

Grundzüge der molekularbiologischen Wirkung der extrakorporalen Stoßwellen am menschlichen Organismus

In Vitro- und in Vivountersuchungen

H. Neuland / H.-J. Duchstein

Bis heute sind nur die physikalischen Parameter der extrakorporalen Stoßwellen (ESWT) exakt definiert und im Wesentlichen empirische Untersuchungen über die klinischen Ergebnisse der ESWT verfügbar.

Im Gegensatz zu den physikalischen Effekten sind die biologischen bzw. die molekularbiologischen Veränderungen durch die Anwendung der ESWT im Wesentlichen noch unbekannt und wenig untersucht.

Grundsätzlich handelt es sich bei der molekularbiologischen Wirkungsweise der extrakorporalen Stoßwellen um einen mechanischen Stress, der geeignet ist die Freisetzung bestimmter körpereigener Substanzen zu induzieren, die in der Lage sind, die Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen herzustellen wie auch innerhalb der Zellen eine Signalübertragung zu ermöglichen. Diese Signalübertragung (Signaltransduktion) ist für die Aufrechterhaltung spezialisierter Funktionen der Signalzellen von fundamentaler Bedeutung. Bei der Signaltransduktion handelt es sich um einen gerichteten Informationsfluss, dessen Signale als biologische Informationseinheiten anzusehen sind, die zu bestimmten biochemischen Veränderungen in der Zelle führen, für die das Signal bestimmt ist. Hierbei bedient sich der Organismus verschiedener Wege der Signalübertragung sowohl inter- als auch intrazellulär. Interzellulär bilden manche Zellen untereinander Kanäle, sogenannte "gap junctions" oder "Zell-zu-Zell-Kanäle", durch die kleine Moleküle passieren können und physiologische Vorgänge in den Partnerzellen auslösen. Außerdem kann die Kommunikation über zellwandständige Rezeptoren erfolgen oder über Freisetzung sogenannter neuroendokriner Transmitter, die dann größere Distanzen auf dem Weg zur Zielsetzung überwinden können. Letztendlich führen alle interzellulären Signaltransduktionen zu einer intrazellulären Stimulierung und Aktivierung der Zielzellen, um entsprechende zellspezifische Funktionen zu induzieren.

Die extrakorporale Stoßwelleninduktion stellt nun eine komplexe signalgebende Stresssituation dar, die sich auf verschiedenen, vielfach miteinander interagierenden Ebenen manifestiert. U. a. kommt es zur Generierung freier Radikale, denen man in der Vergangenheit im Wesentlichen die Auslösung von sogenannten oxidativem Stress zugemessen hat. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass sie eine bedeutende Rolle als Signal- und Modulatormoleküle insbesondere bei der Aktivierung der zellulären Abwehr gegenüber der Einwirkung verschiedener Stressoren auf die Zelle selbst spielen.

Unter freien Radikalen versteht man Teilchen, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen aufweisen und infolgedessen eine ausgeprägte chemische Reaktivität besitzen können. Die wichtigsten Vertreter sind das Superoxidation - ($\cdot\text{O}_2^-$), das Hydroxyl - ($\cdot\text{OH}$) und Stickstoffmonoxid - radikal ($\cdot\text{NO}$).

In Abhängigkeit ihres zentralen Atomes erfahren diese freien Radikale per Definitionen eine Zuordnung in reaktive Sauerstoff- (reactive oxygen species ROS) oder Stickstoffverbindungen (reactive nitrogen species RNS). Zusammenfassend bezeichnet man sie als "Reactive oxygen and nitrogen species" (RONS).

Durch RONS herbeigeführte Veränderungen des zellulären Redoxstatus, durch Oxidation und Nitrosylierung anderer Atome und Moleküle bilden sie die Grundlage für ihre entscheidende Rolle als Signal- und Mediatormoleküle. Wichtig ist, dass das Ablaufen solcher Reaktionen in unkontrollierter Weise zu zellschädigenden Effekten bis hin zum Zelltod führen kann.

Die Induktion der endogenen antioxidativen Schutzsysteme durch mechanischen Stress (ESW) kann u.a. durch eine noch nachzuweisende Aktivierung von der in Mitochondrien und Cytosol lokalisierten Superoxidismutase (SOD) ausgelöst werden, die eine primäre Abwehr gegenüber $\text{O}_2^{\cdot-}$ darstellt, sowie der selenabhängige Glutathionperoxidase (GPx) und Katalase, die H_2O_2 inaktivieren.

Zur Detektierung dieser freien Radikale, die durch den Einfluß des mechanischen Stresses – ausgelöst durch die extrakorporalen Stoßwellen – entstehen, haben wir uns der electron paramagnetic resonance Spektroskopie (EPR) bedient, mit der wir eindeutig die Entstehung freier Radikale durch ESW-Einfluß nachweisen konnten. U.a. sind wir dabei auf Stickstoffmonoxid gestoßen, dessen überragende biologische Bedeutung ein hohes Interesse zwischenzeitlich in der naturwissenschaftlichen Literatur gefunden hat.

Chemisch handelt es sich bei $\cdot\text{NO}$ um ein farbloses, schlecht wasserlösliches Gas, das trotz seines radikalischen Charakters relativ stabil ist und nur mäßige chemische Reaktivität zeigt.

Die Biosynthese aus Arginin ist aufgeklärt, ebenso die der $\cdot\text{NO}$ -Synthasen, von der es drei Isoformen gibt (die endotheliale, die neuronale und induzierbare NOS). Die drei wichtigsten Eigenschaften von NO sind:

1. Die Aktivierung der Guanylyl-cyclase durch Reaktion von $\cdot\text{NO}$ mit dem Hämeisen dieses Enzyms mit nachfolgender Vasodilatation.
2. Die unter oxydativen Bedingungen beobachtete Neuroprotektion von $\cdot\text{NO}^+$, welche der Interaktion von $\cdot\text{NO}^+$ mit Thiolat-Ionen (Cysteinreste) im Ionenkanal eines NMDA-Rezeptors (N-Methyl-D-Asparat) zugeordnet wird. Daraus folgt die Inaktivierung der Neurotransmission der excitatorischen (erregenden) Aminosäuren wie Glutamat.
3. Die Fremdstoffabwehr bei der Phagocytose durch Induktion der iNOS verbunden mit einer Freisetzung größerer Mengen von $\cdot\text{NO}$ und die gleichzeitige Anwesenheit von aktiven Sauerstoffspezies (respirotory burst) (ROS).

Da die $\cdot\text{NO}$ -Messung mittels EPR-Spektroskopie sehr aufwendig ist, zur Zeit nur in vitro durchgeführt werden kann und dadurch sehr ungenau ist, haben wir nach einer anderen Methode gesucht, mit der eine direkte $\cdot\text{NO}$ -Erfassung in vivo möglich ist. Dabei haben wir uns des sogenannten $\cdot\text{NO}$ -Analysators der Firma Thermo Instruments bedient, der ursprünglich im Umweltschutz zur Messung des Stickstoffmonoxidgehalts der Luft eingesetzt wurde. Bei dem äußerst empfindlichen Verfahren kommt es zu einer Reaktion von $\cdot\text{NO}$ mit Ozon. Hierbei entstehen energetisch angeregte NO_2 -Moleküle, die ein breites Strahlungsband im Wellenlängenbereich von ca. 600 bis 1200 nm aussenden, wenn sie auf niedrigere Niveaus zurückfallen. Dieser Vorgang wird spektroskopisch als Chemolumineszenz wahrgenommen. Ihre Intensität ist nahezu proportional zur $\cdot\text{NO}$ -Konzentration.

Die Spezifität wird dadurch gewährleistet, dass nur gasförmige Stoffe, die durch Reaktion mit Ozon Chemolumineszenz zeigen, detektiert werden können.

In der Haut findet nach Duchstein et al. durch äußere Einflüsse im Wesentlichen nur eine exogene $\cdot\text{NO}$ -Synthese statt. Die endogene NOS-katalysierte $\cdot\text{NO}$ -Synthese aus L-Arginin läßt sich nur in tieferen Gewebsschichten durch äußere Einflüsse realisieren. Diesen Umstand kann man zur in vivo-Testung der Induktion von $\cdot\text{NO}$ durch mechanische Stressfaktoren, z. B. mittels extrakorporaler Stoßwellen, nutzen. Mit dem $\cdot\text{NO}$ -Analysator haben wir die $\cdot\text{NO}$ -Emission der Haut zunächst ohne Beschallung, dann in verschiedenen Zeiträumen nach der Beschallung gemessen. Die Differenz zwischen dem T-Null-Wert und dem Wert nach Beschallung gibt dann Auskunft über die Ausbildung von endogenen $\cdot\text{NO}$, das über die Haut emittiert wird. Die bisher durchgeführten Versuche zeigten noch bis zu 24 Stunden nach Beschallung eine vermehrte $\cdot\text{NO}$ -Produktion.

Ein weiterer Marker für die Wechselwirkung des Organismus mit hochfrequenten extrakorporalen Stoßwellen ist die Bestimmung der ultraschwachen Photonemission (UPE). Viele Lebewesen sind in der Lage Licht auszusenden. Diese Lichtreaktionen resultieren in der Regel aus der chemischen Reaktion zwischen ATP – dem Energielieferanten der Zelle – Sauerstoff und Luciferin und sind mit bloßem Auge sichtbar. Die Quantenausbeute einer solchen Reaktion ist außerordentlich hoch und kann bis zu 95 % betragen.

Aber auch Reaktionen, die durch reaktive Sauerstoffspezies bzw. freie Radikale induziert werden, können unter Lichtbeteiligung ablaufen. Die meisten exogenen oxidativen Reaktionen produzieren allerdings hauptsächlich Wärme. Nur ein sehr geringer Prozentsatz (unter 1 %) der Reaktionsenthalpie wird als Licht freigesetzt. Die Emission elektromagnetischer Strahlung im UV-, VIS- oder IR-Spektralbereich von Atomen oder Molekülen nach dem Übergang von einem Elektron aus einem energetisch höheren Zustand in einen unbesetzten energetisch niedrigeren Zustand bezeichnet man als Lumineszenz. Bei der Chemolumineszenz wird die Lumineszenz direkt durch eine chemische Reaktion hervorgerufen, mechanische Energie – z. B. durch extrakorporale Stoßwellen – führt zur sogenannten Tribolumineszenz.

Die ultraschwache Photonemission (UPE) beschreibt nun Lumineszenzphänomene sehr geringer Intensität vom biologischen System oder Proben ohne den Gebrauch von lichtverstärkenden Systemen wie Luminol oder Luciferin.

In der Literatur wird sie auch als *Low Level Chemilumineszenz*, *Dark Chemilumineszenz*, *Low Intensity Chemilumineszenz*, *Delayed Chemilumineszenz* oder *Ultra Week Lumineszenz* beschrieben.

Die UPE wird eingeteilt in die spontane Photonenemission also eine Photonenemission ohne äußere Anregung, zu deren Messung äußerst empfindliche Detektoren erforderlich sind und die induzierte Photonenemission, eine Photonenemission durch äußere Anregung. Diese Form der UPE ist am besten erforscht, da sie leichter zu detektieren ist als die spontane Photonenemission. Die Anregung kann durch physikalische oder chemische Stressoren erfolgen. Ein solcher physikalischer Stressor wären die hochfrequenten extrakorporalen Stoßwellen, nach deren Applikation wir die UPE auf der Haut bestimmt haben. Die Quantifizierung der UPE kann als Maß für den physikalischen Stress gelten. Unter dieser Prämisse haben wir zwei auf dem Markt befindliche ESWT-Geräte hinsichtlich ihrer Wirkungskonstanz überprüft. Wie wir feststellen mußten, kommt es bei beiden Geräten sehr schnell zu einem Effektivitätsverlust. Bei einem Gerät konnten nur etwa ca. 20 % der angegebenen Effektivität ausgenutzt werden. Die Wirksamkeit dieses Gerätes ging nach kurzer Zeit gegen Null. Das gleiche galt beim Nachweis der NO-Freisetzung. Mit "Alterung der Elektroden" wurde der Nachweis der NO-Freisetzung immer stärker bishin gegen Null abgeschwächt.

Als weiteres Schutzsystem neben der enzymatisch-antioxidativen Verteidigung entfaltet der Organismus durch die Bildung sogenannter Stressproteine einen weiteren Abwehrmechanismus gegenüber dem Einfluß von RONS. Zu diesen gehören die sogenannten Hitzeschockproteine (HSP), die als zelluläre Antwort auf einen von außen zugefügten Stress, sei er nun physikalischer oder chemischer Art, rasch und in großer Menge gebildet werden können. Sie kommen in fast allen bisher untersuchten eukarioten Zellen vor und werden entsprechend ihrer relativen Molekülmasse in Gruppen eingeteilt, wobei die im Kürzel erhaltene Zahl die ungefähre Molekülmasse in Kilo-Dalton wiedergibt. Als zellulär induzierende Stressführer gelten u. a. Hyperthermie, Ischämie, Proteindenaturierung durch verschiedene chemische oder physikalische Einwirkung sowie körperliche Belastung. Es lag also nahe zu versuchen, ob durch die mechanische Stressinduktion mittels extrakorporaler Stoßwellen die Bildung von Hitzeschockproteinen nachgewiesen werden kann.

Unser Experiment bestand nun darin, dass wir die Achillessehne am Übergang zum Gastrocnemius mit extrakorporalen Stoßwellen beschallten. Es wurde vor der

Behandlung, 3 Stunden nach der Behandlung und 24 Stunden nach der Behandlung eine Feinnadelbiopsie im Behandlungsbereich entnommen und Hitzeschockproteine nach der Western-blotting-Technik mittels monoklonaler HSP-Antikörper identifiziert. Nach 3 Stunden kam es zu einer deutlichen Expression von HSP 70, die nach 24 Stunden noch deutlicher verstärkt wurde. Ein ähnliches Ergebnis konnte auf mRNA Ebene erhoben werden.

Nach unseren bisherigen Untersuchungen läßt sich zusammenfassend sagen, dass durch mechanischen Stress mittels extrakorporaler Stoßwellen der Selbstschutzmechanismus des Organismus aktiviert wird und somit die Regeneration pathologischer Prozesse, seien sie nun chronischer oder akuter Art, stimuliert und beschleunigt wird.

AUSTRIA:

RICHARD WOLF Austria
Ges.m.b.H.
Wilhelminenstraße 93 a
A-1160 Wien
Tel.: 01-405 51 51
Fax: 01-405 51 51 45
info@richard-wolf.at

BELGIUM:

N.V. Endoscopie
RICHARD WOLF Belgium S.A.
Industriezone Drogen, Landegemstraat 6
B-9031 Gent-Drogen
Tel.: 09.280.81.00
Fax: 09.282.92.16
endoscopy@richard-wolf.be

FRANCE:

RICHARD WOLF France S.A.R.L.
Rue Daniel Berger
Z.A.C. La Neuvilleffe
F-51100 Reims
Tél.: 03.26.87.02.89
Fax: 03.26.87.60.33
endoscopes@richardwolf.fr

UK:

RICHARD WOLF UK Ltd.
Waterside Way
Wimbledon
SW17 0HB
Tel.: 020 8944 7447
Fax: 020 8944 1311
admin@richardwolf.uk.com

USA:

RICHARD WOLF
Medical Instruments Corp.
353 Corporate Woods Parkway
Vernon Hills, Illinois 60061
Tel.: 847-913 1113
Fax: 847-913 1488
sales&marketing@richardwolfusa.com