

Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Gradinger)

Hochdrucksterilisation von Knochen zur Transplantation und von Implantaten

Monika G. Brendle-Simon

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Gradinger)

Hochdrucksterilisation von Knochen zur Transplantation und von Implantaten

Monika G. Brendle-Simon

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E.-J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. H. W. Gollwitzer
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. K.-D. Wolff

Die Dissertation wurde am 06.07.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 23.11.2011 angenommen.

Für meine Eltern -
In Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

<u>I. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG.....</u>	<u>5</u>
I.1 PROBLEMATIK „KNOCHENDEFEKT“ IN ORTHOPÄDIE UND UNFALLCHIRURGIE.....	5
I.1.1 SCHWIERIGKEITEN DER DERZEIT EINGESETZTEN VERFAHREN ZUR REKONSTRUKTION VON KNOCHENDEFEKTEN.....	5
I.1.2 KOMPLIKATIONEN BEI DER VERWENDUNG VON ALLOGRAFTS UND ETABLIERTE DESINFEKTIONSVERFAHREN.....	7
I.1.3 DESINFEKTION SENSIBLER BIOMATERIALIEN.....	8
I.2 DER HYDROSTATISCHE HOCHDRUCK IN DER LEBENSMITTELTECHNOLOGIE.....	8
I.3 AUFGABENSTELLUNG	9
<u>II. MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>10</u>
II.1 MATERIAL	10
II.1.1 REFERENZKEIME.....	10
II.1.2 HOCHDRUCKANLAGEN.....	10
II.1.2.1 Die Hochdruckanlage der Firma SITEC-Sieber Engineering AG	10
II.1.2.2 Die Hochdruckanlage der Firma RECORD Maschinenbau GmbH, jetzt: Schurter-Retrofit GmbH	12
II.1.3 WEITERE MATERIALIEN	14
II.2 METHODEN.....	15
II.2.1 HERSTELLUNG DER NÄHRLÖSUNG	15
II.2.2 EXPERIMENTELLE VERSUCHE MIT BAKTERIENSUSPENSIONEN.....	15
II.2.2.1 Experimenteller Vorgang.....	15
II.2.3 EXPERIMENTELLE VERSUCHE MIT DEN MIT REFERENZKEIMEN KONTAMINIERTEN SCHRAUBEN AUS EDELSTAHL	16
II.2.3.1 Präparation der Schrauben	16
II.2.3.2 Hochdruckbehandlung der Schrauben	16
II.2.4 KOMBINIERTE APPLIKATION VON HHD UND ULTRASCHALL.....	18
II.2.4.1 Präparation der Bakteriensuspension	18
II.2.5 HYDROSTATISCHE HOCHDRUCKBEHANDLUNG VON KONTAMINIERTEN SPONGIOSAZYLINDERN AUS HUMANEN FEMURKÖPFEN.....	19
II.2.5.1 Präparation der infizierten Knochenproben	19
II.2.5.2 Hochdruckbehandlung der infizierten Knochenproben	21

III. ERGEBNISSE	22
III.1 HOCHDRUCKBEHANDLUNG VON BAKTERIENSUSPENSIONEN.....	22
III.2 HOCHDRUCKBEHANDLUNG VON KONTAMINIERTEN EDELSTAHLSCHRAUBEN.....	23
III.3 KOMBINATIONSEFFEKT VON APPLIZIERTEM HHD UND ULTRASCHALL AUF BAKTERIENSUSPENSIONEN	25
III.4 HOCHDRUCKBEHANDLUNG VON KONTAMINIERTEN SPONGIOSAZYLINDERN AUS HUMANEN FEMURKÖPFEN.....	26
IV. DISKUSSION	28
IV.1 PHYSIKALISCHE GRUNDLAGEN DES HHD	29
IV.2 HHD: EINFLUSS AUF BIOLOGISCHE PROZESSE	31
IV.3 HHD: EINFLUSS AUF MIKROORGANISMEN	32
IV.3.1 HHD UND BAKTERIEN	33
IV.3.2 HHD UND SPOREN	33
IV.3.3 HHD UND HEFEN SOWIE PILZE.....	33
IV.3.4 HHD UND VIREN	34
IV.4 HHD: EINFLUSS AUF KNOCHEN	34
V.5 DESINFEKTION DURCH HHD.....	36
IV.5.1 UNTERSUCHTE BAKTERIENSTÄMME	37
IV.5.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 und MRSA 27065 (Methicillin-resistenter Stamm von <i>Staphylococcus aureus</i>)	38
IV.5.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	39
IV.5.1.3 <i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6057	39
IV.6 HHD WIRKSAMKEIT AUF REFERENZKEIME	40
IV.7 KOMBINIERT ANWENDUNG VON HHD UND ULTRASCHALL.....	42
IV.8 ANTIBAKTERIELLE WIRKUNG VON HHD AUF INFIZIERTE KNOCHENPROBEN	43
IV.9 SCHLUSSFOLGERUNG.....	44
V. ZUSAMMENFASSUNG	48
VI. LITERATURVERZEICHNIS	50
VII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	59

VIII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... 61

IX. TABELLENVERZEICHNIS 63

X. ANHANG 64

XI. LEBENSLAUF 85

XII. DANKSAGUNG 88

XIII. PUBLIKATION..... 89

I. Einleitung und Zielsetzung

I.1 Problematik „Knochendefekt“ in Orthopädie und Unfallchirurgie

Die Beeinträchtigung oder Zerstörung von Knochengewebe durch Tumoren bzw. Tumorresektionen, Infektionen, Traumata sowie Endoprothesenwechsel stellt die orthopädische Chirurgie vor große Schwierigkeiten und ist somit eine der zentralen Herausforderungen der modernen Medizin. Die Regeneration und Rekonstruktion der entstandenen Knochendefekte gelingt oftmals nur mit großem operativen Aufwand. Infektionen sind nach wie vor die häufigsten und gefährlichsten Komplikationen der rekonstruierenden Therapieverfahren, die daher infektionsvorbeugende Maßnahmen erfordern.

I.1.1 Schwierigkeiten der derzeit eingesetzten Verfahren zur Rekonstruktion von Knochendefekten

Es gibt eine Vielzahl gebräuchlicher Therapieverfahren zur Rekonstruktion von Knochendefekten.

Die Implantation von Endoprothesensystemen zur Überbrückung der Knochendefekte stellt eines der Verfahren dar. Die Systeme bestehen aus Metall, Keramik oder Polyethylen. Nachteile dieser speziellen Endoprothesensysteme, welche v.a. zur Rekonstruktion großer tumoröser Defekte entwickelt wurden, sind neben der begrenzten Haltbarkeit die Gefahr eines Materialbruchs, die Abriebrate der Gelenkpartner, die Gefahr der Prothesenlockerung sowie das relativ hohe Infektionsrisiko durch das große Implantat. Besonders bei zementierten Prothesen kann ein durch Abriebpartikel von den Gleitflächen induziertes aggressives Granulationsgewebe durch Knochenresorption zur Lockerung führen. Die Voraussetzung für ein dauerhaftes Einwachsen der zementlosen Prothesen hängt von der Primärstabilität und nicht zuletzt von der entsprechenden Oberflächenstruktur des Implantats ab (Gördes W et al, 2003, S. 628-630), und ist bei großen Tumorprothesen daher durch die großen Hebelarme und geringeren knöchernen Auflageflächen zusätzlich gefährdet. Die 5-Jahresüberlebensrate der großen Megaprothesen liegt bei etwa 83%, die 10-Jahresüberlebensrate bei ca. 67%. Die Revisionsraten von Tumorprothesen variieren zwischen 10% und 66%. Letztere Angabe stammt von Schultergelenksprothesen (Malawer M.M. und Chou L.B., 1995, S. 1154-1165; Bos G. et al., 1987, S. 178-191).

Eine weitere Möglichkeit der Knochendefekt-Rekonstruktion stellt die Implantation synthetischer und biologischer Knochenersatzmaterialien dar. Zu den synthetischen Knochenersatzmaterialien zählen die osteokonditiv wirkenden Kalziumphosphatkeramiken, Kalziumhydroxylapatit, Trikalziumphosphat und biphasisches Kalziumphosphat (Paderni S. und Terzi S., 2009, S. 89-96; Niethard F.U. und Pfeil J., 2003, S.77), sowie Kalziumsulfat und korralines Hydroxylapatit. Der Vorteil dieser synthetischen Knochenersatzmaterialien liegt in der sehr guten Verfügbarkeit sowie der Sterilität (Moore W.R. et al., 2001, S. 354-361). Bei Revisionen von Hüftgelenksprothesen mit synthetischen Knochenersatzmaterialien konnte in konventionellen Bildgebungen eine direkte Verbindung zwischen den synthetischen Knochenersatzmaterialien und dem Knochen beobachtet werden (Nich C. et al., 2006, S. 343-350). Probleme stellen die postoperativen Frakturen, die Re-Revisions-Operationen sowie die Schafflockerungen dar (Nich C. und Sedel L., 2006, S. 525-531). Weitere Probleme bestehen in der geometrischen und mechanischen Stabilität dieser Knochenersatzmaterialien (Hofmann G.O. et al., 1995, S. 159-166). Zudem wirken die synthetischen Knochenersatzmaterialien nicht osteoinduktiv und sind allgemein nicht für große Knochendefekte geeignet (Betz R.R., 2002, S. 561-570).

Als biologische Knochenersatzmaterialien stehen demineralisierte Knochenmatrix und verschiedene, meist rekombinant hergestellte, osteoinduktiv wirkende Wachstumsfaktoren wie TGF- β , IGF-1, IGF-2, FGF, PDGF und BMPs zur Verfügung (Raschke M.J. und Haas N.P., 1997, S. 808). Die Eigenschaften der demineralisierten Knochenmatrix sind mit denen der synthetischen Knochenersatzmaterialien vergleichbar. Nachteile der Wachstumsfaktoren bestehen in den hohen Kosten sowie der Schwierigkeit, größere Knochendefekte überbrücken zu können.

Schließlich gehören die autogene und allogene Knochentransplantation zu den gebräuchlichsten Therapieverfahren zur Rekonstruktion von Knochendefekten.

Verwendet werden hierbei Spongiosa, kortikale oder kortikospongiöse Knochen meist aus dem Bereich des Beckenkamms oder der Fibula sowie Hüftköpfe oder ganze Knochen für die allogene Transplantation (Breusch S. und Mau H., 2002, S.311). Bei den Autografts – die aktuell den Goldstandard der Knochenersatzmaterialien darstellen – besteht hierbei die Gefahr der sekundären Morbidität im Bereich der Knochenentnahmestelle; zudem ist die Verfügbarkeit eher gering (Ekholm M. et al., 2006, S. 139-145).

Die Allografts haben eine bessere Verfügbarkeit, jedoch höhere Infektionsraten. Hinzu kommt eine signifikante Häufigkeit für postoperative Frakturen durch Transplantatnekrosen und eine fehlende Einheilung aufgrund nicht ausreichender Durchblutung und immunologischer Inkompetenzen (Moore W.R. et al., 2001, S. 354-361). Berücksichtigen

muß man zudem die Problematik der HIV- und Hepatitisvirusübertragung. Grundsätzlich anzuführen ist die unsichere Prognose bzgl. langfristiger Integration bzw. Resorption und Stabilität der Knochentransplantate (Rechl H. et al., 2003, S. 453).

I.1.2 Komplikationen bei der Verwendung von Allografts und etablierte Desinfektionsverfahren

Die Hauptkomplikation bei der Transplantation von Allografts ist das erhöhte Risiko viraler und bakterieller Infektionen. Aus diesem Grunde wurden verschiedene Desinfektionsverfahren für Knochentransplantate eingeführt, welche auch in den Richtlinien zum Führen einer Knochenbank zur Erhöhung der Transplantatsicherheit gefordert werden. Dies sind Inaktivierungsverfahren, die als „hinreichend“ eingestuft werden, wenn eine Reduktion der Lebendkeimzahl der getesteten Mikroorganismen in allogenen Knochentransplantaten um mindestens 5 log Kolonie bildende Einheiten (KBE) 10/ml erreicht ist (Pruß A., 2003, S. 21). Etablierte Verfahren sind dabei die chemische Behandlung der Knochentransplantate mit Peressigsäure/Ethanol (v. Versen R. et al., 1992, S. 380-386; Wutzler P. und Sauerbrei A., 2000, S. 304-308) und die Sterilisation von Knochentransplantaten mit Gammastrahlen. Der Effekt liegt darin, die Zellkerne, respektive die genetische Information, zu treffen und Defekte zu setzen, um die Replikation des Erregers zu verhindern sowie Sekundäreffekte, wie beispielsweise die Bildung freier Radikale, zu erzeugen (Campbell D.G. und Li P., 1999, S. 517-521). Studien von Sugimoto et al. zeigten, dass es 12 Wochen nach Bestrahlung mit 50 Gy zu einer Beeinträchtigung der Kortikalis sowie zu einer Zunahme der Knochenporosität und zu Knochenresorptionshöhlen kam (Sugimoto M. et al., 1991, S. 492-497).

Des Weiteren zählt die thermische Behandlung mit feuchter Hitze zu den etablierten Desinfektionsverfahren. Die wirksame Inaktivierungstemperatur $\geq 82,5$ °C führt zu einer Konformitätsänderung von Proteinen. Die Osteokonduktivität, Festigkeit und Struktur des Knochens werden hierbei nicht wesentlich beeinträchtigt (v. Garrel T., 2001-2003), wohingegen es beim Autoklavieren mit mehr als 100°C zu einer deutlichen Beeinträchtigung dieser Strukturen kommt (Kuner E.H. et al., 1998, S. 870-876). Die Knochenstabilität reduziert sich nach dem Autoklavieren um etwa 58% (Borchers R.E. et al., 1995, S. 545-551).

Risiken der Knochentransplantation bestehen, neben der möglichen Gefahr der Abstoßung des Transplantats, in der Gefahr der Infektion bzw. Übertragung von Viren und bakteriellen Krankheitserregern auf Seiten des Transplantatempfängers. Zu den potenziell übertragbaren Viren gehören das humane Immundefizienzvirus (HIV) (Simonds R.J. et al., 1992, S. 726-

732), das humane Hepatitis B- und -C-Virus (Conrad E.U. et al., 1995, S. 214-224) sowie Parvoviren, humanes Hepatitis A-Virus, Cytomegalievirus und der humane T-Zell-Leukämie-Virus 1. Nichtvirale Erreger können durch Kontamination während oder nach Knochenentnahme (Sekundärinfektion) in das Knochenimplantat gelangen (Tomford W.W., 1995, S. 1742-1754; Eastlund T., 2002). Daher ist ein keimarmes Vorgehen bei Explantation und Bearbeitung der Gewebe sowie ein mikrobiologisches Monitoring erforderlich (Forsell J.H. und Liesman J., 2000, S. 111-115; Martinez O., 2002; Bankowski M.J., 2002).

Je nach Studienlage liegt das Infektionsrisiko bei 11,7 % (Lord C.F. et al., 1988, S. 369-376) bis 12,2% (Liu J.W. et al., 2002, S. 293-297).

I.1.3 Desinfektion sensibler Biomaterialien

Orthopädische Implantate müssen vor Implantation sterilisiert sein, um das biologische Risiko zu reduzieren. Dabei kann es durch verschiedene Sterilisationsverfahren, die im vorherigen Abschnitt beschrieben wurden, zu einer Veränderung der Implantatoberfläche kommen. Die Implantatoberflächen bestehen in der Regel aus Metall (Titan, Chrom-Cobalt-Legierungen), Keramik oder Polyethylen. Zunehmend werden funktionalisierte Oberflächen eingesetzt, welche beispielsweise mit Hydroxylapatit oder auch biologischen Produkten wie Proteinen beschichtet sind, verwendet, um die Osseointegration der biomedizinischen Implantate zu fördern und die Einheilung der Implantate zu steigern (Geesink R., 2002, S. 53-65; Lintner F. et al., 1994, S. 824-830; Søballe K. et al., 1990, S. 299-306).

Auf Grund der Nebenwirkungen der etablierten Desinfektionsverfahren, wie die chemische Behandlung der Knochenimplantate mit Peressigsäure/Ethanol (v. Versen R. et al., 1992, S. 380-386; Wutzler P. und Sauerbrei A., 2000, S. 304-308) oder die Sterilisation von Knochenimplantaten mit Gammastrahlen, ergibt sich die Suche nach neuen Verfahren zur Knocheninfektion und Desinfektion sensibler Biomaterialien.

I.2 Der Hydrostatische Hochdruck in der Lebensmitteltechnologie

Der Hydrostatische Hochdruck (HHD) spielt in unterschiedlichen Bereichen industrieller Fertigung eine Rolle. Aktuelle Anwendungsbereiche dieses Verfahrens sind die Lebensmitteltechnologie zur Haltbarmachung verschiedener Lebensmittelprodukte wie Fruchtsäfte und Milch sowie die Werkstoffindustrie zur Herstellung von Plastikwaren und Härtung von Metallen.

Erste Studien, den HHD als Desinfektionsverfahren in der Lebensmitteltechnologie zu etablieren, wurden bereits vor 100 Jahren begonnen. Die meisten vegetativen Formen der Mikroorganismen werden durch HHD zwischen 300-600 MPa zerstört. Diese Verfahrensweise der Abtötung von Bakterien, Hefe- und Schimmelpilzen in Lebensmitteln wie Marmelade, Fruchtsäften und Saucen ist bereits etabliert. Zudem wird der Geschmack und das Erscheinungsbild der Nahrungsmittel durch HHD als Desinfektionsverfahren in keiner Weise verändert (Cheftel J.C., 1995, S. 75-90).

In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob die Behandlung von Knochen mit HHD Bakterien abtöten kann und zu einer Desinfektion des zu transplantierenden Knochens führt, so dass die Möglichkeit besteht, das bereits in der Lebensmittelindustrie angewandte Hochdruckverfahren auch in der Medizin zur Sterilisation medizinischer Implantate und allogener Knochen zu etablieren

I.3 Aufgabenstellung

Die Aufgabenstellung beinhaltet neben der Literaturrecherche den Nachweis der Wirksamkeit der Hochdruckbehandlung zur Inaktivierung von Bakterien. Neben der Desinfektion von Bakteriensuspensionen sollte auch der Einfluss organischer Produkte wie Blut auf die Inaktivierungsrate von Bakterien auf kontaminierten Oberflächen von Standardschrauben untersucht werden. Weiterhin sollte die Effektivität des HHD zur Desinfektion künstlich infizierter Knochenproben gemäß standardisierter mikrobiologischer Verfahren geprüft werden.

Darauf aufbauend sollte durch Modifikation der Parameter Druck, Zeit und Temperatur eine Optimierung des Verfahrens erarbeitet werden und eine Beurteilung des Verfahrens - auch in Zusammenschau mit den herkömmlichen Sterilisationsverfahren - erfolgen.

II. Material und Methoden

II.1 Material

II.1.1 Referenzkeime

3 Referenzkeime der American Tissue and Culture Collection (ATCC) wurden eingesetzt:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Enterococcus faecium* ATCC 6057
- Isolat eines Methicillin-resistenten Stammes von *S. aureus* einer Patientin mit chronischer Osteomyelitis MRSA 27065

II.1.2 Hochdruckanlagen

- SITEC-Sieber Engineering AG, Modell 765. 0050, 8124 Maur/Zürich, Schweiz
- RECORD Maschinenbau GmbH jetzt: Schurter-Retrofit GmbH, 07426 Königsee, Deutschland

II.1.2.1 Die Hochdruckanlage der Firma SITEC-Sieber Engineering AG

Ein Teil der Versuche wurde mit der Hochdruckanlage der Firma SITEC-Sieber Engineering AG, Modell 765.0050 durchgeführt. Der Betriebsdruck ist mit max. 400 MPa angegeben. Wasser dient als Druckmedium, dessen geringe Viskosität der Viskosität des Untersuchungsmediums ähnlich ist und so eine schnelle und gleichmäßige Druckübertragung auf die Untersuchungsprobe gewährleistet. Anfangs wird der Druck mittels einer Handpumpe manuell erzeugt. Ab einem Druck von ca. 50 MPa wird der Druckaufbau von einer Spindelpresse übernommen, die von einem Elektromotor (1600 W Nennleistung, 4 ml Hubvolumen, 100 mm Hub) angetrieben wird. Die Geschwindigkeit des Elektromotors und somit die Druckaufbauzeit betragen konstant ca. 100 MPa/Min. Die Druckkammer für die Untersuchungsproben besteht aus Edelstahl und hat ein Volumen von 50 ml. Sie ist vollständig mit Wasser gefüllt. Ein Heizmantel zur Temperaturvariation und ein 4 cm dicker Stahlmantel umgeben die Druckkammer.

Zwischen der Spindelpresse und der Druckkammer befindet sich ein Drucksensor, der mit der Schaltmesseinheit verbunden ist und den Druck auf 1 bar (entspricht 0,1 MPa) genau misst. In die Hochdruckanlage ist ein Heiz-Kühl-Aggregat integriert, das abhängig vom jeweiligen Druckmedium in der Druckkammer Temperaturen einstellen kann (mit Wasser zwischen 1°C und 50°C). Direkt am Heiz-Kühl-Aggregat kann die gewünschte Untersuchungstemperatur eingestellt werden. Dieser eingestellte Wert wird permanent mit dem von einem Thermostat in der Druckkammer gemessenen Ist-Wert abgeglichen. Die Temperatur wird über die gesamte Druckdauer konstant gehalten. Der Druck kann über einen Druckausgleichsbehälter nach Ende einer Druckhaltephase kontrolliert abgelassen werden. Die Steuereinheit ermöglicht es, Zieldruckwerte für den Automatikbetrieb einzustellen, aktuelle Druck- und Temperaturwerte im System genau abzulesen sowie die Hochdruckanlage manuell oder im Automatikbetrieb zu bedienen.

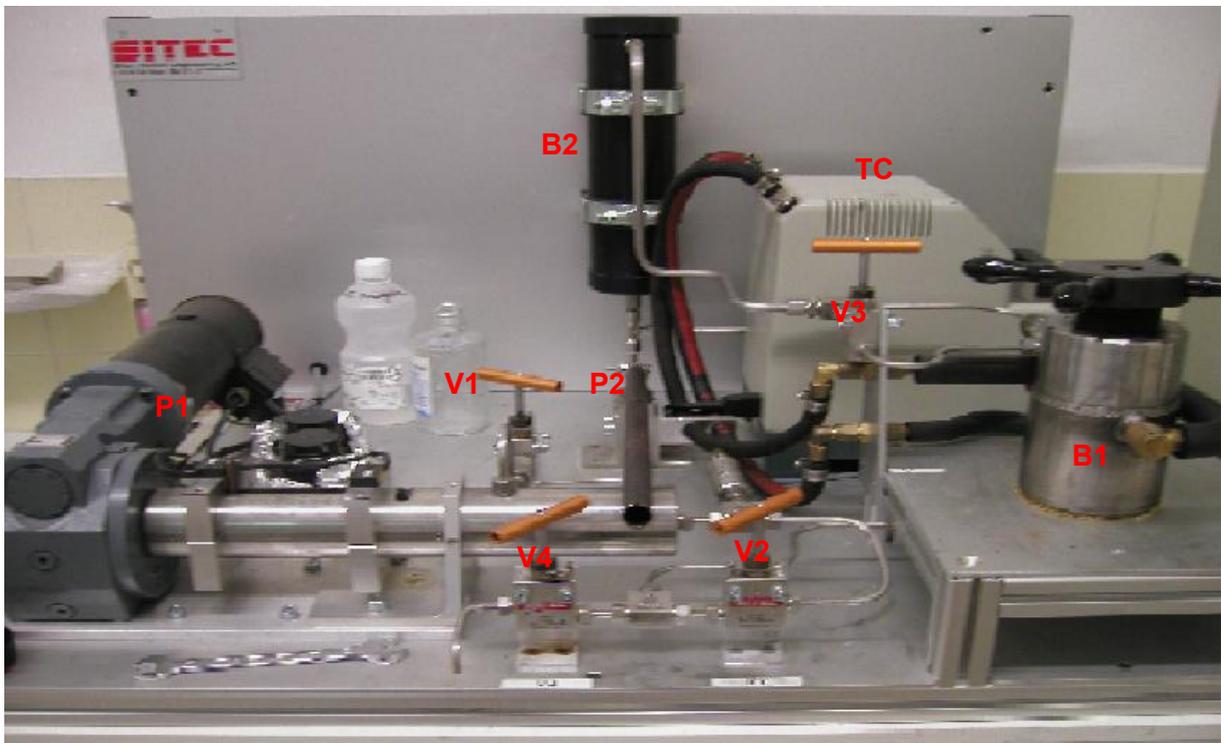


Abbildung 1: Aufsicht der Hochdruckanlage der Firma SITEC-Sieber Engineering AG.

P1: Spindelpresse, P2: Handpumpe, B1: Druckkammer, B2: Überdruckbehälter, TC: Heiz-Kühl-Termostat, V1-4: Ventile

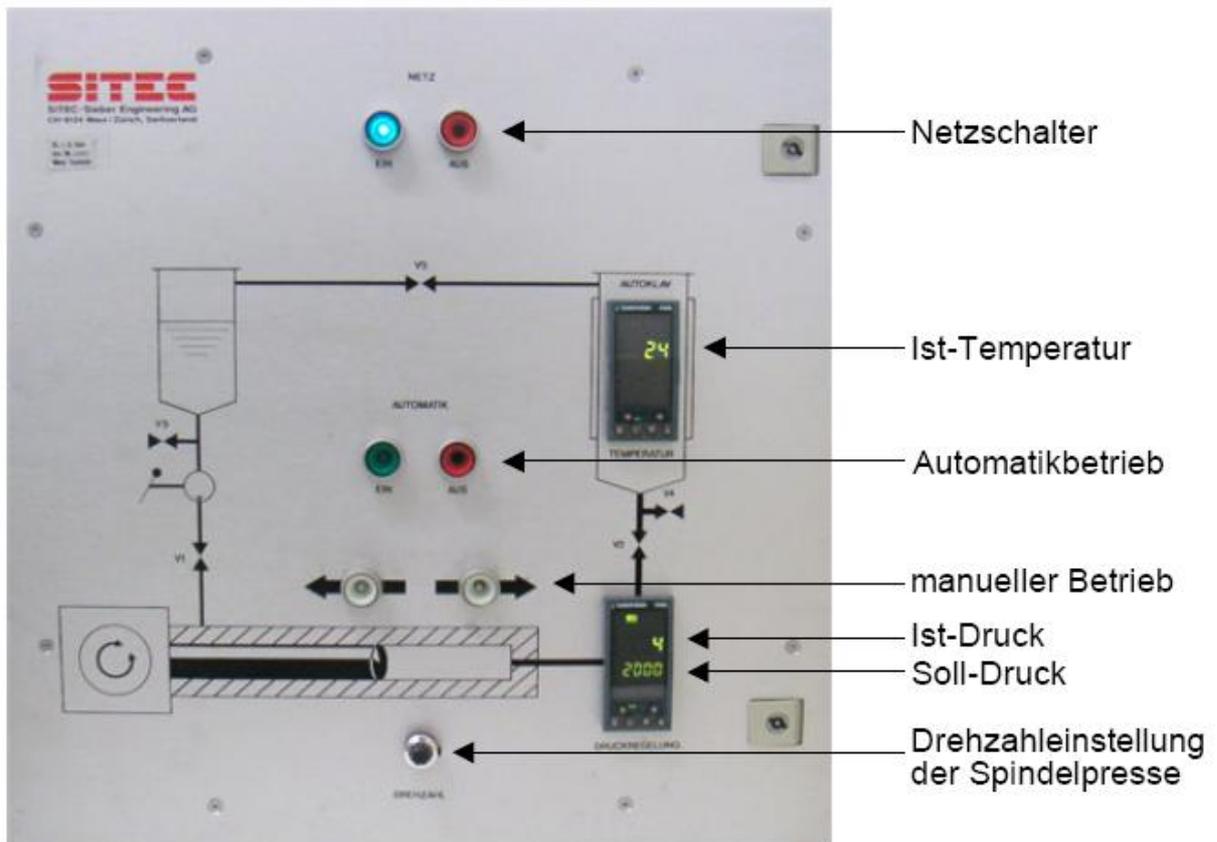


Abbildung 2: Steuereinheit der Hochdruckanlage der Firma SITEC-Sieber Engineering AG

(Quelle: Schauwecker J. *In vitro* Verhalten der Matrixmetalloproteinase-9 nach hydrostatischer Hochdruckbehandlung. In: "Dissertation", Schauwecker J. (Autor), 2004, Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie der Technischen Universität München)

II.1.2.2 Die Hochdruckanlage der Firma RECORD Maschinenbau GmbH, jetzt: Schurter-Retrofit GmbH

Der andere Teil der Versuche wurde mit der Hochdruckanlage HDR 100 - 20 der Firma RECORD Maschinenbau GmbH durchgeführt. Die Hochdruckanlage ist eine transportable Anlage, bestehend aus einem Pressenständer inkl. Elektrik und Autoklav, einem Hydraulikaggregat sowie einem Kühlgerät. Als Hydrauliköl wird HLP 46 verwendet, Füllmenge ca. 3 Liter. Als Kühlflüssigkeit für das Kühlgerät kann Wasser mit einem Frostschutzmittel (Autokühlflüssigkeit) verwendet werden. Der Autoklav stellt ein hochgenaues Bauteil aus hochfester Stahllegierung dar und bedarf beim Beschicken und Entleeren mit Prüfsubstanzen besonderer Sorgfalt. Da der Autoklav nicht aus rostfreiem Stahl besteht, darf er nur mit Flüssigkeiten befüllt werden, die einen guten Rostschutz garantieren (z.B. Öl oder Emulsion mit ausreichendem Rostschutz). Am unteren Teil des fest in der Schwenkeinrichtung eingespannten Autoklavenkörpers ist ein axial verschiebbarer

Druckkopf montiert, an welchem der Hochdruckkolben befestigt ist, der als Druckübersetzer arbeitet. Das Druckübersetzungsverhältnis beträgt 1:39.69, dies bedeutet, dass z.B. bei einem angezeigten Hydraulikdruck von 100 bar (entspricht 10 MPa) ein Autoklaveninnendruck von 3969 bar (entspricht 396,9 MPa) vorliegt.

Der verschlossene Autoklav wird in den Pressraum eingeschwenkt und mit dem seitlich am Pressständer angeordneten Exzenterbolzen auf den Druckkolben abgesenkt. Am Druckeinstellventil wird zunächst ein niedriger Druckbereich vorgewählt. Ist ein Druckaufbau am Manometer erkennbar, wird der Druck erhöht, bis der erforderliche Druck der Versuchsreihen von 6000 bar (entspricht 600 MPa) angezeigt wird.

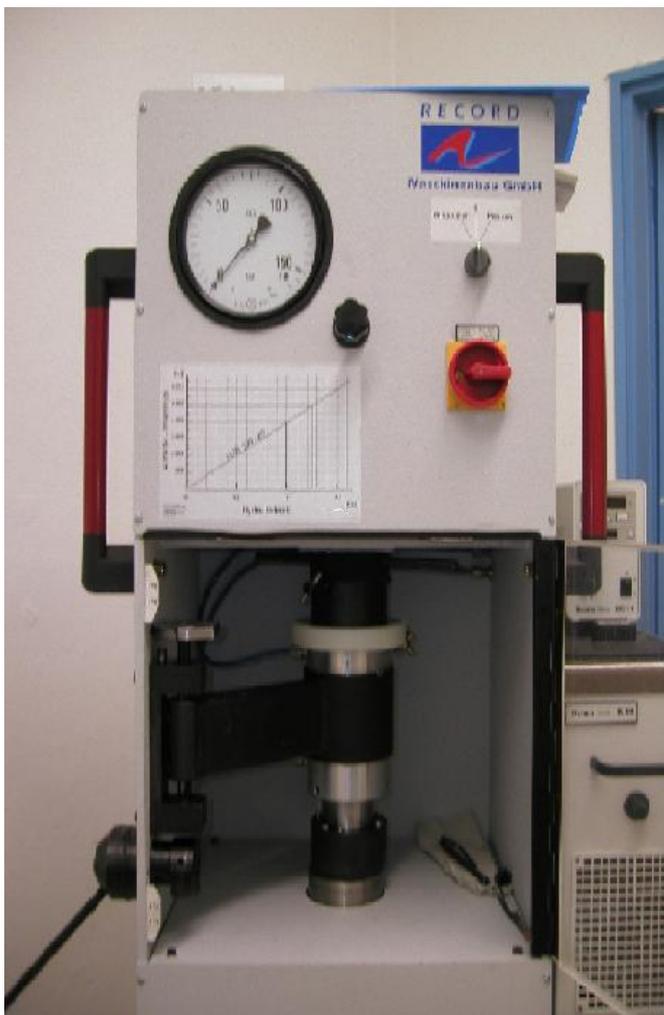


Abbildung 3: Die Hochdruckanlage der Firma RECORD Maschinenbau GmbH, jetzt Schurter-Retrofit GmbH

II.1.3 Weitere Materialien

- Schrauben aus Edelstahl nach DIN 84 M (6 x 20 mm)
- Schafblut, defibrilliert, 100 ml (Oxoid GmbH, Postfach 10 07 53, 46467 Wesel, Deutschland)
- Humane Femurköpfe, arthrotisch degeneriert
- Brutschrank (MEMMERT Bodo Kohloff GmbH, Krankenhaus- und Laborbedarf, 82110 Germering, Deutschland)
- Zentrifuge (HETTICH Universal)
- Densimat (bio Mérieux, Mac Farland)
- Ultraschallgerät (BANDELIN SONOREX, RK 255 H)
- Waage (SARTORIUS, max. 1600 g)
- Vakuumversiegelungsgerät, Komet (Vacuboy, INV-Nr. 318 199122, Technische Universität München, Institut für Energie- und Umwelttechnik, Weihenstephan, Deutschland)
- Trypton-Soya-Bouillon
- Blutagarplatten
- Cryogenic Vials (NALGENE® CRYOWARE™, Nalge Company, Rochester, NY 14602-0365, USA)

- Diamanthohlfraße, (Innendurchmesser 10 mm)

II.2 Methoden

II.2.1 Herstellung der Nährlösung

Zunächst wurde eine Nährlösung, Trypton-Soya-Bouillon (TSB), in der die verschiedenen Testkeime als Übernachtskultur angezüchtet wurden, wie folgt hergestellt: 26,9 g TSB-Pulver wurden mit 750 ml H₂O vermischt und anschließend autoklaviert. Jeweils eine Kultur der genannten Testkeime wurde anschließend mit 5 ml der Nährlösung TSB in einem Stuhlröhrchen, das als Versuchsgefäß diente, vermischt, gerüttelt und danach bei 37°C im Brutschrank über Nacht angezüchtet.

II.2.2 Experimentelle Versuche mit Bakteriensuspensionen

Als Testkeime wurden *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 sowie *E. faecium* ATCC 6057 verwendet. Die zu untersuchenden Bakteriensuspensionen bestanden aus TSB, die mit dem jeweiligen Referenzkeim infiziert wurden.

II.2.2.1 Experimenteller Vorgang

Jeweils eine Kultur der Referenzkeime wurde mit 5 ml TSB bei 37°C im Brutschrank als Übernachtskultur angezüchtet.

Die in TSB angezüchteten Keime wurden bei 4°C und 4000 rpm 10 Min. lang zentrifugiert. Der Überstand nach dem Zentrifugieren wurde verworfen und das Bakterienpellet in NaCl resuspendiert, wobei in Abgleich mit einer Mac Farland Standardsuspension eine Konzentration von 5×10^7 KBE/ml eingestellt wurde. Die Nährlösung TSB wurde anschließend mit den Keimen infiziert und eine Konzentration von 10^6 KBE/ml eingestellt, beispielsweise indem 0,5 ml der Bakterienlösung zu 24,5 ml TSB zugegeben wurden. Die Bakteriensuspensionen wurden anschließend in Cryogenic Vials gefüllt.

Die Hochdruckbehandlung der einzelnen Bakteriensuspensionen erfolgte bei 20°C über 10 Min. lang mit einem Druck von 300 MPa bzw. 600 MPa.

Je Bakterienstamm und Versuchsgruppe wurde n = 5 Proben untersucht.

Die Proben und Kontrollproben wurden dann mit den dazugehörigen Verdünnungen auf Blutagarplatten ausgestrichen und 24 Std. lang bei 37°C im Brutschrank bebrütet.

Anschließend wurden die Kolonie bildenden Einheiten (KBE) quantifiziert und in Übersichtstabellen bzw. in Grafiken mit Hilfe von MS-Excel dargestellt.

II.2.3 Experimentelle Versuche mit den mit Referenzkeimen kontaminierten Schrauben aus Edelstahl

Als Testkeime wurden *S. aureus* ATCC 25923, *MRSA* 27065, *P. aeruginosa* ATCC 27853 sowie *E. faecium* ATCC 6057 verwendet. Schafblut, das mit den jeweiligen Keimen infiziert wurde, diente als Testlösung. Als Testobjekte wurden Schrauben aus Edelstahl nach DIN 84 M (6 x 20 mm) verwendet.

II.2.3.1 Präparation der Schrauben

Die Prüfanschmutzung der Schrauben zur Überprüfung des Hochdruckverfahrens wurde wie folgt hergestellt:

Die in TSB angezüchteten Keime wurden bei 4°C und 4000 rpm 10 Min. lang zentrifugiert. Der Überstand nach dem Zentrifugieren wurde verworfen und das Bakterienpellet in NaCl resuspendiert, wobei in Abgleich mit einer Mac Farland Standardsuspension eine Konzentration von 5×10^7 KBE/ml eingestellt wurde.

Das defibrillierte Schafblut wurde mit den jeweiligen Bakterienzentrifugaten infiziert und die Konzentration auf 10^6 KBE/ml eingestellt, beispielsweise 0,5 ml resuspendiertes Bakterienzentrifugat auf 24,5 ml Schafblut.

Anschließend wurden die Schrauben aus Edelstahl in steriler Arbeitsweise jeweils 1 Min. lang mit dem infizierten Schafblut benetzt und schließlich in Petrischalen im Brutschrank bei 37°C 24 Std. lang getrocknet.

II.2.3.2 Hochdruckbehandlung der Schrauben

Nach der Bereitung der Prüfanschmutzung der Schrauben mit Schafblut erfolgte die Hochdruckbehandlung. Die Versuchsreihen wurden mit der Hochdruckanlage der Firma SITEC-Sieber Engineering AG durchgeführt. Um eine Optimierung des Hochdruckverfahrens zu erzielen, wurden bei den verschiedenen Versuchen die Parameter Druck (MPa), Zeit (Min.) und Temperatur (°C) variiert.

Die mit infiziertem Schafblut kontaminierten Schrauben wurden jeweils in Stuhlröhrchen gelegt, die als Versuchsgefäße dienten. Diese mit den Schrauben gefüllten Versuchsgefäße

wurden dann luftdicht mit TSB aufgefüllt. Die Versuchsgefäße wurden anschließend in die Druckkammer der Hochdruckmaschine gestellt und abhängig von der Versuchsreihe dem HHD wie folgt ausgesetzt:

Versuche	Bakterienstamm	Druckstufe (MPa)	Temperatur (°C)	Druckdauer (Min)
1	S. aureus ATCC 25923	0, 200, 300, 400	20	10
2	S. aureus ATCC 25923	0, 200, 300, 400	20	30
3	S. aureus ATCC 25923	0, 200, 300, 400	4	10
4	S. aureus ATCC 25923	0, 200, 300, 400	4	30
5	MRSA 27065	0, 200, 300, 400	20	10
6	E. faecium ATCC 6057	0, 200, 300, 400, 600	20	10
7	S. aureus ATCC 25923	0, 200	20	30
8	S. aureus ATCC 25923	0, 200	20	6x5
9	S. aureus ATCC 25923	0, 600	4	6x5
10	E. faecium ATCC 6057	0, 600	4	10
11	E. faecium ATCC 6057	0, 600	4	6x5
12	P. aeruginosa ATCC	0, 600	4	6x5

Tabelle 1: Behandlungsparameter Edelstahlschrauben

Die Fallzahl betrug dabei je Versuchsgruppe $n = 5$, fünf unbehandelte Schrauben dienten jeweils als Kontrolle.

Nach der Hochdruckbehandlung wurden die hochdruckbehandelten Schrauben jeweils einzeln in ein mit 10 ml TSB gefülltes Reagenzglas gegeben. Anschließend wurden die Reagenzgläser - die mit den Proben (Schrauben) und die mit der Kontrollprobe - bei Zimmertemperatur 7 Min. lang mit dem Ultraschallgerät bei 55 kHz behandelt, um anhaftende Keime von den Schrauben zu lösen. Aus der entstandenen Suspension wurden dann Verdünnungsreihen zur Beimpfung der Blutagarplatten hergestellt.

Anschließend wurde die Verdünnung auf dem Vortex-Rüttler gut durchgemischt. Danach wurden die Blutagarplatten mit den hergestellten Verdünnungsreihen wie folgt beimpft:

Auf einer Hälfte der Platte wurden mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette 100 µl der 1:100-Verdünnung (entspricht 10^{-2}) pipettiert, auf der anderen Hälfte 100 µl der unverdünnten Probe bzw. Kontrollprobe.

Danach wurden die Blutagarplatten mittels Einmal-Ausstrichpipetten ausgestrichen.

Anschließend wurden die Blutagarplatten bei 37°C 48 Std. lang im Brutschrank bebrütet und die gewachsenen KBE quantifiziert.

Schließlich wurden die Ergebnisse in Übersichtstabellen bzw. in Grafiken mit Hilfe von MS-Excel dargestellt.

II.2.4 Kombinierte Applikation von HHD und Ultraschall

Um zu verifizieren, ob Ultraschall Bakterien empfindlicher für eine HHD-Behandlung macht, oder umgekehrt, wurden die im Folgenden beschriebenen Kombinationsversuche durchgeführt.

II.2.4.1 Präparation der Bakteriensuspension

Als Testkeim wurde *S. aureus* ATCC 25923 in Suspension verwendet. Eine *S. aureus* ATCC 25923-Kultur wurde zunächst mit 5 ml der Nährlösung TSB bei 37°C als Übernachtskultur angezchtet.

Danach folgte die Herstellung der *S. aureus*-Testlösung zur Überprüfung des Hochdruck- und Ultraschallverfahrens. Die in TSB angezüchtete *S. aureus*-Kultur wurde bei 4°C und 4000 rpm 10 Min. lang zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und die Ausgangskonzentration des Zentrifugats über Mac Farland auf 5×10^7 KBE/ml eingestellt. Daraufhin wurde die TSB mit *S. aureus* infiziert und eine Konzentration von 10^6 KBE/ml eingestellt, beispielsweise indem 0,5 ml der Bakterienlösung zu 24,5 ml TSB zugegeben wurden.

Diese *S. aureus*-Testlösung wurde dann in Cryogenic Vials gefüllt, um den Versuch mit fünf Probenreihen und einer Kontrollprobe zu starten. Die Fallzahl der Probenreihen betrug dabei $n = 5$, fünf unbehandelte mit der Nährlösung TSB gefüllte Cryogenic-Vials dienten jeweils als Kontrollprobe. Jeweils fünf Cryogenic Vials einer Probenreihe, die mit der Testlösung gefüllt waren, wurden wie folgt behandelt:

Probenreihe	Behandlung
a	Kontrolle
b	5 min. Ultraschall (55 kHz)
c	10 min. Hochdruck 200 MPa und 20° C
d	5 min. Ultraschall (55 kHz) und 10 min. Hochdruck 200 MPa und 20° C
e	10 min. Hochdruck 200 MPa und 20° C und 5 min. Ultraschall (55 kHz)

Tabelle 2: Behandlungsprotokolle a-e der Versuchsreihe „Kombinierte Applikation von HHD und Ultraschall“

Analog der experimentellen Versuche der mit den Referenzkeimen kontaminierten Schrauben aus Edelstahl wurden aus den behandelten Suspensionen und der unbehandelten Kontrollsuspension Verdünnungsreihen zur Beimpfung auf Blutagarplatten hergestellt und Aliquots auf Blutagarplatten überimpft.

Die Blutagarplatten wurden dann bei 37°C 48 Std. lang im Brutschrank zur Quantifizierung bebrütet.

Schließlich wurden die Ergebnisse in Übersichtstabellen bzw. in Grafiken mit Hilfe von MS-Excel dargestellt.

II.2.5 Hydrostatische Hochdruckbehandlung von kontaminierten Spongiosazylindern aus humanen Femurköpfen

Als Testkeime wurden *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 sowie *E. faecium* ATCC 6057 verwendet. Testobjekte waren Spongiosazylinder, die aus degenerierten humanen Femurköpfen mit Hilfe eines Diamantbohrers gewonnen wurden und mit den Testkeimen vor der Hochdruckbehandlung infiziert wurden. Die Versuchsreihen wurden mit der Hochdruckanlage der Firma RECORD Maschinenbau GmbH, jetzt Schurter-Retrofit GmbH, durchgeführt.

II.2.5.1 Präparation der infizierten Knochenproben

Die Knochenproben wurden insgesamt 9 Patienten mit Coxarthrose - 3 männlichen und 6 weiblichen - intraoperativ unter sterilen Arbeitsbedingungen während einer Hüfttotalendoprothesen-Operation entnommen. Zuvor hatten die Patienten eine Einverständniserklärung zur Durchführung der Studie unterschrieben. Die Patienten waren zwischen 61 und 92 Jahre alt. Mittels einer Diamanthohlfräse mit einem Innendurchmesser von 10 mm wurden schließlich in steriler Arbeitsweise die Spongiosazylinder aus den arthrotisch veränderten Knochenproben der humanen Femurköpfe gewonnen.



Abbildung 4: Mittels Diamanthohlfräse gewonnener Spongiosazylinder

Jeweils eine Kultur der Referenzkeime wurde mit 5 ml TSB als Nährlösung in einem Stuhlröhrchen als Versuchsgefäß vermischt und bei 37°C als Übernachtskultur im Brutschrank angezchtet.

Die TSB-Bakterienlösungen wurden dann bei 4°C und 4000 rpm 10 Min. lang zentrifugiert.

Anschließend wurde analog den zuvor beschriebenen Versuchen die Ausgangskonzentration über Mac Farland eingestellt.

Danach wurde die Testlösung mit TSB verdünnt, beispielsweise 250 µl Testlösung in 49,75 ml TSB, um 10^5 KBE/ml in TSB zu erhalten.

Anschließend wurde jeweils ein Spongiosazylinder in ein Stuhlröhrchen, das als Versuchsgefäß diente und mit 5 ml der jeweiligen Bakteriensuspension gefüllt war, gegeben. Danach wurden die gefüllten Versuchsgefäße bei 37°C 24 Std. lang im Brutschrank bebrütet und die Knochenproben dadurch mit den Testkeimen infiziert.



Abbildung 5: Spongiosazylinder in infizierter Nährlösung

Nach 24 Std. Bebrütungszeit wurden die infizierten Spongiosazylinder in Cryogenic Vials gegeben und mit nicht-infizierter TSB luftdicht aufgefüllt.

Anschließend erfolgte die Hochdruckbehandlung.

II.2.5.2 Hochdruckbehandlung der infizierten Knochenproben

Zur Optimierung des Hochdruckverfahrens wurden je nach Versuchsreihe die Parameter Zeit (Min.) sowie Temperatur (°C) wie folgt variiert:

Die Versuchsreihen der mit *S. aureus*, *P. aeruginosa* und *E. faecium* kontaminierten Spongiosazylinder aus humanen Femurköpfen wurden dem Zieldruck von 6000 bar zunächst bei einer Temperatur von 37°C und Druckzeiten von 6 x 5 Min., 10 Min. und 30 Min. ausgesetzt. Anschließend wurden die Versuchsreihen bei modifizierter Temperatur von 4°C und einer Druckzeit von 6 x 5 Min. dem Zieldruck von 6000 bar ausgesetzt.

Versuche	Bakterienstamm	Druckstufe (MPa)	Temperatur (°C)	Druckdauer (Min)
1	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,600	37	10, 30, 6x5
2	<i>E. faecium</i> ATCC 6057	0,600	37	10, 30, 6x5
3	<i>P. aeruginosa</i> ATCC	0,600	37	10, 30, 6x5
4	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,600	4	6x5
5	<i>E. faecium</i> ATCC 6057	0,600	4	6x5
6	<i>P. aeruginosa</i> ATCC	0,600	4	6x5

Tabelle 3: Behandlungsparameter Femurköpfe

Je Bakterienstamm und Versuchsgruppe wurde n= 5 Proben untersucht.

Nach der Hochdruckbehandlung wurden die Proben bzw. Kontrollproben 15 Sek. lang auf dem Vortex-Rüttler gerüttelt und anschließend bei 37°C 7 Min. lang mit dem Ultraschallgerät behandelt.

Wie bei den zuvor beschriebenen Versuchen wurden dann von den Proben bzw. Kontrollproben Verdünnungsreihen hergestellt.

Die Verdünnungsreihen wurden wie auch die Proben und Kontrollproben auf Blutagarplatten ausgestrichen und zusammen mit den Proben und Kontrollproben 24 Std. lang im Brutschrank inkubiert. Nach 24 Std. wurden die KBE auf den Blutagarplatten quantifiziert.

Die Proben und Kontrollproben, die für 24 Std. im Brutschrank gebrütet haben, wurden zusammen mit den jeweiligen Verdünnungen auf Blutagarplatten ausgestrichen und dann erneut für 24 Std. zur Quantifizierung im Brutschrank bebrütet.

Schließlich erhielt man Ergebnisse nach 24 und 48 Std., die in Übersichtstabellen bzw. in Grafiken mit Hilfe von MS-Excel dargestellt wurden.

III. Ergebnisse

III.1 Hochdruckbehandlung von Bakteriensuspensionen

Das Bakterienwachstum der Suspensionen aller dem HDD ausgesetzten Bakterienstämme konnte nach Applikation von HDD im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen signifikant reduziert werden. Sowohl die mit *S. aureus* ATCC 25923 als auch die mit *P. aeruginosa* ATCC 27853 infizierten Suspensionen konnten bei einer Behandlungstemperatur von 20°C und einer Druckstufe von 600 MPa vollständig inaktiviert werden, wie im in Abbildung 6 ersichtlich ist.

E. faecium ATCC 6057 zeigte auch in diesem Versuch eine hohe Barotoleranz. Das Bakterienwachstum konnte lediglich um 62±4% im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert werden (Abbildung 6).

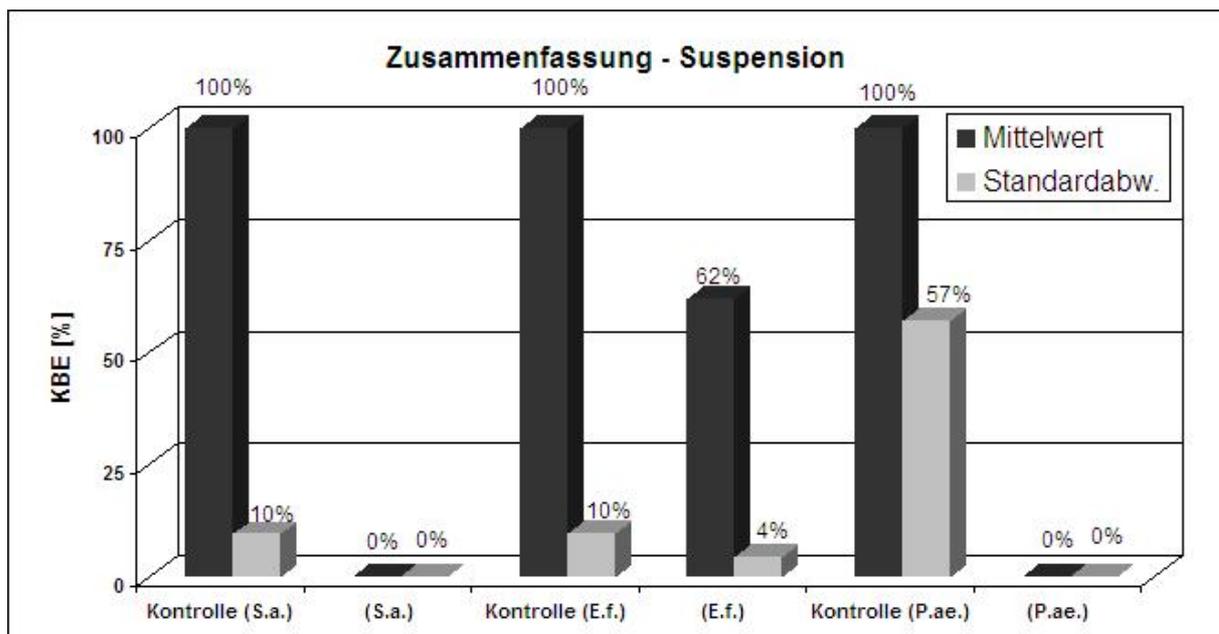


Abbildung 6: Inaktivierung verschiedener Bakterienstämme in Bakteriensuspensionen nach HDD-Applikation von 600 MPa (10 Min, 20 °C). Die Kolonie bildenden Einheiten (KBE) nach Hochdruckbehandlung sind in % dargestellt.

III.2 Hochdruckbehandlung von kontaminierten Edelstahlschrauben

Die Abbildung 7 zeigt das bakterielle Wachstum auf kontaminierten Edelstahlschrauben nach Applikation von HHD.

S. aureus ATCC 25923 sowie *MRSA* 27065 zeigten mit steigendem Druckniveau eine signifikante Reduktion bakteriellen Wachstums. Nach Applikation von 400 MPa zeigte sich bei beiden Bakterienstämmen lediglich ein vereinzelt bakterielles Wachstum. Die Keimanzahl konnte um den Faktor 10^3 reduziert werden.

E. faecium ATCC 6057 zeigte sowohl bei der Applikation von 200 MPa als auch bei 400 MPa erhebliche Barotoleranz. Bei beiden Druckstufen konnte keine signifikante Reduktion der Keimanzahl erreicht werden.

Die Inaktivierung bakteriellen Wachstums durch Applikation von HHD konnte nach Modifikation des Behandlungsprotokolls verbessert werden (Abbildung 8). Sowohl eine Reduktion der Behandlungstemperatur von 20°C auf 4°C als auch eine verlängerte Behandlungsdauer von 10 Min auf 30 Min zeigte bereits bei einer Druckstufe von 300 MPa eine deutliche antibakterielle Wirkung für *S. aureus* ATCC 25923. Eine vollständige Desinfektion der Edelstahlschrauben für *S. aureus* ATCC 25923 konnte bei einer Druckstufe von 300 MPa und einer Behandlungstemperatur von 4°C, bzw. nach einer Behandlungsdauer von 30 Min. erreicht werden. Die Keimanzahl wurde so um den Faktor 10^4 reduziert.

Hingegen zeigte die weitere Modifikation der Behandlungsdauer - eine wiederholende Applikation von HHD (6 x 5 Min.) bei einer Behandlungstemperatur von 4°C - außer bei *S. aureus* ATCC 25923 keine signifikante Reduktion des bakteriellen Wachstums. Sowohl *E. faecium* ATCC 6057 als auch *P. aeruginosa* ATCC 27853 erwiesen sich unter den gegebenen Umständen bei 600 MPa als barotolerant (Abbildung 9).

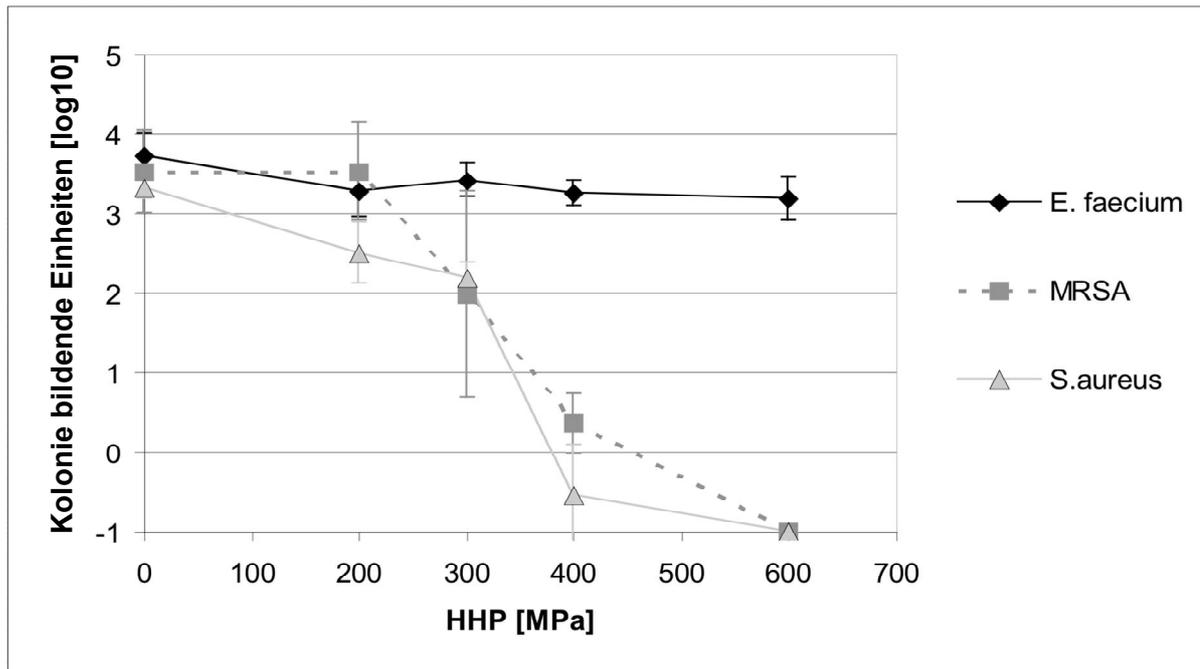


Abbildung 7: Inaktivierung verschiedener Bakterienstämme auf Edelstahlschrauben nach HHD-Applikation (10 Min 20°C). Die Kolonie bildenden Einheiten nach Hochdruckbehandlung sind auf logarithmischer Skala dargestellt.

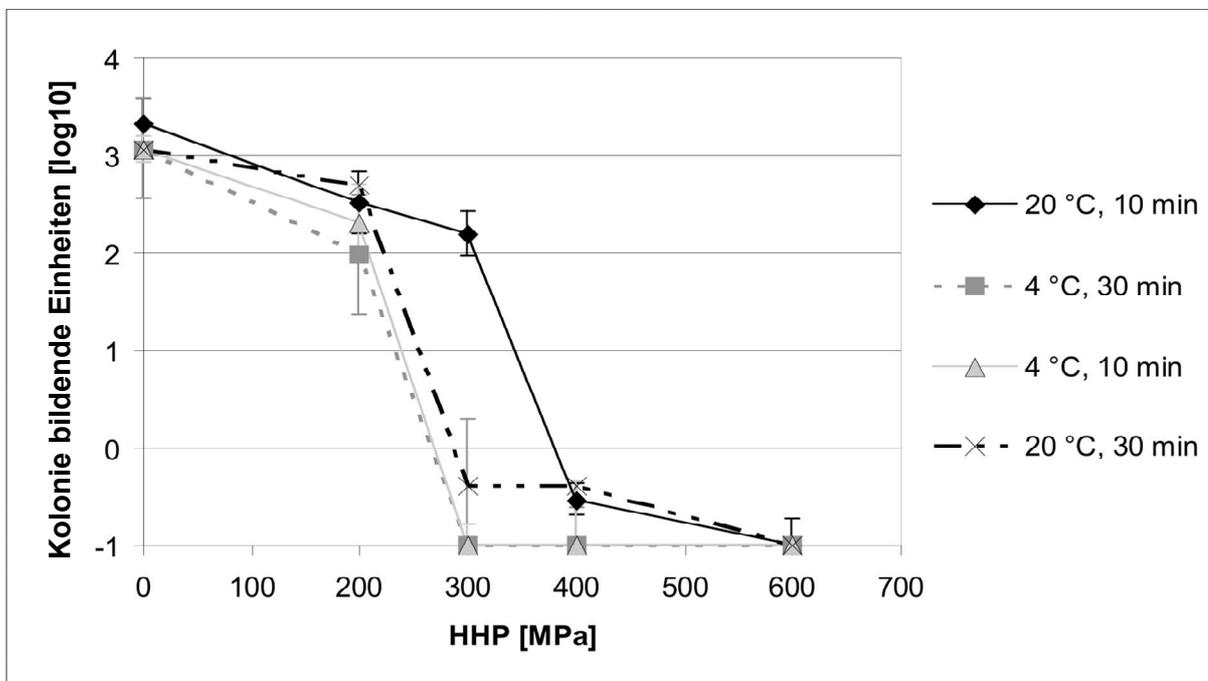


Abbildung 8: Hemmung des bakteriellen Wachstums von *S. aureus* ATCC 25923 auf Edelstahlschrauben nach HHD-Applikation bei verschiedenen Behandlungsprotokollen. Die Kolonie bildenden Einheiten nach Hochdruckbehandlung sind auf logarithmischer Skala dargestellt.

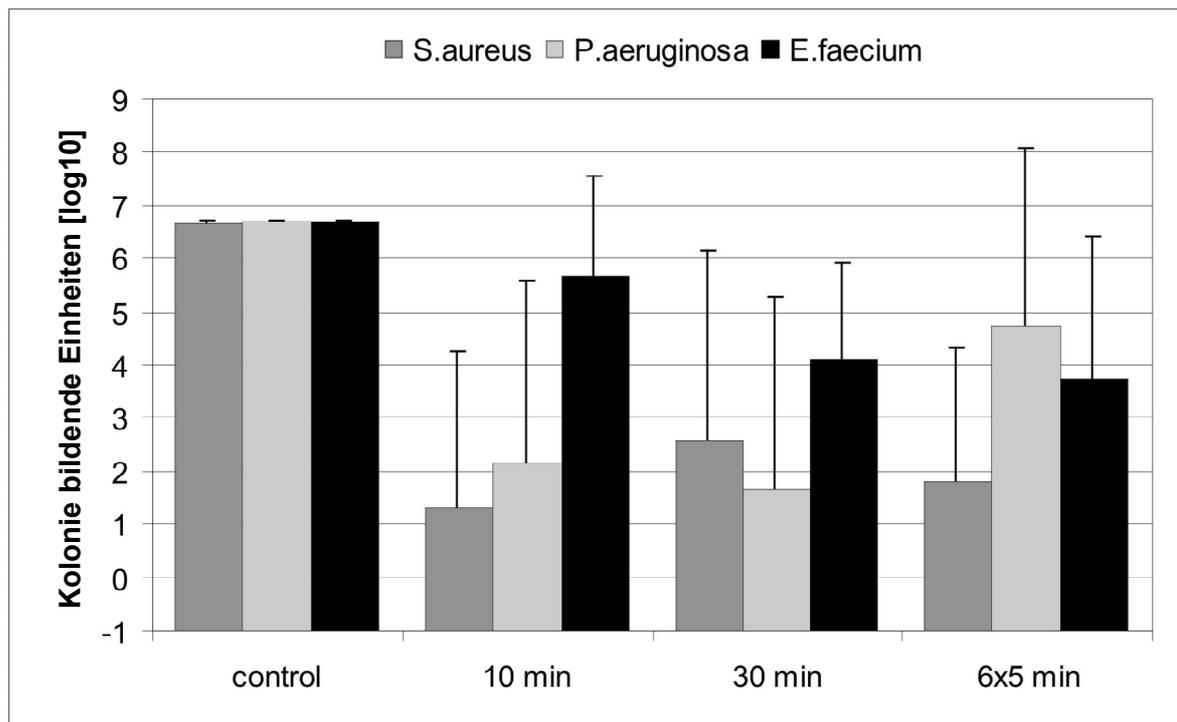


Abbildung 9: Bakteriell Wachstum von *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecium* ATCC 6057 und *P. aeruginosa* ATCC 27853 nach Applikation von HHD mit 600 MPa bei 4°C auf kontaminierten Edelstahlschrauben. Die Kolonie bildenden Einheiten sind als logarithmische Skala dargestellt.

III.3 Kombinationseffekt von appliziertem HHD und Ultraschall auf Bakteriensuspensionen

Die kombinierte Hochdruck- und Ultraschallbehandlung der mit *S. aureus* ATCC 25923 infizierten Bakteriensuspensionen zeigte hinsichtlich der Inaktivierung bakteriellen Wachstums keinen signifikanten Effekt. Eine vollständige Desinfektion der mit *S. aureus* ATCC 25923 infizierten Bakteriensuspensionen konnte nicht erreicht werden (Abbildung 10).

Bei alleiniger Applikation von HHD bei 200 MPa, einer Behandlungsdauer von 10 Min und einer Behandlungstemperatur von 20°C sowie bei der Kombination aus beginnender Hochdruck- und anschließender Ultraschallbehandlung konnte lediglich eine geringfügige Reduktion bakteriellen Wachstums erreicht werden.

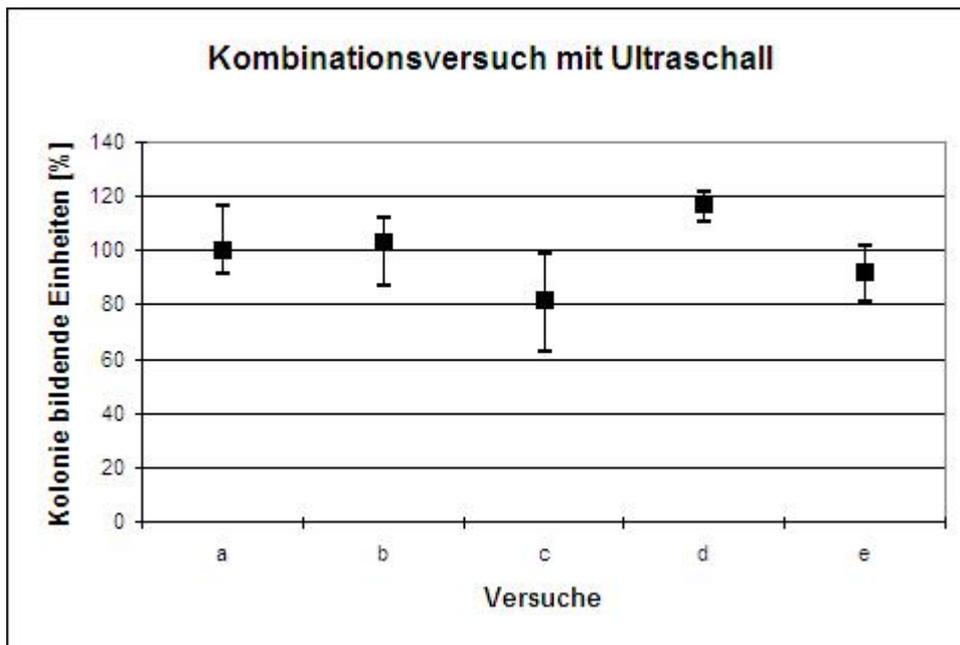


Abbildung 10: Hemmung des bakteriellen Wachstums von *S. aureus* ATCC 25923 in Bakteriensuspensionen nach kombinierter Applikation von HHD und Ultraschall. Die Kolonie bildenden Einheiten sind nach HHD- und Ultraschallbehandlung in % dargestellt. Legende: a: Kontrolle, b: 5 Min. Ultraschall, c: 10 Min. bei 20° C, 200 MPa , d: 5 Min. Ultraschall und 10 Min. bei 20° C, 200 MPa, e: 10 Min. bei 20° C, 200 MPa und 5 Min. Ultraschall.

III.4 Hochdruckbehandlung von kontaminierten Spongiosazylindern aus humanen Femurköpfen

Die Abbildung 11 zeigt die antibakterielle Wirkung von HHD auf Knochen, die nach Behandlung mit der Druckstufe 600 MPa evaluiert wurde.

Einige der kontaminierten Knochenproben konnten trotz der HHD-Applikation nicht desinfiziert werden und zeigten ein deutliches Bakterienwachstum, wohingegen andere kontaminierten Knochenproben durch die HHD-Applikation vollständig desinfiziert wurden. Insgesamt zeigte sich somit eine starke Heterogenität der antibakteriellen Wirkung auf die Knochenproben.

Die antibakterielle Wirksamkeit von HHD konnte im Besonderen für *S. aureus* ATCC 25923 und *P. aeruginosa* ATCC 27853 gezeigt werden, wobei die Behandlungsdauer der HHD-Applikation (10, 30 und 6×5 Min) keinen Einfluss auf das Wachstum zeigte. Bei den Versuchen mit diesen beiden Keimen zeigte sich jeweils eine reduzierte Anzahl der Keime um den Faktor 10^2 .

In summa zeigte sich bei den verschiedenen Behandlungsprotokollen kein signifikanter Unterschied des antibakteriellen Effektes. Weder die Modifikation der Behandlungsdauer noch die wiederholende Applikation von HDD zeigten für *S. aureus* ATCC 25923 und *P. aeruginosa* ATCC 27853 eine unterschiedliche antibakterielle Wirksamkeit.

E. faecium ATCC 6057 zeigte eine hohe Barotoleranz. Sowohl bei einer Behandlungstemperatur von 37°C als auch bei einer Behandlungstemperatur von 4°C konnte lediglich bei wenigen kontaminierten Knochenproben eine antibakterielle Wirksamkeit gezeigt werden.

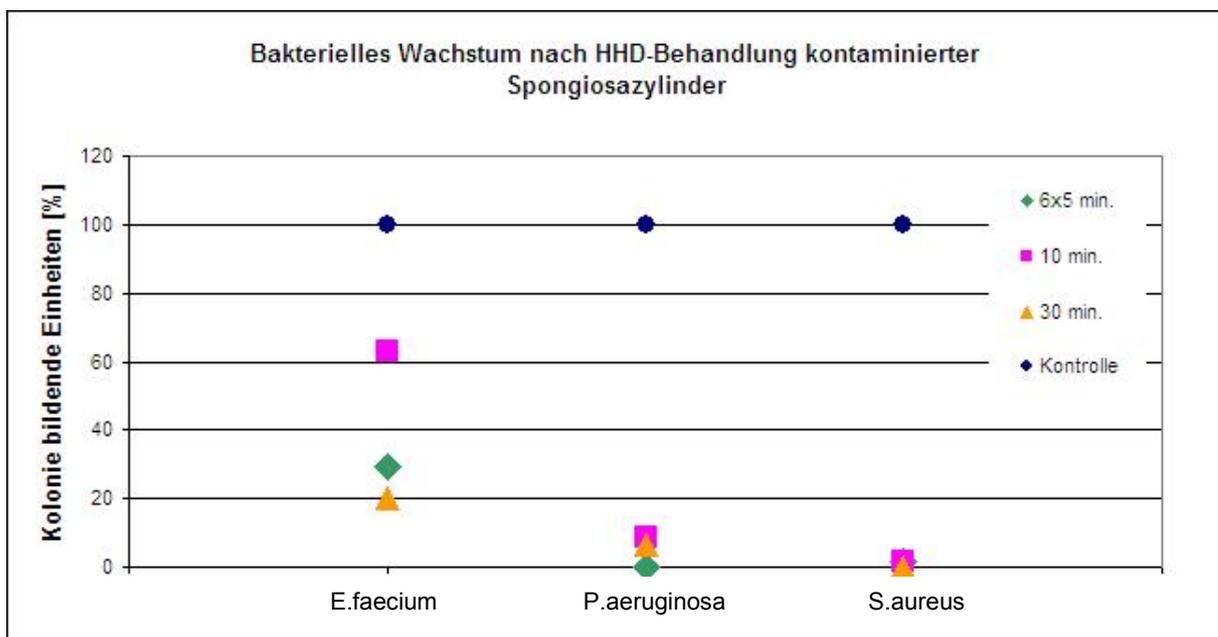


Abbildung 11: Bakteriellcs Wachstum von *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecium* ATCC 6057 sowie *P. aeruginosa* ATCC 27853 nach Hochdruckbehandlung kontaminierter Spongiosazylinder aus humanen Femurköpfen bei verschiedenen Behandlungsprotokollen (600 MPa, 37°C). Die Kolonie bildenden Einheiten nach Hochdruckbehandlung sind in % dargestellt.

IV. Diskussion

Verfahren zur Desinfektion von (potentiell) infizierten autologen und allogenen Transplantaten sowie kontaminierten Biomaterialien, die in der Medizin zur Behandlung von Knochendefekten angewendet werden, führen häufig zu einer Beeinträchtigung der mechanischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften.

Derzeit angewandte etablierte Verfahren zur Desinfektion von Allografts, wie die chemische Behandlung mit Peressigsäure/Ethanol und die Sterilisation mit Gammastrahlen, führen zu einer Beeinträchtigung der Kortikalis, zu einer Zunahme der Knochenporosität sowie zu Knochenresorptionshöhlen (v. Versen R. et al., 1992, S. 380-386; Wutzler P. und Sauerbrei A., 2000, S. 304-308; Campbell D.G. und Li P., 1999, S. 517-521; Sugimoto M. et al., 1991, S. 492-497). Die Stabilität und biologische Potenz des Knochens nehmen wesentlich ab.

Ein weiteres etabliertes Desinfektionsverfahren ist die thermische Behandlung. Beim Autoklavieren von mehr als 100°C kommt es zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Osteokonduktivität, Festigkeit und Struktur des Knochens (Kuner E.H. et al., 1998, S. 870-876). Borchers et al. konnten eine Reduktion der Knochenstärke um etwa 58% zeigen (Borchers R.E. et al., 1995, S. 545-551).

Ferner müssen auch thermosensible Biomaterialien, wie Implantate mit biologischen Oberflächenbeschichtungen, welche vermehrt zur Implantatfunktionalisierung erprobt werden, vor Implantation sterilisiert sein.

HHD stellt eine neue Verfahrensweise der Desinfektion dar. In vorklinischen Studien wird derzeit geprüft, ob der HHD ein adäquates Desinfektionsverfahren ist, um auf der einen Seite Transplantate und Implantate zu desinfizieren, und auf der anderen Seite Mikroorganismen und auch Tumorzellen in Geweberesektaten abzutöten (Diehl P. et al., 2004, S. 369-373; Naal F.D. et al., 2005, S. 1977-1982).

Bisherige Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass die biomechanischen und biologischen Zelleigenschaften von Knochen, Knorpel und Sehnen durch die Anwendung von HHD nicht beeinträchtigt werden. Daher besteht die Möglichkeit, die Qualität von Transplantaten durch die Anwendung von HHD zu verbessern, sowie eine Reimplantation von Knochenteilen, die durch eine Osteomyelitis oder Tumor beeinträchtigt sind, nach extrakorporaler Devitalisierung bzw. Desinfektion mit HHD zu ermöglichen (Diehl P. et al., 2004, S. 369-373; Diehl P. et al., 2005, S. 285-289; Diehl P. et al., 2008, S. 3877-83).

HHD hat als Desinfektionsverfahren bereits eine wichtige Bedeutung in unterschiedlichen Bereichen industrieller Fertigung, so beispielsweise in der Lebensmitteltechnologie zur

Haltbarmachung verschiedener Lebensmittelprodukte, oder der Werkstoffindustrie zur Herstellung von Plastikwaren und Härtung von Metallen (Lopes M.L. et al., 2010, S. 6-15; Zhou G.H. et al., 2010, S. 119-28).

Bereits seit mehr als 100 Jahren wird die Bedeutung des HHD als Desinfektionsverfahren in der Lebensmitteltechnologie erforscht (Cheftel J.C., 1995, S. 75-90). Erste Forschungsansätze zur Verwendung von HHD in der Lebensmitteltechnologie begannen erstmals Ende des 19. Jahrhunderts. 1899 berichteten Hite et al. von einer Verbesserung der Haltbarkeit von Milch nach Behandlung mit 450 MPa (Knorr D., 1992, S. 159-174; Hite B.H. et al., 1914, S. 2-67). Besonders in Japan war das Interesse an dieser Technologie sehr groß, so dass schließlich Produkte wie druckbehandelte Fruchtpürees und Marmeladen kommerziell vermarktet wurden (Patterson M.F. et al., 1995, S. 224-529).

IV.1 Physikalische Grundlagen des HHD

Für den HHD sind die Gesetzmäßigkeiten von Druck in Flüssigkeiten relevant. Der Wirkung des HHD liegt das Pascalsche Prinzip der uniformen und sofortigen Übertragung des Drucks auf das zu behandelnde Objekt, unabhängig von dessen Größe und Geometrie, zugrunde. Der Druck in einer Flüssigkeit verteilt sich in gleicher Größe ungehindert nach allen Seiten und auf die Wände des Behälters (Tipler P.A. und Mosca G., 2009, S. 123). Die Isostatik beruht auf dem Prinzip, dass die Ausbreitung von Druck in Flüssigkeit gleichmäßig und ohne relevante zeitliche Verzögerung erfolgt. Für eine zu untersuchende Substanz, die in keinem direkten Kontakt mit dem druckübertragenden Medium steht, gilt dies ebenso, sofern das die Probe umgebende Material flexibel ist. Diese beiden Gesetze besagen, dass Druck bis zu einer bestimmten Viskosität des Druckmediums gleichmäßig und ohne zeitliche Verzögerung auf die gesamte Untersuchungsprobe wirksam ist. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der Druck im gesamten Probengefäß gleich groß ist und dem in der Druckkammer indirekt gemessenen Druck entspricht.

Man unterscheidet zwischen einer direkten und indirekten hydrostatischen Hochdruckerzeugung. Die Druckerzeugung im Proben- bzw. Druckraum erfolgt mit der Reduktion des spezifischen Volumens des dort vorliegenden Mediums. Wie in Abbildung 12 dargestellt, kann dies durch das Einfahren eines Kolbens in den zylindrischen Druckbehälter (Kolbensystem) oder durch die externe Zufuhr von Flüssigkeitsmasse mittels einer Flüssigkeitsleitung (Rohrsystem) realisiert werden. Im ersten Fall bilden der mittels Öl-Hydraulik betriebene Druckübersetzer und die Druckkammer eine kompakte Einheit (linke Seite, Abbildung 12), wodurch Rohrleitungsverbindungen und weitere anfällige Dichtungen vermieden werden können und weniger Volumen komprimiert werden muss. Im zweiten Fall

sind die beiden Systeme separat aufgebaut und über Rohrleitungen verbunden (rechte Seite, Abbildung 12). Dies hat den Vorteil, dass die hydraulische Druckerzeugung räumlich getrennt erfolgen kann oder der Betrieb mehrerer Druckbehälter mit einem Druckübersetzer möglich ist (Fischer S., 2005).

Die am stärksten von Druck beeinflusste physikalische Größe ist das Volumen. Um druckinduzierte Einflüsse auf physikalische und chemische Reaktionen verstehen zu können, benötigt man das Prinzip von Le Chatelier und Braun. Wird auf ein System im Gleichgewicht durch Änderung der äußeren Bedingungen ein Zwang bzw. eine Störung ausgeübt, reagiert das System derart mit einer Gleichgewichtsverschiebung, dass die Wirkung dieser Störung möglichst gering ist (Moore W.J. und Hummel D.O., 1986, S. 345). Dies bedeutet, dass physikalische und chemische Vorgänge wie Phasenübergang, molekulare Transformation und chemische Reaktion, die mit einer Volumenverringerung einhergehen, unter HHD bevorzugt ablaufen, wohingegen Vorgänge, die mit einer Volumenzunahme verbunden sind, vermindert ablaufen. Volumenveränderungen auf Grund innerer Strukturveränderungen von Proteinen beeinflussen die Gleichgewichtskonstante der reversiblen oder irreversiblen Denaturierungsreaktion sowie die Reaktionsgeschwindigkeit von enzymatischen Reaktionen (Heremans K. und Smeller L., 1998, S. 353-370). Bei hohem Druck werden Flüssigkeiten in unterschiedlichem Maß komprimiert und zeigen unterschiedliche Phasenübergänge. Für Untersuchungen, bei denen Drücke bis 600 MPa verwendet werden, ist als Druckmedium Wasser geeignet. Bei Drücken oberhalb von 600 MPa und bei Temperaturen unter 0 °C liegt Wasser eisförmig vor, so dass ölartige Druckmedien verwendet werden müssen. Der Gefrierpunkt von Wasser wird durch HHD zunächst bis zu einem Druck von 220 MPa gesenkt, bevor dieser bei höheren Druckstufen auf Temperaturen über dem Gefrierpunkt ansteigt (Foguel D. und Silva J.L., 1994, S. 8244-8247).

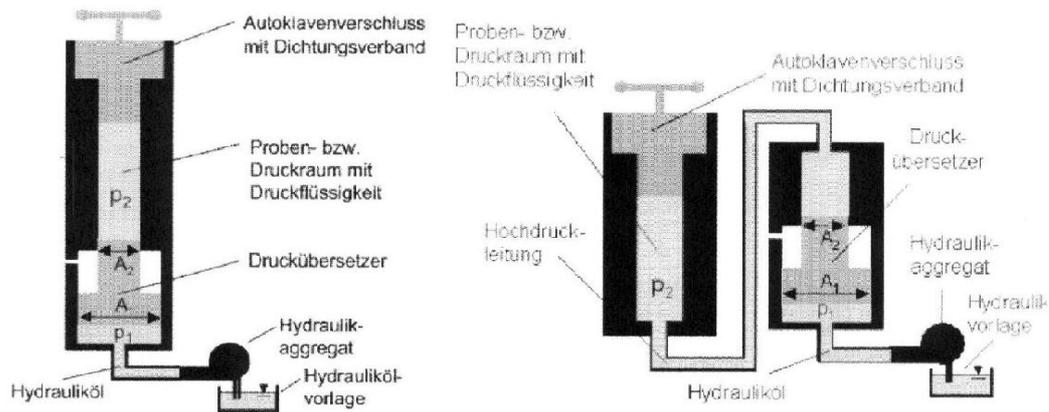


Abbildung 12: Prinzip der direkten (links) und indirekten (rechts) hydrostatischen Hochdruckerzeugung

(Quelle: Fischer S., Einfluß der hydrostatischen Hochdruckbehandlung auf die Filtrierbarkeit von Bier und das Verhalten von β -Glucan-Gel. In: „Dissertation“, Fischer S. (Autor), 2005, Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Lehrstuhl für Energie- und Umwelttechnik der Lebensmittelindustrie der Technischen Universität München)

IV.2 HHD: Einfluss auf biologische Prozesse

Die Applikation von HHD führt in der Zelle zur Zerstörung von Sekundär- und Tertiärstrukturen (Patterson M.F. et al., 1995, S. 224-529). Dies führt zu einer Veränderung der strukturellen und funktionellen Integrität von Proteinen und Polysacchariden (Kalchayanand N. et al., 1998, S. 425-431). Enzyme können dadurch abhängig vom Druckpegel inaktiviert oder aktiviert werden. Bei Triglyzeriden bewirkt ein steigender Druck einen Anstieg der Schmelztemperatur (Knorr D., 1992, S. 159-174).

Durch die Druckeinwirkung kann es zu einer Beschleunigung bestimmter Vorgänge kommen. Neben chemischen Reaktionen sind dies auch makromolekulare Transformationen, Änderungen in der Membranstruktur und der Kristallform sowie des Schmelzpunktes, die mit einer Volumenveränderung der Ausgangsreaktantien einhergehen (Cheftel J.C., 1995, S. 75-90).

Die physikochemischen Eigenschaften des Wassers wie Dichte, ionische Dissoziation und der pH-Wert sowie der Schmelzpunkt von Eis werden durch die Applikation von HHD im Bereich von 100 bis 1.000 MPa erheblich beeinträchtigt. Die adiabatische Kompression von Wasser führt zu einer Temperaturerhöhung von zwei bis drei Grad Celsius pro 100 MPa. Der pH-Wert nimmt bei 100 MPa um 0,73 ab, da Druck die Separation elektrischer Ladungen verursacht, weil diese Wassermoleküle um sich arrangieren, wodurch wiederum eine Volumenreduktion des gesamten Systems erfolgt. Zudem werden die Phasenübergänge des

Wassers durch Druck beeinflusst. Dadurch, dass Druck dem Volumenanstieg bei der Eiskristallbildung entgegenwirkt, bleibt Wasser bei 210 MPa bis zu - 22 °C flüssig. Dadurch können biologische Proben in diesem Temperaturbereich ohne gefrieren aufbewahrt und Anwendungen wie das Auftauen bei Temperaturen von - 20°C bis 0°C unter Druck ermöglicht werden (Chefftel J.C., 1995, S. 75-90).

Die Struktur von Biopolymeren wie Polysaccharide und Polypeptide wird durch schwache chemische Bindungskräfte stabilisiert. Dazu gehören Wasserstoffbrückenbindungen, Van der Waalsche Kräfte und elektrostatische Kräfte. Durch die Applikation von HHD werden diese schwachen Bindungskräfte beeinflusst. Strukturen, die durch kovalente Bindungen aufgebaut sind, werden dagegen durch HHD nicht verändert.

Die Denaturierung von Proteinen gelingt ab einer Druckstufe von etwa 200 MPa und wird mit steigendem Druck signifikanter. Irreversible Proteindenaturierung gelingt bei Drücken über 100 bis 300 MPa, unterhalb 100 MPa ist die Denaturierung als reversibel anzusehen. Zusätzliche Einflussfaktoren sind pH-Wert, Temperatur und die Ionenstärke des Solvens.

Durch die Applikation von HHD wird der Schmelzpunkt von Lipiden in der Größenordnung von 30°C/kbar erhöht. Biomembranen bestehen aus zwei Schichten Lipiden, einer sogenannten „Bilayer“. Zwischen den beiden Schichten befindet sich eine Schicht intrinsischer Membranproteine, die für die Steuerung der Ionenkonzentration in der Zelle sowie für die aktive oder passive Permeation der Membran durch Botenstoffe und Makromoleküle wie Hormone, Enzyme etc. verantwortlich ist. Durch Druckeinwirkung wird die Schutzfunktion der Lipidschichten gestört und die Zelle wird geschädigt.

Die DNA ist ein relativ druckstabiles Makromolekül, da die DNA-Doppelhelix als ein Stab mit negativer Ladung auf der Außenseite angesehen werden kann und die Außenseite mit positiven Gegenladungsträgern besetzt ist. Ihr Schmelzpunkt wird um etwa 3°C/kbar erhöht.

IV.3 HHD: Einfluss auf Mikroorganismen

Der Hauptursache für das Absterben von Mikroorganismen durch die Anwendung von HHD kann im Wesentlichen in der daraus resultierenden Membranschädigung gesehen werden (Kalchayanand N. et al., 1994, S. 4174-4177). Der Druck führt zu einer Erhöhung der Permeabilität der Membranen und der Zellwände (Perrier-Cornet J.M. et al., 1999, S. 1-7). Bei Bakterienzellen konnten durch die Druckeinwirkung auch Effekte auf die Nukleinsäuren und Ribosomen beobachtet werden (Benito A. et al., 1999, S. 1564-1569). Zudem kam es durch HHD zu Veränderungen des Membranflusses (Tsuchido T. et al., 1996, S. 185-188).

IV.3.1 HHD und Bakterien

Die Widerstandsfähigkeit von Mikroorganismen gegen hohe Drücke ist sehr unterschiedlich. Vegetative Zellen sind in der exponentiellen Wachstumsphase sensitiver gegenüber HHD als vegetative Zellen in der stationären Phase. Der unterschiedliche Aufbau der Bakterienzellwand von gramnegativen und -positiven Bakterienspezies bedingt wohl eine erhöhte Druckresistenz der grampositiven Keime (Alpas H. et al., 1999, S. 4248-4251). Die gramnegativen Keime scheinen eine hohe Sensitivität gegenüber HHD zu haben. Benito et al. und Mackey et al. berichten von einer größeren Resistenz der grampositiven Keime wie *S. aureus* und Enterokokken gegenüber Druck und Hitze im Vergleich zu gramnegativen Keimen wie *P. aeruginosa* (Benito A. et al., 1999, S. 1564-1569; Mackey B.M. et al., 1995, S. 1-11).

Die Druckempfindlichkeit ist nicht nur von Spezies zu Spezies unterschiedlich, sondern kann auch innerhalb einer Bakterienspezies sehr stark variieren (Patterson M.F. et al., 1995, S. 224-529).

Neben der zur Desinfektion notwendigen Druckanwendungszeit variiert jedoch bei verschiedenen Mikroorganismen auch der Einfluss der Temperatur und des Druckes sehr stark (Ludwig H. et al., 1994, S. 193-197).

IV.3.2 HHD und Sporen

Sporen sind generell widerstandsfähiger gegen Druck als Bakterien. Sporen können nicht durch alleinige Druckbehandlung vollständig inaktiviert werden. Durch eine Stimulierung mit Druck (Druckbereich 1.000 bar) können die Sporen jedoch zum Keimen angeregt werden. Durch eine anschließende Druckerhöhung auf 300 MPa ist schließlich eine Inaktivierung der gekeimten Sporen möglich (Cheftel J.C., 1995, S. 75-90).

IV.3.3 HHD und Hefen sowie Pilze

Schon nach geringer Behandlungszeit lassen sich Hefen und Pilze unter hohen Drücken inaktivieren. Bis etwa 200 MPa zeigen beide keine Druckempfindlichkeit. Bei Drücken über 200 MPa wird die Zellwand jedoch irreversibel denaturiert und die innere Struktur verändert. Perrier-Cornet et al. zeigten zum einen eine Abnahme des Zellvolumens von *Saccharomyces cerevisiae* bei einer Drucksteigerung auf 250 MPa. Durch die Druckeinwirkung kam es zu einem Massen-Transfer zwischen den Zellen und dem Medium, der durch die Modifizierung der Membraneigenschaften, Zerstörung oder Anstieg der

Permeabilität, erklärt werden kann. (Perrier-Cornet J.M. et al., 1995, S.49-58). Zum anderen zeigte sich bei einer Druckstufe von 250 MPa und einer Druckzeit von 15 Min. ein irreversibler Volumrückgang von druckinaktivierten Hefezellen (Perrier-Cornet J.M. et al., 1999, S. 1-7).

IV.3.4 HHD und Viren

Viren können wie andere Mikroorganismen durch hohe Drücke inaktiviert werden. Es existieren jedoch starke Unterschiede in der Druckempfindlichkeit, deren Ursachen bisher noch nicht geklärt sind.

Die Lipidhülle von Viren scheint verantwortlich zu sein für die hohe Druckresistenz. Selbst nach Druckstufen von 300 bis 700 MPa behielten einzelne Viren ihre Infektiosität (Butz P. et al., 1992, S. 61-64).

Shimasaki et al. und Tian et al. berichteten über eine Inaktivierung der Hepatitis-A-Viren bei Druckstufen zwischen 300 und 500 MPa (Shimasaki N. et al., 2009, S. 14-9; Tian et al, 2002, S. 4486-4494). Das Poliovirus als Referenzvirus für das Hepatitis-C-Virus konnte hingegen mit Druckstufen bis 600 MPa nicht inaktiviert werden (Kingsley D.H. et al., 2002, S. 1605-1609). Auch das Rhinovirus zeigte bei Raumtemperatur Baroresistenz. Druckstufen bis zu 240 MPa erzeugten keine Auflösung oder Inaktivierung des Virus. Das Auflösen konnte lediglich bei 240 MPa und niedrigen Temperaturen (-15°C) sowie durch Zusatz von subdenaturierender Ureakonzentration erzielt werden (Oliveira A.C. et al., 1999, S. 1270-1279). Barosensibel zeigte sich hingegen das HIV-Virus. Nakagami et al. berichteten über eine HIV-Inaktivierung von mehr als 5 log-Stufen bei Drücken von 300-400 MPa (Nakagami T. et al., 1996, S. 475-476).

IV.4 HHD: Einfluss auf Knochen

Maligne Tumoren führen zu Knochendefekten durch direkte Zerstörung des betroffenen Knochens oder durch die notwendige chirurgische Entfernung betroffener Skelettabschnitte. Diese Defekte könnten in vielen Fällen mit Hilfe eines geeigneten Verfahrens durch Devitalisierung des betreffenden Knochens und konsekutiver Reimplantation dieses autologen Knochens repariert werden. Bis zur Verfügbarkeit eines derartigen Verfahrens müssen die Defekte durch Knochenersatzmaterialien überbrückt werden (Diehl P. et al., 2004, S. 369-373). Zur Devitalisierung von Knochen und Knorpel, die von Tumorzellen befallen sind, werden derzeit hauptsächlich zwei Verfahren eingesetzt: die extrakorporale

Bestrahlung und das Autoklavieren (Naal F.D. et al., 2005, S. 1977-1982). Beide Verfahren weisen erhebliche Nachteile auf wie beispielsweise den Verlust der biomechanischen und/oder biologischen Knochenstruktur sowie die Destabilisierung der Knorpeloberfläche (Naal F.D. et al., 2005, S. 1977-1982). Die extrakorporale Bestrahlung und das Autoklavieren führten zur Reduktion der mechanischen Knochenstärke. Nach Applikation von HHD mit 300 MPa blieben die Kortikalis und die Knochenbälkchen unversehrt. Die Applikation einer höheren Druckstufe (600 MPa) führte zur Abnahme der biomechanischen Stabilität der Kortikalis um 10-20%. Die Knochenbälkchen blieben jedoch auch bei dieser Druckstufe unverändert (Steinhauser E. et al., 2006, S. 130-135), so dass trotz der extrem hohen Druckeinwirkung nur eine geringgradige Minderung der mechanischen Eigenschaften des behandelten Knochens zu beobachten war.

In diesem Zusammenhang wird der HHD als ein neues Verfahren zur Sterilisation von Knochen in vorklinischen Studien getestet, um Tumorzellen im Knochen extrakorporal durch HHD inaktivieren zu können (Diehl P. et al., 2004, S. 369-373; Naal F.D. et al., 2005, S. 1977-1982).

Die HHD-Behandlung von Chondrosarkomzellen und Chondrozyten mit 350 MPa führte bei 37°C und einer Behandlungsdauer von 10 Min. zu morphologischen Veränderungen wie Blasenbildungen und Membranveränderungen. Die Chondrosarkomzellen konnten durch Applikation von HHD bei 350 MPa irreversibel geschädigt werden (Naal F.D. et al., 2005, S. 1977-1982).

In einer anderen Studie wurden 4 verschiedene Tumorzelllinien (Fibrosarkom- und Osteosarkomzellen sowie Eierstocktumor- und Brusttumorzellen) ebenfalls mit 350 MPa behandelt. Alle 4 Tumorzelllinien konnten irreversibel geschädigt werden. Jedoch konnten die Tumorzellen, die sich im adherenten und nicht im gelösten Zustand befanden, nicht von der fibronectinumhüllten Oberfläche gelöst werden (Diehl P. et al., 2004, S. 369-373).

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die Anwendung von HHD bei frisch entnommenen Knochen und Sehnen zu keinen nachteiligen Veränderungen ihrer Stabilität bzw. biomechanischen Eigenschaften führte (Diehl P. et al., 2004, S. 369-373).

Zudem konnte in Studien gezeigt werden, dass die biologischen Eigenschaften der wichtigen Proteine der extrazellulären Knochenmatrix (Fibronectin, Vitronectin und Typ I Kollagen) nach Applikation von HHD mit weniger oder exakt 600 MPa nicht beeinträchtigt wurden (Diehl P. et al., 2005, S. 285-289).

Diese Studien zeigen, dass sowohl die biomechanischen Eigenschaften des Knochens und Knorpels als auch die Proteine der extrazellulären Knochenmatrix durch die Anwendung von

HHD unbeeinflusst bleiben, wohingegen die Tumorzellen - wie beispielsweise Chondrosarkomzellen - irreversibel geschädigt werden.

HHD könnte somit als ein neues Verfahren in der operativen Orthopädie zur Inaktivierung von Tumorzellen vor autologer Reimplantation der von Tumor befallenen Knochen- und Sehnenresektate herangezogen werden.

V.5 Desinfektion durch HHD

In dieser Arbeit sollte die Wirksamkeit der Hochdruckbehandlung zur Inaktivierung von Mikroorganismen (Bakterien) untersucht werden.

Das zentrale Thema dieser Arbeit, ob HHD in der operativen Orthopädie als ein neuartiges Sterilisationsverfahren zur Inaktivierung von Mikroorganismen etabliert werden kann, galt es zu überprüfen.

Die herkömmlichen Verfahren zur Desinfektion von mit Mikroorganismen infizierten Knochen oder von mit Tumorzellen befallenen Knochendefekten wie extrakorporale Bestrahlung und Autoklavieren haben erhebliche Einwirkungen auf die biomechanische und biologische Knochenstruktur sowie die Stabilität des Knorpelgewebes (Naal F.D. et al., 2005, S. 1977-1982). Um körpereigene, mit Mikroorganismen infizierte oder mit Tumorzellen befallene Knochen, aber auch mit Keimen infizierte synthetische und biologische Knochenersatzmaterialien effektiv und ohne Beeinträchtigung des Knochens sowie der Stabilität der Knochenersatzmaterialien desinfizieren zu können, benötigt es ein Verfahren, das diesen Ansprüchen gerecht wird.

In wissenschaftlichen Studien konnte gezeigt werden, dass Zusätze im Behandlungsmedium durchaus erheblichen Einfluss auf die Barotoleranz der Bakterien haben können (Sugimoto M. et al., 1991, S. 492-497; Knorr D., 1992, S. 159-174). Um also HHD als ein Verfahren zur Desinfektion von Knochen und Biomaterialien etablieren zu können, ist es unausweichlich, die antibakterielle Wirksamkeit der HHD-Behandlung eben auch im Hinblick auf einen potenziellen Einfluss organischer Rückstände wie Proteine oder auch Blut zu überprüfen.

Daher wurden in dieser Arbeit neben der HHD-Behandlung von in TSB angezüchteten Bakteriensuspensionen, mit infiziertem Schafblut kontaminierte Edelstahlschrauben sowie mit den Referenzkeimen infizierte Knochenproben der HHD-Behandlung unterzogen.

IV.5.1 Untersuchte Bakterienstämme

Die Referenzkeime, die in dieser Arbeit zur Infektion der Nährlösungen, der Edelstahlschrauben sowie der Knochenproben verwendet wurden, können allesamt Osteomyelitiden, Osteitiden und septische Arthritiden sowie Implantatinfektionen verursachen.

Um die Barointoleranz bzw. die -toleranz der verschiedenen Bakterienstämme verstehen zu können, ist zunächst das Verständnis über die Struktur bzw. den Aufbau der Keime unerlässlich.

Grampositive Keime wie *S. aureus*, MRSA und *E. faecium* erscheinen bei der Gram-Färbung blau, gramnegative Keime wie *P. aeruginosa* rot (Kayser F.H., 2001, S. 154-238).

Die Ursache der unterschiedlichen Färbung liegt im unterschiedlichen Zellwandaufbau. Die Zellwand der grampositiven Bakterien besteht aus einem bis zu vierzig Schichten dicken Mureinnetz mit Membran-Lipoteichonsäuren und Zellwand-Teichonsäuren (Abbildung 13). Die Zellwand der gramnegativen Bakterien besteht lediglich aus einer dünnen Mureinschicht. Wichtiges Strukturelement ist die äußere Membran, in der zahlreiche Proteine und das medizinisch wichtige Lipopolysaccharid lokalisiert sind (Abbildung 14) (Kayser F.H., 2001, S. 154-238).

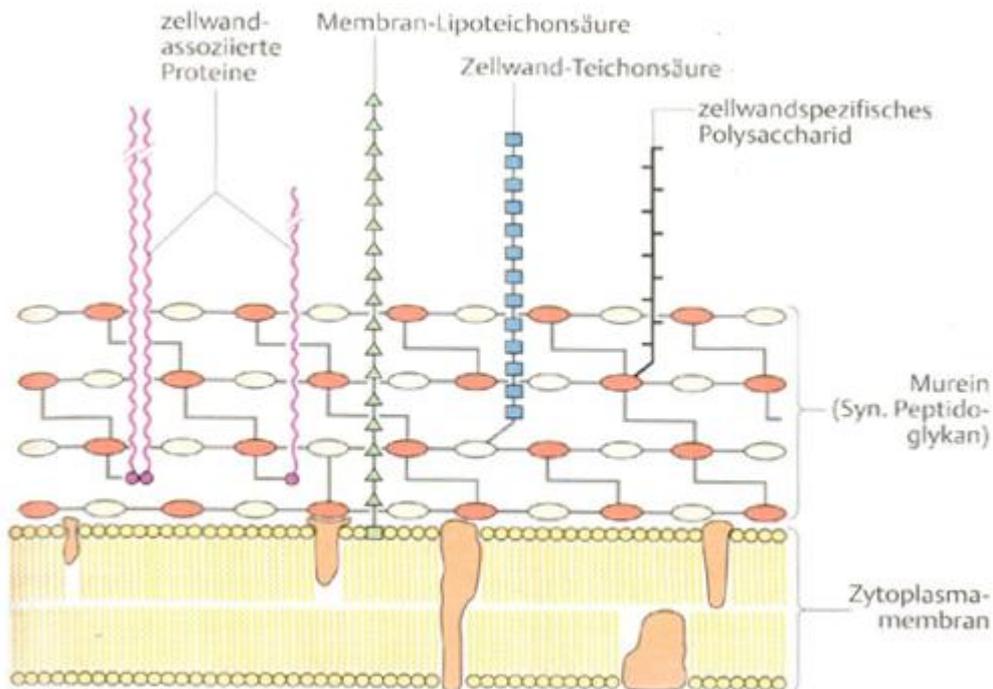


Abbildung 13: Zellwand grampositiver Bakterien

(Quelle: Kayser FH. Morphologie und Feinstruktur der Bakterien. In: „Medizinische Mikrobiologie“, Kayser F.H., Bienz K.A., Eckert J., Zinkernagel R.M. (Hrsg), Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 2001, 10. Auflage, S. 163)

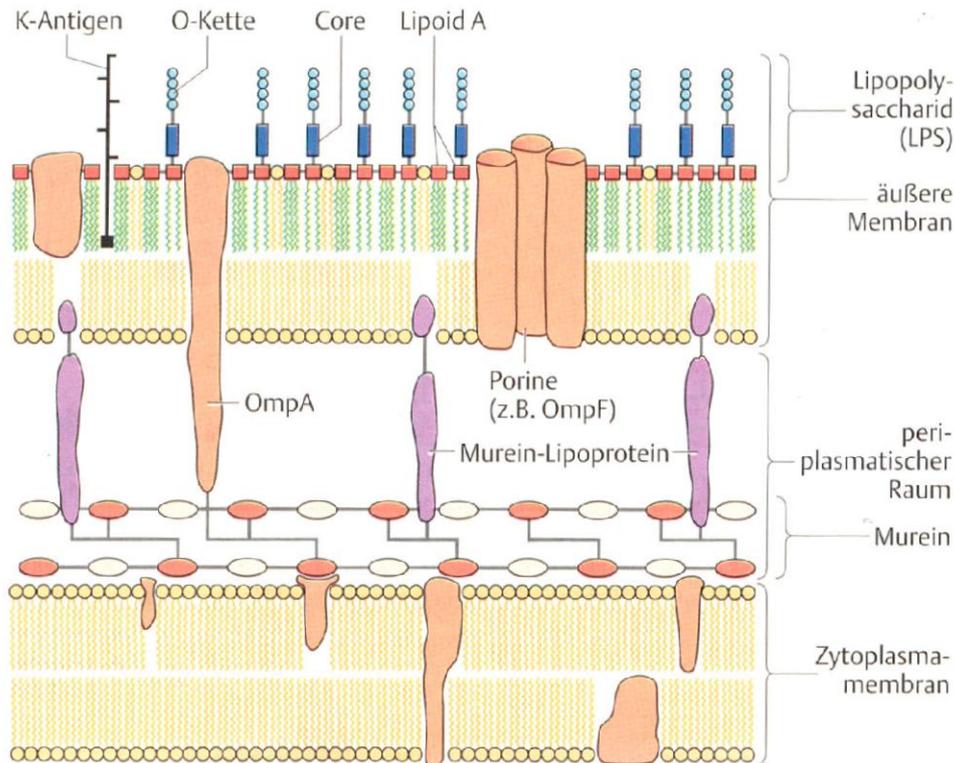


Abbildung 14: Zellwand gramnegativer Bakterien

(Quelle: Kayser FH. Morphologie und Feinstruktur der Bakterien. In: „Medizinische Mikrobiologie“, Kayser F.H., Bienz K.A., Eckert J., Zinkernagel R.M. (Hrsg), Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 2001, 10. Auflage, S. 164)

IV.5.1.1 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 und MRSA 27065 (Methicillin-resistenter Stamm von *Staphylococcus aureus*)

S. aureus und MRSA gehören zur Gruppe der grampositiven Kokken, die zur Familie der Micrococcaceae gehören. Die Keime sind unbeweglich und bilden das Enzym Katalase. Zusammen mit *Escherichia coli* gehört *S. aureus* zu den häufigsten Erregern bakterieller Infektionen des Menschen.

Als typische und häufige Erreger von invasiven Knocheninfektionen wie Osteomyelitiden, Osteitiden sowie septischen Arthritiden wurden beide Keime in dieser Arbeit zur Überprüfung der HHD-Wirksamkeit bei grampositiven Keimen herangezogen.

Die Diagnostik gelingt mittels mikroskopischem und kulturellem Nachweis (Kayser F.H., 2001, S. 239-360).

IV.5.1.2 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

P. aeruginosa gehört zur Gruppe der gramnegativen, aeroben, stäbchenförmigen, begeißelten Pseudomonaden. Diese kommen in der Natur weitverbreitet vor, in kleiner Zahl auch im Darm von Mensch und Tier. *P. aeruginosa* ist für die Medizin der wichtigste Vertreter. Der Keim verursacht neben postoperativen Wundinfektionen bei immunsupprimierten Patienten invasive Knocheninfektionen wie Osteomyelitiden, Osteitiden und septische Arthritiden (Kayser F.H., 2001, S. 239-360).

P. aeruginosa wurde in dieser Arbeit als Referenzkeim zur Überprüfung der HHD-Wirksamkeit gegen gramnegative Bakterienstämme herangezogen.

Als Teil der Zellwand besitzt *P. aeruginosa* eine äußere Membran, deren Architektur für die natürliche Resistenz gegen viele Antibiotika verantwortlich ist.

Die Diagnostik umfasst den mikroskopischen und kulturellen Nachweis. Die Kultur gelingt in einem Medium, das freien Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor aufweist (Kayser F.H., 2001, S. 239-360).

IV.5.1.3 *Enterococcus faecium* ATCC 6057

E. faecium gehört zur Gruppe der grampositiven Kokken. Sie sind unbeweglich und Katalase-negativ. Der normale Standort der weitverbreiteten Enterokokken ist der Darm von Mensch und Tier (Kayser F.H., 2001, S. 239-360). Enterokokken weisen nur geringe Pathogenität auf, sind aber häufig Erreger von nosokomialen Infektionen bei immunsupprimierten Patienten, meist als Teil einer Mischflora. Bei 5-10 % der Krankheitsfälle handelt es sich um den Erreger *E. faecium*, der für eine Reihe von Osteomyelitiden, Osteitiden und septische Arthritiden verantwortlich ist (Kayser F.H., 2001, S. 239-360).

E. faecium ATCC 6057 dient als Referenzkeim für die standardisierte Prüfung von Desinfektionsautomaten, da die Bakterien bekanntermaßen eine hohe Thermotoleranz zeigen. In dieser Arbeit wurde der Keim als sogenannter Problemkeim für Desinfektionsverfahren herangezogen. *E. faecium* zeigte in dieser Arbeit sowie in vorangegangenen Studien erhebliche barotolerante Eigenschaften bis zu einer Druckstufe von 600 MPa.

Die Diagnostik gelingt ebenso wie bei den anderen Referenzkeimen mittels mikroskopischem und kulturellem Nachweis.

IV.6 HHD Wirksamkeit auf Referenzkeime

Bei der Versuchsreihe mit kontaminierten Edelstahlschrauben erfolgte zunächst die Infektion des Schafblutes mit den einzelnen Referenzkeimen. Anschließend erfolgte die Bereitung der Prüfanschmutzung der Edelstahlschrauben mit dem infizierten Schafblut.

Zunächst wurden die mit *S. aureus* ATCC 25923, *MRSA* 27065 und *E. faecium* ATCC 6057 kontaminierten Edelstahlschrauben über einen Zeitraum von 10 Min. bei Raumtemperatur (20°C) mit Druckstufen von 200, 300 und 400 MPa behandelt.

Bei steigendem Druckniveau zeigte sich sowohl für *S. aureus* ATCC 25923, als auch für *MRSA* 27065 eine signifikante Reduktion der Keimanzahl. *E. faecium* ATCC 6057 zeigte hingegen bei steigendem Druckniveau erhebliche Barotoleranz. Es konnte keine signifikante Reduktion der Keimanzahl erreicht werden.

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine unterschiedliche Druckempfindlichkeit nicht nur von Spezies zu Spezies, sondern auch innerhalb einer Bakterienspezies stark variiert (Patterson et al., 1995, S. 224-529). Daneben variiert jedoch auch bei den verschiedenen Bakterienspezies der Einfluss der Druckhaltdauer sowie der Temperatur (Ludwig H. et al., 1994, S. 193-197).

Um eine Verbesserung der Ergebnisse bzw. eine vollständige Desinfektion der kontaminierten Edelstahlschrauben erzielen zu können, wurden die Behandlungsparameter Druck (MPa), Temperatur (°C) und Zeit (Min.) modifiziert.

Die Temperatur wurde von Raumtemperatur (20°C) auf 4°C reduziert. Allein durch diese Temperaturreduktion konnte für *S. aureus* ATCC 25923 bereits bei einem Druckniveau von 300 MPa eine signifikante Keiminaktivierung festgestellt werden. Die Verlängerung der Behandlungsdauer bzw. der Druckhaltdauer von 10 Min. auf 30 Min. führte bei demselben Druckniveau ebenfalls zu einer signifikanten Keimreduktion.

Die Keimanzahl konnte so durch eine Reduktion der Behandlungstemperatur und durch eine Verlängerung der Druckhaltezeit um den Faktor 10^4 reduziert werden.

Um den Einfluss der Druckhaltezeit auf die Keiminaktivierung genauer verifizieren zu können, wurden die mit *S. aureus* ATCC 25923 kontaminierten Edelstahlschrauben bei Raumtemperatur (20°C) über einen Zeitraum von 30 Min. sowie durch wiederholende HHD-Applikation (6 x 5 Min.) mit den Druckniveaus 200, 300 und 400 MPa behandelt. Die wiederholte HHD-Applikation zeigte bei einem Druckniveau von 200 MPa eine größere Effektivität als die Druckhaltdauer von 30 Min. 98% der Keime konnten im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert werden, wohingegen die Keimanzahl bei einer Druckhaltdauer von 30 Min. lediglich um 87% im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert werden konnte.

Eine signifikante Reduktion der Keimanzahl konnte also durch eine Reduktion der Raumtemperatur (20°C) auf 4°C sowie durch Modifikation der Druckhaldedauer von 10 Min. auf 30 Min. bzw. durch wiederholte HHD-Applikation (6 x 5 Min.) erreicht werden.

Eine vollständige Desinfektion der kontaminierten Edelstahlschrauben konnte anschließend durch Modifikation des Behandlungsparameters Druck (MPa) erzielt werden. Durch eine Erhöhung des Druckniveaus auf 600 MPa konnte schließlich eine vollständige Desinfektion der mit *S. aureus* ATCC 25923 kontaminierten Schrauben erreicht werden.

Im Vergleich zu *S. aureus* ATCC 25923 erwies sich *E. faecium* ATCC 6057 sowohl bei der Applikation der Druckstufe 200 MPa als auch bei Erhöhung der Druckstufe auf 600 MPa als erheblich barotolerant. Die Optimierung der Behandlungsparameter Temperatur (°C) und Druckhaldedauer (Min.) zeigte keinen positiven Effekt hinsichtlich der Keiminaktivierung.

Es konnte für *E. faecium* ATCC 6057 keine signifikante Reduktion der Keimanzahl nachgewiesen werden.

Neben *E. faecium* ATCC 6057 zeigte auch *P. aeruginosa* ATCC 27853 barotolerante Eigenschaften. Im Vergleich zu *S. aureus* ATCC 25923 konnte keine signifikante Reduktion der Keimanzahl erreicht werden.

Auch bei der HHD-Behandlung von Bakteriensuspensionen bestätigte sich die Barotoleranz von *E. faecium* ATCC 6057 im Vergleich mit *S. aureus* ATCC 25923.

Die zu untersuchenden Bakteriensuspensionen bestanden aus der Nährlösung TSB, die mit den Referenzkeimen *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 und *E. faecium* ATCC 6057 kontaminiert wurden.

E. faecium ATCC 6057 zeigte in Suspension ebenso wie in der Versuchsreihe mit kontaminierten Edelstahlschrauben barotolerante Eigenschaften. Die Applikation von 600 MPa führte zu einer Reduktion des Bakterienwachstums um lediglich 62±4% der Kontrollgruppe.

In beiden Versuchsreihen - kontaminierte Edelstahlschrauben und Bakteriensuspensionen - konnte für *S. aureus* ATCC 25923, *MRSA* 27065 und *P. aeruginosa* ATCC 27853 durch Modifikation der Behandlungsparameter Druck (MPa), Temperatur (°C) und Zeit (Min.) eine signifikante Reduktion des Bakterienwachstums bzw. eine vollständige Bakterieninaktivierung nachgewiesen werden.

IV.7 Kombinierte Anwendung von HHD und Ultraschall

In einer anschließenden Versuchsreihe sollte die antibakterielle Wirksamkeit der Kombination von HHD-Applikation und Ultraschallbehandlung herausgearbeitet werden. Es sollte überprüft werden, ob Bakterien durch eine Ultraschalluntersuchung für eine HHD-Behandlung empfindlich gemacht werden, oder die HHD-Applikation Bakterien für eine Ultraschallbehandlung empfindlich macht.

Bereits 1967 sprachen Puleo et al. von Ultraschall als einer genauen und effektiven Technik, um mikrobielle Kontaminationen von Oberflächen zu lösen (Puleo J.R. et al., 1967, S.58-62). Erst in neuerer Zeit erkannte man jedoch das Potenzial von Ultraschall, Bakterienzellen zu zerstören und Enzyme zu inaktivieren (Raso J. et al., 1998, S. 849-54; Schütt-Abraham I. et al., 1992, S. 864-867; Böhm R., 2002, S. 19-61). Die Einsatzbreite der Ultraschallreinigung reicht von Instrumenten aus der mikroinvasiven Chirurgie bis hin zur Aufbereitung von Reinigungsgütern in der Großindustrie. Die Ultraschall-Reinigung beruht auf dem Prinzip der Kavitation. Ultraschallwellen werden über die übertragende Flüssigkeit an das Reinigungsgerät herangetragen (Schütt-Abraham I. et al., 1992, S. 864-867). Durch die raschen Folgen von Druckerhöhung und Druckabfall werden gelöste Gase extrahiert (Kavitationsphänomen) und die Zellwände von Mikroorganismen mechanisch überstrapaziert. Dies führt zur Ruptur der Zellwände und zur Zerstörung der Zellen, also zur Plasmolyse (Schütt-Abraham I. et al., 1992, S. 864-867; Böhm R., 2002, S. 19-61). Im Gegensatz zur Wärmebehandlung überwiegt hier die Zerreißung von Zellhüllen und -membranen (Sajas I.F. und Gorbatow M.R., 1978, S. 1325-1328, 1331-1332).

Durch Versuchsreihen in der Zahnheilkunde oder in der Lebensmittelindustrie konnte der antibakterielle und bakterizide Effekt der Ultraschallbehandlung gezeigt werden. Nicht nur die alleinige Ultraschallbehandlung, sondern auch der Kombinationseffekt von Ultraschall mit Wärmebehandlung zeigte bei Czank et al. antibakterielle und bakterizide Wirkung auf *E. coli* und *Staphylococcus epidermidis* (Ishibashi K. et al., 2010, S. 751-756; Czank C. et al., 2010, S. 183-189).

Es sollte somit in der vorliegenden Arbeit geprüft werden, ob durch eine Kombination von Ultraschall und HHD eine verstärkte antibakterielle Wirksamkeit erreicht werden kann, dass beide Verfahren auf die Integrität der Zellwände einwirken.

Als Referenzkeime wurde *S. aureus* ATCC 25923 verwendet, der in den vorangegangenen Versuchsreihen durch HHD-Applikation vollständig desinfiziert werden konnte.

In summa zeigte die kombinierte Hochdruck- und Ultraschallbehandlung jedoch keinen signifikanten Effekt auf die Inaktivierung bakteriellen Wachstums.

Nachgewiesen wurde lediglich eine geringfügige Reduktion der Keimanzahl nach alleiniger HHD-Applikation von 200 MPa sowie durch eine beginnende HHD-Behandlung bei 200 MPa und anschließender fünfminütiger Ultraschallbehandlung.

Eine signifikante Reduktion der Keimanzahl konnte nicht erreicht werden.

IV.8 Antibakterielle Wirkung von HHD auf infizierte Knochenproben

Die Evaluation der antibakteriellen Wirkung von HHD auf Knochen erfolgte nach Applikation einer Druckstufe von 600 MPa.

Unter sterilen Arbeitsbedingungen wurden insgesamt 9 Patienten - 3 männlichen und 6 weiblichen - Knochenproben intraoperativ während einer Hüft-Totalendoprothesen-Operation entnommen. Alle Patienten litten an einer Coxarthrose. Mit Hilfe einer Hohlfräse mit einem Innendurchmesser von 10 mm wurden in steriler Arbeitsweise Spongiosazyylinder aus den arthrotisch degenerierten Femurköpfen der Patienten gewonnen. Anschließend wurden die Spongiosazyylinder mittels einer Nährlösung aus TSB, die mit den Referenzkeimen kontaminiert wurde, infiziert.

Antibakterielle Wirksamkeit von HHD konnte insbesondere für *S. aureus* ATCC 25923 sowie für *P. aeruginosa* ATCC 27853 nachgewiesen werden. Bei einem Druckniveau von 600 MPa und einer Behandlungstemperatur von 37°C kam es zu einer signifikanten Reduktion der Keimanzahl. Die Modifikation der Druckhaldedauer (10 Min., 30 Min. sowie wiederholte HHD-Applikation) zeigte keinen Einfluss auf die Inaktivierung der beiden Bakterienspezies. Die Keimanzahl konnte um den Faktor 10^2 reduziert werden, eine komplette Desinfektion wurde jedoch nicht zuverlässig erreicht. Insbesondere zeigte sich eine deutliche Heterogenität der Inaktivierungsraten, d.h. während einzelne Proben komplett desinfiziert werden konnten, zeigte sich bei anderen Proben nahezu unverändertes Bakterienwachstum.

S. aureus ATCC 25923 konnte durch Reduktion der Behandlungstemperatur auf 4°C vollständig inaktiviert werden. *P. aeruginosa* ATCC 27853 zeigte hingegen durch die Temperaturreduktion keine signifikante Keiminaktivierung.

Auch in dieser Versuchsreihe konnte für *E. faecium* ATCC 6057 eine hohe Barotoleranz nachgewiesen werden. Lediglich bei wenigen kontaminierten Spongiosazyindern konnte eine Keimreduktion gezeigt werden, wobei die Modifikation der Behandlungstemperatur keinen signifikanten Einfluss hatte.

In summa konnte in der Versuchsreihe mit kontaminierten humanen Spongiosazyindern bei den verschiedenen Behandlungsprotokollen kein signifikanter Unterschied der

antibakteriellen Wirksamkeit der HHD-Applikation im Vergleich zu Suspensionen bzw. kontaminierten Schrauben nachgewiesen werden. Auffallend war die deutliche Heterogenität der antibakteriellen Wirkung bei den Knochenproben. Trotz HHD-Behandlung zeigten einige kontaminierte Knochenproben signifikantes bakterielles Wachstum, wohingegen andere kontaminierte Knochenproben vollständig desinfiziert werden konnten.

Die antibakterielle Wirksamkeit von HHD konnte sowohl für *S. aureus* ATCC 25923, als auch für *P. aeruginosa* ATCC 27853 nachgewiesen werden, ohne eine sichere Desinfektion zu garantieren.

Entscheidenden Einfluß auf die HHD-Wirksamkeit zeigte sich durch die Modifikation bzw. Optimierung der Behandlungsparameter Druck (MPa), Temperatur (°C) und Zeit (Min.).

Keine entscheidende Rolle spielte es dabei, ob sich die Bakterien in einem flüssigen Medium oder aber auf Edelstahlschrauben und Knochen befanden.

IV.9 Schlussfolgerung

Die Testergebnisse der verschiedenen Versuchsreihen zeigen, dass eine signifikante Reduktion der Keimanzahl bzw. eine vollständige Bakterieninaktivierung durch Applikation von HHD möglich ist.

Die verwendeten Referenzkeime *S. aureus* ATCC 25923, *MRSA* 27065, *P. aeruginosa* ATCC 27853 und *E. faecium* ATCC 6057 sind allesamt typische Erreger von invasiven Knocheninfektionen wie Osteomyelitiden, Osteitiden, septischen Arthritiden und Implantatinfektionen.

Sowohl bei den Versuchsreihen mit kontaminierten Edelstahlschrauben und den Versuchsreihen mit Bakteriensuspensionen als auch bei den Versuchsreihen mit kontaminierten humanen Spongiosazylindern zeigte vor allem *E. faecium* ATCC 6057 barotolerante Eigenschaften, wohingegen vor allem *S. aureus* ATCC 25923 vollständig inaktiviert werden konnte. Für *P. aeruginosa* ATCC 27853 als Vertreter der gramnegativen Keime konnte teilweise eine signifikante Reduktion der Keimanzahl erreicht, aber auch Barotoleranz nachgewiesen werden.

Die Testergebnisse gehen nicht vollständig einher mit Studien, beispielsweise von Mackey et al., die von einer erhöhten Druckresistenz grampositiver Keime wie Enterokokken und *S. aureus* im Vergleich zu gramnegativen Keimen wie *P. aeruginosa* berichteten (Mackey B.M. et al., 1995, S. 1-11).

Auch die von Alpas et al. sowie von Patterson et al. berichtete höhere Sensitivität gramnegativer Keime im Vergleich zu grampositiven Keimen konnte anhand der Testergebnisse nicht vollständig belegt werden (Alpas H. et al., 1999, S. 4248-4251; Patterson M.F. et al., 1995, S. 224-529).

Es zeigte sich jedoch, dass die Empfindlichkeit gegenüber Druck innerhalb einzelner Bakterienspezies wie der grampositiven Kokken stark variiert. Diese Erkenntnis konnte bereits von Patterson et al. und Cheftel festgestellt werden (Cheftel J.C., 1995, S. 75-90; Patterson M.F. et al., 1995, S. 224-529).

Um die antibakterielle Wirksamkeit des HHD verifizieren zu können, wurden die Behandlungsparameter Druck (MPa), Temperatur (°C) und Zeit (Min.) modifiziert. Cheftel beschrieb die wichtige Bedeutung des verwendeten Druckpegels für das Sterilisationspotential des HHD-Verfahrens (Cheftel J.C., 1995, S. 75-90). Autoren wie Bieler et al. sowie Kalchayanand et al. beschrieben ebenfalls die Abhängigkeit der Inaktivierungsrate der Bakterien vom Druckniveau (Bieler C. et al., 1992; Kalchayanand N. et al., 1998, S. 425-431).

S. aureus ATCC 25923 und *MRSA* 27065 zeigten nach Applikation von 400 MPa bereits eine signifikante Reduktion der Keimzahl. Nach Erhöhung des Druckniveaus auf 600 MPa konnte sogar eine vollständige Inaktivierung erreicht werden.

Neben der Erhöhung des Druckniveaus führte die Verlängerung der Druckhaldedauer bzw. die wiederholte HHD-Applikation zu einer verbesserten antibakteriellen Wirksamkeit des HHD. Durch die Verlängerung der Druckhaldedauer von 10 Min. auf 30 Min. konnte für *S. aureus* ATCC 25923 bei einem Druckniveau von 300 MPa eine vollständige Inaktivierung nachgewiesen werden. Bei anderen Versuchsproben zeigte sich jedoch, dass die Modifikation der Druckhaldedauer - 10 Min. - 30 Min. - 6 x 5 Min. - keinen signifikanten Einfluss auf das Bakterienwachstum hatte.

Dieses Ergebnis spiegelt die Ergebnisse von Kalchayanand et al. wieder, die feststellten, dass eine längere Druckhaldedauer alleine zu keiner ausreichenden Keimabtötung führt (Kalchayanand N. et al., 1998, S. 425-431).

Neben dem Druckniveau und der Druckhaldedauer ist HHD grundsätzlich von der Temperatur abhängig. Die antibakterielle Wirksamkeit des HHD ist besonders effizient in Bereichen höher als 50°C bzw. im Bereich von -30°C bis +5°C (Cheftel J.C., 1995, S. 75-90; Arroyo G et al, 1997, S. 735-742).

Bedingt durch eine Phasenveränderung der Membranlipide bei Temperaturen über 35°C steigt die Druckempfindlichkeit der Bakterien (Ludwig H. et al., 1992, S. 25-32). Es gibt

jedoch auch Studien, die zeigen, dass eine Temperaturerhöhung keinen wesentlichen Effekt auf die Inaktivierungsrate nach HHD-Applikation hat (Bieler C. et al., 1992).

Eine signifikante Reduktion der Keimanzahl konnte in dieser Arbeit bei Raumtemperatur (20°C) für *S. aureus* ATCC 25923 und *MRSA* 27065 gezeigt werden. Eine vollständige Inaktivierung gelang jedoch sowohl bei 4°C, als auch bei 37°C. Ein signifikanter Unterschied der Überlebensrate der Bakterien bei Raumtemperatur, höheren oder niedrigeren Temperaturen konnte daher nicht festgestellt werden.

Dass der Einfluss der Temperatur bei den verschiedenen Mikroorganismen stark variieren kann (Hauben K. et al., 1996, S. 350-355), konnte in den Versuchsreihen nachgewiesen werden. *E. faecium* ATCC 6057 zeigte sowohl bei Raumtemperatur (20°C) als auch bei 37°C und 4°C eine erhebliche Barotoleranz. Ursächlich hierfür scheint zum einen der Zellwandaufbau grampositiver Bakterien zu sein mit einem bis zu vierzig Schichten dicken Mureinnetz mit Membran-Lipoteichonsäuren und Zellwand-Teichonsäuren, der die Druckresistenz bedingt (Kayser F.H., 2001, S. 154-238). Zum anderen scheint die Enzymeigenschaft von *E. faecium* eine Rolle zu spielen. *E. faecium* ist Katalase-negativ. Das Enzym Katalase kann von Enterokokken nicht gebildet werden im Gegensatz zu den Staphylokokken und weist so bei Temperaturen bis zu 45°C Wachstum auf (Kayser F.H., 2001, S. 239-360).

Komplettierend erwähnen muss man den Einfluss des Mediums auf die sterilisierende Wirkung des HHD.

Im Fall der HHD-Wirksamkeit auf Knochen muss man organische Rückstände wie Blut und Proteine nennen. Betrachtet man die Versuchsreihen mit kontaminierten Edelstahlschrauben, die mit Schafblut infiziert wurden, und die Versuchsreihen mit Bakteriensuspensionen, so zeigen die Testergebnisse, dass Blut als Umgebungsmedium im Vergleich zu den Bakteriensuspensionen in der Nährlösung TSB die Inaktivierung von Bakterien durch HHD nicht signifikant verändert. Durch die Einwirkung von HHD kommt es zur Zerstörung von Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine (Patterson MF et al, 1995, S. 224-529), die ein Bestandteil des Blutes sind, und dadurch zu einer Veränderung der strukturellen und funktionellen Integrität (Kalchayanand N. et al., 1998, S. 425-431).

Für den Fettgehalt des Knochens, der mit zunehmendem Alter und durch zunehmende Degeneration steigt, konnte nach Studienlage kein baroprotektiver Effekt beobachtet werden (Gervilla R. et al., 2000, S. 674-682).

In Studien konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe bzw. Erhöhung der NaCl-, Glucose- und Saccharosekonzentration die Baroresistenz gesteigert werden konnte (Knorr D., 1992, S. 159-174). Wiederum andere Studien zeigen, dass die Inaktivierungsrate durch

die verschiedenen Nährlösungen wie physiologische NaCl-Lösung oder ein 1:1-Gemisch aus NaCl und Glycerol nicht beeinflusst wird (Ludwig H. et al., 1992, S. 25-32; Bieler C. et al., 1992).

In summa stellt HHD ein wirksames Verfahren zur Abtötung von mit Bakterien infiziertem Knochen dar. Allerdings zeigte sich, dass keine komplette Desinfektion erreicht und die Wirksamkeit nur für bestimmte barosensitive Erreger bestätigt werden konnte. Für eine klinische Anwendung ist das Verfahren somit nicht ausreichend sicher und muss weiter optimiert werden. Unter den beschriebenen Behandlungsparametern blieben die biochemischen Eigenschaften des Knochens unbeeinflusst bzw. unbeeinträchtigt und somit erhalten.

Eine weitere Optimierung der Behandlungsparameter Druck (MPa), Temperatur (°C) und Zeit (Min.) bzw. die zusätzliche Anwendung spezieller synergistisch wirkender Suspensionen könnte den HHD zu einem sicheren Desinfektionsverfahren von Knochentransplantaten und von Implantaten werden lassen.

V. Zusammenfassung

Die Beeinträchtigung oder Zerstörung von Knochengewebe durch Tumoren bzw. Tumorresektionen, Infektionen, Traumata sowie Endoprothesenwechsel stellt die orthopädische Chirurgie vor große Schwierigkeiten und ist somit eine der zentralen Herausforderungen der modernen Medizin. Oftmals gelingt die Regeneration und Rekonstruktion der entstandenen Knochendefekte nur mit großem operativen Aufwand. Zu den gebräuchlichsten Therapieverfahren zur Rekonstruktion von Knochendefekten gehören die Implantation von Endoprothesensystemen zur Überbrückung der Knochendefekte, die Implantation synthetischer und biologischer Knocheneratzmaterialien, wie osteokonditiv wirkende Kalziumphosphatkeramiken oder demineralisierte Knochenmatrix, und osteoinduktiv wirkende Wachstumsfaktoren sowie die autogene und allogene Knochen transplantation.

Zur Erhöhung der Sicherheit von Knochen transplantaten und Implantaten mit funktionalisierten Oberflächen existieren verschiedene etablierte Desinfektionsverfahren, wie die chemische Behandlung mit Peressigsäure/Ethanol, die Sterilisation mit Gammastrahlen, die thermische Behandlung mit feuchter Hitze sowie das Autoklavieren. Regelmäßig führen diese etablierten Desinfektionsverfahren zu einer Reihe von negativen Veränderungen des Knochens wie die Schwächung der Kortikalis, die Zunahme der Knochenporosität und Knochenresorptionshöhlen, die Beeinträchtigung der Osteoinduktivität, Festigkeit und Struktur des Knochens, die Konformitätsänderung von Proteinen sowie zu einer Veränderung der Oberflächen von funktionalisierten Implantaten. Auf Grund dieser Nebenwirkungen ergibt sich die Suche nach neuen Verfahren zur Knochen desinfektion und Desinfektion sensibler Biomaterialien.

In dieser Arbeit wurde die Effektivität der Hochdruckbehandlung als alternative Methode zur Inaktivierung klinisch relevanter Bakterien auf mit künstlich infiziertem Blut kontaminierten Oberflächen von Standardschrauben und künstlich kontaminierten Knochenproben sowie in Suspension geprüft.

Schrauben aus Edelstahl, die mit durch die Referenzkeime *S. aureus* ATCC 25923, *MRSA* 27065, *E. faecium* ATCC 6057 und *P. aeruginosa* ATCC 27853 künstlich infiziertem Blut kontaminiert wurden und Bakteriensuspensionen der Referenzkeime sowie mit den Referenzkeimen in vitro kontaminierte Spongiosazylinder aus arthrotisch veränderten humanen Femurköpfen wurden verschiedenen HDD-Behandlungsprotokollen von 200 MPa bis 600 MPa unterzogen. Das Wachstum der Bakterien wurde sowohl für die verschiedenen

Probenreihen als auch für die Kontrollgruppen ausgewertet und schließlich die Inaktivierungsrate des HHD bestimmt.

Blut als organisches Produkt auf kontaminierten Oberflächen von Standardschrauben zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Inaktivierung der Bakterien. Das bakterielle Wachstum von *S. aureus* ATCC 25923 konnte vollständig, das von *MRSA* 27065 signifikant reduziert werden. Als barotolerant erwiesen sich *E. faecium* ATCC 6057 und geringer auch *P. aeruginosa* ATCC 27853. In Suspension konnte das bakterielle Wachstum sowohl von *S. aureus* ATCC 25923 als auch das von *P. aeruginosa* ATCC 27853 vollständig inaktiviert werden. *E. faecium* ATCC 6057 zeigte auch in dieser Versuchsreihe barotolerante Eigenschaften bis zu einem Behandlungsdruck von 600 MPa. Arthrotisch veränderter Knochen zeigte einen nicht homogenen baroprotektiven Effekt. Einige kontaminierte Knochenproben zeigten trotz HHD-Applikation deutliches bakterielles Wachstum. Vollständige Desinfektion der kontaminierten Knochenproben konnte für *S. aureus* ATCC 25923 und *P. aeruginosa* ATCC 27853 nachgewiesen werden. *E. faecium* ATCC 6057 erwies sich auch in dieser Versuchsreihe als barotolerant.

HHD könnte eine alternative Methode unter den etablierten Desinfektionsverfahren sein. HHD ermöglicht eine Desinfektion von mit Keimen infiziertem Knochen, ohne dessen biochemische und biomechanische Eigenschaften zu beeinträchtigen. Für typische Erreger von invasiven Knocheninfektionen konnte eine signifikante Reduktion des Keimwachstums, zum Teil sogar eine vollständige Keiminaktivierung, nachgewiesen werden. Eine weitere Optimierung der Behandlungsparameter Druck, Temperatur und Zeit ist notwendig, um den HHD als ein sicheres Desinfektionsverfahren von Knochen- und Implantattransplantaten zu etablieren. Die antibakterielle Wirksamkeit von HHD könnte als intraoperatives Sterilisationsverfahren von infiziertem körpereigenem Knochengewebe mit anschließender Reimplantation herangezogen werden. Die Indikation für HHD als Desinfektionsverfahren wird jedoch auf Infektionen durch barotolerante Bakterien begrenzt bleiben.

VI. Literaturverzeichnis

1. Alpas H., Kalchayanand N., Boroglu F., Sikes A., Dunne C.P., Ray B. Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Appl. Environ Microbiol.* 1999 Sept.; 65 (9): 4248-51.
2. Arroyo G., Sanz P.D., Prestamo G. Effect of high pressure on gen reduction of microbialpopulations in vegetables. *J Appl Microbial* 1997; 82: 735-42.
3. Bankowski M.J. Microbiology Practices in Recovery and Testing. In: "26th Annual Meeting" American Association of Tissue Banks, 2002 August 23-27, Boston, MA, USA.
4. Benito A., Ventoura G., Casadei M., Robinson T., Mackey B. Variation in resistance of natural isolates of E. coli 0157 to high hydrostatic pressure, mild heat and other stresses. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65: 1564-9.
5. Betz R.R. Limitations of Autograft and Allograft: New Synthetic Solutions. *Orthopedics.* 2002 May; 25(5Suppl): S. 561-70.
6. Bieler C., Hallbauer K., Scigalla W., Ludwig H. Druckinaktivierung von Mikroorganismen. In: „Skriptum zum Hochschulkurs Hochdruck-Pasteurisierung; Behandlung von LM, Pharmazeutika und Kosmetika mit Drücken bis 1.000 bar“ Gruppe Physikal. Chemie Heidelberg, 24. und 25. September 1992. Universität Heidelberg, Institut für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie,. Im Narrenheimer Feld 346, 69120 Heidelberg.
7. Böhm R. Grundlagen der Reinigung und Desinfizierung. In: „Reinigung und Desinfizierung in der Nutztierhaltung und Veredelungswirtschaft“, Strauch D. und Böhm R. (Hrsg.), Enke Verlag, Stuttgart, S. 19-61.
8. Borchers R.E., Gibson L.J., Burchardt H., Hayes W.C. Effects of selected thermal Variables on the mechanical properties of trabecular bone. *Biomaterials* 1995, 16: 545-51.

9. Bos G., Sim F., Pritchard D., Shives T., Rock M., Askew L., Chao E. Prosthetic Replacement of the Proximal Humerus. Clin Orthop Relat Res. 1987 Nov; (224): 178-91.
10. Breusch S., Mau H. Allgemeine Traumatologie - Knochentransplantation. In: „Klinikleitfaden Orthopädie“, Breusch S., Mau H. Sabo D. (Hrsg.), Urban & Fischer Verlag München-Jena, 2002, 4. Auflage, S.311.
11. Butz P., Habison G., Ludwig H. Influence of high pressure on a lipid coated virus. In: “High Pressure and Biotechnology”, Colloque Inserm Vol. 224 (1992) 61-64
12. Campbell D.G., Li P. Sterilisation of HIV with irradiation: Relevance to infected bone allografts. Aust N Z J Surg. 1999, 69: 517-521.
13. Cheftel J.C. High-pressure, microbial inactivation and food preservation. Food science and technology international 1995, 1:75-90.
14. Conrad E.U., Gretch D.R., Obermeyer K.R., Moogk M.S., Seyers M., Wilson J.J., Strong D.M. Transmission of the Hepatitis-C virus by Tissue Transplantation. J Bone Surg Am. 1995 Feb; 77(2): 214-24.
15. Czank C., Simmer K., Hartmann P.E. Simultaneous pasteurization and homogenization of human milk by combining heat and ultrasound: effect on milk quality. J Dairy res. 2010 May; 77(2):183-9. Epub 2010 Jan7.
16. Diehl P., Breuning U., Gollwitzer H., Magdolen U., Gerdesmeyer L., Schauwecker J., Tuebel J., Gradinger R., Mittelmeier W., Schmitt M. Effect of extracorporeal high hydrostatic pressure on tumor cell adherence and viability. Oncol rep. 2004, Aug 12; (2): 369-73.
17. Diehl P., Schauwecker J., Mittelmeier W., Schmitt M. High hydrostatic pressure, a novel approach in orthopedic surgical oncology to disinfect bone, tendons and cartilage. Anticancer Res. 2008 Nov-Dec; 28(6B): 3877-83.
18. Diehl P., Schmitt M., Schauwecker J., Eichelberg K., Gollwitzer H., Gradinger R., Goebel M., Preissner K.T., Mittelmeier W., Magdolen U. Effect of HHP on biological properties of extracellular bone matrix proteins. Int/Mol Med. 2005 Aug; 16 (2): 285-9.

19. Eastlund T. Tissue Transplant-Transmitted Bacterial Infections: AATB Investigation. In: "AATB Quality Assurance Workshop IV", 2002 November 13th, New Orleans, LA, USA.
20. Ekholm M., Hietanen J., Tulamo R.M., Muhonen J., Lindqvist C., Kellomäki M., Suuronen R. The Copolymer of Epsilon-Caprolactone-Lactide and tricalcium-phosphate does not enhance Bone Growth in Mandibular Defect of Sheep. *J Mater Sci Mater Med.* 2006 Feb; 17(2): 139-45.
21. Fischer S. Einfluss der hydrostatischen Hochdruckbehandlung auf die Filtrierbarkeit von Bier und das Verhalten von β -Glucan-Gel. In „Dissertation“, Fischer S. (Autor), 2005, Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Lehrstuhl für Energie- und Umwelttechnik der Lebensmittelindustrie der Technischen Universität München, Universitätsbibliothek der TU München.
22. Foguel D., Silva J.L. Cold denaturation of A repressor-operator complex: the role of entropy on protein-DNA recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994; 91: 8244-8247.
23. Forsell J.H., Liesman J. Analysis of potential causes of positive microbiologica cultures in tissue donors. *Cell and Tissue Banking* 2000 1: 111-115.
24. Geesink R. "Osteoconductive Coatings for Total Joint Arthroplasty." *Clin Orthop Relat Res.* 2002 395: 53-65.
25. Gervilla R., Ferragut V., Guamis B. High pressure inactivation of microorganisms inoculated into ovine milk of different fat contents. *J Dairy Sci* 2000; 83: 674-82.
26. Gördes W., Plötz W. Hüftendoprothetik. In: „Orthopädie und Traumatologie“, Hipp E.G., Plötz W., Thiemel G. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 2003, 1. Auflage, S. 628-630.
27. Hauben K., Wuytack E.Y., Soontjens C.C.F., Michiels C.W. High-pressure transient sensitization of E. coli to lysozyme and nisin by disruption of outer-membrane permeability. *J Food Protect* 1996; 59: 350-5.
28. Heremans K., Smeller L. Protein Structure and dynamics at high pressure. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Aug 18; 1386 (2): 353-70.

29. Hite B.H., Giddings N.J., Weakly C.E. The effect of pressure on certain microorganisms encountered in the preservation of fruits and vegetables. W. Va. Agric. Exp. Sta. Bull. 1914; 146: 2-67.
30. Hofmann G.O., Kirschner M.H., Wangemann T., Falk C., Mempel W., Hammer C. Infections and Immunological Hazards of Allogeneic Bone Transplantation. Arch Orthop Trauma Surg. 1995; 114(3): 159-66.
31. Ishibashi K., Shimada K., Kawato T., Kaji S., Maeno M., Sato S., Ito K. Inhibitory effects of low-energy pulsed ultrasonic stimulation on cell surface protein antigen C through heat shock proteins GroEL and DnaK in *Streptococcus mutans*. Appl Environ Microbiol 2010 Feb; 76(3): 751-6. Epub 2009 Dec 18.
32. Kalchayanand N., Sikes A., Dunne C.P., Ray B. Interaction of pressure, time and temperature of pressurization and pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. J Food Prot. 1998 Apr; 61 (4): 425-31.
33. Kalchayanand N., Sikes T., Dunne C.P., Ray B. Hydrostatic Pressure and Electroporation have increased bactericidal efficiency in Combination with Bacteriocins. Appl Environ Microbiol. 1994 Nov; 60 (11): 4174-4177.
34. Kayser F.H. Bakterien als Krankheitserreger. In: „Medizinische Mikrobiologie“, Kayser F.H., Bienz K.H., Eckert J., Zinkernagel R.M. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 2001, 10. Auflage S. 239-360.
35. Kayser F.H. Allgemeine Bakteriologie. In: „Medizinische Mikrobiologie“, Kayser F.H., Bienz K.H., Eckert J., Zinkernagel R.M. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 2001, 10. Auflage S. 154-238.
36. Kingsley D.H., Hoover D.G., Papafragkou E., Richards G.P. Inactivation of hepatitis A virus and a calicivirus by high hydrostatic pressure. J. Food Prot. 2002 65: 1605-1609.
37. Knorr D. Advances in High-Pressure Food preservation methods. In: Food process design and evaluation, Rakesh Kumal Singh, Ph.D., Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, Basel. 1992; S. 159-174.

38. Kuner E.H., Schlickewei W., Huber-Lang M., Schaefer D.J., Laubenberger J. Using autoclaved Spongiosa. *Unfallchirurg*. 1998 Nov; 101(11): 870-6.
39. Lintner F., Böhm G., Huber M., Scholz R. Histology of tissue adjacent to an HAC-coated femoral prosthesis. A case report." *J Bone Joint Surg*.1994 76-B (5): 824-30.
40. Liu J.W., Chao L.H., Su L.H., Wang J.W., Wang C.J. Experience with a bone bank operation and allograft bone infection in recipients at medical centre in southern Taiwan. *J Hosp Infect* 2002 50: 293-297.
41. Lopes M.L., Valente Mesquita V.L., Chiaradia A.C., Fernandes A.A., Fernandes P.M. High hydrostatic pressure processing of tropical fruits. *Ann NY Acad Sci*. 2010 Feb; 1189:6-15.
42. Lord C.F., Gebhardt M.C., Tomford W.W., Mankin H.J. Infection in Bone Allograft. Incidence, Nature, and Treatment. *J Bone Joint Surg Am* 1988 70(3): 369-376.
43. Ludwig H., Bieler C., Hallbauer K., Scigalla W. Inactivation of microorganisms by hydrostatic pressure. *High Pressure and Biotechnology*. 1992; Vol. 224, pp 25-32.
44. Ludwig H., Gross P., Scigalla W., Bojka B. Pressure Inactivation of microorganisms. *High Pressure Research*. 1994; Vol. 12, 193-197.
45. Mackey B.M., Foretière K., Isaacs N. Factors affecting the resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure. *Food Biotechnology*. 1995; 9(1+2), 1-11.
46. Malawer M.M., Chou L.B. Prosthetic Survival and Clinical Results with Use of large-Segment Replacements in the Treatment of high-grade bone sarcomas. *J Bone Surg Am*. 1995 Aug; 77(8): 1154-65.
47. Martinez O. Microbiologic Screening of Cadaver Donors and Tissues for Transplantation. In: "26th Annual Meeting, American Association of Tissue Banks", 2002 August 23-27, Boston, MA, USA.

48. Moore W.J., Hummel D.O. Prinzip nach Le Chatelier und Braun. In: „Physikalische Chemie“, Moore W.J., Hummel D.O. (Hrsg.), Verlag Walter de Gruyter & Co, 1986, 4. Auflage, S. 345.
49. Moore W.R., Graves S.E., Bain G.I. Synthetic Bone Graft Substitutes. ANZ J Surg. 2001 Jun; 71(6): 354-61.
50. Naal F.D., Mengele K., Schauwecker J., Gollwitzer H., Gerdesmeyer L., Breuning U., Mittelmeier W., Gradinger R., Schmitt M., Diehl P. High hydrostatic pressure-induced cell death in human chondrocytes and Chondrosarcoma cells. Anticancer res. 2005 May-June; 25 (3B9): 1977-82.
51. Nakagami T., Ohno H., Shigehisa T., Otake T., Mori H., Kawahata T., Morimoto M., Ueba N. Inactivation of human immunodeficiency virus by high hydrostatic pressure. Transfusion, 36 (1996): 475-476.
52. Nich C., Bizot P., Nizard R., Sedel L. Femoral Reconstruction with Impacted Macroporous Calciumphosphate Ceramic in Revision Hip Arthroplasty. Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot. 2006 Jun; 92(4): 343-50.
53. Nich C., Sedel L. Bone Substitution in Revision Hip Replacement. Int Orthop. 2006 Dec; 30(6): 525-31.
54. Niethard F.U., Pfeil J. Orthopädische Therapie – Operative Therapie. In: “Duale Reihe – Orthopädie”, Niethard F.U., Pfeil J. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York, 2003, 4. komplett überarbeitete Auflage, S.77.
55. Oliveira A.C., Ishimaru D., Gonçalves R.B., Smith T.J., Mason P., Sá-Carvalho D., Silva J.L. Low temperature and Pressure Stability of Picornaviruses: Implications for Virus Uncoating. Biophys J. 1999 Mar; 76 (3): 1270-9.
56. Paderni S., Terzi S., Amendola L. Major Bone Defect Treatment with an Osteoconductive Bone substitute. Chir Organi Mov. 2009 Sep; 93(2): 89-96.
57. Patterson M.F., Quinn M., Simpson R., Gilmone A. The sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in buffered saline and foods. J Food Protect. 1995; Vol. 58, 224-529.

58. Perrier-Cornet J.M., Hayert M., Gervais P. Yeast cell mortality related to a high-pressure shift: occurrence of cell membrane permeabilization. *J Appl Microbiol.* 1999; 87: 1-7.
59. Pruß A. Chemische und physikalische Verfahren zur Inaktivierung von pathogenen Mikroorganismen in allogenen Knochentransplantaten. In „ Habilitations-schrift“ 2003, Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin, S.21
60. Puleo J.R., Favero M.S., Tritz G.J. Feasibility of using ultrasonics for removing viable microorganisms from surfaces. *Contam Control.* Apr 1967 6(4): 58-62 passim.
61. Raschke M.J., Haas N.P. Frakturen, Gelenkverletzung und Luxationen des Halte- und Bewegungsapparates. In: „Siewert – Chirurgie begründet von M. Allgöwer“, Siewert R.J. (Hrsg.), Springer Verlag, 1997, 7. Auflage, S. 808.
62. Raso J., Palop A., Pagán., Condón S. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by combining ultrasonic waves under pressure and mild heat treatment. *J Appl Microbiol.* 1998 Nov; 85(5): 849-54.
63. Rechl H., Burgkart R., Hipp E.G. Becken. In: „Orthopädie und Traumatologie“, Hipp E.G., Plötz W., Thieme G. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 2003, 1. Auflage, S. 453.
64. Sajas I.F., Gorbatow M.R. Anwendung von Ultraschallschwingungen in den technologischen Vorgängen der Fleischindustrie. *Fleischwirtsch.* 1978 58, 1325-1328, 1331-1332.
65. Schütt-Abraham I., Trommer E., Levetzow R. Ultraschall im „Steri-Becken“? Zum Einsatz von Ultraschall in Einrichtungen zur Reinigung und Desinfektion von Messern am Arbeitsplatz in Schlacht- und Zerlegebetrieben. *Fleischwirtsch.* 1992 72, 864-867.
66. Shimasaki N., Kiyohara T., Totsuka A., Nojima K., Okada Y., Yamaguchi K., Kajioka J., Wakita T., Yoneyama T. Inactivation of hepatitis A virus by heat and high hydrostatic pressure: variation among laboratory strains. *Vox Sang.* 2009 Jan;96(1): 14-9.

67. Simonds R.J., Holmberg S.D., Hurwitz R.L., Coleman T.R., Bottenfield S., Conley L.J., Kohlenberg S.H., Castro K.G., Dahan B.A., Schable C.A., Rayfield M.A., Rogers M.F. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. *N Engl J Med* 1992 326(11): 726-732.
68. Søballe K., Hansen E.S., Brockstedt-Rasmussen H., Pedersen C.M., Bünger C. "Hydroxyapatite coating enhances fixation of porous coated implants. A comparison in dogs between press fit and noninterference fit." *Acta Orthop Scan.* 1990 61: 299-306.
69. Steinhauser E., Diehl P., Hadaller M., Schauwecker J., Busch R., Gradinger R., Mittelmeier W. Biomechanical investigation of the effect of high hydrostatic pressure treatment on the mechanical properties of human bone. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006 Jan; 76 (1): 130-5.
70. Sugimoto M., Takahashi S., Toguchida J., Kotoura Y., Shibamoto Y., Yamamuro T. Changes in bone after high-dose irradiation. Biomechanics and histomorphology. *J Bone Joint Surg Br* 1991, 73: 492-7.
71. Tian S.M., Ruan K.C., Qian J.F., Shao G.Q., Balny C. Effects of hydrostatic pressure on the structure and biological activity of infectious bursal disease virus. *Eur. J. Biochem.* 2000 267: 4486-4494
72. Tipler P.A., Mosca G. Pascalsches Prinzip. In: "Physik für Wissenschaftler und Ingenieure", Tipler P.A., Mosca G. (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag, Veröffentlichung August 2009, 6. Auflage, S. 123.
73. Tomford W.W. Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts. *J Bone Joint Surg Am* 1995 77(11):1742-1754.
74. Tsuchido T., Miyake K., Hayashi M., Tamura K. Similar characteristics of bacterial death caused by high temperature and high pressure: Involvement of membrane fluidity. In: "High pressure bioscience and biotechnology", Hayashi M., Balncy C. (Ed.), Elsevier Science, 1996; p. 185-8.
75. von Garrel T. Persönliche Mitteilung auf der Grundlage einer Befragung von 1.400 chirurgischen/orthopädischen Kliniken in Deutschland aus dem Jahr 2001-2003.

76. von Versen R., Heider H., Kleemann I., Starke R. Chemische Sterilisation biologischer Implantate mit einer Kombinationsmethode. In: „Osteologie aktuell“, Pesch H.J., Stöß H., Kummer B. (Hrsg.), Springer-Verlag, 1992, 7(suppl.): 380–386.
77. Wutzler P., Sauerbrei A. Virucidal efficacy of a combination of 0.2% peracetic acid and 80% (v/v) ethanol (PAA-ethanol) as a potential hand disinfectant. *J Hosp Infect* 2000 46: 304-308.
78. Zhou G.H., Xu X.L., Liu Y. Preservation technologies for fresh meat – a review. *Meat Sci.* 2010 Sep; 86(1): 119-28. Epub 2010 Apr 29.

VII. Abkürzungsverzeichnis

AG	Aktiengesellschaft
ATCC.....	American Tissue and Culture Collection
BMPs.....	Bone Morphogenic Proteins
bzgl.....	bezüglich
ca.	circa
cm.....	Centimeter
°C	Grad Celsius
DIN	Deutsche Industrie Norm
DNA.....	Deoxyribonucleic Acid
E. faecium.....	Enterococcus faecium
et al.	und andere
FGF	Fibroblast Growth Factor
g	Gramm
GmbH.....	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Gy.....	Gray
HHD.....	Hydrostatischer Hochdruck
H ₂ O.....	Chemisches Symbol für Wasser
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLP	Kurzbezeichnung für Hydrauliköl mit Alterungs-, Korrosions- und Verschleisschutzzusätzen
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IGF-2	Insulin-like Growth Factor 2
INV-Nr.	Inventarnummer
kbar	Kilobar
KBE	Koloniebildende Einheit
kHz	Kiloherz
Log	Logarithmus auf der Basis 10
max.....	maximal
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ml.	Milliliter
mm	Millimeter
Min.....	Minute

MPa	Megapascal
MRSA	Methicillin-resistenter Stamm von Staphylococcus aureus
MS-Excel	Microsoft-Excel
n	Abkürzung für Fallzahl
NaCl	Natriumchlorid
NY	New York
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
pH-Wert	pondus hydrogenii-Wert
%	Prozent
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
Rpm	rounds per minute
S.	Seite
Sek.	Sekunde
Standardabw.	Standardabweichung
S.aureus	Staphylococcus aureus
Std.	Stunde
TGF-b	Transforming Growth Factor-b
TSB	Trypton-Soya-Bouillon
USA	United States of America
verw.	verworfen
W	Watt
z.B.	zum Beispiel

VIII. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufsicht der Hochdruckanlage der Firma SITEC-Sieber Engineering AG. P1: Spindelpresse, P2: Handpumpe, B1: Druckkammer, B2: Überdruckbehälter, TC: Heiz-Kühl-Termostat, V1-5: Ventile, S. 11

Abbildung 2: Steuereinheit der Hochdruckanlage der Firma SITEC-Sieber Engineering AG, S. 12

Abbildung 3: Die Hochdruckanlage der Firma RECORD Maschinenbau GmbH, jetzt Schurter-Retrofit GmbH, S. 13

Abbildung 4: Mittels Diamanthohlfräse gewonnener Spongiosazylinder, S. 19

Abbildung 5: Spongiosazylinder in infizierter Nährlösung, S. 20

Abbildung 6: Inaktivierung verschiedener Bakterienstämme in Bakteriensuspensionen nach HHD-Applikation von 600 MPa (10 Min. 20 °C). Die Koloniebildenden Einheiten (KBE) nach Hochdruckbehandlung sind in % dargestellt, S. 22

Abbildung 7: Inaktivierung verschiedener Bakterienstämme auf Edelstahlschrauben nach HHD-Applikation (10 Min. 20°C). Die Kolonie bildenden Einheiten (KBE) nach Hochdruckbehandlung sind auf logarithmischer Skala dargestellt, S. 24

Abbildung 8: Hemmung des bakteriellen Wachstums von *S. aureus* ATCC 25923 auf Edelstahlschrauben nach HHD-Applikation bei verschiedenen Behandlungsprotokollen. Die Kolonie bildenden Einheiten (KBE) nach Hochdruckbehandlung sind auf logarithmischer Skala dargestellt, S. 24

Abbildung 9: Bakteriellies Wachstum von *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecium* ATCC 6057 und *P. aeruginosa* ATCC 27853 nach Applikation von HHD mit 600 MPa bei 4°C auf kontaminierten Edelstahlschrauben. Die Kolonie bildenden Einheiten (KBE) sind als logarithmische Skala dargestellt, S. 25

Abbildung 10: Hemmung des bakteriellen Wachstums von *S. aureus* ATCC 25923 in Bakteriensuspensionen nach kombinierter Applikation von HHD und Ultraschall. Die Kolonie bildenden Einheiten (KBE) sind nach HHD- und Ultraschallbehandlung in % dargestellt. Legende: a: Kontrolle, b: 5 Min. Ultraschall, c: 10 Min. bei 20° C, 200 MPa , d: 5 Min. Ultraschall und 10 Min. bei 20° C, 200 MPa, e: 10 Min. bei 20° C, 200 MPa und 5 Min. Ultraschall, S. 26

Abbildung 11: Bakteriellles Wachstum von *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecium* ATCC 6057 sowie *P. aeruginosa* ATCC 27853 nach Hochdruckbehandlung kontaminierter Spongiosazylinder aus humanen Femurköpfen bei verschiedenen Behandlungsprotokollen (600 MPa, 37°C). Die Kolonie bildenden Einheiten (KBE) nach Hochdruckbehandlung sind in % dargestellt, S. 27

Abbildung 12: Prinzip der direkten (links) und indirekten (rechts) hydrostatischen Hochdruckerzeugung, S. 31

Abbildung 13: Zellwand grampositiver Bakterien, S. 37

Abbildung 14: Zellwand gramnegativer Bakterien, S. 38

IX. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Behandlungsparameter Edelstahlschrauben, S. 17

Tabelle 2: Behandlungsprotokolle a-e der Versuchsreihe „Kombinierte Applikation von
HHD und Ultraschall“. S. 18

Tabelle 3: Behandlungsparameter Femurköpfe, S. 21

X. Anhang

X.1 Experimentelle Versuche mit Bakteriensuspensionen

X.1.1 Versuch mit *S. aureus* ATCC 25923 bei einer Temperatur von 20°C, einer Druckhaltdauer von 10 Min. und einer Druckstufe von 600 MPa

X.1.1.1 Auswertung der Proben

Probe	1	2	3	4	5
KBE (unverdünnt)	>500	>500	>500	>500	>500
KBE 1/100	90	112	88	83	94
KBE 1/10.000	1	1	0	0	0
KBE 1/1.000.000	0	0	0	0	0

X.1.1.1.1 Absolutergebnis der Proben

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE 1/100	9000	11200	8800	8300	9400	9.340	1.113
KBE 1/10.000	10000	10000	0	0	0	4.000	5.477
KBE 1/1.000.000	0	0	0	0	0	0	0

X.1.1.1.2 Relativergebnis der Proben

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE 1/100	77	95	75	71	80	79	9
KBE 1/10.000	125	125	0	0	0	50	68
KBE 1/1.000.000	0	0	0	0	0	0	0

X.1.1.2 Auswertung der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5
KBE (unverdünnt)	>500	>500	>500	>500	>500
KBE 1/100	113	137	117	112	109
KBE 1/10.000	3	1	0	0	0
KBE 1/1.000.000	0	0	0	0	0

X.1.1.2.1 Absolutergebnis der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE 1/100	11300	13700	11700	11200	10900	11.760	1.122
KBE 1/10.000	30000	10000	0	0	0	8.000	13.038
KBE 1/1.000.000	0	0	0	0	0	0	0

X.1.1.2.2 Relativergebnis der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE 1/100	96	116	99	95	93	100	10
KBE 1/10.000	375	125	0	0	0	100	163
KBE 1/1.000.000	0	0	0	0	0	0	0

X.1.2 Versuch mit *E. faecium* ATCC 6057 bei einer Temperatur von 20°C, einer Druckhaldedauer von 10 Min. und einer Druckstufe von 600 MPa

X.1.2.1 Auswertung der Proben

Probe	1	2	3	4	5
KBE (unverdünnt)	>500	>500	>500	>500	>500
KBE 1/100	92	90	88	96	79

X.1.2.1.1 Absolutergebnis der Proben

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE 1/100	9.200	9.000	8.800	9.600	7.900	8.900	632

X.1.2.1.2 Relativergebnis der Proben

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE 1/100	64	63	61	67	55	62	4

X.1.2.2 Auswertung der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5
KBE (unverdünnt)	>500	>500	>500	>500	>500
KBE 1/100	151	149	147	152	119

X.1.2.2.1 Absolutergebnis der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE 1/100	15.100	14.900	14.700	15.200	11.900	14.360	1.389

X.1.2.2.2 Relativergebnis der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE 1/100	105	104	102	106	83	100	10

X.1.3 Versuch mit *P. aeruginosa* ATCC 27853 bei einer Temperatur von 20°C, einer Druckhaltdauer von 10 Min. und einer Druckstufe von 600 MPa

X.1.3.1 Auswertung der Proben

Probe	1	2	3	4	5
KBE (unverdünnt)	0	0	0	0	0
KBE 1/100	0	0	0	0	0

X.1.3.1.1 Absolutergebnis der Proben

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE 1/100	0	0	0	0	0	0	0

X.1.3.1.2 Relativergebnis der Proben

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE 1/100	0	0	0	0	0	0	0

X.1.3.2 Auswertung der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5
KBE (unverdünnt)	>500	>500	>500	>500	>500
KBE 1/100	64	79	68	2	93

X.1.3.2.1 Absolutergebnis der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE 1/100	6.400	7.900	6.800	200	9.300	6.120	3.495

X.1.3.2.2 Relativergebnis der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE 1/100	45	55	47	1	65	43	24

X.2 Experimentelle Versuche mit den mit Referenzkeimen kontaminierten Schrauben aus Edelstahl

X.2.1 Versuch mit *S. aureus* ATCC 25923 bei einer Temperatur von 20°C, einer Druckhaldedauer von 10 Min. und Druckstufen von 200/300 und 400 MPa

X.2.1.1 Absolutergebnis der Proben

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200 MPa	100	400	1100	400	200	440	391
300 MPa	100	verw.	100	300	verw.	167	115
400 MPa	0	0	0	verw.	2	0,50	1

X.2.1.2 Relativergebnis der Proben

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200 MPa	5	19	51	19	9	20	18
300 MPa	5	verw.	5	14	verw.	8	5
400 MPa	0	0	0	verw.	0	0	0

X.2.1.3 Absolutergebnis der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200/300 MPa	3200	1900	1400	2100	2200	2.160	658
400 MPa	400		1100	700	700	725	287

X.2.1.4 Relativergebnis der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200/300 MPa	148	88	65	97	102	100	30
400 MPa	55		152	97	97	100	40

**X.2.2 Versuch mit *E. faecium* ATCC 6057 bei einer Temperatur von 20°C,
einer Druckhaltdauer von 10 Min. und Druckstufen von 200/300 und
400 MPa**

X.2.2.1 Absolutergebnis der Proben

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200 MPa	700	verw.	1.600	1.400	verw.	1.233	473
300 MPa	3.700	1.400	5.000	1.800	2.700	2.920	1.462
400 MPa	1.100	2.500	2.500	2.000	1.300	1.880	657
600 MPa	200	500	100	300	2100	640	829

X.2.2.2 Relativergebnis der Proben

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200 MPa	11	verw.	26	22	verw.	20	8
300 MPa	59	22	80	29	43	47	23
400 MPa	18	40	40	32	21	30	11
600 MPa	31	78	16	47	328	100	130

X.2.2.3 Absolutergebnis der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200/300/400 MPa	2.300	5.400	12.100	7.000	4.400	6.240	3.692
600 MPa	700	600	3.100	1.700	3.700	1.960	1.399

X.2.2.4 Relativergebnis der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200/300/400 MPa	37	87	194	112	71	100	59
600 MPa	36	31	158	87	189	100	71

X.2.3 Versuch mit *MRSA 27065* bei einer Temperatur von 20°C, einer Druckhaltdauer von 10 Min. und Druckstufen von 200/300 und 400 MPa

X.2.3.1 Absolutergebnis der Proben

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200 MPa	2.400	4.200	4.900	400	20.000	6.380	7.811
300 MPa	200	100	4.000	0	100	880	1.746
400 MPa	2	0	0	6	5	2,60	3

X.2.3.2 Relativergebnis der Proben

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200 MPa	41	71	83	7	340	109	133
300 MPa	3	2	68	0	2	15	30
400 MPa	0	0	0	0	0	0	0

X.2.3.3 Absolutergebnis der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200/300 MPa	17.500	4.200	1.000	5.600	1.100	5.880	6.793
400 MPa	100	1.000	4.500	1.100	4.000	2.140	1.973

X.2.3.4 Relativergebnis der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200/300 MPa	298	71	17	95	19	100	116
400 MPa	5	47	210	51	187	100	92

X.2.4 Versuch mit *E. faecium* ATCC 6057 bei einer Temperatur von 4°C, einer Druckhaltdauer von 10 Min. und einer Druckstufe von 600 MPa

X.2.4.1 Absolutergebnis der Proben

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
600 MPa	700	1200	2400	5900	verw.	2.550	2.344

X.2.4.2 Relativergebnis der Proben

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
600 MPa	33	57	113	278	verw.	120	111

X.2.4.3 Absolutergebnis der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
600 MPa	200	1.000	1.700	1.600	6.100	2.120	2.304

X.2.4.4 Absolutergebnis der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
600 MPa	9	47	80	75	288	100	109

X.2.5 Versuch mit *E. faecium* ATCC 6057 bei einer Temperatur von 4°C, einer Druckhaldedauer von 6x5 Min. und einer Druckstufe von 600 MPa

X.2.5.1 Absolutergebnis der Proben nach 48 Stunden

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
600 MPa	27.800	>500	>500	24.300	>500	∞	∞

X.2.5.2 Relativergebnis der Proben nach 48 Stunden

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
600 MPa	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞

X.2.5.3 Absolutergebnis der Kontrollgruppe nach 48 Stunden

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
600 MPa	>500	>500	>500	>500	>500	∞	∞

X.2.5.4 Relativergebnis der Kontrollgruppe nach 48 Stunden

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
600 MPa	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞

X.2.6 Kombinationsversuch mit *S. aureus* ATCC 25923 bei einer Temperatur von 4°C, einer Druckhaltdauer von 30 Min. und Druckstufen von 200/ 300 und 400 MPa

X.2.6.1 Absolutergebnis der Proben

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200 MPa	600	200	0	800	800	480	363
300 MPa	0	0	0	0	0	0	0
400 MPa	0	verw.	0	0	0	0	0

X.2.6.2 Relativergebnis der Proben

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200 MPa	51	17	0	68	68	41	31
300 MPa	0	0	0	0	0	0	0
400 MPa	0	verw.	0	0	0	0	0

X.2.6.3 Absolutergebnis der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200/300 MPa	800	1.100	1.200	1.500	1.300	1.180	259
400 MPa	4.400	500	200	1.700	400	1.440	1.756

X.2.6.4 Relativergebnis der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200/300 MPa	68	93	102	127	110	100	22
400 MPa	306	35	14	118	28	100	122

X.2.7 Kombinationsversuch mit *S. aureus* ATCC 25923 bei einer Temperatur von 4°C, einer Druckhaltdauer von 10 Min. und Druckstufen von 200/ 300 und 400 MPa

X.2.7.1 Absolutergebnis der Proben

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200 MPa	200	200	100	800	100	280	295
300 MPa	0	0	0	0	0	0	0
400 MPa	0	0	0	0	verw.	0	0

X.2.7.2 Relativergebnis der Proben

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200 MPa	17	17	8	68	8	24	25
300 MPa	0	0	0	0	0	0	0
400 MPa	0	0	0	0	verw.	0	0

X.2.7.3 Absolutergebnis der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200/300 MPa	800	1.100	1.200	1.500	1.300	1.180	259
400 MPa	4.400	500	200	1.700	400	1.440	1.756

X.2.7.4 Relativergebnis der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200/300 MPa	68	93	102	127	110	100	22
400 MPa	306	35	14	118	28	100	122

X.2.8 Kombinationsversuch mit *S. aureus* ATCC 25923 bei einer Temperatur von 20°C, einer Druckhaltdauer von 30 Min. und Druckstufen von 200/ 300 und 400 MPa

X.2.8.1 Absolutergebnis der Proben

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200 MPa	800	1.500	800	100	300	700	543
300 MPa	0	0	100	0	verw.	25	50
400 MPa	0	0	100	0	0	20	45

X.2.8.2 Relativergebnis der Proben

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200 MPa	68	127	68	8	25	59	46
300 MPa	0	0	8	0	verw.	2	4
400 MPa	0	0	8	0	0	2	4

X.2.8.3 Absolutergebnis der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200/300 MPa	800	1.100	1.200	1.500	1.300	1.180	259
400 MPa	4.400	500	200	1.700	400	1.440	1.756

X.2.8.4 Relativergebnis der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200/300 MPa	68	93	102	127	110	100	22
400 MPa	306	35	14	118	28	100	122

X.2.9 Intervallversuch mit *S. aureus* ATCC 25923 bei einer Temperatur von 20°C, einer Druckhaldedauer von 30 Min. und einer Druckstufe von 200 MPa

X.2.9.1 Absolutergebnis der Proben

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200 MPa	2	1	1	0	1	1	1

X.2.9.2 Relativergebnis der Proben

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200 MPa	31	16	16	0	0	13	13

X.2.9.3 Absolutergebnis der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200 MPa	5	6	2	10	9	6	3

X.2.9.4 Relativergebnis der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200 MPa	78	94	31	156	141	100	50

X.2.10 Intervallversuch mit *S. aureus* ATCC 25923 bei einer Temperatur von 20°C, einer Druckhaldedauer von 6x5 Min. und einer Druckstufe von 200 MPa

X.2.10.1 Absolutergebnis der Proben

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200 MPa	1	2	7	3	2	3	2

X.2.10.2 Relativergebnis der Proben

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200 MPa	1	1	5	2	0	2	2

X.2.10.3 Absolutergebnis der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200 MPa	93	141	152	156	137	136	25

X.2.10.4 Relativergebnis der Kontrollgruppe

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
200 MPa	68	104	112	115	101	100	19

X.3 Kombinierte Applikation von HHD und Ultraschall auf Bakterien- suspension mit *S. aureus* ATCC 25923

X.3.1 Absolutergebnis des Versuchs

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
a	28.400	26.800	34.000	29.800	27.200	29.240	2.907
b	25.400	32.800	32.100	32.800	27.600	30.140	3.425
c	28.900	24.200	18.400	22.800	24.800	23.820	3.786
d	35.000	32.400	35.600	32.800	35.200	34.200	1.483
e	27.800	29.800	26.400	27.000	23.600	26.920	2.257

X.3.2 Relativergebnis des Versuchs

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
a	97	92	116	102	93	100	10
b	87	112	110	112	94	103	12
c	99	83	63	78	85	81	13
d	120	111	122	112	120	117	5
e	95	102	90	92	81	92	8

X.3.3 Legende zum Absolut- und Relativergebnis des Versuchs

Probenreihe	Behandlung
a	Kontrolle
b	5 Min. Ultraschall (55 kHz)
c	10 Min. Hochdruck 200 MPa und 20° C
d	5 Min. Ultraschall (55 kHz) und 10 Min. Hochdruck 200 MPa und 20° C
e	10 Min. Hochdruck 200 MPa und 20° C und 5 Min. Ultraschall (55 kHz)

X.4 Hydrostatische Hochdruckbehandlung von kontaminierten Spongiosa-zylindern aus humanen Femurköpfen

X.4.1 Versuch mit *S. aureus* ATCC 25923 bei einer Temperatur von 37°C, Druckhaltezeiten von 6x5/ 10 und 30 Min. und einer Druckstufe von 600 MPa. nach 24 und 48 Stunden

X.4.1.1 Absolutergebnis der Proben nach 24 Std.

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
6x5 Min.	0	1	0	0	0	0	0
10 Min.	0	0	0	0	1	0	0
30 Min.	0	0	0	0	0	0	0

X.4.1.2 Relativergebnis der Proben nach 24 Std.

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
6x5 Min.	0	8	0	0	0	2	3
10 Min.	0	0	0	0	8	2	3
30 Min.	0	0	0	0	0	0	0

X.4.1.3 Absolutergebnis der Kontrollgruppe nach 24 Std.

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
6x5/10/30 Min.	22	9	8	14	13	13	6

X.4.1.4 Relativergebnis der Kontrollgruppe nach 24 Std.

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
6x5/10/30 Min.	167	68	61	106	98	100	42

X.4.1.5 Absolutergebnis der Proben nach 48 Std..

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
6x5 Min.	0	0	0	0	0	0	0
10 Min.	0	0	0	0	0	0	0
30 Min.	0	0	0	0	0	0	0

X.4.1.6 Relativergebnis der Proben nach 48 Std.

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
6x5 Min.	0	0	0	0	0	0	0
10 Min.	0	0	0	0	0	0	0
30 Min.	0	0	0	0	0	0	0

X.4.1.7 Absolutergebnis der Kontrollgruppe nach 48 Std.

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
6x5/10/30 Min.	11	0	0	0	0	2	5

X.4.1.8 Relativergebnis der Kontrollgruppe nach 48 Std.

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
6x5/10/30 Min.	500	0	0	0	0	100	224

**X.4.2 Versuch mit *E. faecium* ATCC 6057 bei einer Temperatur von 37°C,
Druckhaltezeiten von 6x5/ 10 und 30 Min. und einer Druckstufe von 600 MPa.
nach 24 und 48 Stunden**

X.4.2.1 Absolutergebnis der Proben nach 24 Std.

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
6x5 Min.	0	0	0	0	0	0	0
10 Min.	400	0	20.600	0	0	4.200	9.170
30 Min.	0	8.700	11.900	4.700	0	5.060	5.277

X.4.2.2 Relativergebnis der Proben nach 24 Std.

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
6x5 Min.	0	0	0	0	0	0	0
10 Min.	4	0	219	0	0	45	97
30 Min.	0	92	126	50	0	54	56

X.4.2.3 Absolutergebnis der Kontrollgruppe nach 24 Std.

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
6x5/10/30 Min.	0	22.200	0	300	24.600	9.420	12.791

X.4.2.4 Relativergebnis der Kontrollgruppe nach 24 Std.

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
6x5/10/30 Min.	0	236	0	3	261	100	136

X.4.2.5 Absolutergebnis der Proben nach 48 Std..

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
6x5 Min.	50.000	23.100	0	0	0	14.620	22.164
10 Min.	50.000	100	7.500	50.000	50.000	31.520	25.440
30 Min.	200	50.000	100	500	0	10.160	22.272

X.4.3.4 Relativergebnis der Kontrollgruppe nach 24 Std.

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
6x5/10/30 Min.	100	100	100	100	100	100	0

X.4.3.5 Absolutergebnis der Proben nach 48 Std.

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
6x5 Min.	0	300	0	verw.	0	75	150
10 Min.	0	0	1.100	0	19.200	4.060	8.477
30 Min.	0	13.600	1.100	0	0	2.940	5.978

X.4.3.6 Relativergebnis der Proben nach 48 Std.

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
6x5 Min.	0	1	0	0	0	0	0
10 Min.	0	0	2	0	42	9	19
30 Min.	0	30	2	0	0	6	13

X.4.3.7 Absolutergebnis der Kontrollgruppe nach 48 Std.

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
6x5/10/30 Min.	50.000	50.000	50.000	27.300	50.000	45.460	10.152

X.4.3.8 Relativergebnis der Kontrollgruppe nach 48 Std.

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
6x5/10/30 Min.	110	110	110	60	110	100	22

X.4.4 Versuch mit *S. aureus* ATCC 25923 bei einer Temperatur von 4°C, einer Druckhaltdauer von 6x5 Min. und einer Druckstufe von 600 MPa. nach 24 und 48 Stunden

X.4.4.1 Absolutergebnis der Proben nach 24 Std.

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE (unverdünnt)	0	0	0	0	0	0	0
KBE 1/100	0	0	0	0	0	0	0
KBE 1/10.000	0	0	0	0	0	0	0
KBE 1/1000.000	0	0	0	0	0	0	0

X.4.4.2 Relativergebnis der Proben nach 24 Std.

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE (unverdünnt)	∞	∞	∞	∞	∞	∞	0
KBE 1/100	14.400	16.300	0	15.600	0	9.260	8.480
KBE 1/10.000	0	20.000	0	10.000	0	6.000	8.944
KBE 1/1000.000	0	0	0	0	0	0	0

X.4.4.3 Absolutergebnis der Kontrollgruppe nach 24 Std.

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE (unverdünnt)	0	0	0	0	0	0	0
KBE 1/100	0	0	0	0	0	0	0
KBE 1/10.000	0	0	0	0	0	0	0
KBE 1/1000.000	0	0	0	0	0	0	0

X.4.4.4 Relativergebnis der Kontrollgruppe nach 24 Std.

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE (unverdünnt)	0	0	0	0	0	0	0
KBE 1/100	156	176	0	168	0	100	92
KBE 1/10.000	0	333	0	167	0	100	149
KBE 1/1000.000	0	0	0	0	0	0	0

X.4.4.5 Absolutergebnis der Proben nach 48 Std.

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE (unverdünnt)	∞	0	∞	∞	0	0	0
KBE 1/100	0	0	20.600	26.700	0	9.460	13.132
KBE 1/10.000	0	0	1.380.000	1.880.000	0	652.000	910.121
KBE 1/1000.000	0	0	3.000.000	8.000.000	0	2.200.000	3.492.850

X.4.4.6 Relativergebnis der Proben nach 48 Std.

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE (unverdünnt)	∞	∞	∞	∞	∞	∞	0
KBE 1/100	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	0
KBE 1/10.000	2.130.000	1.730.000	2.040.000	1.680.000	1.830.000	1.882.000	195.627
KBE 1/1000.000	12.000.000	7.000.000	10.000.000	5.000.000	11.000.000	9.000.000	2.915.476

X.4.4.7 Absolutergebnis der Kontrollgruppe nach 48 Std.

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE (unverdünnt)	0	0	0	0	0	0	0
KBE 1/100	0	0	41	53	0	19	26
KBE 1/10.000	0	0	73	100	0	35	48
KBE 1/1000.000	0	0	33	89	0	24	39

X.4.4.8 Relativergebnis der Kontrollgruppe nach 48 Std.

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE (unverdünnt)	0	0	0	0	0	0	0
KBE 1/100	100	100	100	100	100	100	0
KBE 1/10.000	113	92	108	89	97	100	10
KBE 1/1000.000	133	78	111	56	122	100	32

**X.4.5 Versuch mit *E. faecium* ATCC 6057 bei einer Temperatur von 4°C,
einer Druckhaltdauer von 6x5 Min. und einer Druckstufe von 600 MPa.
nach 24 und 48 Stunden**

X.4.5.1 Absolutergebnis der Proben nach 24 Std.

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE (unverdünnt)	∞	∞	∞	∞	∞	∞	0
KBE 1/100	6.400	3.300	22.200	100	18.200	10.040	9.643
KBE 1/10.000	20.000	0	10.000	0	20.000	10.000	10.000
KBE 1/1000.000	0	0	0	0	0	0	0

X.4.5.2 Relativergebnis der Proben nach 24 Std.

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE (unverdünnt)	∞	∞	∞	∞	∞	∞	0
KBE 1/100	16.500	20.700	24.500	17.300	32.200	22.240	6.404
KBE 1/10.000	60.000	220.000	160.000	110.000	430.000	196.000	143.631
KBE 1/1000.000	0	5.000.000	0	1.000.000	0	1.200.000	2.167.948

X.4.5.3 Absolutergebnis der Kontrollgruppe nach 24 Std.

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE (unverdünnt)	0	0	0	0	0	0	0
KBE 1/100	29	15	100	0	82	45	43
KBE 1/10.000	10	0	5	0	10	5	5
KBE 1/1000.000	0	0	0	0	0	0	0

X.4.5.4 Relativergebnis der Kontrollgruppe nach 24 Std.

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE (unverdünnt)	0	0	0	0	0	0	0
KBE 1/100	74	93	110	78	145	100	29
KBE 1/10.000	31	112	82	56	219	100	73
KBE 1/1000.000	0	417	0	83	0	100	181

X.4.5.5 Absolutergebnis der Proben nach 48 Std.

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE (unverdünnt)	∞	∞	∞	∞	∞	∞	0
KBE 1/100	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	0
KBE 1/10.000	2.050.000	2.040.000	1.720.000	2.680.000	3.440.000	2.386.000	684.383
KBE 1/1000.000	24.000.000	15.000.000	17.000.000	33.000.000	29.000.000	23.600.000	7.668.116

X.4.5.6 Relativergebnis der Proben nach 48 Std.

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE (unverdünnt)	∞	∞	∞	∞	∞	∞	0
KBE 1/100	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	0
KBE 1/10.000	5.000.000	5.000.000	5.000.000	2.810.000	3.560.000	4.274.000	1.028.873
KBE 1/1000.000	57.000.000	74.000.000	50.000.000	34.000.000	62.000.000	55.400.000	14.825.653

X.4.5.7 Absolutergebnis der Kontrollgruppe nach 48 Std.

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE (unverdünnt)	0	0	0	0	0	0	0
KBE 1/100	100	100	100	100	100	100	0
KBE 1/10.000	48	48	40	63	80	56	16
KBE 1/1000.000	43	27	31	60	52	43	14

X.4.5.8 Relativergebnis der Kontrollgruppe nach 48 Std.

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE (unverdünnt)	0	0	0	0	0	0	0
KBE 1/100	100	100	100	100	100	100	0
KBE 1/10.000	117	117	117	66	83	100	24
KBE 1/1000.000	103	134	90	61	112	100	27

**X.4.6 Versuch mit *P. aeruginosa* ATCC 27853 bei einer Temperatur von 4°C,
einer Druckhaldedauer von 6x5 Min. und einer Druckstufe von 600 MPa.
nach 24 und 48 Stunden**

X.4.6.1 Absolutergebnis der Proben nach 24 Std.

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE (unverdünnt)	∞	∞	∞	∞	∞	∞	0
KBE 1/100	20.400	50.000	50.000	50.000	50.000	44.080	13.238
KBE 1/10.000	400.000	780.000	640.000	20.000	1.830.000	734.000	677.038
KBE 1/1000.000	1.000.000	0	0	1.000.000	4.000.000	1.200.000	1.643.168

X.4.6.2 Relativergebnis der Proben nach 24 Std.

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE (unverdünnt)	∞	∞	∞	∞	∞	∞	0
KBE 1/100	50.000	50.000	50.000	50.000	verw.	50.000	0
KBE 1/10.000	520.000	1.430.000	710.000	420.000	verw.	770.000	456.143
KBE 1/1000.000	2.000.000	9.000.000	0	1.000.000	verw.	3.000.000	4.082.483

X.4.6.3 Absolutergebnis der Kontrollgruppe nach 24 Std.

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE (unverdünnt)	0	0	0	0	0	0	0
KBE 1/100	41	100	100	100	100	88	26
KBE 1/10.000	52	101	83	3	238	95	88
KBE 1/1000.000	33	0	0	33	133	40	55

X.4.6.4 Relativergebnis der Kontrollgruppe nach 24 Std.

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE (unverdünnt)	0	0	0	0	verw.	0	0
KBE 1/100	100	100	100	100	verw.	100	0
KBE 1/10.000	68	186	92	55	verw.	100	59
KBE 1/1000.000	67	300	0	33	verw.	100	136

X.4.6.5 Absolutergebnis der Proben nach 48 Std.

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE (unverdünnt)	∞	∞	∞	∞	∞	∞	0
KBE 1/100	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	0
KBE 1/10.000	5.000.000	5.000.000	5.000.000	5.000.000	5.000.000	5.000.000	0
KBE 1/1000.000	124.000.000	144.000.000	87.000.000	119.000.000	91.000.000	113.000.000	23.864.199

X.4.6.6 Relativergebnis der Proben nach 48 Std.

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE (unverdünnt)	∞	∞	∞	∞	∞	∞	0
KBE 1/100	50.000	50.000	50.000	50.000	verw.	50.000	0
KBE 1/10.000	5.000.000	5.000.000	5.000.000	5.000.000	verw.	5.000.000	0
KBE 1/1000.000	242.000.000	500.000.000	141.000.000	131.000.000	verw.	253.500.000	171.810.943

X.4.6.7 Absolutergebnis der Kontrollgruppe nach 48 Std.

Probe	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE (unverdünnt)	0	0	0	0	0	0	0
KBE 1/100	100	100	100	100	100	100	0
KBE 1/10.000	100	100	100	100	100	100	0
KBE 1/1000.000	49	57	34	47	36	45	9

X.4.6.8 Relativergebnis der Kontrollgruppe nach 48 Std.

Kontrolle	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabw.
KBE (unverdünnt)	0	0	0	0	verw.	0	0
KBE 1/100	100	100	100	100	verw.	100	0
KBE 1/10.000	100	100	100	100	verw.	100	0
KBE 1/1000.000	95	197	56	52	verw.	100	68

X.5 Probanden für die Versuchsreihen der HHD-Wirksamkeit auf kontaminierte Spongiosazylinder aus arthrotisch degenerierten humanen Femurköpfen

X.5.1 Männliche Probanden

3 männliche Probanden mit Coxarthrose und einem Alter zwischen 64 und 75 Jahren

X.5.2 Weibliche Probanden

6 weibliche Probanden mit Coxarthrose und einem Alter zwischen 51 und 92 Jahren

XI. Lebenslauf

Vorname: Monika Gertrud
Nachname: Brendle-Simon geb. Brendle
Geb. am: 22.09.1975
Geburtsort: Ulm/Donau

Schulbildung:

September 1982 – Juli 1986 Grundschule, Ulm-Einsingen
September 1986 – Juli 1992 Priv. Kath. Mädchengymnasium
St. Hildegard; Ulm
September 1992 – Juli 1995 Kepler-Gymnasium Ulm

Abschluss:

29. Juni 1995 Allgemeine Hochschulreife

Freiwilliges Soziales Jahr:

September 1995 – August 1996 Prof. Dr. W. Puhl
Ärztlicher Direktor und Chefarzt,
Rehabilitationskrankenhaus Ulm

Studium:

Oktober 1996 – März 1997 Eberhard Karls Universität, Tübingen
Philosophie und Soziologie

Vorklinischer Studienabschnitt:

Oktober 1997- März 2001 Ludwig-Maximilians-Universität,
München

Abschluss:

31. März 2001 Physikum

Klinischer Studienabschnitt:

April 2001 – April 2005

Technische Universität, München

Abschluss:

31. März 2002

1. Staatsexamen

23. März 2004

2. Staatsexamen

18. April 2005

3. Staatsexamen

Famulaturen:

August 2001 – September 2001

Prof. Dr. W. Puhl,
Ärztlicher Direktor und Chefarzt,
Orthopädische Abteilung des
Rehabilitationskrankenhauses Ulm,
Orthopädische Klinik mit Querschnitts-
Gelähmtenzentrum der Universität Ulm

August 2002

Prof. Dr. B. Heimkes,
Schwerpunkt Kinderorthopädie in der
Kinderchirurgie,
Krankenhaus München-Schwabing

Februar 2003 – März 2003

Prof. Dr. R. Gradinger,
Direktor der Klinik und Poliklinik für
Orthopädie und Sportorthopädie,
Klinikum rechts der Isar der
Technischen Universität München

Juli 2003 – August 2003

Dr. med. D. Kahl,
Praxis für Innere Medizin,
Rathausplatz 1, 82031 Grünwald

Praktisches Jahr:

April 2004 – August 2004

Prof. Dr. J. Siewert,
Direktor der Chirurgischen Klinik
und Poliklinik,
Klinikum rechts der Isar der
Technischen Universität München

August 2004 – Dezember 2004

Prof. Dr. R. Gradinger,
Direktor der Klinik und Poliklinik für
Orthopädie und Sportorthopädie,
Klinikum rechts der Isar der
Technischen Universität München

Dezember 2004 – März 2005

Prof. Dr. Ch. Peschel,
Direktor der III. Med. Klinik und Poliklinik,
Klinikum rechts der Isar der
Technischen Universität München

Weiterbildung zur Fachärztin für Physikalische Medizin und Rehabilitation:

Februar 2006 – Juli 2009

Prof. Dr. G. Stucki,
Direktor der Klinik und Poliklinik für
Physikalische Medizin und Rehabilitation,
Klinikum Großhadern der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Seit August 2009

Prof. Dr. Dipl.-Ing. V. Jansson,
Direktor der Klinik und Poliklinik für
Physikalische Medizin und Rehabilitation,
Klinikum Großhadern der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Facharztprüfung:

17.05.2011

Anerkennung zur Fachärztin für
Physikalische und Rehabilitative Medizin

XII. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. R. Gradinger von der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie, Klinikum rechts der Isar der TU München, und Herrn Prof. Dr. med. W. Mittelmeier von der Orthopädischen Klinik der Universität Rostock (früher Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie, Klinikum rechts der Isar der TU München) für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Doktorarbeit durchführen zu können.

Mein allerherzlichster Dank gilt Herrn PD Dr. med. H. Gollwitzer für die vorbildliche Einarbeitung und Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, die intensive Betreuung, Unterstützung und große Geduld.

Ich danke Herrn Dr.-Ing. G. Blümelhuber, Lehrstuhl für Energie- und Umwelttechnik der Lebensmittelindustrie, TU München, für die Zusammenarbeit.

Meinen Eltern, Marie und Richard Brendle, danke ich von Herzen für ihre stets bedingungslose vielseitige Unterstützung - nicht nur während meines gesamten Medizinstudiums.

Ein spezieller und herzlicher Dank gilt meinem Mann, Peer-G. Simon, für seine immerwährende große Unterstützung und Motivation in vielfältiger Weise.

XIII. Publikation

Gollwitzer H, Mittelmeier W, Brendle M, Weber P, Miethke Th, Hofmann GO, Gerdesmeyer L, Schauwecker J, Diehl P. High Hydrostatic Pressure for Disinfection of Bone Grafts and Biomaterials: An Experimental Study. The Open Orthopaedics Journal, 2009, 3, 1-7