5629\(96\)00223-2](https://doi.org/10.1016/s0301-5629(96)00223-2)

LIU Y., GAMPERT L., PROKOPCHUK O., STEINACKER J.M. (2007). *Satellitenzellaktivierung beim Krafttraining.* In: Jahrgang 58, Nr. 1 (2007) *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*

LIU, J., SAUL, D., BÖKER, K. O., ERNST, J., LEHMAN, W., & SCHILLING, A. F. (2018). *Current Methods for Skeletal Muscle Tissue Repair and Re-generation.* *BioMed research international*, 2018, 1984879. <https://doi.org/10.1155/2018/1984879>

LAUGHLIN, M. H., COOK, J. D., TREMBLE, R., INGRAM, D., COLLERAN, P. N., & TURK, J. R. (2006). *Exercise training produces nonuniform increases in arteriolar density of rat soleus and gastrocnemius muscle.* *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 13(3), 175–186. <https://doi.org/10.1080/10739680600556829>

LAUGHLIN, M. H., & ROSEGUINI, B. (2008). *Mechanisms for exercise training-induced increases in skeletal muscle blood flow capacity: differences with interval sprint training versus aerobic endurance training.* *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*, 59 Suppl 7(Suppl 7), 71–88.

MACKEY, A. L., MIKKELSEN, U. R., MAGNUSSON, S. P., & KJAER, M. (2012). *Rehabilitation of muscle after injury - the role of anti-inflammatory drugs.* *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 22(4), e8–e14. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2012.01463.x>

MAIRBÄURL H. (2013). *Red blood cells in sports: effects of exercise and training on oxygen supply by red blood cells.* *Frontiers in physiology*, 4, 332. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00332>

MARIOTTO, S., CAVALIERI, E., AMELIO, E., CIAMPA, A. R., DE PRATI, A. C., MARLINGHAUS, E., RUSSO, S., & SUZUKI, H. (2005). *Extracorporeal shock waves: from lithotripsy to anti-inflammatory action by NO production.* *Nitric oxide: biology and chemistry*, 12(2), 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2004.12.005>

MARIOTTO, S., DE PRATI, A. C., CAVALIERI, E., AMELIO, E., MARLINGHAUS, E., & SUZUKI, H. (2009). *Extracorporeal shock wave therapy in inflammatory diseases: molecular mechanism that triggers anti-inflammatory action.* *Current medicinal chemistry*, 16(19), 2366–2372. <https://doi.org/10.2174/092986709788682119>

MEAZZINI, M. C., TOMA, C. D., SCHAFFER, J. L., GRAY, M. L., & GERSTENFELD, L. C. (1998). *Osteoblast cytoskeletal modulation in response to mechanical strain in vitro.* *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 16(2), 170–180. <https://doi.org/10.1002/jor.1100160204>

MITTERMAYR, R., ANTONIC, V., HARTINGER, J., KAUFMANN, H., REDL, H., TÉOT, L., STOJADINOVIC, A., & SCHADEN, W. (2012). *Extracorporeal shock wave therapy (ESWT) for wound healing: technology, mechanisms, and clinical efficacy.* *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 20(4), 456–465. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2012.00796.x>

MOHANDAS, N., & CHASIS, J. A. (1993). *Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids.* *Seminars in hematology*, 30(3), 171–192.

MOTT, R. E., & HELMKE, B. P. (2007). *Mapping the dynamics of shear stress-induced structural changes in endothelial cells.* *American journal of physiology. Cell physiology*, 293(5), C1616–C1626. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00457.2006>

MOYER, A. L., & WAGNER, K. R. (2011). *Regeneration versus fibrosis in skeletal muscle.* *Current opinion in rheumatology*, 23(6), 568–573. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e32834bac92>

MYERS, D. E., ANDERSON, L. D., SEIFERT, R. P., ORTNER, J. P., COOPER, C. E., BEILMAN, G. J., & MOWLEM, J. D. (2005). *Noninvasive method for measuring local hemoglobin oxygen saturation in tissue using wide gap second derivative near-infrared spectroscopy.* *Journal of biomedical optics*, 10(3), 034017. <https://doi.org/10.1117/1.1925250>

NELISSEN-VRANCKEN, H. J., BOUDIER, H. A., DAEMEN, M. J., & SMITS, J. F. (1993). *Antihypertensive therapy and adaptive mechanisms in peripheral ischemia.* *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 22(5), 780–788. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.22.5.780>

NISHIDA, T., SHIMOKAWA, H., OI, K., TATEWAKI, H., UWATOKU, T., ABE, K., MATSUMOTO, Y., KAJIHARA, N., ETO, M., MATSUDA, T., YASUI, H., TAKESHITA, A., & SUNAGAWA, K. (2004). *Extracorporeal cardiac shock wave therapy markedly ameliorates ischemia-induced myocardial dysfunction in pigs in vivo.* *Circulation*, 110(19), 3055–3061. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000148849.51177.97>

OONISHI, T., SAKASHITA, K., & UYESAKA, N. (1997). *Regulation of red blood cell filterability by Ca²⁺ influx and cAMP-mediated signaling pathways*. The American journal of physiology, 273(6), C1828–C1834. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.6.C1828>

OTA, S., UEHARA, K., NOZAKI, M., KOBAYASHI, T., TERADA, S., TOBITA, K., FU, F. H., & HUARD, J. (2011). *Intramuscular transplantation of muscle-derived stem cells accelerates skeletal muscle healing after contusion injury via enhancement of angiogenesis*. The American journal of sports medicine, 39(9), 1912–1922. <https://doi.org/10.1177/0363546511415239>

OZÜYAMAN, B., GRAU, M., KELM, M., MERX, M. W., & KLEINBONGARD, P. (2008). *RBC NOS: regulatory mechanisms and therapeutic aspects*. Trends in molecular medicine, 14(7), 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.05.002>

PARK, J. S., CHU, J. S., CHENG, C., CHEN, F., CHEN, D., & LI, S. (2004). *Differential effects of equiaxial and uniaxial strain on mesenchymal stem cells*. Biotechnology and bioengineering, 88(3), 359–368. <https://doi.org/10.1002/bit.20250>

PELLETIER, M. M., KLEINBONGARD, P., RINGWOOD, L., HITO, R., HUNTER, C. J., SCHECHTER, A. N., GLADWIN, M. T., & DEJAM, A. (2006). *The measurement of blood and plasma nitrite by chemiluminescence: pitfalls and solutions*. Free radical biology & medicine, 41(4), 541–548. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.05.001>

PUMBERGER, M., QAZI, T. H., EHRENTAUT, M. C., TEXTOR, M., KUEPER, J., STOLTENBURG-DIDINGER, G., WINKLER, T., VON ROTH, P., REINKE, S., BORSELLI, C., PERKA, C., MOONEY, D. J., DUDA, G. N., & GEIBLER, S. (2016). *Synthetic niche to modulate regenerative potential of MSCs and enhance skeletal muscle regeneration*. Biomaterials, 99, 95–108. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.05.009>

QAZI, T. H., MOONEY, D. J., PUMBERGER, M., GEISSLER, S., & DUDA, G. N. (2015). *Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering: existing technologies and future trends*. Biomaterials, 53, 502–521. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.110>

QAZI, T. H., MOONEY, D. J., DUDA, G. N., & GEISSLER, S. (2017). *Biomaterials that promote cell-cell interactions enhance the paracrine function of MSCs*. Biomaterials, 140, 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.06.019>

RÅDEGRAN G. (1999). *Limb and skeletal muscle blood flow measurements at rest and during exercise in human subjects*. The Proceedings of the Nutrition Society, 58(4), 887–898. <https://doi.org/10.1017/s0029665199001196>

RECCHIA, F. A., VOGEL, T. R., & HINTZE, T. H. (2000). *NO metabolites accumulate in erythrocytes in proportion to carbon dioxide and bicarbonate concentration*. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology, 279(2), H852–H856. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.279.2.H852>

RIECKEHEER, E., SCHWINGER, R. H., BLOCH, W., & BRIXIUS, K. (2011). *Hawthorn special extract WS® 1442 increases red blood cell NO-formation without altering red blood cell deformability*. Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phyto-pharmacology, 19(1), 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.08.059>

RYCHLY, J., POMMERENKE, H., DÜRR, F., SCHREIBER, E., & NEBE, B. (1998). *Analysis of spatial distributions of cellular molecules during mechanical stressing of cell surface receptors using confocal microscopy.* *Cell biology international*, 22(1), 7–12. <https://doi.org/10.1006/cbir.1997.0210>

SCHULTZ, E., JARYSZAK, D. L., & VALLIERE, C. R. (1985). *Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury.* *Muscle & nerve*, 8(3), 217–222. <https://doi.org/10.1002/mus.880080307>

SCHULTZ, E., JARYSZAK, D. L., GIBSON, M. C., & ALBRIGHT, D. J. (1986). *Absence of exogenous satellite cell contribution to regeneration of frozen skeletal muscle.* *Journal of muscle research and cell motility*, 7(4), 361–367. <https://doi.org/10.1007/BF01753657>

SCHULTZ, E., & MCCORMICK, K. M. (1994). *Skeletal muscle satellite cells.* *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, 123, 213–257. <https://doi.org/10.1007/BFb0030904>

SHEU, J. J., SUN, C. K., CHANG, L. T., FANG, H. Y., CHUNG, S. Y., CHUA, S., FU, M., LEE, F. Y., KAO, Y. H., KO, S. F., WANG, C. J., YEN, C. H., LEU, S., & YIP, H. K. (2010). *Shock wave-pretreated bone marrow cells further improve left ventricular function after myocardial infarction in rabbits.* *Annals of vascular surgery*, 24(6), 809–821. <https://doi.org/10.1016/j.avsg.2010.03.027>

SMITH, C., KRUGER, M. J., SMITH, R. M., & MYBURGH, K. H. (2008). *The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities.* *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 38(11), 947–969. <https://doi.org/10.2165/00007256-200838110-00005>

SMITS, G. A., OOSTERHOF, G. O., DE RUYTER, A. E., SCHALKEN, J. A., & DEBRUYNE, F. M. (1991). *Cytotoxic effects of high energy shock waves in different in vitro models: influence of the experimental set-up.* *The Journal of urology*, 145(1), 171–175. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)38284-8](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)38284-8)

STUART, J., LUCAS, G. S., CALDWELL, N. M., KENNY, M. W., MEAKIN, M., AILLAUD, M. F., & JUHAN-VAGUE, I. (1984). *Anticoagulants and erythrocyte filterability.* *Biorheology. Supplement: the official journal of the International Society of Biorheology*, 1, 279–281. <https://doi.org/10.3233/bir-1984-23s149>

SOWA, M. G., KUO, W. C., KO, A. C., & ARMSTRONG, D. G. (2016). *Review of near-infrared methods for wound assessment.* *Journal of biomedical optics*, 21(9), 091304. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.21.9.091304>

SUHR, F., PORTEN, S., HERTRICH, T., BRIXIUS, K., SCHMIDT, A., PLATEN, P., & BLOCH, W. (2009). *Intensive exercise induces changes of endothelial nitric oxide synthase pattern in human erythrocytes.* *Nitric oxide: biology and chemistry*, 20(2), 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2008.10.004>

SUHR, F., BREINIG, J., MÜLLER, R., BEHRENS, H., BLOCH, W., & GRAU, M. (2012). *Moderate exercise promotes human RBC-NOS activity, NO production and deformability through Akt kinase pathway.* *PloS one*, 7(9), e45982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045982>

TIDBALL J. G. (2005). *Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaptation.* *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 98(5), 1900–1908. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01178.2004>

TOMSCHI, F. (2018). *Der Einfluss der erythrozytären Verformbarkeit auf die Ausdauerleistungsfähigkeit.* Köln: Deutsche Sporthochschule Köln, 2018. 42 S.

TOMSCHI, F., BLOCH, W., & GRAU, M. (2018). *Impact of Type of Sport, Gender and Age on Red Blood Cell Deformability of Elite Athletes.* International journal of sports medicine, 39(1), 12–20. <https://doi.org/10.1055/s-0043-119879>

TSUDA, K., KIMURA, K., NISHIO, I., & MASUYAMA, Y. (2000). *Nitric oxide improves membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension: An electron paramagnetic resonance investigation.* Biochemical and biophysical research communications, 275(3), 946–954. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3408>

VAN DORT, H. M., KNOWLES, D. W., CHASIS, J. A., LEE, G., MOHANDAS, N., & LOW, P. S. (2001). *Analysis of integral membrane protein contributions to the deformability and stability of the human erythrocyte membrane.* The Journal of biological chemistry, 276(50), 46968–46974. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107855200>

VAN LEEUWEN, M. T., ZWERVER, J., & VAN DEN AKKER-SCHEEK, I. (2009). *Extracorporeal shockwave therapy for patellar tendinopathy: a review of the literature.* British journal of sports medicine, 43(3), 163–168. <https://doi.org/10.1136/bjsm.2008.050740>

VARDI, Y., APPEL, B., KILCHEVSKY, A., & GRUENWALD, I. (2012). *Does low intensity extracorporeal shock wave therapy have a physiological effect on erectile function? Short-term results of a randomized, double-blind, sham controlled study.* The Journal of urology, 187(5), 1769–1775. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2011.12.117>

VIERCK, J., O'REILLY, B., HOSSNER, K., ANTONIO, J., BYRNE, K., BUCCI, L., & DODSON, M. (2000). *Satellite cell regulation following myotrauma caused by resistance exercise.* Cell biology international, 24(5), 263–272. <https://doi.org/10.1006/cbir.2000.0499>

WAHL, P., BLOCH, W., MESTER, J., BORN, D. P., & SPERLICH, B. (2012). *Effects of different levels of compression during sub-maximal and high-intensity exercise on erythrocyte deformability.* European journal of applied physiology, 112(6), 2163–2169. <https://doi.org/10.1007/s00421-011-2186-7>

WANG C. J. (2012). *Extracorporeal shockwave therapy in musculoskeletal disorders.* Journal of orthopaedic surgery and research, 7, 11. <https://doi.org/10.1186/1749-799X-7-11>

WANG, C. J., WENG, L. H., KO, J. Y., WANG, J. W., CHEN, J. M., SUN, Y. C., & YANG, Y. J. (2011). *Extracorporeal shockwave shows regression of osteoarthritis of the knee in rats.* The Journal of surgical research, 171(2), 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2010.06.042>

WARNECKE, J., WENDT, T., SCHAK, M., SCHIFFER, T., BLOCH, W., KOHL-BAREIS, M. (2011). *Evaluation of haemoglobin changes of skin and muscle tissue of the calf induced by topical application of a nonivamide / nicoboxil cream.* Proc. SPIE 8087, Clinical and Biomedical Spectroscopy and Imaging II, 80871X (June 10, 2011); doi:10.1117/12.889329

WESS, O. (2004). *Physikalische Grundlagen der extrakorporalen Stoßwellentherapie.* Journal für Mineralstoffwechsel 2004; 11 (4), 7-18



WESS, O. (2004). *Hypothesis towards associative pain memory and pain management by shock wave therapy.* Seventh Congress of the International Society for Musculoskeletal Shockwave Therapy. Kaohsiung/ Taiwan, 1.–4. April 2004; Abstract.

WICK, G. (2012). *Erkrankungen des Bindegewebes: Fibrose – eine häufige Komplikation bei Implantaten.* Erkrankungen des Bindegewebes: Fibrose – eine häufige Komplikation bei Implantaten. <https://scienceblog.at/book/export/html/281#.YhpIpejMJPZ>

WYATT, J. S., COPE, M., DELPY, D. T., RICHARDSON, C. E., EDWARDS, A. D., WRAY, S., & REYNOLDS, E. O. (1990). *Quantitation of cerebral blood volume in human infants by near-infrared spectroscopy.* Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985), 68(3), 1086–1091. <https://doi.org/10.1152/jappl.1990.68.3.1086>

YEH, K. H., SHEU, J. J., LIN, Y. C., SUN, C. K., CHANG, L. T., KAO, Y. H., YEN, C. H., SHAO, P. L., TSAI, T. H., CHEN, Y. L., CHUA, S., LEU, S., & YIP, H. K. (2012). *Benefit of combined extracorporeal shock wave and bone marrow-derived endothelial progenitor cells in protection against critical limb ischemia in rats.* Critical care medicine, 40(1), 169–177. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31822d74d0>

ZISSLER, A., STEINBACHER, P., ZIMMERMANN, R., PITTNER, S., STOIBER, W., BATHKE, A. C., & SÄNGER, A. M. (2017). *Extracorporeal Shock Wave Therapy Accelerates Regeneration After Acute Skeletal Muscle Injury.* The American journal of sports medicine, 45(3), 676–684. <https://doi.org/10.1177/0363546516668622>

