

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

Extrakorporale hydrostatische Hochdruckbehandlung als neues Verfahren zur Desinfektion infizierter Knochenpräparate

Patrick Weber

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. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.- Prof. Dr. R. Gradinger
2. apl. Prof. Dr. Th. Chr. Miethke

Die Dissertation wurde am 28.06.06 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.10.06 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	2
1 Einleitung	6
1.1 Problem Knochendefekt	6
1.2 Aktuelle Möglichkeiten der Therapie von Knochendefekten	7
1.2.1 Biologische Knochenersatzmaterialien	8
1.2.1.1 Autogener Knochen	8
1.2.1.2 Allogener Knochen	8
1.2.2 Alloplastische Materialien/ Knochenersatzmaterialien	9
1.2.2.1 Anorganische, synthetische Knochenersatzmittel	10
1.2.2.1.1 Keramiken	10
1.2.2.1.2 Biogläser und Glaskeramiken	11
1.2.2.1.3 Kalziumphosphatzemente	11
1.2.2.1.4 Kalziumsulfat	12
1.2.2.2 Organische Knochenersatzmittel	12
1.2.2.2.1 Demineralisierte Knochenmatrix	12
1.2.2.2.2 Demineralisierte Knochenmatrixextrakte	13
1.2.2.2.3 Hochgereinigte Knochenmatrixfaktoren und Bone morphogenetic proteins (BMPs)	14
1.2.2.3 Composites (Materialkombinationen)	15
1.2.3 Biologische Defektdeckung- der Segmenttransport	16
1.2.4 Endoprothesen	16
1.3 Problematik Allograft- Infektion	17
1.3.1 Bakterien	17
1.3.2 Viren und Prionen	18
1.3.3 Richtlinien zum Führen einer Knochenbank	19
1.3.4 Bakterielle Infektionen von Knochen	19
1.3.5 Methoden zur Sterilisation und Desinfektion von allogenen Knochen	21
1.3.5.1 Chemische Verfahren	21
1.3.5.2 Bestrahlungsverfahren	22
1.3.5.3 Thermische Behandlungsverfahren	22
1.3.5.3.1 Autoklavierung	22
1.3.5.3.2 Pasteurisation	23
1.3.5.3.3 Wärmebehandlung	23
1.3.5.4 Mikrowellenbehandlung	24
1.4 Hochdruck zur Inaktivierung von Bakterien	24

1.4.1	Geschichte und Anwendung des Hochdrucks als etablierte Methode in der Lebensmitteltechnologie	24
1.4.2	Effekt des hydrostatischen Hochdrucks (HHD) auf verschiedene Bakterienspezies, Pilze und Viren mit dem Ziel der Inaktivierung	25
1.4.2.1	Hochdruckbehandlung von Bakterien, Sporen und Pilzen	25
1.4.2.2	Hochdruckbehandlung von Viren	26
2	Problemstellung/ Zielsetzung	28
3	Material und Methoden	29
3.1	Hochdruckanlage und Probengefäße	29
3.2	Hochdruckbehandlung von verschiedenen Referenzkeimen in Suspension	32
3.2.1	Herstellung der Bakteriensuspensionen	32
3.2.2	Behandlung der Suspensionen mit hydrostatischem Hochdruck	33
3.2.3	Mikrobiologische Untersuchung der Bakteriensuspensionen	33
3.3	Behandlung von Osteitis- Knochenproben mit hydrostatischem Hochdruck	34
3.3.1	Patientengut	34
3.3.1.1	Klinische Daten der Patienten	34
3.3.1.2	Klinische Diagnosen und Operationen	35
3.3.2	Gewinnung der Knochenproben	36
3.3.3	Hochdruckbehandlung	37
3.3.3.1	Hochdruckbehandlung ohne vorherige Anreicherung (Methode 1)	37
3.3.3.2	Behandlung mit vorheriger Anreicherung (Methoden 2+3)	37
3.3.3.2.1	Hochdruckbehandlung mit einer Druckhaltezeit von 10/20 Minuten (Methode 2)	38
3.3.3.2.2	Repetitive Hochdruckbehandlung (Methode 3)	38
3.3.4	Mikrobiologische Untersuchung/Auswertung	39
3.4	Morphologische Darstellung der hochdruckbehandelten Bakterien mittels Rasterelektronenmikroskop	40
3.4.1	Anlegen der Bakteriensuspensionen	40
3.4.2	Gewinnung des Knochens und Infektion	41
3.4.3	Behandlung mit hydrostatischem Hochdruck	41
3.4.4	Probenpräparation für die REM- Untersuchung	41
3.4.5	Morphologische Auswertung mittels REM	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Hochdruckbehandlung von Referenzkeimen in Suspension	43
4.1.1	Behandlung von <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) in Suspension	43
4.1.2	Behandlung von <i>S. epidermidis</i> (ATCC 35984) in Suspension	45
4.1.3	Behandlung von <i>E. faecium</i> (ATCC 6057) in Suspension	45
4.1.4	Behandlung von <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853) in Suspension	46

4.2	Behandlung von Osteitis- Knochenstücken mit hydrostatischem Hochdruck	47
4.2.1	Behandlung mit hydrostatischem Hochdruck ohne vorherige Anreicherung mit einer Druckhaltdauer von 10 Minuten (Methode 1)	47
4.2.2	Behandlung mit hydrostatischem Hochdruck mit vorheriger Anreicherung	48
4.2.2.1	Druckhaltdauer von 10 Minuten (Methode 2)	48
4.2.2.2	Repetitive Hochdruckbehandlung: 30 Minuten Druckhaltezeit, dann 30 Minuten Pause und dann wieder 30 Minuten Druckhaltezeit (Methode 3)	50
4.3	Morphologische Darstellung der hochdruckbehandelten Bakterien mittels REM	51
5	Diskussion	58
5.1	Problem des Knochendefektes und der Sterilisation der Allografts	58
5.2	Extrakorporale Tumordevitalisierung	59
5.3	Einführung des Hydrostatischen Hochdrucks als neue Methode in die Medizin	60
5.3.1	Einfluss des Hochdrucks auf physikalische und chemische Vorgänge	61
5.3.2	Inaktivierung von Bakterien durch hydrostatischen Hochdruck	64
5.3.3	Biomechanische Eigenschaften vom Knochen unter HHD – Ergebnisse mit Tumorzellen	64
5.4	Diskussion der vorliegenden Ergebnisse	66
5.4.1	Voruntersuchungen von Referenzkeimen in Suspension	66
5.4.2	Behandlung der Knochenproben von an Osteitis/ Osteomyelitis erkrankten Patienten	68
5.4.2.1	Behandlung ohne vorherige Anreicherung (Methode 1)	68
5.4.2.2	Behandlung mit vorheriger Anreicherung	69
5.4.2.2.1	Behandlung mit einer Druckhaltezeit von 10 Minuten nach vorheriger Anreicherung (Methode 2)	69
5.4.2.2.2	Repetitive Hochdruckbehandlung: 2x30 Minuten Druckhaltezeit (Methode 3)	70
5.4.3	Beobachtung von hochdruckbehandelten Knochenstücken und Bakterien unter dem REM	72
5.4.4	Steigerung der Effektivität des hydrostatischen Hochdrucks auf die Inaktivierung von Keimen durch Untersuchung verschiedener Einflussfaktoren	73
5.5	Schlussfolgerung	75
6	Zusammenfassung	76
7	Literatur	78
8	Verzeichnis der Abkürzungen, Tabellen und Abbildungen	88
8.1	Verzeichnis der Abkürzungen	88
8.2	Verzeichnis der Tabellen	89
8.3	Verzeichnis der Abbildungen	89
9	Danksagung	91

1 EINLEITUNG

1.1 Problem Knochendefekt

Knochendefekte stellen in der orthopädischen Chirurgie, in der Unfallchirurgie, wie auch in der Wiederherstellungschirurgie nach wie vor eine große therapeutische Herausforderung dar. Ist das Skelett einmal anatomisch ausgebildet, findet noch Knochenumbau innerhalb der anatomischen Grenzen der Knochenstrukturen statt, größere Knochenneubildungen außerhalb derselben jedoch nicht mehr. Erreicht ein entstandener Knochendefekt eine Größe, die durch Knochenneubildung nicht mehr überbrückt werden kann, so spricht man von einem kritischen Defekt [Debrunner A.M.: 1994, 45-47] (S. 45).

Insbesondere bei den nach folgenden operativen Therapien wird häufig die Indikation zur Knochenersatzoperation gestellt [Debrunner A.M.: 1994, 259; Hofmann et al.: 1995, 159-166] (S 259/162):

- in der Revisions- Endoprothetik, und hier insbesondere bei aseptischen Lockerungen der Hüftpfanne im Acetabulum oder dem femoralen Stiel bei Hüft-Totalendoprothesen. Das Gleiche gilt für die Auffüllung von Knochendefekten am distalen Femur und am Tibiaplateau bei Knie- Totalendoprothesen,
- bei Wirbelkörperfusionen (Spondylodesen) zum Erreichen einer knöchernen Überbauung zwischen den beiden Wirbelkörpern,
- bei additiven Korrektur-Osteotomien von diaphysären Knochen, wobei der implantierte Knochen hier als Keil dient um den Korrekturwinkel zu erhalten und zu überbrücken,
- bei Osteosynthesen von geschlossenen Frakturen mit großen Knochendefekten, vor allem bei Stauchungsfrakturen an Gelenken (z.B. eingestauchte Tibiakopffraktur),
- zur Förderung der Frakturheilung, wo dies notwendig erscheint (verzögerte Heilung, atrophe Pseudarthrosen),
- in der Tumorchirurgie bei Defekten nach der Resektion von großen Knochensegmenten (z.B. bei malignen Tumoren wie Osteosarkomen oder Chondrosarkomen), oder bei benignen Tumoren und so genannten Pseudotumoren (z.B. den aneurysmatischen Knochenzysten),
- und mit kritischer Indikationsstellung auch bei bleibenden Defekten nach therapierten Knocheninfektionen.

So ist davon auszugehen, dass sich bei circa 15% aller Operationen am Skelettsystem die Notwendigkeit zum Knochenersatz ergibt, um Stabilität und Form des betroffenen Skelettabschnitts wiederherzustellen [Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer:

1996, 1715-1719] (S. 1715). In Zahlen bedeutet das jährlich für Deutschland etwa 71.000 autologe und 25.000 allogene Knochentransplantationen. Ältere Untersuchungen gehen davon aus, dass weitere 18.000 durchgeführt werden könnten, aber nicht ausreichend Material in den Knochenbanken vorhanden ist [Jerosch et al.: 1990, 334-338] (S 334). In den USA wurden im Jahr 2001 sogar 875.000 Knochentransplantationen durchgeführt (1990: 350.000) [Statistical abstracts of the United States: 2003, 125] (S 125, No 177), wobei die Zahl der allogenen Knochen- Transplantationen Mitte der neunziger Jahre bei 300.000-400.000 lag [Pruss et al.: 2003, 287-294; von Garrel et al.: 1998, 713-727] (S 288/714). Damit ist Knochen das zweithäufigste Transplantat nach der Transfusion von Erythrozytenkonzentrat [Rees et al.: 2003, 205-209] (S 205).

1.2 Aktuelle Möglichkeiten der Therapie von Knochendefekten

Die Generierung von Gewebe durch Tissue Engineering und hier insbesondere die extrakorporale Herstellung natürlichen Knochens ist die Idealvorstellung zur Therapie von Knochendefekten. Jedoch stellt dieses Verfahren aktuell und in absehbarer Zukunft noch kein alleiniges adäquates Therapiekonzept dar, und so muss im klinischen Alltag auf andere Knochenersatzmaterialien zurückgegriffen werden.

Diese sollten idealerweise folgende Eigenschaften besitzen [von Garrel et al.: 1998, 713-727] (S 713):

- keine immunologischen Abstoßungsreaktionen
- keine toxischen oder mutagenen Nebenwirkungen
- vollständiger knöcherner Ein- und Umbau
- hohe biologische Potenz:
 - o osteogenetische Wirkung durch zelluläre Knochenneubildung
 - o osteoinduktive Wirkung durch Freisetzung von Knochenwachstumsfaktoren
 - o osteokonduktive Wirkung durch Leitschienenfunktion
- Festigkeit entsprechend den jeweiligen Erfordernissen
- keine Mengen- und Lagerungsprobleme
- freie Auswahl in Form und Größe
- einfache Bearbeitbarkeit
- niedrige Kosten.

Bisher gibt es jedoch kein Ersatzmaterial, welches sich in der klinischen Anwendung oder präklinischen Entwicklung befindet und sämtlichen dieser Kriterien gerecht wird. Folgende Materialien kommen zum Einsatz:

- Autogener Knochen
- Allogener Knochen
- Demineralisierter Knochen
- Keramiken
- Materialkombinationen
- Endoprothesen.

1.2.1 Biologische Knochenersatzmaterialien

1.2.1.1 Autogener Knochen

Autogener Knochen wird beim gleichen Patienten entnommen und (meistens während des gleichen Eingriffs wieder am Ort des Defekts) implantiert. Autogener Knochen ist osteogenetisch, weil ein Teil lebendiger Zellen übertragen wird, osteokonditiv wegen der mit übertragenen knöchernen Matrix und aufgrund der Knochenstruktur und der Proteine der extrazellulären Matrix sehr gut osteoinduktiv [Bauer et al.: 2000, 10-27; Rees et al.: 2003, 205-209] (S 11/205). Er ist hinsichtlich der biologischen Wertigkeit allen anderen Knochenersatzmaterialien überlegen [von Garrel et al.: 1998, 713-727] (S 714). Somit ist der autogene Knochen bei infektgefährdeten Eingriffen, wie die Behandlung von offenen Frakturen, Behandlung von geschlossenen Frakturen mit großem Weichteilschaden, bei atrophen Pseudarthrosen und Defekten nach Osteitis, mit dem geringsten Risiko einsetzbar [Hofmann et al.: 1995, 159-166] (S 162).

Jedoch beinhaltet die Transplantation von autologem Knochen auch viele Nachteile und Risiken und erfährt so Limitationen. Eine erste Einschränkung ist die geringe Verfügbarkeit [Rees et al.: 2003, 205-209; von Garrel et al.: 1998, 713-727] (S 205/714). So sollte die Notwendigkeit zur Benutzung von autologem Knochen wohl überlegt sein. Weiterhin entstehen durch die zusätzliche Operation entsprechende Kosten und nicht zu unterschätzende mögliche Komplikationen an der Entnahmestelle. Seiler und Johnson berichten von folgenden Komplikationen am vorderen Beckenkamm, der häufigsten Entnahmestelle [Seiler, III et al.: 2000, 91-97] (S 91): chronische, häufig therapieresistente Schmerzen, Infektion, Hernie, Fraktur, Instabilität, Nervenverletzung, Verletzung der Arteria glutea superior, Ureterverletzung, Hämatom, kosmetische Probleme. Die Hämatomrate wird sogar mit bis zu 64% angegeben [Rüger J.M.: 1995, 51-65] (S. 51) . Schließlich stellt die Entnahme von großen Transplantaten insbesondere bei Kindern, Schwerverletzten und Patienten in schlechtem Allgemeinzustand einen nicht vertretbaren Zweiteingriff dar [von Garrel et al.: 1998, 713-727] (S 714).

1.2.1.2 Allogener Knochen

Eine Transplantation von allogem Knochen ist eine Transplantation von Knochen zwischen 2 genetisch verschiedenen Individuen der gleichen Spezies. Allogener Knochen ist

sehr gut osteokonduktiv und osteoinduktiv (durch Wachstumsfaktoren und extrazelluläre Matrixproteine im transplantierten Knochen), aber quasi nicht osteogenetisch [Rees et al.: 2003, 205-209; von Garrel et al.: 1998, 713-727] (S 205/715).

Der allogene Knochen wird entweder von Leichen gewonnen oder als resezierter Femurkopf bei Implantation von Hüft- Totalendoprothesen asserviert. Knochen von amputierten Extremitäten werden als Transplantat meist ausgeschlossen, weil es sich meist um einen biologisch minderwertigen Knochen handelt [Hofmann et al.: 1995, 159-166] (S 162). Bei Multiorgandonoren muss der Knochen optimalerweise sofort nach der Explantation von Herz, Lungen, Nieren, Leber und Pankreas gewonnen werden. Vorteil von Leichenknochen gegenüber dem Femurkopf ist, dass sich seine Form besser anpassen lässt, insbesondere bei Rekonstruktion von großen Defekten bei ossären Tumoren. Das Risiko der Transplantation von Tumorzellen, die bei pathologischen Frakturen des Schenkelhalses vorliegen können, ist geringer [Hofmann et al.: 1995, 159-166] (S 163). Weiterhin handelt es sich hierbei meist um Knochen von jüngeren Patienten, der von seiner biologischen Qualität her besser ist.

Allogenen Knochen kann man entweder als Kortikalis oder als Spongiosa gewinnen. Kortikaler Knochen wird meistens in der Form von großen Knochenblöcken transplantiert, und gibt so einen guten biomechanischen Halt. Spongiöser Knochen wird meist als gemahlene Knochenstückchen transplantiert (gemischt mit Kortikalis) [Rees et al.: 2003, 205-209] (S 205). Reddi konnte zwar beweisen, dass in kortikalem Knochen eine deutlich höhere Konzentration an wachstumsstimulierenden Faktoren vorliegt [Reddi AH: 1976, 449-478] (S 470), dennoch wird das Kortikalistransplantat aufgrund der stark verzögert ablaufenden Revaskularisation wesentlich langsamer umgebaut als Spongiosa [von Garrel et al.: 1998, 713-727] (S 716).

Die Transplantation von allogenen Knochen wird u.a limitiert durch Frakturen, Infektionen, Ausbleiben des knöchernen Ein- und Umbaus des allogenen Knochens, Instabilität und Antigeninkompatibilität [Hornicek, Jr. et al.: 1998, 179-186; Rees et al.: 2003, 205-209] (S 181/206). Vor allem die Infektion stellt eine verheerende und schwer zu behandelnde Komplikation dar [Norman-Taylor et al.: 1997, 178-180] (S 178).

1.2.2 Alloplastische Materialien/ Knochenersatzmaterialien

Die Aspekte „Vermeidung eines Zweiteingriffs für die Gewinnung eines autogenen Transplantats“ und „Entwicklung einer zum autogenen Knochen idealen Alternative“ sind bereits seit längerem Grundlage der Forschung zur Herstellung eines klinisch uneingeschränkt verwendbaren Knochenersatzmittels [Rüger J.M. et al.: 2004, 166-182] (S. 166). Alloplastische Materialien haben gegenüber dem allo- oder autogenen Knochen den

großen Vorteil einer unbegrenzten Verfügbarkeit und einer einfacheren Sterilisierung und Lagerung [Buchholz: 2002, 44-52] (S 44). Die Knochenersatzstoffe können dabei osteokonduktiv oder osteoinduktiv wirken. Zumeist beschränkt sich die Wirkung dieser Materialien jedoch auf einen Leitschieneneffekt zur gezielten Lenkung der Knochenneubildung (Osteokonduktivität). Eine weitere Voraussetzung für ihre Integration ist die Biokompatibilität [Schnurer et al.: 2003, 2-10] (S 2) und nach Möglichkeit Degradierbarkeit, um nach ihrem Abbau durch neu gebildeten Knochen ersetzt werden zu können.

Die Erfahrung mit diesen Materialien beschränkt sich auf 15-20 Jahre. Bisher gibt es noch kein ideales Knochenersatzmittel, was auch die riesige Anzahl der auf dem Markt befindlichen Materialien unterstreicht [Schnurer et al.: 2003, 2-10] (S 3). Viele dieser Ersatzstoffe werden heute kombiniert mit allo- und autogenem Knochen oder anderen synthetischen Materialien eingesetzt. Grundsätzlich kann man zwischen anorganischen synthetischen und organischen Materialien unterscheiden.

1.2.2.1 Anorganische, synthetische Knochenersatzmittel

1.2.2.1.1 Keramiken

Definition und Herstellung: Keramiken sind anorganische feste Sinterungsstoffe, die aus einem pulverförmigem Ausgangsmaterial durch mechanische Verdichtung und Brennen aus einem Grünkörper unter dessen Schrumpfung (Sinterung) hergestellt werden [Rüger J.M. et al.: 2004, 166-182] (S 172). In der Klinik kommen Hydroxylapatit (HA), Tricalciumphosphat (TCP) und Mischungen von beiden (Biphasische Keramiken) zum Einsatz, wobei das TCP im Knochen resorbiert wird, das HA hingegen über Jahre histologisch und röntgenologisch nachweisbar bleibt [Schnurer et al.: 2003, 2-10] (S. 4). Die glasartig- amorphen oder kristallinen Verbindungen sind in ihrer elementaren Zusammensetzung dem im menschlichen Knochen vorkommendem biologischen Apatit, das mit 60-70% den Hauptbestandteil des Knochens bildet, sehr ähnlich [Schnurer et al.: 2003, 2-10] (S 2). Sie weisen wie dieses Porensysteme auf, welche sehr wichtig für das Einwachsen vom Knochen sind.

Osteokonduktives/ -induktives/ -genetisches Verhalten: Die Kalziumphosphatkeramiken besitzen nur eine osteokonduktive Wirkung und sind weder osteoinduktiv noch osteogenetisch.

Klinischer Einsatz: Dieser beschränkt sich auf Knochendefekte in unbelasteten Regionen, auf sehr kleine Defekte und in - zumindest passager – entlasteten Situationen, bei bestens durchblutetem Lager [Rüger J.M. et al.: 2004, 166-182] (S 174). Als Composite mit autogenem Knochen bestehen Indikationen bei Spondylodesen an der Wirbelsäule [Linovitz et al.: 2002, s585-s589; Meadows: 2002, s579-s584] (S s585/s579) und in der Gelenkersatzchirurgie bei Prothesenwechsel [Rüger J.M. et al.: 2004, 166-182] (S. 174).

1.2.2.1.2 Biogläser und Glaskeramiken

Definition und Herstellung: Die Biogläser sind Knochenersatzmaterialien aus einer Glasphase aus Siliziumdioxid und bestehen zu einem hohen Prozentsatz aus Kalzium- und Phosphatoxiden. Mit zunehmender Dauer der Implantation wird aufgrund des Ausdiffundierens der Ionen der Netzwerkmodifikatoren die siliziumreiche Glasschicht immer dicker, d.h. der Glascharakter des Materials wird stärker. Somit verschlechtert sich die von vornherein geringe mechanische Belastbarkeit der Biogläser zunehmend.

Die Glaskeramiken bestehen als Weiterentwicklung aus 2 Glasphasen, d.h. eine kristalline Phase liegt in einer Glasmatrix vor. Somit kann im Vergleich zu den Biogläsern eine bessere knöcherne Anheftung wie auch eine größere mechanische Stabilität erreicht werden, jedoch keine Resorption und Integration in den Knochen.

Klinischer Einsatz: Die Zukunft dieser beiden Substanzgruppen scheint nicht im Knochenersatz zu liegen, da z. B. eine zentrale Forderung wie die nach vollständiger Resorption und Integration in den Knochen von beiden nicht erfüllt werden kann. Sie werden eher bei der Oberflächenaktivierung von Implantaten, die aus unterschiedlichen, biologisch nicht reaktionsfähigen Ausgangsmaterialien hergestellt sind, eine Rolle spielen, um deren Verankerungsmöglichkeiten im Knochengewebe zu verbessern. Weiterhin werden sie als lokale Wirkstoffträger z. B. in der antiseptischen Chirurgie benutzt [Rüger J.M. et al.: 2004, 166-182] (S 171-2).

1.2.2.1.3 Kalziumphosphatzemente

Kalziumphosphatzemente entstehen aus der Zusammensinterung von ein oder zwei Phosphatkomponenten und einer wässrigen Lösung, wobei eine formbare Paste entsteht, die per Hand oder per Spritze appliziert werden kann und in situ aushärtet bzw. abbindet [Schnurer et al.: 2003, 2-10] (S 4).

Osteokonduktives/ -induktives/ -genetisches Verhalten: Die Kalziumphosphatzemente sind nicht makroporös und können somit nicht osteokonduktiv wirken, sind aber aufgrund der vorhandenen - wenn auch sehr gering ausgeprägten Mikroporosität - einem zellulären Abbau unterworfen, werden also resorbiert und durch autochtonen Knochen ersetzt. Kalziumphosphate sind weder osteoinduktiv noch osteogen sie dienen somit als temporäre Platzhalter im Knochen.

Klinischer Einsatz: Ihre möglichen Einsatzgebiete sind neben der distalen Radiusfraktur u. a. die Tibiakopf- und Kalkaneusfraktur zur Unterfütterung der Gelenkflächen nach Fraktur-reposition und knöcherne Defekte an den Phalangen [Rüger J.M. et al.: 2004, 166-182] (S 175). Der Einsatz von Kalziumphosphatzementen hat sich klinisch bisher nur teilweise

bewährt. Da sie jedoch nur für die Aufnahme von axialen Druckkräften und nicht für die von Scherkräften geeignet sind, ist eine begleitende Osteosynthese zur Stabilisierung notwendig [Rüger J.M. et al.: 2004, 166-182] (S 175).

1.2.2.1.4 Kalziumsulfat

Kalziumsulfat-Ersatzmaterialien sind schon lange in Erprobung. Sie bestehen aus CaSO_4 sowie kombiniert in unterschiedlichen Mischverhältnissen mit Wasser, liegen als feste Formkörper oder Granulat vor und werden heute z.B. unter dem Namen Osteoset™ verarbeitet. Kalziumsulfate degradieren innerhalb weniger Wochen und können ihre Platzhalterfunktion nur bedingt erfüllen.

Osteokonduktives/ -induktives/ -genetisches Verhalten: Kalziumsulfat ist als Knochenersatz sicher, biokompatibel und osteokonduktiv, aber weder osteoinduktiv noch osteogen. Ein weiterer Nachteil ist die geringe biomechanische Stabilität.

Klinischer Einsatz: Im klinischen Gebrauch werden die Kalziumsulfate als Zusatz bei autogenem Knochenersatz oder als Verabreichungsmaterialien für Antibiotika oder lokale Wachstumsfaktoren eingesetzt [Bucholz: 2002, 44-52; Schnurer et al.: 2003, 2-10] (S 49-50/5).

1.2.2.2 Organische Knochenersatzmittel

1.2.2.2.1 Demineralisierte Knochenmatrix

Nach der Transplantation von Knochengewebe konnte man beobachten, dass auch außerhalb des transplantierten Knochens eine Knochenneubildung durch die induktive Wirkung transplantierte Knochenzellen und der mittransferierten Knochensubstanz stattfindet. Man folgerte, dass eine oder mehrere osteoinduktive Substanz(en) in der Knochenmatrix enthalten sind. Weiterhin stimulierte demineralisierte Knochenmatrix die knöcherne Heilung deutlich besser als mineralisierte Knochenmatrix. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die osteoinduktive Aktivität zu 60% mit dem Knochenkollagen assoziiert ist, zu 15% an mineral-organischen Komplexen gebunden ist und nur zu 25% frei in der amorphen Grundsubstanz vorhanden ist.

Herstellung: Verschiedene chemische Behandlungen (schonende Demineralisation mit niedermolekularen Säuren bzw. Chelatbildnern) führen zur Demineralisation des Knochens und zur Denaturierung des Typ-1-Kollagens. Durch diese Denaturierung und durch weitere Extraktionen kann die spezifische osteoinduktive Aktivität freigesetzt werden [Rüger J.M. et al.: 2004, 166-182] (S 177).

Weiterhin ist die immunologische Reaktion gegen demineralisierten Knochen geringer und das Implantat wird schneller in neuen Knochen umgewandelt, als mineralisierte Strukturen. Auch können verschiedene Keime durch den Demineralisationsprozess abgetötet werden. Jedoch ist es relativ schwierig, demineralisierten Knochen unter sterilen Bedingungen zu präparieren. So ist es von immenser Wichtigkeit, den Knochen anschließend zu sterilisieren [Hallfeldt et al.: 1995, 614-620] (S 619/614).

Osteokonduktives/ -induktives/ -genetisches Verhalten: Demineralisierter Knochen ist gut osteoinduktiv, osteokonduktiv, jedoch nicht osteogenetisch.

Klinischer Einsatz: Übereinstimmend berichten die Untersuchenden über eine positive Beeinflussung der knöchernen Heilung bei Implantation von demineralisierter Knochenmatrix in Versuchstiere, jedoch ist der klinische Einsatz bisher nur in den USA in größerem Masse erfolgt [Rüger J.M. et al.: 2004, 166-182] (S. 177), u. a. auch weil die biomechanische Stabilität von demineralisierter Knochenmatrix in Frage gestellt wird [Davy: 1999, 553-563; Rees et al.: 2003, 205-209] (S 559/206).

1.2.2.2 Demineralisierte Knochenmatrixextrakte

Definition und Herstellung: Durch eine weiter sequenzielle chemische Extraktion bzw. Dissoziation werden aus demineralisierter Knochenmatrix demineralisierte Knochenmatrixextrakte hergestellt. Die bekanntesten Knochenmatrixextrakte sind das „demineralized bone powder“, das aus demineralisierter Knochenmatrix durch nur zwei weitere Extraktionsvorgänge gewonnen wird, und die „insoluble bone gelatine“, Knochengelatine, bei der aus dem gleichen Ausgangsmaterial durch eine komplexe chemischen Aufarbeitung zahlreiche, nichtkollagene, nicht osteoinduktive Proteine extrahiert und gleichzeitig die kollagenen Fibrillen denaturiert werden.

Osteokonduktives/ -induktives/ -genetisches Verhalten: In diesen sollen zumindest theoretisch alle zur Osteoinduktion fähigen Faktoren frei vorliegen und somit nach der Implantation im Gewebe ihre chemotaktischen, proliferativen und differenzierenden Effekte auslösen können. Aufgrund der fehlenden Zell- und Gewebsstruktur sind die Extrakte weder osteogen noch osteokonduktiv.

Klinischer Einsatz: Die Wirksamkeit dieser Extrakte war bei experimentellen Überprüfungen teilweise sehr schlecht, so dass nur wenige Forschergruppen das Material bei traumatologischen und orthopädischen Indikationen implantieren. Auch wenn diese Materialien in den USA häufig eingesetzt werden, ist derzeit noch von einer generellen Empfehlung und einem routinemäßigem Einsatz abzuraten, weil trotz zahlreicher Implantationen die Ergebnisse inkonstant sind. Dies ist unter anderem dadurch begründet, dass die osteoinduktive Potenz der Materialien sehr stark in Abhängigkeit von ihrem Herstellungsprozess variiert [Rüger J.M. et al.: 2004, 166-182] (S 178-9).

1.2.2.2.3 Hochgereinigte Knochenmatrixfaktoren und bone morphogenetic proteins (BMPs)

Definition: 1965 wurden einige der für die Knocheninduktion verantwortlichen Faktoren, später bone morphogenetic proteins (BMP) genannt, von Urist entdeckt [Urist: 1965, 893-899] (S 893). Es wurden zahlreiche weitere Faktoren extrahiert, die chemotaktische, proliferationsinduzierende und -fördernde sowie zellendifferenzierende Wirkungen in Zellkulturen zeigten. Zu diesen Faktoren, nicht notwendigerweise Osteoblastenprodukte, aber in der Knochenmatrix nachweisbar, gehören u.a. transforming growth factor- beta (TGF- β), fibroblast growth factor (FGF), platelet derived growth factor (PDGF) [Rüger J.M. et al.: 2004, 166-182] (S 179).

Nach mehr als 30 Jahren Forschung hat man die BMPs, in der Superfamilie der TGF klassiert, zur Therapie von Knochendefekten eingeführt [Sandhu: 2003, S64-S73] (S S64). Sie spielen eine Rolle im Wachstum und in der Differenzierung vieler Zelltypen während der Embryogenese, sowie in der Homöostase [Bauer et al.: 2000, 10-27] (S 21) und sind wichtig in der Differenzierung von Stammzellen zu Osteoblasten [Long et al.: 1995, 881-887] (S 881)

Herstellung: Zwei der Faktoren, die im klinischen Gebrauch sind, rekombiniertes humanes BMP-2 und rekombiniertes humanes BMP-7 (OP-1) können biotechnologisch mit Hilfe von rekombinierter DNA-Technologie hergestellt werden. So kann man sie in unbegrenzter Menge herstellen und hat Kontrolle über ihre Reinheit [Wozney: 2002, S2-S8] (S S2).

Klinischer Einsatz: In Tierversuchen wurde die Fähigkeit der BMPs zur Verbesserung der Spondylodese und der Heilung von kritischen Knochendefekten, zum beschleunigten Knochenzusammenwachsen sowie zum Heilen von Knorpelläsionen bewiesen [Issack et al.: 2003, 429-436] (S 429). In ersten klinischen Studien konnte ihre Wirkung auch am Menschen nachgewiesen werden: appliziert auf verschiedenen Wirkstoffträgern, wie z.B. Kalziumphosphate, werden sie bei Spondylodesen eingesetzt, teilweise mit einer besseren Effektivität als die autologe Knochentransplantation [Sandhu: 2003, S64-S73] (S S64-5). Auch bei Tibiapseudarthrosen zeigte sich eine ähnliche Effektivität von OP-1 und rhBMP-2 wie die von autogenen Knochentransplantaten. In Zukunft wird es sogar möglich sein die BMPs als Gentherapie zu verwenden oder sie perkutan zu injizieren [Einhorn: 2003, 82-88] (S S83). Nach Femurosteotomien von Ratten zeigte sich eine deutliche bessere Heilung der Fraktur durch perkutane Injektion von BMP als bei den Kontrolltieren [Einhorn et al.: 2003, 1425-1435] (S 1425), ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei perkutanen BMP- Injektionen bei Fibulaosteotomien von Cynomolgus Affen [Seeherman et al.: 2004, 1961-1972] (S 1961).

In Deutschland ist Op-1 nur für Revisions- Operationen bei Tibiapseudarthrosen zugelassen. Bei größeren Knochendefekten wie z. B. bei Revisionen von Hüft- TEPs, reicht die Masse an Knochenformation von BMPs, die bei 3-5 cm³ liegt nicht aus. In naher Zukunft wird BMP als Simulator unter zusätzlichem Einsatz eines osteokonduktiven Materials benutzt werden [Einhorn: 2003, 82-88] (S 85, 86).

1.2.2.3 Composites (Materialkombinationen)

Die Verwendung eines Composites als Knochenersatzmittel zielt darauf ab, durch Mischung von Biomaterialien die Aktivität der entstehenden Komplexe im Vergleich zu den Einzelsubstanzen über einen additiven Effekt hinaus zu steigern (Synergismus). Ein Beispiel für ein eingesetztes Composite besteht aus Eigen- oder Fremdknochen zusammen mit einer Kalziumphosphatkeramik bzw. einem demineralisiertem Matrixextrakt. Dabei soll die Keramik die Menge des zu implantierenden Knochens „strecken“ bzw. der demineralisierte Matrixextrakt die biologische Aktivität des Trans- oder Implantats im Sinne einer Steigerung seiner osteoinduktiven Aktivität fördern [Rüger J.M. et al.: 2004, 166-182] (S 180).

Insgesamt besteht bei fast allen Knochenersatzwerkstoffen keine ausreichende Belastbarkeit, um Stabilität ohne begleitende Osteosynthese, externe Schienung bzw. nachfolgende Entlastung vermitteln zu können. Die vielversprechendsten Knochenersatzmittel der Zukunft sind rekombinante Wachstumsfaktoren wie rhBMP2 und -7 in Kombination mit osteoinduktiven und osteokonduktiven Materialien. Mit dem zunehmenden Verständnis der Komplexität der multifaktoriellen Steuerung von Knochenzellen und der Erkenntnis, dass die beteiligten knocheninduzierenden Faktoren und Wachstumsfaktoren, wie auch die BMPs, in Lösung vorliegen, wird klar, dass ein klinisch einsatzfähiges ideales Knochenersatzmittel ein Composite sein muss [Rüger J.M. et al.: 2004, 166-182] (S. 180-1).

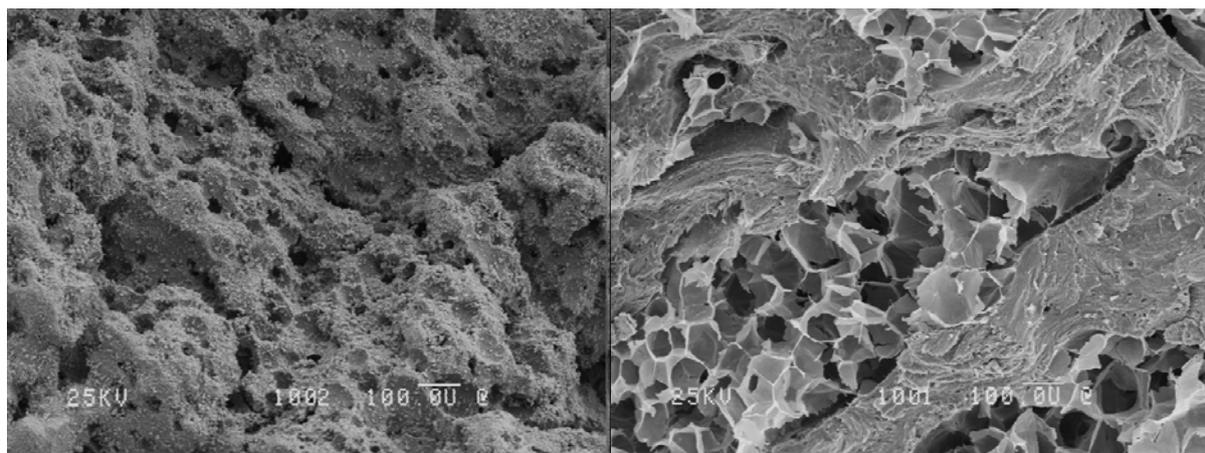


Abbildung 1:

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen verschiedener Knochenersatzmaterialien: Beachte die Porenstruktur zur Erschließung durch natürlichen Knochen.

1.2.3 Biologische Defektdeckung- der Segmenttransport

Eine weitere Alternative, insbesondere bei langstreckigen Defekten der Tibia, bietet der Segmenttransport mit einem Fixateur. Das Verfahren ist sehr langwierig und mit einer hohen Komplikationsrate verbunden [Faber et al.: 1991, 327-332; Hosny et al.: 2003, 303-306] (S 327/303).

Es bietet jedoch gleichzeitig Stabilisation, Kallusdistraction, Weichteiltransport, Extremitätenverlängerung und Achsenkorrektur. Hierzu wird eine Kortikotomie distal oder proximal des Defektes durchgeführt. Das hierbei entstandene Knochensegment wird nach einer geringen postoperativen Latenzzeit mit einer Geschwindigkeit von maximal 1mm/Tag in Richtung Knochendefekt transportiert. Es kommt zu einer kontinuierlichen Knochenneubildung im Bereich der Kortikotomie bei gleichzeitiger Verkleinerung der Defektstrecke. Nach Beendigung der Transportphase erfolgt die Anlagerung von autologer Spongiosa an der Kontaktstelle (docking side) und nach erfolgter Durchbauung (Fixationszeit) die Entfernung des Fixateurs, bzw. der Plattenosteosynthese an der Docking-Stelle [Peters KM et al.: 1997, 1-51] (S 47). Die Behandlungszeit beträgt hierbei 42,1 Tage/cm bei Tibiadefekten über 3 cm, wobei 1/3 der Gesamtzeit auf den Transport und 2/3 auf die Fixation entfällt [Josten Ch et al.: 1993, 222-223] (S 222-223).

1.2.4 Endoprothesen

Eine andere Möglichkeit zur Überbrückung von Knochendefekten ist die Implantation eines metallischen Lastträgers im Sinne einer Endoprothese, und bei langstreckigen Knochendefekten die entsprechenden Tumorprothesen [Gebhardt: 2002, 694-701] (S 694). Durch die relativ einfache Technik mit sofortiger Defektüberbrückung ist die Implantation von Endoprothesen die vielleicht am meisten benutzte Methode, um lange Defekte nach Resektion zu schließen [Bohm et al.: 2003, 355-365] (S 362). In den letzten Jahren gab es sehr viele Verbesserungen in der OP-Technik und im Design der Implantate für Hüfte, Knie und Schulter. Dies hatte eine deutliche Senkung der mittelfristigen Komplikationsraten bei Tumorendoprothesen von 60- 100% in den 70er und 80er Jahren [Johnston: 1980, 73-80] (S 77) bis auf ca. 30% in den 90er Jahren zur Folge [Abudu et al.: 1996, 652-657; Malawer et al.: 1995, 1154-1165] (S 654-5/1157). Trotzdem ist die Implantation einer Tumorprothese in vielen Fällen keine endgültige Lösung, da es zu Spätkomplikationen wie Infektionen, Prothesenbruch und am häufigsten zu aseptische Lockerungen kommt, die zu wiederholten Revisionen bis hin zur Amputation führen können [Bohm et al.: 2003, 355-365] (S 362). Gerade für junge Patienten sollte deshalb die Entwicklung biologischer Rekonstruktionsverfahren vorangetrieben werden.

1.3 Problematik Allograft- Infektion

Die allogene Knochen transplantation, erstmalig schon 1881 von Macewen durchgeführt, ist mit vielen Komplikationen behaftet und wird sicher nie die Qualität einer autologen Transplantation erreichen [Macewen W: 1881, 232], (nach [von Garrel et al.: 1998, 713-727], Ref. 89 S 714). Sie spielt trotzdem noch immer eine immense Rolle: Insbesondere in der Rekonstruktion von großen knöchernen Defekten, unter anderem durch die fast uneingeschränkte Verfügbarkeit von allogenen Knochen. Die schwerwiegendste Komplikation bei der allogenen Knochen transplantation besteht sicher in der Übertragung von bakteriellen und viralen Krankheitserregern [von Garrel et al.: 1998, 713-727] (S 716) [Norman-Taylor et al.: 1997, 178-180] (S 178).

Tabelle 1 :

Bei allogener Knochen transplantation übertragbare humanpathogene Erreger:

Bakterien	Alle Bakterien können übertragen werden. Am häufigsten sind vegetative Bakterien, vor allem Staphylokokken und Streptokokken, aber auch Sporenbildner wie z.B. Bacillus subtilis
Viren	Hepatitis-A-Virus, Hepatitis-B-Virus, Hepatitis-C-Virus, Hepatitis-D-Virus, Zytomegalievirus, Epstein-Barr-Virus, HIV I+II, HTLV-I, Parvovirus, Rabiesvirus
Andere	Treponema pallidum, Trypanosomen, Malariaplasmodien, Mikrofilarien, Babesia microti
Prionen	Creutzfeld-Jacobs-Agens

1.3.1 Bakterien

Die Angaben über die bakterielle Besiedlungsrate von allogenen, unter sterilen Bedingungen entnommenem Knochen bewegen sich in der Literatur zwischen 1 und 92 % [Husted et al.: 1996, 6260-6262] (S6260) [Chapman et al.: 1992, 398-399; Deijkers et al.: 1997, 161-166; Veen et al.: 1994, 259-263] (S 398/161/261).

Diese extreme Spannweite lässt sich am ehesten durch Unterschiede in der Entnahmetechnik und den mikrobiologischen Untersuchungstechniken erklären, weiterhin muss hier der Unterschied zwischen Keimen mit hoher und niedriger Virulenz gemacht werden [Veen et al.: 1994, 259-263] (S 261). Dabei werden grampositive Keime wie Staphylokokken- (Staphylococcus epidermidis und aureus) und Streptokokken species als häufigste Kontamination angegeben (>55%). Gramnegative Keime machen etwa 18%, Mischinfektionen 27% aus [Pruss et al.: 2003, 287-294] (S 289).

Eine bakterielle Kontamination führt nicht zwangsläufig zu einer Infektion beim Empfänger, da es sich meist um Bakterienspezies mit niedriger Pathogenität und geringer Keimzahl handelt. Die in der Literatur angegebenen Infektionsraten nach Transplantation von allogenen, kryokonserviertem Knochen schwanken zwischen 4-13% [Regel et al.: 1992, 1-8] (S 6), [Sudkamp et al.: 1993, 169-177] (S 175), [Lord et al.: 1988, 369-376] (S 369), [Dick et al.: 1994, 46-53] (S 46). Hierbei ist jedoch keineswegs erwiesen, dass die Transplantate allein ursächlich für die Infektion verantwortlich sind, sie spielen aber sicher einen entscheidenden Faktor in der Pathogenese der Infektion [Kainer et al.: 2004, 2564-2571] (S 2564).

Das Allograft wird im Implantatlager nur minimal bis gar nicht durchblutet, außerdem wird das umgebende Gewebe durch die Operation geschädigt und durch eine zusätzlich mögliche Immunreaktion beeinflusst. So kann das Allograft zu einem großen Fremdkörper werden, welcher bekanntermaßen das Infektionsrisiko erhöht [Aro et al.: 1993, 403-412] (S 410).

1.3.2 Viren und Prionen

Über Einzelfälle der Übertragung von Hepatitis und Tollwut durch allogene Gewebetransplantate ist berichtet worden [Eggen et al.: 1992, 411-413; Houff et al.: 1979, 603-604] (S 411/603). Analog zum Infektionsrisiko bei Bluttransfusionen und Gabe von Blutderivaten wird heute das Übertragungsrisiko von Hepatitiden bei der allogenen Knochentransplantation mit 1:10.000-50.000 für Hepatitis C und 1:100.000 für Hepatitis B angegeben [Habal MB et al.: 1992,] (aus [von Garrel et al.: 1998, 713-727] (S 717)).

1988 veröffentlichte das „Center for Disease Control“ (CDC) in den USA den ersten Fall einer HIV-Infektion durch ein tiefkühlkonserviertes, allogenes Knochentransplantat [MMWR: 1988, 2487-2488] (S 2487). 1990 konnte Buck HIV aus Sehnen und Knochenmaterial verstorbener AIDS-Patienten nachweisen und außerdem zeigen, dass durch Tiefkühlung oder Gefriertrocknung von Knochen und Bindegewebe die Infektiosität nur graduell reduziert wird [Buck et al.: 1990, 249-253] (S 249). Er berechnete das HIV-Infektionsrisiko für die allogene Knochentransplantation bei strenger Spenderauswahl und serologischer Testung mit 1:1.000.000, wird dieses Verfahren nicht angewendet, könnte das Risiko bis auf 1:161 steigen [Buck et al.: 1989, 129-136] (S 129). Ein weiterer Bericht über eine HIV-Infektion durch allogene Knochentransplantate hat das Risikobewusstsein erheblich verschärft [Simonds et al.: 1992, 726-732] (S 726).

Eine Übertragung der Creutzfeld-Jakob-Krankheit ist zwar durch allogene Dura-mater-Transplantate bekannt [MMWR: 1989, 1118] (S 1118), über eine solche Infektion durch allogenen Knochen wurde bisher jedoch nicht berichtet.

1.3.3 Richtlinien zum Führen einer Knochenbank

Um den sicheren Umgang mit allogenen Gewebstransplantaten zu gewährleisten wurden Richtlinien erstellt. Diese sehr strengen Richtlinien zum Betreiben einer Knochenbank wurden für Deutschland erstmals 1990 durch den wissenschaftlichen Beirat der Bundesärztekammer erlassen, 1996 und zuletzt 2001 aktualisiert [Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer: 2001, A1011-A1016]. Problem dieser Richtlinien ist, dass sie erstens trotz strenger Vorgaben nicht höchste Sicherheit bieten können und zweitens sehr viele potentielle Spender wahrscheinlich zu Unrecht ausschließen. Dies kann zu einem Mangel an allogenen Knochen führen, so dass die Nachfrage das Angebot der Knochenbanken überschreitet, wie Untersuchungen in Schottland 1995 und 2001 zeigten [Galea et al.: 1998, 595-599; Wilson et al.: 2002, 49-53] (S 595/49).

1.3.4 Bakterielle Infektionen von Knochen

Wenn alle Sicherheitsmaßnahmen nicht greifen, kann eine allogene Knochen transplantation zu einer bakteriellen Infektion des Knochens führen, mit vielen chronischen, lebenslange Verläufen.



Abbildung 2

Röntgenaufnahme eines 30-jährigen Patienten mit chronischer Infektion eines autologen Knochenspans nach Überbrückung eines posttraumatischen Knochendefekts am distalen Humerus

Als Knocheninfektion (Osteitis) werden alle Knochen- und Knochenmarksveränderungen durch Krankheitserreger (Bakterien, Viren, Pilze) bezeichnet. Die Häufigkeit wird mit 2-3% in der Bevölkerung angegeben, die Letalität liegt bei 2% [Peters KM et al.: 1997, 1-51] (S 1).

Bei der posttraumatischen wie auch der postoperativen Knocheninfektion handelt es sich häufig um Infektionen mit *Staphylococcus aureus*, es kommen jedoch auch Mischinfektionen unter anderem mit *Enterobacteriaceae* vor. Beim Einsatz von Implantaten oder anderen Biomaterialien wie Katheter hingegen dominieren niedrig pathogene Koagulase-negative-Staphylokokken, welche als Saprophyten lediglich fakultativ pathogene Keime darstellen [Hof H: 2000, 275-285; Peters KM et al.: 1997, 1-51] (S 280/5).

Häufig werden akute Knocheninfekte chronisch, fisteln endlos und bilden Abszesse die nicht ausheilen. Eine Infektausheilung unter Erhalt der Knochenkontinuität ist dann häufig nicht mehr möglich.[Debrunner A.M.: 1994, 349-366] (S. 351).

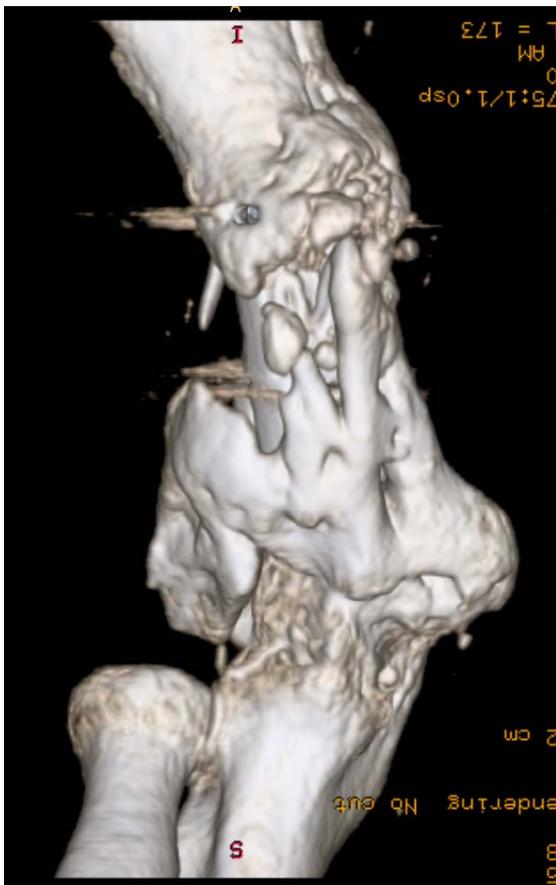


Abbildung 3

3-D-Rekonstruktion des CTs, gleicher Patient wie Abbildung 2, Ansicht von ventral;
Knochenpan als Sequester in putridem Sekret

Trotz der aggressiven kombinierten Therapie aus operativem Débridement und antibiotischer Therapie sind die Behandlungsergebnisse der posttraumatischen Knocheninfektion auch heute noch unbefriedigend (Rezidivraten bis zu 20%). Ein wichtiger Faktor um den Erfolg zu garantieren ist ein radikales chirurgisches Vorgehen, was langstreckige Knochendefekte zur Folge hat, die langwierige rekonstruktive Maßnahmen nach sich ziehen. So sind bei zirkulären Schaftdefekten bis 3 cm durchschnittlich 1,5 bis 6 cm 2,2 und bis 12 cm 2,9

Knochentransplantationen pro Patient erforderlich [Schmidt et al.: 1987, 257-267] (S 264). Die Amputationsrate nach einer Knocheninfektion liegt zwischen 0,7 und 11% [Vécsei V: 1988, 90-104] (S 96).

Die Übersicht über die Schwere dieser Erkrankung zeigt, wie wichtig das Verhindern einer Infektübertragung durch eine allogene Knochentransplantation ist, weil die Folgen dramatisch sein können.

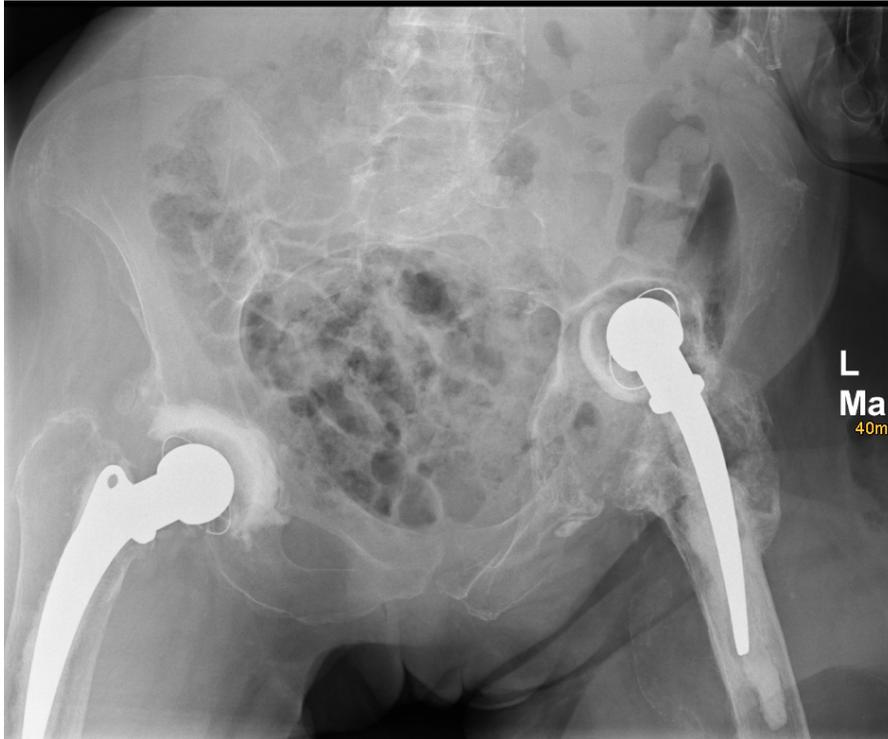


Abbildung 4

Septische Hüft-TEP-Lockerung links mit ausgeprägtem Knochendefekt im Bereich des Acetabulums.

1.3.5 Methoden zur Sterilisation und Desinfektion von allogenen Knochen

Um die viralen und bakteriellen Infektionsrisiken bei der allogenen Knochentransplantation zu reduzieren, wurden zahlreiche Methoden zur Sterilisation und Desinfektion experimentell und klinisch erprobt. Grundsätzlich stehen hierfür chemische und physikalische Verfahren zur Verfügung, wobei letztere sich in thermische und Bestrahlungsverfahren unterteilen.

1.3.5.1 Chemische Verfahren

Bei der Sterilisation mit chemischen Verfahren wird der zu sterilisierende Knochen für eine gewisse Zeitdauer einem aggressiven, potenziell keimabtötenden Milieu ausgesetzt. Es kann

sich hierbei um einen Gas oder ein Lösung handeln. Viele dieser chemischen Verfahren zeigen eine unzureichende Penetration des Agens in den Knochen oder sind wegen toxischer und mutagener Nebenwirkungen nicht für Transplantate zugelassen. Dies ist insbesondere der Fall bei Ethylenoxid, Beta- Propiolakton und bei Formaldehyd, wobei letzteres zusätzlich die osteoinduktiven Eigenschaften des Knochens reduziert [Pruss et al.: 2001, 59-66; von Garrel et al.: 1998, 713-727] (S 60-61/721). Pruss et al. berichten von Erfahrungen mit Peracetylsäure-Ethanol. Sie konnten einen Sterilisationseffekt bei artifizieller Kontamination von Knochenwürfeln <15mm Größe beweisen [Pruss et al.: 2001, 59-66] (S 59). Für größere Knochenstücke konnte für diese Methode noch keine sichere Effektivität nachgewiesen werden.

1.3.5.2 Bestrahlungsverfahren

Die inaktivierende Wirkung der Bestrahlung auf Bakterien und Viren beruht auf einer Zerstörung der RNA und DNA [von Garrel et al.: 1998, 713-727] (S 721). Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Strahlendosis von 25 kGy ausreichend ist, um relevante Keime zu zerstören. So gilt heute eine Strahlendosis von 29,5 kGy allgemein als sicher [Pruss et al.: 2001, 59-66] (S 60). Bei diesen Strahlendosen ist die Entstehung von potentiell toxischen Metaboliten sowie freien Radikalen mit potentiell mutagenen Wirkungen und der negative Einfluss auf die biomechanischen Eigenschaften des Knochengewebes problematisch [Knaepler H et al.: 1994, B-798-B-802; Pruss et al.: 2001, 59-66; von Garrel et al.: 1998, 713-727] (S B-800/60/721). Dennoch findet die Strahlenbehandlung in den USA breite praktische Anwendung [von Garrel et al.: 1998, 713-727] (S 721).

1.3.5.3 Thermische Behandlungsverfahren

Hitze führt zur Proteinkoagulation und Zerstörung der Nukleinsäuren. Die thermische Behandlung von Knochentransplantaten wurde breit untersucht [von Garrel et al.: 1998, 713-727] (S 721). So können Autoklavierung, Pasteurisation, Wärmebehandlung und Mikrowellenbehandlung unterschieden werden.

1.3.5.3.1 Autoklavierung

Autoklavierte, d.h. mit Temperaturen von über 100° C unter gespanntem Wasserdampf behandelte spongiöse Transplantate sind frei von Bakterien und somit steril. Sie weisen jedoch nicht nur einen extremen Festigkeitsverlust (bis zu 85%), sondern auch einen Strukturverlust auf, der eine Beeinträchtigung der Osteokonduktivität zur Folge hat [Knaepler H et al.: 1994, 1-101; Kohler et al.: 1986, 141-145] (S.84/142-3).

Die qualitative Unterlegenheit des autoklavierten Knochen gegenüber unbehandeltem Knochen beruht auch auf der Inaktivierung osteoinduktiver Proteine (BMPs), die bei 100° C einen völligen Wirkungsverlust zeigten [Urist et al.: 1967, 243-283] (S.266). Deshalb wird diese Methode heute kaum noch benutzt.

1.3.5.3.2 Pasteurisation

Diese besteht aus einer 10-stündigen Erhitzung auf 60° C, zum Beispiel bei der Sterilisation von Blutprodukten. Hierbei erfährt der Knochen keinen Festigkeitsverlust. Das Verfahren hat sich für die Inaktivierung aller Viren, die eine Proteinhülle besitzen, als wirksam erwiesen. Eine Inaktivierung zahlreicher vegetativer Keime ist mit dieser Methode ebenfalls gegeben, allerdings zeigen einige humanpathogene Erreger (z.B. Clostridien) in diesem Temperaturbereich ein ungehindertes Wachstum [von Garrel et al.: 1998, 713-727] (S 721). Es gibt einzelne positive klinische Erfahrungen, jedoch keine weite Verbreitung der Methode, weil die Inaktivierung pathogener Keime mit einer entscheidenden Sicherheitslücke verbunden ist [Toma de G et al.: 1992, 77] (S 77).

1.3.5.3.3 Wärmebehandlung

Die Wärmebehandlung von Hüftköpfen mit 80° C wurde eingehend durch die Arbeitsgruppe um von Garrel und Knaepler untersucht [Knaepler H et al.: 1994, 1-101; Pruss et al.: 2003, 287-294; von Garrel et al.: 1998, 713-727] (S 84-85/287/722). Hierbei werden Hüftköpfe unmittelbar nach Entnahme unter sterilen Bedingungen in einem Wasserbad bei 80° C über mindestens 15 Minuten behandelt. Vorteil dieser Methode gegenüber der Autoklavierung ist ein geringerer Festigkeitsverlust des Knochens von nur 10-15% und einer osteoinduktiven Kapazität von 50-80% des Ausgangswertes [von Garrel et al.: 1998, 713-727] (S 722). Ferner zeigte sich im Gegensatz zu autoklaviertem Knochen ein deutlich besseres Einbauverhalten und eine deutlich bessere Biomechanik [Knaepler et al.: 1992, 477-484] (S 480). Die Sterilisationsfähigkeit dieser Methode wurde untersucht mit einer artifizialen Kontamination des Zentrums von Hüftköpfen eines Durchmesser von mehr als 55mm. Infiziert wurde mit klinisch relevanten Keimen, unter anderem Staphylococcus epidermidis und Staphylococcus aureus, und das Verfahren zeigte hierbei gute Ergebnisse [Pruss et al.: 2003, 287-294] (S 287). Somit ist diese Methode zur Sterilisation von allogenen Knochen unter der Einschränkung einer verminderten Stabilität und Osteoinduktivität geeignet, jedoch auf Hüftköpfe von Lebendspendern beschränkt. Problematisch sind jedoch auch hier Infektionen mit hitzeresistenten Bakterien und Viren, wie z.B. dem Hepatitis-C-Virus.

1.3.5.4 Mikrowellenbehandlung

Verschiedene Forschergruppen konnten zeigen, dass Mikrowellenbestrahlung Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten abtöten kann. Mikrowellen werden bei der Sterilisation von Labormaterial und OP-Material eingesetzt [Dunsmuir et al.: 2003, 4755-4757] (S. 4756). Erste Versuche zur Sterilisation von Knochen mit Mikrowellen gab es 1995 von Ranft et al. [Ranft TW et al.: 1995, 226] (S 226). Dunsmuir und Gallacher haben 2003 weitere Versuche zur Sterilisation von Femurköpfen publiziert. Dabei kontaminierten sie die Hüftköpfe mit *Staphylococcus aureus* oder *Bacillus subtilis* und behandelten die Knochen dann in einem herkömmlichen Mikrowellenherd. Nach mindestens 2 Minuten Bestrahlungszeit konnten sie kein Wachstum mehr auf den Femurköpfen feststellen [Dunsmuir et al.: 2003, 4755-4757] (S 4755). Jedoch war die Fallzahl sehr gering, es wurde nur ein sehr geringes Keimspektrum untersucht, deshalb muss man auf weitere Ergebnisse warten. Weiterhin produzieren die Mikrowellen Hitze und noch ist unklar, wie sich die biomechanische Qualität des mikrowellenbehandelten Knochens verhält.

1.4 Hochdruck zur Inaktivierung von Bakterien

1.4.1 Geschichte und Anwendung des Hochdrucks als etablierte Methode in der Lebensmitteltechnologie

Erste Beobachtungen über den Effekt von Hochdruck auf biologische Materialien gehen auf das vorletzte Jahrhundert zurück. Hite et al. präsentierten erstmals 1899 den Gebrauch von Hochdruck zur Haltbarmachung von Milch [Hite: 1899, 15-35] (nach [Hoover: 1993, 150-155] S 150). Die Forschung über den Effekt von Hochdruck auf biologische Materialien ging ununterbrochen weiter, jedoch wurde der Effekt des Hochdrucks auf Lebensmittel erst 70 Jahre später in Japan analysiert. Hier erlebte er 1992 den Durchbruch, als hochdruckbehandelte und somit pasteurisierte Marmelade auf den Essensmarkt kam, gefolgt von Gelee und Saucen [Hayashi Rikimaru: 1996, 1-6] (S 3). Hochdruckbehandelte Nahrung hat gegenüber der hitzebehandelten den Vorteil, dass sie ihren vollen Geschmack und ihre Farbe, in anderen Worten ihre originalen natürlichen Eigenschaften behält [Hayashi Rikimaru: 1996, 1-6] (S 3-4). So sah Hoover 1993 der Zukunft des Hochdrucks in der Lebensmittelindustrie sehr positiv entgegen [Hoover: 1993, 150-155] (S 154). In absehbarer Zeit ist jedoch nicht damit zu rechnen, dass die hydrostatische Hochdruckbehandlung konventionelle Methoden zur Haltbarmachung von Lebensmitteln in großem Maßstab

ersetzen wird, da die Rentabilität dieses Verfahrens die Voraussetzung für eine kommerzielle Anwendung sein wird. Im wachsenden Markt von qualitativ und preislich hoch liegenden Lebensmitteln könnte diese Technologie aber gewissermaßen eine Art Nische finden [Mertens B et al.: 1992, 124-133] (S 125).

1.4.2 Effekt des hydrostatischen Hochdrucks (HHD) auf verschiedene Bakterienspezies, Pilze und Viren mit dem Ziel der Inaktivierung

Der Effekt des Hochdrucks entsteht durch verschiedene komplexe physiko- chemikalischen Vorgänge an Membransystemen, Zellenzymen, Transkription und Translation der Proteine, jedoch ohne Effekt auf kovalente Bindungen.

1.4.2.1 Hochdruckbehandlung von Bakterien, Sporen und Pilzen

Die Widerstandsfähigkeit einzelner Mikroorganismen gegenüber Hochdruck ist sehr unterschiedlich. Die Reduzierung der Keimzahl ist allgemein größer bei höheren Druckniveaus [Ludwig H et al.: 1994, 193-197] (S 194), wobei Drücke unter 200 MPa keine signifikante Reduktion der Bakterienzahl bewirken. Bisher ist bekannt, dass Zellsuspensionen von folgenden Mikroorganismen bei 25° C und 10 Minuten Einwirkdauer des Hochdrucks folgendermaßen abgetötet werden: Hefen bei Drücken von 300 MPa, Gram-negative Bakterien und Schimmelpilze bei 350 MPa, für grampositive Bakterien sind Drücke bis 600 MPa und mehr notwendig [Alpas et al.: 1999, 4248-4251; Arroyo et al.: 1997, 735-742; Shigehisa et al.: 1991, 207-215] (S 4248/S 735/S 207). Ferner ist die Inaktivierung der Keime von verschiedenen Umgebungsparametern wie Temperatur, Druckhaltedauer [Ludwig H et al.: 1994, 193-197] (S 194-5), Druckaufbau- und Druckabbaugeschwindigkeit sowie vom umgebenden Medium abhängig [Mackey BM et al.: 1995, 1-11] (S 1). Weiterhin ist zu beachten, dass die Druckempfindlichkeiten nicht nur von Spezies zu Spezies, sondern auch innerhalb der Stämme einer Bakterienspezies signifikant variieren kann [Alpas et al.: 1999, 4248-4251; Cheftel JC: 1995, 75-90; Hauben et al.: 1997, 945-950] (S 4248/ S. 79/ S 945).

Die Inaktivierung von Bakteriensporen gestaltet sich weitaus komplexer, hier konnten hohe Barotoleranzen nachgewiesen werden. So ist die Keimzahlreduktion auch nach Anwendung von hohen Drücken bei Zimmertemperatur sehr gering [Arroyo et al.: 1999, 544-556] (S 547). Sporen können nur abgetötet werden, wenn sie vorher zur Germination gezwungen werden. Dies kann durch mittlere Hochdrücke, hohe Temperaturen und geeignete Lösungsmittel erreicht werden [Ludwig H et al.: 1992, 25-32] (S31).

1.4.2.2 Hochdruckbehandlung von Viren

Schon 1956 wurden verschiedene Untersuchungen über die Inaktivierung des Poliovirus mit hydrostatischem Hochdruck berichtet [BASSET et al.: 1956, 575-593] (S 575). Bestimmte Viren sind weitaus sensibler gegenüber Hochdruck als Bakterien: sie werden teilweise bereits bei Druckstufen von 100- 300 MPa abgetötet [Masson P: 1999, 49-55] (S 52). Bei diesen Druckstufen werden nur Viren mit einer Kapsel inaktiviert, weil die kovalenten Bindungen vom Druck nicht zerstört werden. Wegen der fehlenden Kapsel können ungekapselte Viren nicht abgetötet werden.

Bereits bei Druckstufen von 300 MPa werden CMV und Herpes simplex Virus Typ-1 inaktiviert [Nakagami et al.: 1992, 255-261] (S 257), die Inaktivierung von Rotaviren wird ab Drücken von 250 MPa erreicht [Pontes et al.: 2001, 1171-1179] (S 1173). Weiterhin wurde über Inaktivierung des „infectious bursal disease virus“ [Tian et al.: 2000, 4486-4494] (S 4488) bei 240 MPa und dem Hepatitis A- Virus bei Drücken von 450 MPa berichtet. Das Norwalk- Virus - ein Calici-Virus (in den Untersuchungen das feline Calicivirus) - war bei Drücken von 275 MPa nicht mehr nachweisbar [Kingsley et al.: 2002, 1605-1609] (S 1606). Das Poliovirus als Referenzvirus für das Hepatitis-C-Virus konnte hingegen nicht mit Druckstufen bis 600 MPa inaktiviert werden [Kingsley et al.: 2002, 1605-1609] (S 1606). Das HIV-Virus zeigte sich hingegen barosensibel, so berichteten Nakagami et al. 1996 über die HIV-Inaktivierung von mehr als 5 log-Stufen bei Drücken von 300-400 MPa. Diese Arbeitsgruppe schlug diese Technik vor, um das Blut von HIV-infizierten Patienten ex- vivo zu behandeln, um so medikamenten-resistente Viren abtöten zu können. Weiterhin könne Plasma vor Transfusionen HHD behandelt werden, um es so insbesondere frei von (verschiedenen) Viren zu machen [Nakagami et al.: 1996, 475-476; Shigehisa et al.: 1996, 273-278] (S 475/277-8). Bei ähnlichen Untersuchungen konnte man mit mehreren Zyklen von Hochdruck und optimaler Temperaturwahl eine Reduktion von bis zu 6 log Stufen vom Lambda-Phagen bei 345 MPa im Plasma beobachten. Die Aktivität von verschiedenen Plasma- Enzymen blieb hierbei intakt [Bradley et al.: 2000, 193-200] (S 196-7).

Tabelle 2:

Inaktivierung verschiedener Viren durch hydrostatischen Hochdruck:

(CMV: Zytomegalovirus, HSV: Herpes simplex Virus, IBDV: infectious bursal disease virus, HAV: Hepatitis A Virus, FCV: feline calicivirus, HIV: human immunodeficiency virus)

Virus	Inaktivierungsdruck und -grad	Untersuchung
CMV	400 MPa > 4 log- Stufen	[Nakagami et al.: 1992, 255-261]
HSV	400 Mpa > 7 log- Stufen	[Nakagami et al.: 1992, 255-261]
Rota- Virus	250 MPa > 5,5 log- Stufen (nicht mehr nachweisbar)	[Pontes et al.: 2001, 1171-1179]
IBDV	230 Mpa > 5 log- Stufen	[Tian et al.: 2000, 4486-4494]
HAV	450 Mpa > 7 log- Stufen (nicht mehr nachweisbar)	[Kingsley et al.: 2002, 1605-1609]
FCV	275 MPa > 7 log- Stufen (nicht mehr nachweisbar)	[Kingsley et al.: 2002, 1605-1609]
Poliovirus	Bei 600 MPa kein Effekt	[Kingsley et al.: 2002, 1605-1609]
HIV	400 MPa > 5 log- Stufen (nicht mehr nachweisbar)	[Nakagami et al.: 1996, 475-476; Shigehisa et al.: 1996, 273-278]
Lambda-Phage	345 Mpa > 7 log- Stufen	[Bradley et al.: 2000, 193-200]

Verschiedene Autoren beobachteten trotz der Inaktivierung der Viren durch den Hochdruck den Erhalt ihrer immunogenen Potenz. So konnten das hochdruckbehandelten Rotavirus und das IBDV die Produktion von Antikörpern im Tierversuch hervorrufen, ohne infektiös zu sein. Diese Beobachtung birgt ein enormes Potenzial in der Herstellung von Impfstoffen mit Hilfe des hydrostatischen Hochdrucks [Pontes et al.: 2001, 1171-1179; Tian et al.: 2000, 4486-4494] (S 1175/4491).

2 PROBLEMSTELLUNG/ ZIELSETZUNG

Das Problem des Knochendefekts ist in der Orthopädie und der Unfallchirurgie bisher nur unzureichend gelöst. Sowohl bei Revisionsoperationen von Endoprothesen als auch nach Resektion von Knochentumoren oder infizierten Knochenteilen entstehen große Defekte, die es zu ersetzen gilt.

Autologe Knochentransplantationen und alloplastische Knochenersatzmittel zeigen verschiedene Nachteile, die ihren uneingeschränkten Einsatz verhindern. Ein ideales Knochenersatzmittel ist bisher nicht verfügbar. Die Transplantation allogenen Knochens ist mit dem Risiko der Übertragung von Mikroorganismen mit der möglichen katastrophalen Folge der Knocheninfektion oder Virusübertragung assoziiert. Verschiedene Verfahren wie die Autoklavierung, die Bestrahlung, die Hitzebehandlung oder chemische Verfahren können Knochentransplantate desinfizieren, üben aber allesamt einen negativen Einfluss auf biomechanische und osteoinduktive Eigenschaften des Transplantates aus.

Hydrostatischer Hochdruck wird sehr erfolgreich in der Haltbarmachung von Lebensmitteln eingesetzt. Bisher gibt es noch keine Daten über die Sterilisation von Knochen mit Hilfe von hydrostatischem Hochdruck. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass der hochdruckbehandelte Knochen bei Drücken bis zu 600 MPa biomechanisch stabil bleibt und er somit ein osteoinduktives und osteokonduktives Gerüst für den einzuwachsenden Knochen darstellen kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die Inaktivierungsraten typischer Erreger von Knochen- und Transplantatinfektionen in Suspensionen nach einer Behandlung mit hydrostatischem Hochdruck ermittelt werden.

Anschließend sollte das Verfahren des HHD zur Desinfektion von infizierten Osteitisknochen geprüft und optimiert werden. Verschiedene Infektmodelle wurden dazu angewandt. In weiteren Untersuchungen sollten die Einflüsse der Hochdruckbehandlung auf artifiziell kontaminierte humane Knochenproben anhand rasterelektronenmikroskopischer Untersuchungen evaluiert werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Hochdruckanlage und Probengefäße

Sowohl die Untersuchungen der Referenzkeime in Suspension als auch die Hochdruckbehandlung der Knochenproben mit anschließender morphologischer Differenzierung unter dem Rasterelektronenmikroskop (REM) wurden mit einer sondergefertigten Hochdruckmaschine (Firma Record Maschinenbau GmbH, Königsee, Deutschland) durchgeführt.

Zur Hochdruckbehandlung der Osteitis- Knochenproben diente eine Anlage mit externer Druckerzeugung (Fa. Dunze AAD – Hochdrucktechnik, Bad Homburg, Deutschland, Abb.6) am Lehrstuhl für Energie- und Umwelttechnik in der Lebensmittelindustrie der Technischen Universität München. Die Gesamtanlage gliederte sich in zwei verschiedene Baugruppen, dem eigentlichen Druckerzeuger und dem zur eigentlichen Behandlung der Proben dienenden Druckbehälter, dem Autoklaven (siehe Abbildung 5).

Das zur Kompression verwendete, druckübersetzende Medium war ein Gemisch aus Glykol, Wasser, Ethanol und Additiven (Schmierstoffen). Es wurde mit Hilfe einer pneumatischen Vorfüllpumpe auf einen Vordruck von ca. 30 bis 40 MPa gebracht. Die Vorfüllpumpe, die mit Druckluft von 1 MPa betrieben wurde, diente gleichfalls zum Entlüften des Autoklaven.

Im eigentlichen Hochdruckprozess wurde dann ein Hydrauliköl, das sich in einem zweiten Leitungssystem befand, mit einer Hydraulikpumpe auf den gewünschten Druck komprimiert. Mit Hilfe eines Druckübersetzers, der mit einem Übersetzungsverhältnis von 1:50 arbeitete, wurde dann der Druck über das druckübertragende Medium auf das Produkt übertragen.

Die Regelung des Druckniveaus, der Druckauf- bzw. -abbauzeit und der Haltezeit erfolgte rechnergesteuert.

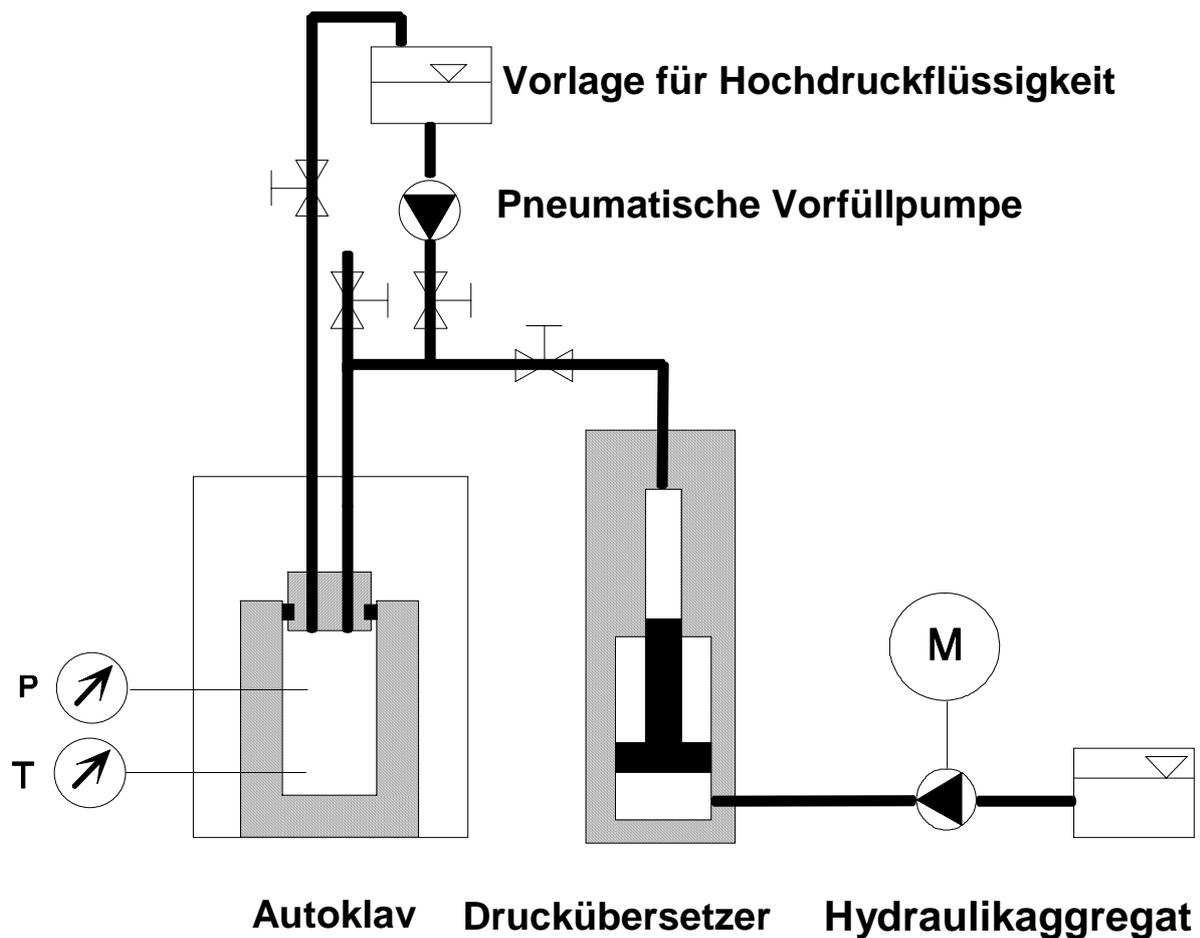


Abbildung 5:

Schematische Darstellung der Hochdruckanlage:

Oben in der Abbildung die Vorfüllpumpe (hier wurde ein Vordruck von ca. 30 bis 40 MPa erzeugt), rechts das Hydraulikaggregat, in dem der eigentliche Druck erzeugt wurde, links der Autoklav, in dem sich die Proben in der Hochdruckflüssigkeit befanden und der Hochdruck einwirkte.



Abbildung 6:

Photo der Hochdruckanlage (Fa. Dunze AAD – Hochdrucktechnik, Bad Homburg), rechts im Bild der Autoklav, links die Steuerstelle.

Die Proben mussten zur Hochdruckbehandlung in spezielle Röhrchen eingefüllt werden. Verwendet wurden Nalgene[®] Cryogenic Vials (Nalge Company, Rochester, NY, USA, Art. 5000-0012) (siehe Abb. 7). Diese Gefäße, hergestellt für das Einfrieren von Substanzen in flüssigem Stickstoff, waren in Vorversuchen am stabilsten, sicher zu verschließen und auch hinsichtlich des Volumens gut geeignet. Besonders kritisch ist der Verschlussmechanismus, der einer hohen mechanischen Belastung standhalten muss. Es darf weder Probenflüssigkeit austreten noch Flüssigkeit aus der Druckkammer in das Gefäß gelangen. In vorbereitenden Untersuchungen mit tintengefärbten Lösungen zeigten diese Gefäße einen dichten Verschluss. Dabei wurde bei sämtlichen Versuchen die Kappe der Gefäße zusätzlich mit Parafilm[®] (American National Can Company, Joplin, MO, USA) abgedichtet, um das Risiko eines Flüssigkeitsaustritts bzw. – eintritts oder eines möglichen Ablösens des Deckels während der Gefäßverformung unter Druck weiter zu minimieren.

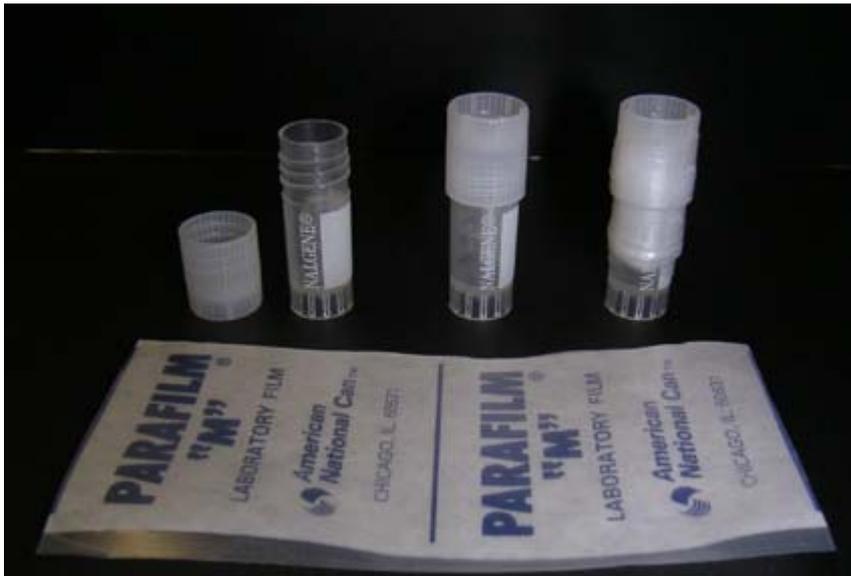


Abbildung 7:

Probengefäße und Parafilm®

Der geringen Verformung infolge Flüssigkeitskompression können die verwendeten Gefäße standhalten, nicht aber der starken Verformung durch Kompression von Luft. Daher ist beim Befüllen konsequent darauf zu achten, dass sich keine Luft in den Gefäßen befindet. Vollständig gefüllt fassen die Probengefäße ein Volumen von 2,3 ml.

3.2 Hochdruckbehandlung von verschiedenen Referenzkeimen in Suspension

3.2.1 Herstellung der Bakteriensuspensionen

Es wurden folgende Referenzkeime der American Type Culture Collection (ATCC) in den vitro Studien untersucht: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984), *Enterococcus faecium* (ATCC 6057) und *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Die beiden Staphylokokkenstämme wurden gewählt, weil sie als häufigste Erreger von Knochen- und Gelenkinfektionen gelten, wobei *S. epidermidis* insbesondere bei Infektionen mit medizinischen Implantaten und Fremdkörpern vorkommt [Ziebuhr W.: 2004, 20-25] (S 20). *P. aeruginosa* wurde als Modellkeim für gramnegative Keime gewählt, und ist ebenfalls ein häufiger Erreger von Knochen- und Gelenkinfektionen [Hendrich C. et al.: 2004, 2-13] (S 6). *E. faecium* ist zwar ein eher seltener Erreger von Knochen- und

Gelenkinfektionen, stellt jedoch aufgrund einer hohen Barotoleranz einen Problemkeim bei der Behandlung mit hydrostatischem Hochdruck dar [Wuytack et al.: 2002, 205-212; Wuytack et al.: 2003, 918-923] (S 208/920). Außerdem zeigt dieser Stamm bekanntermaßen eine sehr hohe Resistenz gegen Hitze und ist somit ein Testkeim für Desinfektionsautomaten [Robert Koch-Institut des Bundesgesundheitsamtes: 1980, 364-367].

Die Keime waren bei -70°C gelagert. Nach 24 Stunden in Müller- Hinton II Bouillon wurden sie nach einem Waschvorgang weitere 24 Stunden in TSB bei 37°C bis zur endlogarithmischen Wachstumsphase angezüchtet, bevor die Studien begannen. Die Keime wurden anschließend zweimal in PBS (phosphate buffered saline = Phosphatpuffer) gewaschen, abzentrifugiert und in physiologischer Ringer- Lösung resuspendiert. Anschließend wurde ihre Konzentration mit Hilfe der MacFarland Densometrie auf 10⁵ KBE/ml (Kolonie bildende Einheiten) eingestellt. Schließlich wurden sie in sterile cryogenic vials umgefüllt und mit hydrostatischem Hochdruck behandelt.

3.2.2 Behandlung der Suspensionen mit hydrostatischem Hochdruck

Die Befüllung der Probengefäße erfolgte wie oben beschrieben. Die Hochdruckbehandlung erfolgte mit einem Druck von 600 MPa über ein Druckhalteplateau von 10 Minuten bei Raumtemperatur (20°C) mit einer Record- Hochdruckanlage.

Von den Bakteriensuspensionen wurden jeweils 3 Proben eines jeden Keimes mit hydrostatischem Hochdruck behandelt. Parallel wurde für jeden Keim 3 Kontrollproben angelegt die nicht behandelt wurde.

3.2.3 Mikrobiologische Untersuchung der Bakteriensuspensionen

Von den Bakteriensuspensionen wurden jeweils 100 µl abpipettiert und eine Kultur auf MHB-II-Agar angelegt. Es wurden 3 weitere Kulturen mit 1:10, 1:100 und 1:1000 Verdünnungen angelegt und über 48 Stunden bei 37°C bebrütet. Anschließend wurden die Kolonie bildenden Einheiten (KBE) ausgezählt. Die Ergebnisse wurden in den Logarithmusstufen angegeben, um welche das bakterielle Wachstum durch die HHD-Behandlung reduziert wurde. Dazu wurde der Logarithmus des Reduktionsfaktors (log RF) wie folgt berechnet:

$$\log \text{RF} = \log \frac{\text{KBE ohne Behandlung (Kontrolle)}}{\text{KBE nach Behandlung (HHD)}}$$

3.3 *Behandlung von Osteitis- Knochenproben mit hydrostatischem Hochdruck*

3.3.1 *Patientengut*

Das Patientengut setzte sich zusammen aus Patienten der Abteilung für septische Chirurgie des Klinikums rechts der Isar und der Abteilung für septische- und Wiederherstellungschirurgie der BG-Unfallklinik Murnau.

3.3.1.1 *Klinische Daten der Patienten*

Bei den Patienten wurden folgende Informationen erhoben: Datum der Operation, Name, Geburtsdatum, Geschlecht. Bei jedem einzelnen Patienten wurde ein Erkennungscode festgelegt: Initialen des Patienten und Versuchsnummer (zweistellig).

An klinischen Angaben wurden Folgende berücksichtigt: Temperatur, Leukozytenzahl, C-reaktives Protein, Diagnose und Operation. Weiterhin wurde noch der vom mikrobiologischen Institut der jeweiligen Klinik ermittelte Keim notiert und Art und Ort der Materialentnahme.

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Patientendaten. Die Diagnosen sind weiter unten zusammengefasst, wie auch die Operationen. Bei 34 verschiedenen Patienten konnten insgesamt 150 Proben aus 50 Operationen gewonnen werden, (wobei die Probe des Patienten Nummer 37 bereits vor der Behandlung verworfen wurde, weil sie zu klein war und somit nicht behandelbar). Verschiedene Patienten wurden mehrmals erfasst, weil sie während der Laufzeit der Studie zwei oder dreimal operiert wurden. Dabei wurden mehrere Eingriffe bei ein und demselben Patienten als separate Experimente betrachtet, wenn diese Eingriffe an verschiedenen Tagen stattfanden.

So ergab sich folgende Verteilung der Patienten:

Geschlecht: Operationen an 37 männlichen und 13 weiblichen Patienten (25 unterschiedliche männliche Patienten und 9 unterschiedliche weibliche Patienten)

Temperatur: Im Rahmen der Studie trat bei keinem der Patienten eine Temperaturerhöhung von > 38°C auf.

Tabelle 3:

Statistische Verteilung von Alter, Leukozyten und C-reaktivem Protein beim gesamten Patientengut.

	Alter [Jahren]	Leukozytenzahl [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	C-RP [mg/dl]
Median	61,0	8,1	2,6
Minimum	25,2	3,0	0,1
Maximum	80,9	13,2	13,4

3.3.1.2 Klinische Diagnosen und Operationen

Diagnosen:

Bei sämtlichen Patienten bestand die Diagnose einer (periprothetischen) Osteitis oder Osteomyelitis (siehe Tab. 4).

Tabelle 4:

Diagnosen und Operationsindikationen beim Patientengut:

Operationen	Anzahl der Operationen/ Patienten
Infizierte Hüft- Totalendoprothesen	10/7
Infizierte Knie- Totalendoprothesen	2/2
Chronische Osteitis Oberschenkel	2/2
Unterschenkel	28/18
Akute Osteitis mit Metallentfernung	1/1 (Kniegelenk)
Ulcera mit Knochenbeteiligung	3/2 (Sitzbein/Unterschenkel)
Infizierte Myositis ossificans (Wade)	3/1
Infekt der Thoraxwand mit Einbeziehung der Rippen	1/1
TOTAL	50/34

Durchführung der Operationen:

Ziel der operativen Eingriffe war es, durch konsequentes chirurgisches Débridement Infektfreiheit zu erreichen. Die Proben wurden von Patienten gewonnen die mehrfach im Rahmen einer Etappenlavage operiert wurden. Hierzu wurde bei sämtlichen Operationen folgende chirurgische Therapie durchgeführt: zunächst gründliches Débridement der Wunde,

Lavage, respektiv Jet-Lavage und eventuell Einlage eines Antibiotikum- Kollagen- Vlies (meist Sulmycin). Bei einer Patientin wurde dreimal eine Markraumaufbohrung der Tibia durchgeführt. Schließlich wurden die Wunden vakuumversiegelt. Wenn die mikrobiologischen Abstriche bei den Patienten zwei- respektiv dreimal negativ waren, also keine Bakterien mehr nachweisbar waren, wurden die Wunden sekundär verschlossen.

Sechs Mal wurden Osteosynthese- oder Prothesenmaterialien explantiert. Es wurde eine Vorfußamputation bei bekanntem Diabetes mellitus durchgeführt.

3.3.2 Gewinnung der Knochenproben

Die Proben wurden intraoperativ bei Patienten mit starkem Verdacht auf oder nachgewiesener Osteomyelitis oder Osteitis entnommen. Die Proben von den Patienten 1-4 und 12 wurden im Operationssaal für septische Chirurgie des Klinikums rechts der Isar in München entnommen. Die restlichen Proben der Patienten 5-51 wurden im Operationssaal für septische Chirurgie der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Murnau gewonnen.

Sämtliche Proben wurden dabei folgendermaßen entnommen: Mussten im Rahmen des Débridements der Wunde auch Teile vom Knochen entfernt werden, so wurden diese möglichst standardisiert abgenommen. Um eine ähnliche Größe der Proben zu erreichen, wurden die Knochenstücke nach Möglichkeit mit einem Luer mittlerer Größe entnommen. Die Proben hatten somit eine leicht zylindrische Form mit einer Länge von 0,5-1 cm und einem Durchmesser von knapp einem Zentimeter. Wurden im Rahmen der Operation größere Stück entfernt, so wurden diese noch auf dem Instrumententisch auf die entsprechende Größe zerkleinert. Die Proben bestanden aus corticalem und/oder spongiösem Knochen. Kapselanteile und Sehngewebe sowie Blutreste wurden größtenteils entfernt. Es wurden immer mindestens 2 Proben pro Patient entnommen, wobei jeweils mindestens eine Probe mittels hydrostatischen Hochdrucks behandelt wurde und mindestens eine weitere Probe als Kontrolle diente. Die Lavage der Wunde und die eventuelle Abdeckung mit Antibiotikaskwämmen oder Saugschwämmen wurden erst nach der Materialentnahme durchgeführt, ebenso wie eine perioperative Antibiotikagabe, wenn dies vom medizinischen Standpunkt her vertretbar war.

Die Proben wurden sofort nach Entnahme in sterile Röhrchen gelegt, mit steriler Ringer-Lösung aufgefüllt, bei 4°C im Kühlschrank gelagert und anschließend auf Eis transportiert. Sie wurden innerhalb von maximal 24 Stunden im mikrobiologischen Institut weiter verarbeitet (siehe weiter unten).

3.3.3 Hochdruckbehandlung

3.3.3.1 Hochdruckbehandlung ohne vorherige Anreicherung (Methode 1)

(Proben der Patienten 1-4)

Sofort nach Entnahme wurden die Proben der Patienten 1-4 noch am Operationstisch steril in die cryogenic vials überführt. Die Röhrchen wurden mit steriler Ringer-Lösung aufgefüllt, bis sie komplett luftfrei verschlossen werden konnten und doppelt mit Parafilm versiegelt.

Innerhalb von 24 Stunden wurden die Proben am Institut für Energie- und Umwelttechnik der Lebensmittelindustrie der Technischen Universität München ohne weitere Verarbeitung mittels hydrostatischen Hochdrucks behandelt. Zum Transport waren sie auf Eis gelagert, um so eine Temperatur von ca. 4° Celsius zu garantieren.

Hierbei wurden Proben eines jeden Patienten auf sämtliche der 4 verschiedenen Gruppen verteilt:

- (1) Kontrollgruppe, keine hydrostatische Hochdruckbehandlung,
- (2) Gruppe I, HHD- Behandlung mit 300 MPa ,
- (3) Gruppe II, HHD- Behandlung mit 450 MPa,
- (4) Gruppe III, HHD- Behandlung mit 600 MPa.

Die Umgebungstemperatur lag bei 20° Celsius.

Nach Entlüftung der Hochdruckkammer wurde mit dem Druckaufbau von 100 MPa/min begonnen. Nach 3 Minuten war die Druckhaltstufe von 300 MPa (Gruppe I) erreicht und die Druckstufe wurde für 10 Minuten gehalten. Dann wurde der Druckabbau mit einer Geschwindigkeit von 100 MPa/min eingeleitet. Nach dem Druckabbau wurden die Proben sofort aus der Hochdruckanlage entnommen und auf Eis gelagert.

Anschließend wurden die Proben der Gruppen II (Behandlung mit 450 MPa), und III (Behandlung mit 600 MPa) mit dem identischen Procedere behandelt. Die Druckaufbau- und Abbauzeit für diese Proben lagen dem Druck entsprechend bei 4,5 respektive 6 Minuten.

3.3.3.2 Behandlung mit vorheriger Anreicherung (Methoden 2+3)

Die Probenentnahme erfolgte gemäß dem oben geschildertem Versuchsprotokoll. Jedoch wurden die Knochenstücke nicht sogleich in die cryogenic vials zur Hochdruckbehandlung, sondern zunächst in einfache sterile Röhrchen mit Ringer- Lösung platziert. Diese wurden wiederum auf Eis transportiert und spätestens innerhalb von 24 Stunden weiterbehandelt.

Die Proben (Patienten 5-51) wurden vor der Hochdruckbehandlung mikrobiologisch analysiert. So konnte vor der Hochdruckbehandlung gesichert werden, ob eine Probe tatsächlich infiziert war oder nicht. Hierzu wurden die Knochenstücke für 5 Tage bei 37°C in TSB- Bouillon inkubiert. Anschließend wurde der Keimnachweis identisch durchgeführt wie nach der Hochdruckbehandlung (genauere Beschreibung im Kapitel Mikrobiologische Untersuchung/ Auswertung) und die jeweiligen Infektionserreger dokumentiert.

Nach Identifizierung der bakteriellen Erreger wurden nur die infizierten Knochenproben zur Hochdruckbehandlung in die sterilisierten cryogenic vials überführt und die Gefäße entsprechend mit steriler Ringer- Lösung aufgefüllt. Die Proben, bei denen sich kein Wachstum zeigte, wurden verworfen.

3.3.3.2.1 Hochdruckbehandlung mit einer Druckhaltezeit von 10/20 Minuten (Methode 2)

(Proben der Patienten 5- 25)

Zur Hochdruckbehandlung wurden die Proben auf mindestens 2, wenn ausreichend Proben vorhanden waren auf 3 verschiedene Gruppen verteilt:

- (1) Kontrollgruppe, keine hydrostatische Hochdruckbehandlung (n= 25)
- (2) Gruppe I, HHD- Behandlung mit 300 MPa (n=2)
- (3) Gruppe II, HHD- Behandlung mit 450 MPa (n=7)
- (4) Gruppe III, HHD- Behandlung mit 600 MPa (n= 28).

Die Umgebungstemperatur lag bei 20° Celsius.

Die Proben wurden identisch, wie bei Methode 1 beschrieben, zur Hochdruckbehandlung vorbereitet. Die Druckaufbauzeit lag auch bei 100 MPa/min und die Haltedauer bei 10 Minuten, bis auf die Proben der letzten drei Patienten dieser Serie (Patienten 22-25). Diese wurden mit einer Druckhaltezeit von 20 Minuten behandelt.

Im Mikrobiologischen Institut erfolgte innerhalb von 24 Stunden die Weiterverarbeitung.

Nach Analyse der Ergebnisse der Patienten 5- 25 wurde die Methode folgendermaßen geändert:

3.3.3.2.2 Repetitive Hochdruckbehandlung (Methode 3)

(Proben der Patienten 26- 51)

Zur hydrostatischen Hochdruckbehandlung wurden die Proben wiederum auf 2 verschiedene Gruppen verteilt. Leider war dies bei den Proben von 4 Patienten nicht möglich (jeweils nur eine Probe bewachsen), wobei diese dann mit 600 MPa behandelt wurden:

(1) Kontrollgruppe, keine hydrostatische Hochdruckbehandlung (n=8),

(2) Gruppe I, HHD- Behandlung mit 600 MPa (n=18)

Die Umgebungstemperatur lag bei 20° Celsius.

Es erfolgte jetzt eine repetitive hydrostatische Hochdruckbehandlung (eine Art Tyndallisation): Dazu erfolgte erst eine 30-minütige Hochdruckbehandlung mit 600 MPa (Druckauf- und Abbauphase von 100 MPa/min). Nach dem erneuten Erreichen des atmosphärischen Drucks blieben die Proben für exakt 30 Minuten im Hochdruckautoklaven. Anschließend erfolgte eine weitere 30-minütige Hochdruckbehandlung mit 600 MPa (Druckauf- und Abbauphase von 100 MPa/min).

3.3.4 Mikrobiologische Untersuchung/Auswertung

Nach der Hochdruckbehandlung wurden die Proben wieder auf Eis gelagert und ins Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Klinikum Rechts der Isar der TU München zur weiteren Behandlung transportiert. Nach Möglichkeit wurden sie sofort behandelt, sonst wurden sie im Kühlschrank für maximal 24 Stunden bei 4° Celsius zwischengelagert.

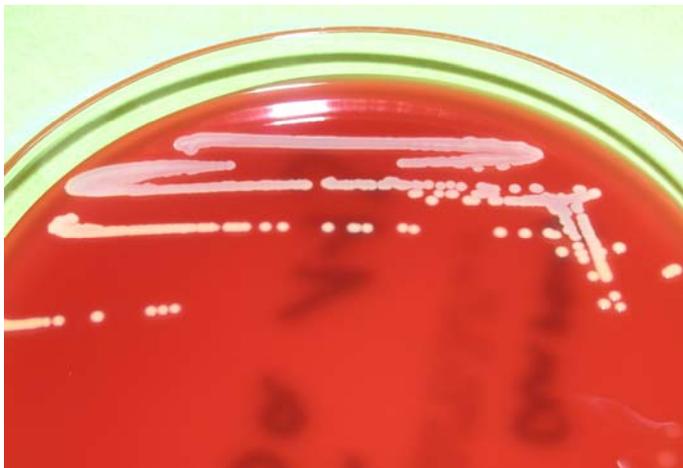


Abbildung 8:

Wachstum von *S. aureus* auf Blut- Agar

Die behandelten Proben und die Kontrollproben wurden steril von den cryogenic vials in die trypticase- soy- broth (TSB)- Röhrcchen umgefüllt. Anschließend wurden die Proben bei 37° Celsius über 5 Tage inkubiert und regelmäßig kontrolliert. Hierbei wurde bei jedem Verdacht

auf Wachstum eine Kultur auf Blut- Agar mit Drei-Ösen-Ausstrich angelegt. Konnte in den Bouillons kein Wachstum festgestellt werden, wurde trotzdem nach Ende der Beobachtungszeit von 5 Tagen bei bekannter Infektion mit grampositiven Keimen eine Abschlusskultur auf Blut- Agar, bei bekannter Infektion mit *E. coli* auf McConkey Platten angelegt.

Bei den Kulturen wurde jeweils nach einem Tag Bebrütung unter CO₂ bei 37° Celsius die Morphologie der Reinkultur makroskopisch nach Form, Aussehen, Farbe und Geruch beurteilt und von einem ärztlichen Kollegen der Mikrobiologie kontrolliert.

Konnte man nach dem Wachstum auf Staphylokokken urteilen, wurde eine Katalase-Reaktion durchgeführt und so der Verdacht auf Staphylokokken bestätigt. Die Plasma-koagulase- Reaktion konnte zwischen Koagulase- negativen- Staphylokokken und *S. aureus* unterscheiden.

Bestand ein Verdacht auf gramnegative Keime, wurden Spezialnährböden („bunte Reihe“) angelegt und nach einem Tag von einem Mikrobiologen abgelesen und dokumentiert.

3.4 Morphologische Darstellung der hochdruckbehandelten Bakterien mittels Rasterelektronenmikroskop

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von HDD auf Bakterien und infizierten Knochen wurden Knochenstücke artifiziell infiziert und hochdruckbehandelt. Bei der Betrachtung unter dem REM wurden die morphologischen Veränderungen der Knochenstücke und der Keime dokumentiert und mit den mikrobiologischen Beobachtungen diskutiert.

3.4.1 Anlegen der Bakteriensuspensionen

Es wurden die identischen Referenzkeime wie für die vorausgehenden Studien an Bakteriensuspensionen untersucht (siehe weiter oben): *S. aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (ATCC 35984), *E. faecium* (ATCC 6057) und *P. aeruginosa* (ATCC 27853). Diese wurden identisch vorbereitet wie weiter oben beschrieben.

3.4.2 Gewinnung des Knochens und Infektion

Der Knochen zur in vitro Infektion bestand aus einem Hüftkopf einer Patientin mit Coxarthrose, welcher bei der Implantation einer Hüft- TEP gewonnen werden konnte. Von diesem wurden Knochenstücke unter aseptischen Bedingungen mit einem scharfen Löffel gewonnen. Die Bakteriensuspensionen wurden wie oben beschrieben in TSB vorbereitet (10^5 KBE/ml). Die Knochenstücke wurden dann in 5 ml Bakteriensuspension für 24 Stunden bei 37°C inkubiert, anschließend in die sterilen cryogenic vials umgebettet, diese komplett mit TSB gefüllt und mit hydrostatischem Hochdruck behandelt.

3.4.3 Behandlung mit hydrostatischem Hochdruck

Die Hochdruckbehandlung wurde mit der Record- Hochdruckanlage durchgeführt. Auch hier wurden die cryogenic vials versiegelt, um einen sicheren Schutz gegen Kontamination zu gewährleisten. Die Hochdruckbehandlung erfolgte mit einem Druck von 600 MPa über 10 Minuten bei Raumtemperatur (20°C).

Von den Knochenstücken wurden jeweils pro Keim zwei Proben behandelt, zwei weitere Proben dienten als Kontrolle.

3.4.4 Probenpräparation für die REM- Untersuchung

Die hochdruckbehandelten Knochenstücke wie auch die unbehandelten Kontrollen wurden für 12-24 Stunden in einer Fixierlösung bei 4°C aufbewahrt. Diese bestand aus 24 Teilen eines Puffers (Lösung A+B) sowie einem Teil Glutaraldehyd 25 % (Serva 23114):

Lsg. A.: 22,6g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ auf 1000 ml aqua dest.

Lsg. B: 25,2g NaOH auf 1000 ml aqua dest.

Puffer (A/B) = 830 ml Lsg. A + 170 ml Lsg. B

Nach Lagerung in der Fixierlösung über 16h wurde am folgenden Tag die Präparation der Knochenstücke durchgeführt. Hierzu wurden diese 3x15 min mit aqua dest. gespült, anschließend wurden die Präparate in aufsteigender Alkoholreihe (50%- 60%- 70%- 80%) für je circa 20 Minuten dehydriert. So konnten die Proben gelagert werden.

Zur REM-Untersuchung erfolgte schließlich die Rehydratation in absteigenden Alkoholreihen (70%, 50%) für jeweils 10 Minuten, gefolgt von der Präparation mit folgendem Behandlungsschema:

- 15 Minuten mit 0,1 M Cacodylatpuffer, pH 7,2.
- 1% Osmiumtetroxid (Polysciences Cat. # 0972B) in 0,1 M Cacodylatpuffer, 70 Minuten bei 4° C im Dunkeln osmieren.
- 2 x 7 Minuten mit Cacodylatpuffer waschen.
- Aufsteigende Alkoholreihe: 30 % 2 x 7 Minuten
 - 50 % 2 x 7 Minuten
 - 70 % 2 x 7 Minuten
 - 100 % 2 x 7 Minuten
- Ethanol + Hexamethyldisilazane (HMDS, Polysciences Cat. # 00692)
Ethanol + HMDS Mischungsverhältnis 2 + 1; 2 x 7 Minuten
 - 1 + 1; 2 x 7 Minuten
 - 1 + 2; 2 x 7 Minuten
- HMDS 100 % 2 x 7 Minuten
- Abpipettieren und über Nacht stehen lassen.

Es wurden je Probe jeweils 2 ml zugegeben. Die Durchführung erfolgte bis auf die Osmierung unter dem Abzug. Die Platte war bis auf die 100%-ige HMDS-Lösung über Nacht abgedeckt.

Anschließend wurden die Proben auf Kieselsteinen gelagert um weiter zu trocknen. Nach dem Trocknen wurden die Proben mit doppelseitig klebenden Folien (Leit- Tabs, Fa. Plano G3347) auf den Probetellern befestigt. Mit dem Sputtergerät SCD 050 (Fa. Balzers) erfolgte schließlich die Beschichtung der Proben mit einer ca. 10 nm dicken Goldschicht.

3.4.5 Morphologische Auswertung mittels REM

Alle Untersuchungen wurden am Rasterelektronenmikroskop JSM 6300 (Firma: JEOL, Tokyo, Japan) durchgeführt und über das geräteeigene Programm Image Converter (Fa. Börder Elektronik) dokumentiert und im TIFF- Format abgespeichert. Die REM-Untersuchungen wurden im Zentrum für Allergie und Umwelt an der Klinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der TU München am REM durchgeführt.

Es wurde jeweils eine Übersicht mit einer 25-fachen Vergrößerung, sowie Detailaufnahmen mit einer 3000-fachen und 10.000-20.000-fachen Vergrößerungen angefertigt. Die morphologischen Veränderungen wurden dokumentiert und deskriptiv ausgewertet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Hochdruckbehandlung von Referenzkeimen in Suspension

4.1.1 Behandlung von *S. aureus* (ATCC 25923) in Suspension

Tabelle 5:

Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten von *S. aureus* (ATCC 25923) in Suspension nach Behandlung mit hydrostatischem Hochdruck (600 MPa, 10 min, 20°C)

<i>S. aureus</i>	1:1	1:10	1:100	1:1000	Mittelwert	1:1	1:10	1:100	1:1000
Probe 1	5	6	1	0	behandelte Proben	6,7	4	0,7	0
Probe 2	1	1	1	0					
Probe 3	14	5	0	0					
Probe 4 (Ko)	tntbc	140	38	5	Kontrollen	tntbc	130	35	7
Probe 5 (Ko)	950	79	41	10					
Probe 6 (Ko)	tntbc	172	25	6					
					log RF		1,5	1,7	

tntbc: to numerous to be counted entspricht > 500 KBE; Angabe der Ergebnisse der verschiedenen Verdünnungsreihen auf MHB-II-Agar (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000).

In den HDD- behandelten Proben konnte nur vereinzelt Bakterienwachstum nachgewiesen werden. Durchschnittlich ergab sich eine statistisch signifikante Reduktion des logarithmischen Wachstumsfaktors um mindestens 1,5 log- Stufen im Vergleich zu den nicht behandelten Proben ($p= 0,05$, Mann- Whitney- Test).

Interessanterweise zeigte sich nach 24 h Bebrütungszeit bei den Kontrollen bereits deutliches Wachstum auf den Agar- Platten, bei den behandelten Proben war nach dieser Inkubationszeit hingegen noch kein Wachstum erkennbar. Die nach HDD überlebenden Bakterien zeigten somit ein langsames Wachstum als die unbehandelten Kontrollen.

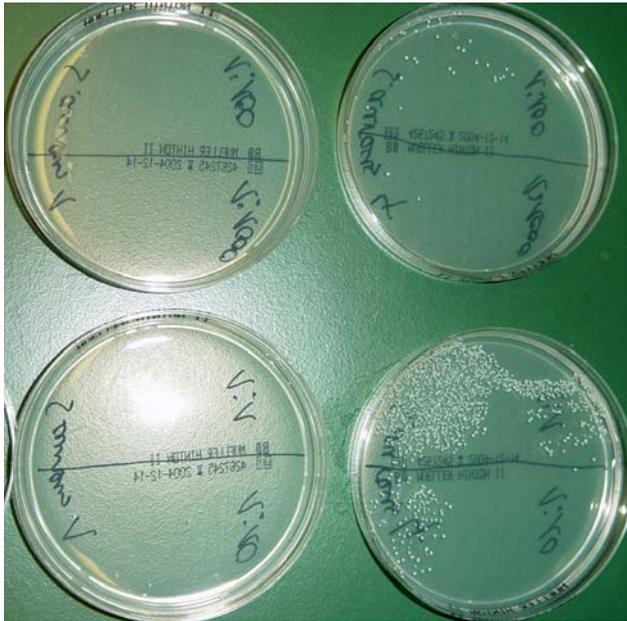


Abbildung 9:

Wachstum von *S.aureus* auf den Agar- Platten (Müller- Hinton II Bouillon) nach einer Inkubationszeit von 24 h. Es zeigt sich noch kein Wachstum bei den HHD- behandelten Bakterien (Platten links). Rechts im Bild die unbehandelten Kontrollen.



Abbildung 10:

Wachstum von *S.aureus* auf den Agar- Platten (Müller- Hinton II Bouillon) nach einer Inkubationszeit von 48 h. Jetzt zeigt sich auch bei den HHD- behandelten Bakterien die vereinzelt Ausbildung von Kolonien (Platten links). Unbehandelte Kontrollen mit deutlichem Keimwachstum (rechts).

4.1.2 Behandlung von *S. epidermidis* (ATCC 35984) in Suspension

Tabelle 6:

Anzahl der KBE von *S. epidermidis* (ATCC 35984) in Suspension nach Behandlung mit hydrostatischem Hochdruck (600 MPa, 10 min, 20°C)

S. epidermidis	1:1	1:10	1:100	1:1000	Mittelwert	1:1	1:10	1:100	1:1000
Probe 1	0	0	0	0	behandelte Proben	1	0	0	0
Probe 2	0	0	0	0					
Probe 3	3	0	0	0					
Probe 4 (Ko)	395	38	2	0	Kontrollen	298,3	25	3	0,3
Probe 5 (Ko)	260	19	7	0					
Probe 6 (Ko)	240	18	0	1					
					log RF	2,5	> 4 log-Stufen		

Bei der Hochdruckbehandlung von *S. epidermidis* (ATCC 35984) zeigte sich eine deutliche Reduktion des Keimwachstums: 2 von 3 Proben konnten komplett sterilisiert werden, bei einer Probe wuchsen nur vereinzelte Bakterienkolonien. Der logarithmische Reduktionsfaktor lag bei durchschnittlich 2,5 log-Stufen im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrollproben ($p < 0,05$, Mann-Whitney-Test), wobei nur eine Probe nach Hochdruckbehandlung noch Bakterienwachstum zeigte. D.h., bei einer eingesetzten Bakteriensuspension von 10^5 KBE/ml konnte bei 2 Proben eine Bakterienreduktion um >4 log-Stufen erreicht werden.

4.1.3 Behandlung von *E. faecium* (ATCC 6057) in Suspension

Tabelle 7:

Anzahl der KBE. von *E. faecium* (ATCC 6057) in Suspension nach Behandlung mit hydrostatischem Hochdruck (600 MPa, 10 min, 20°C)

E. faecium	1:1	1:10	1:100	1:1000	Mittelwert	1:1	1:10	1:100	1:1000
Probe 1	tntbc	214	23	3	behandelte Proben	tntbc	195	21	2,3
Probe 2	tntbc	202	22	1					
Probe 3	tntbc	170	18	3					
Probe 4 (Ko)	tntbc	153	14	2	Kontrollen	tntbc	133	17,3	2
Probe 5 (Ko)	tntbc	111	15	3					
Probe 6 (Ko)	tntbc	134	23	1					
					log RF		-0,2	-0,1	-0,1

Es zeigte sich keine Reduktion des Wachstums von *E. faecium* nach Behandlung mit 600 MPa hydrostatischen Hochdrucks. Das Wachstum der behandelten Proben unterschied sich nicht signifikant zu dem der Kontrollen ($p= 0,376$, Mann-Whitney-Test).

4.1.4 Behandlung von *P. aeruginosa* (ATCC 27853) in Suspension

Tabelle 8:

Anzahl der KBE von *P. aeruginosa* (ATCC 27853) in Suspension nach Behandlung mit hydrostatischem Hochdruck (600 MPa, 10 min, 20°C)

<i>P. aeruginosa</i>	1:1	1:10	1:100	1:1000	Mittelwert	1:1	1:10	1:100	1:1000
Probe 1	0	0	0	0	behandelte Proben	0	0	0	0
Probe 2	0	0	0	0					
Probe 3	0	0	0	0					
Probe 4 (Ko)	tntbc	750	83	16	Kontrollen	tntbc	800	95,5	8
Probe 5 (Ko)	tntbc	fehler	fehler	fehler					
Probe 6 (Ko)	tntbc	850	108	12					
					log RF	>4 log-Stufen			

Bei keiner der behandelten Proben zeigte sich Wachstum, somit konnte eine komplette Inaktivierung von *P. aeruginosa* durch Behandlung des Keimes mit hydrostatischem Hochdruck erreicht werden. Es zeigte sich eine statistisch signifikante Reduktion des Wachstums um mehr als 4 log-Stufen im Vergleich zu den nicht behandelten Proben ($p<0,05$, Mann-Whitney-Test).

Die Probe 5 (Kontrolle) zeigte nur in der unverdünnten Reihe Wachstum, die Verdünnungen 1 zu 10 bis 1 zu 1000 blieben steril. Da das Wachstum in der unverdünnten Reihe jedoch identisch zu dem der anderen Kontrollen war (>500 KBE), muss man davon ausgehen, dass es sich um einen Pipettierfehler handelte. Somit wurden die Verdünnungsreihen in den Berechnungen nicht berücksichtigt.

4.2 Behandlung von Osteitis- Knochenstücken mit hydrostatischem Hochdruck

Insgesamt wurden 150 Proben von 34 Patienten aus 50 verschiedenen Operationen gewonnen und anschließend untersucht.

4.2.1 Behandlung mit hydrostatischem Hochdruck ohne vorherige Anreicherung mit einer Druckhaldedauer von 10 Minuten (Methode 1)

Insgesamt wurden 25 Proben von 4 verschiedenen Patienten aus 4 verschiedenen Operationen behandelt.

Tabelle 9:

Behandlung ohne vorherige Anreicherung (Methode 1), Ergebnis insgesamt

Keim vor Behandlung	Druckstufe (MPa)	Anzahl nach Hochdruck (steril/insgesamt)
<i>S. aureus, CNS, E. coli</i>	Kontrolle	3/8
	300	4/6
	450	4/6
	600	4/5

Von den 25 Proben dienten 8 als Kontrolle, 6 wurden mit 300 MPa, 6 mit 450 MPa und 5 mit 600 MPa behandelt.

Nach Hochdruckapplikation zeigte sich eine komplette Sterilisation bei 12 von insgesamt 17 behandelten Proben (71%). Bei 300 MPa konnten 4 von 6 Proben sterilisiert werden, bei 450 MPa 4 von 6 und bei 600 MPa 4 von insgesamt 5 Proben. Die Kontrollen (unbehandelte Knochenstücke) zeigten jedoch auch bei 3 von 8 Proben (38%) kein bakterielles Wachstum. Der Anteil steriler Proben zwischen den Kontrollen (38%) und den Hochdruckbehandelten Proben (71%) unterschied sich zwar nicht statistisch signifikant ($p=0,194$, Mann-Whitney-Test), ein Sterilisationseffekt durch den HHD kann jedoch vermutet werden.

Tabelle 10:

Behandlung ohne vorherige Anreicherung (Methode 1), Ergebnis aufgeteilt nach einzelnen Keimen:

Keim vor Behandlung	Druckstufe (MPa)	Anzahl nach Hochdruck (steril/insgesamt)
<i>S. aureus</i>	Kontrolle	0/2
	300	0/2
	450	0/2
	600	0/2
<i>CNS</i>	Kontrolle	3/5
	300	3/3
	450	3/3
	600	3/3
<i>E.coli</i>	Kontrolle	0/1
	300	1/1
	450	1/1
	600	1/1

Bei *S. aureus* zeigte sich keine Sterilisation nach Hochdruck (0 von 6 Proben sterilisiert), alle Kontrollproben waren positiv.

Bei den *CNS* zeigte sich bei allen Druckstufen eine erfolgreiche Sterilisation (9 von 9 Proben). Es waren jedoch nur 2 von 5 Kontrollproben positiv.

Bei *E. coli* zeigte sich bei sämtlichen Druckstufen eine erfolgreiche Sterilisation (3 von 3 Proben), die Kontrollprobe war positiv.

4.2.2 Behandlung mit hydrostatischem Hochdruck mit vorheriger Anreicherung

4.2.2.1 Druckhaldedauer von 10 Minuten (Methode 2)

Es wurden 71 Proben von 14 Patienten aus 21 verschiedenen Operationen gewonnen und anschließend behandelt. 9 Proben zeigten kein Wachstum und wurden somit vor der Hochdruckbehandlung verworfen.

Tabelle 11:

Behandlung mit vorheriger Anreicherung (Methode 2), Ergebnis der HDD- Sterilisation insgesamt

Keim vor Behandlung	Druckstufe (MPa)	Anzahl nach Hochdruck (steril/insgesamt)
<i>S. aureus</i> , CNS, <i>E. coli</i> , Mischinfektionen	Kontrolle	0/25
	300	0/2
	450	0/7
	600	2/28

Insgesamt konnten 62 Proben von 12 verschiedenen Patienten aus 17 Operationen behandelt werden. 25 Proben dienten als Kontrollproben (keine Behandlung), 2 wurden mit 300 MPa behandelt, 7 mit 450 MPa, 28 mit 600 MPa.

Insgesamt konnten 2/37 Proben sterilisiert werden (5%), alle Kontrollen (25/25) waren positiv.

Weder bei 300 MPa noch bei 450 MPa konnte eine erfolgreiche Sterilisation erreicht werden. Erst bei 600 MPa konnte in 2/28 Fällen (7%) eine Sterilisation erreicht werden. Im Vergleich zu den 0/25 sterilen Kontrollen ist zwar ein Unterschied zu sehen, dieser ist jedoch statistisch nicht signifikant ($p=0,177$, Mann-Whitney-Test).

Eine Aufteilung nach den unterschiedlichen Keimen erscheint auch hier sinnvoll.

Tabelle 12:

Behandlung mit vorheriger Anreicherung (Methode 2), Ergebnisse dargestellt für die einzelnen Keime:

Keim vor Behandlung	Druckstufe (MPa)	Anzahl nach Hochdruck (steril/insgesamt)
<i>S. aureus</i>	Kontrolle	0/16
	300	0/7
	450	1/17
CNS	Kontrolle	0/7
	600	0/6
<i>S. aureus</i> + CNS	Kontrolle	0/1
	600	0/3
<i>E. coli</i>	Kontrolle	0/1
	300	0/2
	600	1/2

4.2.2.2 Repetitive Hochdruckbehandlung: 30 Minuten Druckhaltezeit, dann 30 Minuten Pause und dann wieder 30 Minuten Druckhaltezeit (Methode 3)

Insgesamt wurden 54 Proben bei 16 Patienten in 25 Operationen gewonnen. 28 Proben zeigten kein Wachstum und wurden vor der Behandlung verworfen.

Tabelle 13:

HHD-Behandlung mit vorheriger Anreicherung (Methode 3), Ergebnis insgesamt

Keim vor Behandlung	Druckstufe (MPa)	Anzahl nach Hochdruck (steril/insgesamt)
<i>S. aureus</i> , <i>CNS</i> , <i>Enterokokken</i> , <i>Mischinfektionen</i>	Kontrolle	0/8
	600	2/18

So konnten 26 Proben von 13 verschiedenen Patienten aus 15 Operationen behandelt werden. 8 Proben dienten als Kontrolle.

Es zeigte sich bei 2 von 18 Proben eine erfolgreiche Sterilisation (11 %), alle Kontrollproben waren positiv (8/8) ($p=0,336$, Mann-Whitney-Test, statistisch nicht signifikant).

Tabelle 14:

Behandlung mit vorheriger Anreicherung (Methode 3), Ergebnisse dargestellt für die einzelnen Keime:

Keim vor Behandlung	Druckstufe (MPa)	Anzahl nach Hochdruck (steril/insgesamt)
<i>S. aureus</i>	Kontrolle	0/3
	600	1/8
<i>CNS</i>	Kontrolle	0/3
	600	1/5
<i>S. aureus</i> + <i>CNS</i>	600	0/1
<i>Enterokokken</i>	Kontrolle	0/1
	600	0/2
<i>S. aureus</i> + <i>Enterokokken</i>	Kontrolle	0/1
	600	0/2

Die Hochdruckbehandlung von *S. aureus* zeigte bei 1 von 8 Proben eine erfolgreiche Sterilisation. Alle Kontrolleproben (3/3) waren positiv.

Bei der Behandlung von den CNS konnte bei 1 von 5 Proben eine Sterilisation erreicht werden, alle Kontrollproben (3/3) waren positiv.

Bei der Behandlung von den Enterokokken, den Proben mit einer Mischinfektion *S. aureus* + Enterokokken, sowie *S. aureus* + CNS zeigte sich in keinem Fall ein Sterilisationserfolg. Alle Kontrollproben waren positiv.

Bei einer Druckstufe von 600 MPa und einer Haltedauer von 10 Minuten konnten 2/28 Proben sterilisiert werden (7%), bei einer Haltedauer von 2x 30 Minuten 2/18 (11%), somit kein statistisch signifikanter Unterschied bei einer Erhöhung der Druckhaltezeit ($p= 0,628$, Mann-Whitney-Test).

4.3 Morphologische Darstellung der hochdruckbehandelten Bakterien mittels REM

***S. aureus* ATCC 25923:**

Die unbehandelten Kontrolleproben von *S. aureus* zeigten eine typische kokkenförmige Morphologie mit glatter, intakter Membran, traubenförmig gruppiert. Die Bakterien waren auf der Oberfläche und in der Mikrostruktur des Knochens verteilt.

Bei den HHD behandelten Proben (600 MPa) zeigte sich weiterhin eine traubenförmige Form, nur vereinzelt Keime erschienen in Ihrer Form entrundet. An den meisten Keimen waren jedoch keine Veränderungen erkennbar (siehe Abbildung 11).

***S. epidermidis* ATCC 35984:**

Die unbehandelten *S. epidermidis* Proben zeigten die für sie typische Kokkenform, mit intakter runder und glatter Membran.

Die behandelten Proben zeigten insgesamt alle eine intakte Membran, nur sehr vereinzelt zeigten sich geringe Deformierungen der Oberfläche. Diese Veränderungen traten in der gesamten Zellpopulation nur sporadisch auf, insgesamt also kaum morphologische Veränderungen, welche bei der gegebenen REM-Auflösung aufgezeigt werden konnten (siehe Abbildung 12).

***P. aeruginosa* ATCC 27853:**

Die unbehandelten Proben zeigten *P. aeruginosa* stäbchenförmig mit intakter, glatter Membran. Mittels REM erkannte man die Mikrostruktur des Knochens mit aufgelagerten und in die Struktur vorgedrungenen Bakterien.

Bei den behandelten Proben von *P. aeruginosa* zeigte sich zunächst auf den Übersichtsaufnahmen eine erhebliche Reduktion der Keimzahl bei den HHD- behandelten Proben (siehe Abbildung 13). Ferner konnte man deutliche Veränderungen der Zellmorphologie beobachten. So erschienen die Zellen komplett verformt mit großen Löchern und Einziehungen in den rissigen Membranen. Ferner zeigte sich eine geringe Bläschenbildung auf der Oberfläche der Bakterien. Diese morphologischen Veränderungen waren bei der gesamten Zellpopulation zu beobachten (siehe Abbildung 14).

***E. faecium* ATCC 6057:**

Die unbehandelten Proben von *E. faecium* zeigten eine runde, intakte Membran mit ihrer typischen Kokkenform.

Bei den behandelten Proben zeigten sich fast alle Keime identisch zu den Kontrollen. Nur sehr vereinzelt (exemplarisch auf der Vergrößerung 15.000x) zeigte sich eine entrundete Membran mit kleinen Löchern. Die morphologischen Veränderungen waren jedoch deutlich geringer ausgeprägt und seltener als bei den Proben vom *P. aeruginosa* (siehe Abbildung 15).

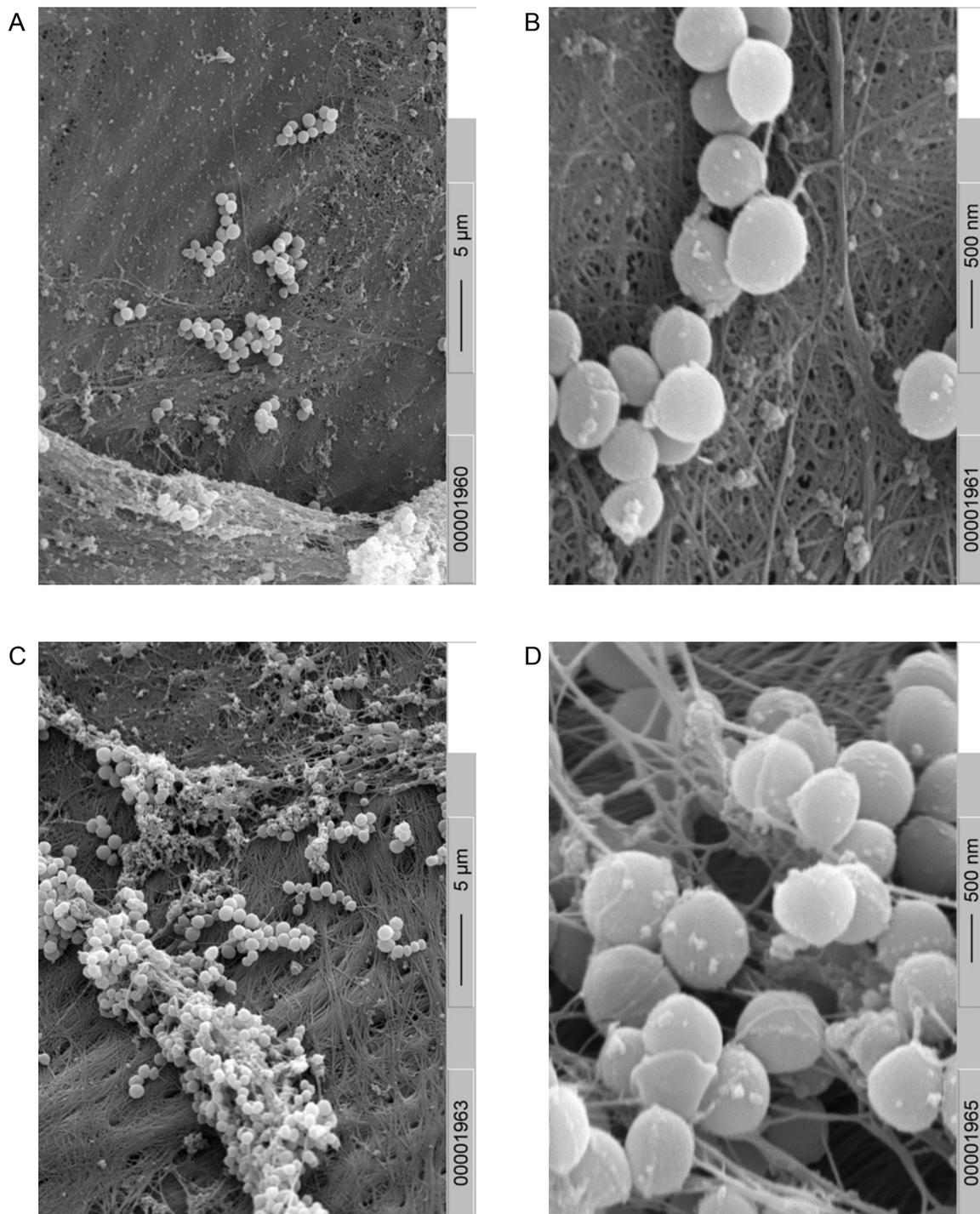


Abbildung 11:

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *S. aureus* im Knochen (A) Kontrolle, 3.000x, (B) Kontrolle, 20.000x, (C) nach HHD- Behandlung (600 MPa), 3.000x, (D) nach HHD- Behandlung (600 MPa), 20.000x. Die Struktur der Keime nach HHD- Behandlung praktisch identisch zu den Kontrollen

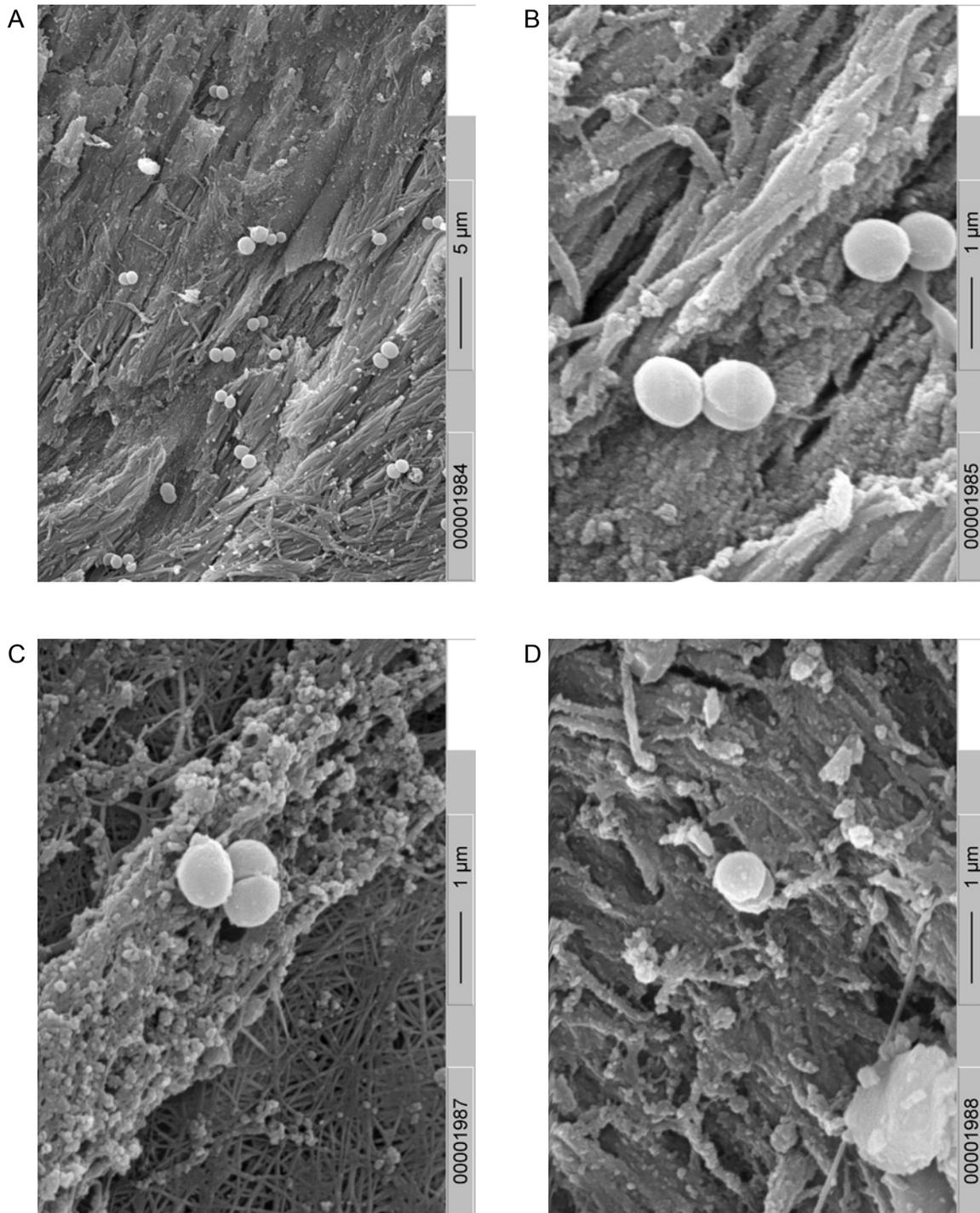
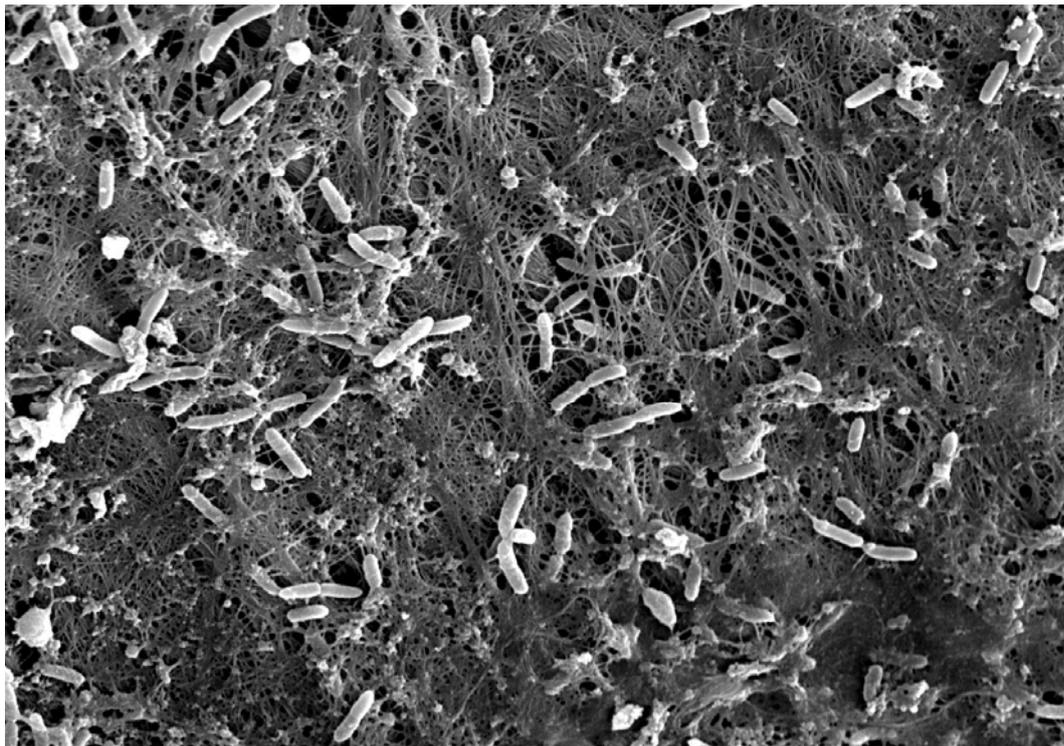


Abbildung 12:

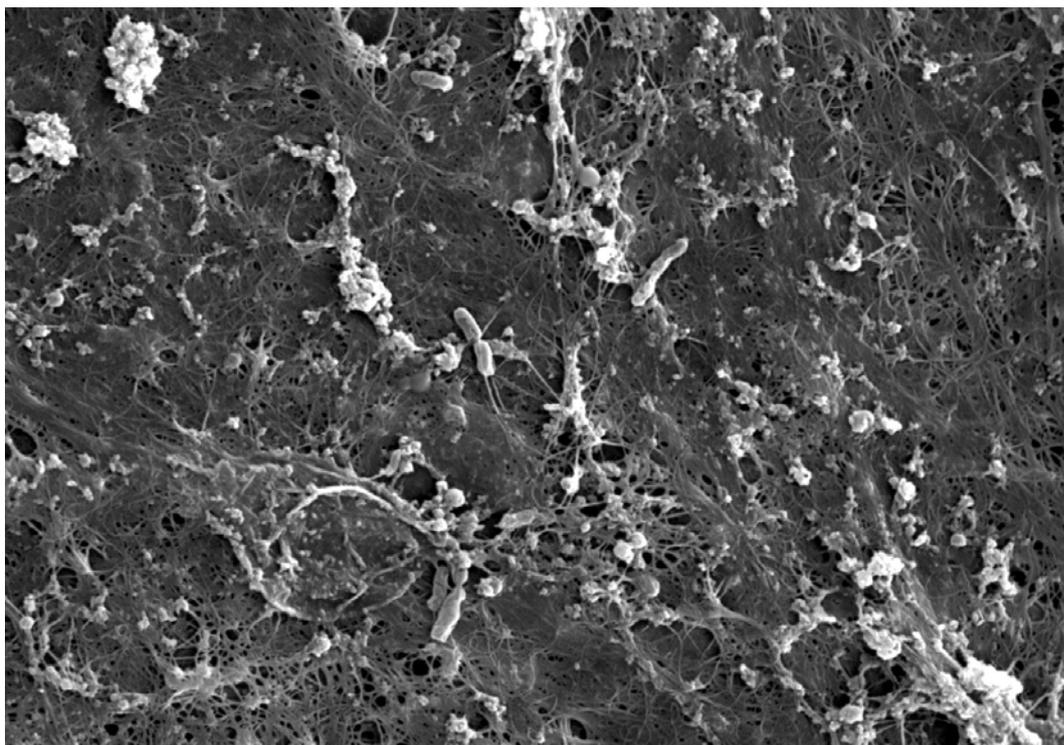
Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *S. epidermidis* im Knochen (A) Kontrolle, 3.000x, (B) Kontrolle, 15.000x, (C) nach HHD- Behandlung (600 MPa), 15.000x, (D) nach HHD- Behandlung (600 MPa), 15.000x. Wie beim *S. aureus* ist die Struktur der HHD- behandelten Keime identisch zu den Kontrollen.



00001967

5 μm

A



00001974

3 μm

B

Abbildung 13:

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *P. aeruginosa* im Knochen, Übersichtsaufnahmen: (A) Kontrolle, 3.000x, (B) nach HHD- Behandlung (600 MPa), 4.000x. Auf diesen Übersichtsvergrößerungen sieht man eine deutliche Reduktion der Anzahl der Keime nach HHD- Behandlung

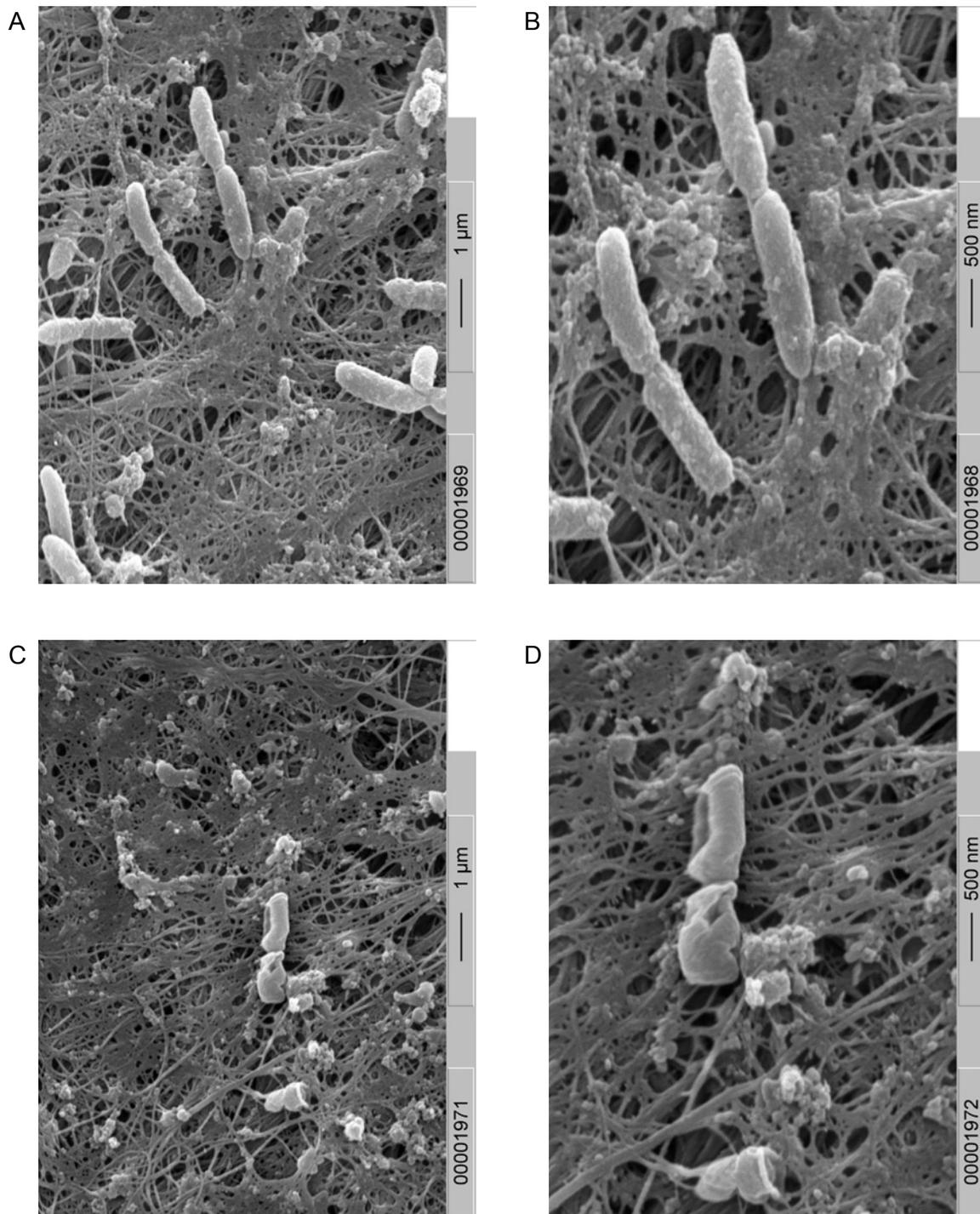


Abbildung 14:

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *P. aeruginosa* im Knochen (A) Kontrolle, 10.000x, (B) Kontrolle, 20.000x, (C) nach HHD- Behandlung (600 MPa), 10.000x, (D) nach HHD- Behandlung (600 MPa), 20.000x. Die HHD- behandelten Bakterien sind komplett deformiert mit großen Löchern und Einziehungen in den rissigen Membranen mit Bläschenbildung.

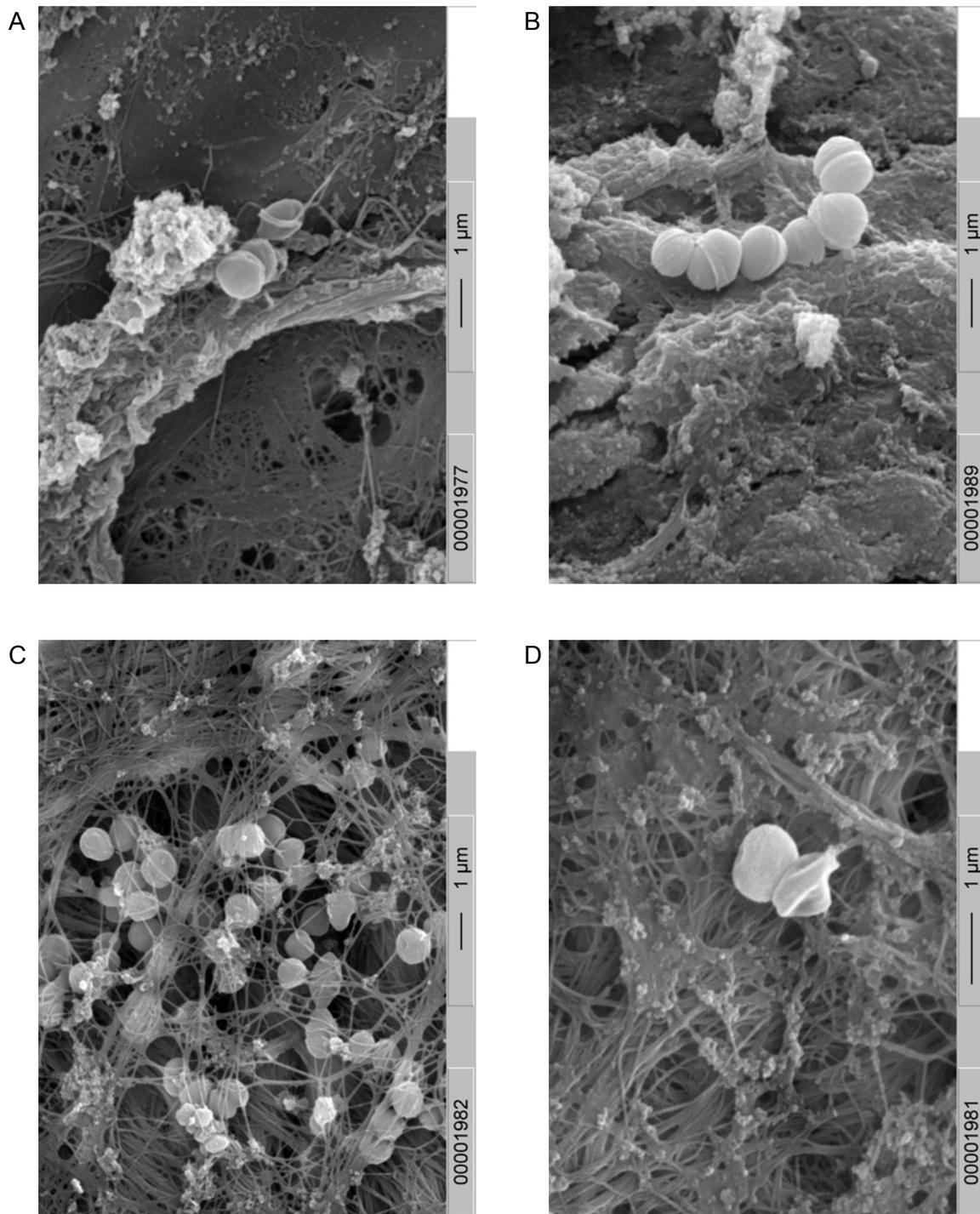


Abbildung 15:

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *E. faecium* im Knochen (A) Kontrolle, 10.000x, (B) Kontrolle, 10.000x, (C) nach HHD- Behandlung (600 MPa), 7.500x, (D) nach HHD- Behandlung (600 MPa), 15.000x. Die HHD- behandelten Keime zeigten sich bis auf vereinzelte Ausnahmen völlig unverändert zu den Kontrollkeimen.

5 DISKUSSION

5.1 Problem des Knochendefektes und der Sterilisation der Allografts

Zur Rekonstruktion von Knochendefekten sind derzeit unterschiedliche Verfahren etabliert: Mechanische Endoprothesen, die Distraktionsosteosynthese, alloplastischer, allogener oder autogener Knochenersatz.

Die Versorgung mit allogenem Knochen zeigt teilweise gute biologische Ergebnisse. So entfaltet der allogene Knochen nach heutigem Verständnis seine defektauffüllende Wirkung vor allem über einen osteokonduktiven Effekt [Rüger J.M. et al.: 2004, 166-182] (S 168). Theoretisch reicht die Menge an allogenem Knochen, der bei der Resektionen von Femurköpfen während der Implantation von Hüft-Totalendoprothesen gewonnen wird aus, um den Bedarf zu decken. Eine verheerende Komplikation der allogenen Knochen transplantation ist jedoch die Infektion. Die in der Literatur angegebenen Infektionsraten nach Transplantation von allogenem, kryokonserviertem Knochen schwanken zwischen 4-13%, wobei die Inzidenz mit der Größe der Allografts steigt [Regel et al.: 1992, 1-8] (S 6), [Sudkamp et al.: 1993, 169-177] (S 175), [Lord et al.: 1988, 369-376] (S 369), [Dick et al.: 1994, 46-53] (S 46) [Norman-Taylor et al.: 1997, 178-180] (S 178).

Die Inkorporation des Transplantates ist zwar durch Osteokonduktion möglich, jedoch langwierig und stellt somit einen weiteren Risikofaktor für eine Infektion wie auch für eine Fraktur dar. So werden die Allografts häufig mit Osteosynthesen fixiert, welche wiederum das Infektionsrisiko durch die Fremdkörperwirkung erhöhen. Trotzdem geht man davon aus, dass die Keimbefestigung des Transplantates den wichtigsten Risikofaktor für die Infektion darstellt, weshalb Sterilisationsmethoden gefordert werden, die das Risiko der Infektionsübertragung verhindern, ohne die biologische und biomechanische Qualität des Transplantates zu kompromittieren [Kainer et al.: 2004, 2564-2571] (S 2564).

Zwei prinzipielle Strategien liegen aktuell der Infektionsprophylaxe zugrunde:

Eine erste Strategie besteht in der Einführung strenger Richtlinien zum Gewinnen und Halten von allogenem Knochen. Diese beinhalten unter anderem eine gründliche Anamnese des potenziellen Spenders mit strengen Ausschlusskriterien, sowie laborchemische Untersuchungen auf HBV, HCV, HIV und schließlich bakteriologische Untersuchungen des Explantats [Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer: 2001, A1011-A1016] (S A 1012- A 1015). Jedoch führt dies dazu, dass mehr als 50% der potenziellen Spender

ausgeschlossen werden. [Norman-Taylor et al.: 1997, 498] (S 498). Auch wenn theoretisch ausreichend Knochen vorhanden wäre um den Bedarf zu decken kommt es insbesondere in Großbritannien durch den Ausschluss potentieller Spender zu einem Engpass in der Versorgung mit allogenen Knochen [Galea et al.: 1998, 595-599; Wilson et al.: 2002, 49-53] (S 595/49). Man darf hierbei nicht außer Acht lassen, dass Knochen nach dem Blut das zweithäufigste Transplantat ist [Warwick et al.: 1996, 71-77] (S 72).

Die zweite Strategie dem Problem der Infektion sowie auch dem Mangel an allogenen Knochen entgegen zu wirken ist die Sterilisation von Knochen. Alle bisher etablierten Verfahren (Autoklavierung, Gamma- Bestrahlung, Äthylendioxid, Thermodesinfektion, Pasteurisation) sind jedoch mit deutlichen Limitationen behaftet. Bei einem Teil der Verfahren ist die Sterilisation zwar gegeben, jedoch mit einer erheblichen Verschlechterung der mechanischen Belastbarkeit des Fremdknochens (Autoklavierung) und/oder mit einer Kompromittierung des biologischen Verhaltens am Transplantationsort durch Denaturierung der osteoinduktiven Faktoren (Gamma- Bestrahlung) verbunden. Bei dem anderen Teil der Bearbeitungsmethoden werden die biologischen und mechanischen Eigenschaften des allogenen Knochens weitgehend erhalten, aber es bleiben erhebliche Sicherheitslücken hinsichtlich einer Infektion nach Transplantation (Thermodesinfektion, Pasteurisation).

So hat man einerseits das Risiko der Infektübertragung mit allogenen Knochen- trans- plantaten - andererseits entsteht beim Bestreben, alle Infektionen zu verhindern ein Engpass von Fremdknochen. In der Tumorchirurgie gibt es erste Bestrebungen diesem Problem mit einer anderen Methode zu entgegnen: der extrakorporalen Tumordevitalisierung.

5.2 Extrakorporale Tumordevitalisierung

Eine autologe Knochen- trans- plantation bei Patienten mit Knochentumoren, also die Resektion des tumorbehafteten Knochen- segmentes mit anschließender extrakorporaler Devitalisierung der Tumorzellen und orthotoper Reimplantation, bietet den Vorteil der fehlenden zusätzlichen Entnahmemorbidität, der meistens sehr guten anatomischen Passgenauigkeit und des Verzichts auf Fremdmaterial. Entscheidend für die Einheilung des Transplantats sind, neben der vollständigen Abtötung maligner Tumorzellen, die biomechanischen und biologischen Veränderungen infolge des gewählten Sterilisations- bzw. Inaktivierungsverfahrens.

Bisher wurden klinisch oder experimentell zur extrakorporalen Tumordevitalisierung von Knochen thermische und radioaktive Verfahren untersucht. Beide Techniken bieten den Vorteil der einzeitigen Reimplantation des autologen Knochen- segmentes, wirken sich aber negativ auf die biologischen und biomechanischen Eigenschaften des Knochens aus.

Die Technik des Autoklavierens (siehe weiter oben) wurde auch zur Behandlung eines resezierten tumorbehafteten Knochensegmentes angewendet, konnte sich aber aufgrund zahlreicher negativer Veränderungen der Knocheneigenschaften nicht durchsetzen [Bohm et al.: 1998, 57-65] (S 61). So werden der Knorpel zerstört, die biologischen und biomechanischen Eigenschaften des Knochens verschlechtert [Bohm et al.: 2003, 355-365] (S 356). Die klinischen Ergebnisse waren nur teilweise zufrieden stellend [Bohm et al.: 1998, 57-65] (S 61). Diese Methode wird nur benutzt, wenn Alternativen wie Tumorprothesen oder ausreichend allogener Knochen hauptsächlich aus Kostengründen fehlen [Asada et al.: 1997, 392-395; Sanjay et al.: 1997, 291-297] (S 392/291).

Ionisierende Strahlung wird seit einigen Jahren vereinzelt zur Behandlung von tumorbehaftetem Knochen eingesetzt [Bohm et al.: 2003, 355-365] (S 356). Die ersten klinischen Ergebnisse sind zufriedenstellend. Es bleibt jedoch abzuwarten, wie sich die Qualität des Knochens verhält, wenn man die bekannten Daten über die Zerstörung der biomechanischen Eigenschaften, sowie die Entstehung von mutagenen Radikalen durch Bestrahlung berücksichtigt (siehe weiter oben).

Es ist durchaus denkbar ein ähnliches Verfahren bei der Behandlung der chronischen Osteitis zu übernehmen, bei welcher die chirurgischen Behandlungsprinzipien der Tumorchirurgie durchaus ähneln. Hierbei könnte man auch den infizierten Knochen explantieren, makroskopisch infizierte Knochenteile débridieren und anschließend Mikroorganismen mit einer sterilisierenden Behandlung inaktivieren. Die Defektrekonstruktion erfolgt durch die orthotope Reimplantation des genau passenden autologen Segmentes. Es würde sich hierbei also um eine autogene Knochentransplantation mit extrakorporaler Sterilisation handeln.

Ein alternatives Sterilisationsverfahren, das sicher ist und die biomechanischen Eigenschaften des Knochens nicht gefährdet, fehlt bisher und wäre wünschenswert. Hydrostatischer Hochdruck könnte hier aufgrund viel versprechender Ergebnisse experimenteller Untersuchungen ein alternatives Verfahren zur Sterilisation darstellen.

5.3 Einführung des Hydrostatischen Hochdrucks als neue Methode in die Medizin

Bereits vor 100 Jahren wurden erste Beobachtungen über den Effekt des hydrostatischen Hochdrucks auf biologische Materialien durchgeführt [Hite: 1899, 15-35], nach [Hoover: 1993, 150-155] (S 150). Die Technik des hydrostatischen Hochdrucks erlebte ihren weiteren Durchbruch in der Haltbarmachung von Lebensmitteln, und insbesondere in Japan wird die

Methode bereits kommerziell seit 1992 eingesetzt [Hayashi Rikimaru: 1996, 1-6] (S 1). Gegenüber der herkömmlichen thermischen Behandlung zur Haltbarmachung von Lebensmitteln (Pasteurisierung) sowie chemischen oder radioaktiven Sterilisierungsverfahren bietet die Hochdrucktechnologie, die auch kalte Sterilisation bzw. Pascalisation genannt wird, den Vorteil, dass sie ein wesentlich schonenderes Verfahren zur Lebensmittelkonservierung und Inaktivierung von Mikroorganismen darstellt. Da der Druck in den wirksamen Bereichen im Gegensatz zum Autoklavieren oder der Bestrahlung nur wenig Einfluss auf kovalente Bindungen hat, werden Farb- und Aromastoffe, Geschmackrichtungen, pharmakologisch aktive Moleküle sowie verschiedene Vitamine nicht zerstört [Masson et al.: 2001, 85-88] (S 85).

5.3.1 Einfluss des Hochdrucks auf physikalische und chemische Vorgänge

Die Wirkung des Hochdrucks wird durch zwei Prinzipien erklärt:

- (1) nach Le Châtelier, wonach jeder Vorgang (chemische Reaktionen, Phasenübergänge, Änderung der molekularen Konfiguration), der mit einer Volumenabnahme vergesellschaftet ist, durch Druck beschleunigt wird (und umgekehrt)
- (2) nach dem isostatischen Prinzip, wonach der Druck vollständig und quasi augenblicklich gleichmäßig durch das ganze biologische System verteilt wird (wobei dieses entweder in direktem Kontakt mit dem Übertragungsmedium steht oder von diesem durch eine hermetisch abschließende und flexible, den Druck weiterleitende Umhüllung getrennt sein muss) [Arroyo et al.: 1997, 735-742] (S 735).

Es gilt als bewiesen, dass Druck die Zellvermehrung unterdrückt und sogar zum Zelltod führen kann. Viele zelluläre Vorgänge werden durch den Druck und seinen Einfluss auf das Volumen verändert. Dabei beeinflusst der Druck eine Kombination von Prozessen und zerstört nicht nur eine spezifische Zellfunktion [Hoover et al.: 1989, 99-107] (S 100).

Chemische Reaktionen, die mit einer Volumenabnahme vergesellschaftet sind, werden durch den Druck beschleunigt, Reaktionen mit Volumenzunahme abgebremst, wie nach dem Prinzip von Le Châtelier erklärt. Die meisten chemischen Vorgänge werden von einer Volumenänderung begleitet. Hydrophile Bindungen sind beispielsweise von einer Volumenabnahme begleitet und entstehen so vermehrt bei erhöhtem Druck [Suzuki K et al.: 1972, 103-124] (S 108). Die Entstehung von hydrophoben Bindungen ergibt bei Drücken unter 1000 bar eine Volumenzunahme. Somit werden sie bei diesen Druckstufen aufgelöst. Bei

Drücken über 1000 bar ergeben sie eine Volumenabnahme. Somit werden sie bei derart hohen Druckstufen stabilisiert [Suzuki K et al.: 1972, 103-124] (S 108,121). Kovalente Bindungen werden vom Hochdruck nicht wesentlich beeinflusst, weil sie weniger komprimierbar sind [Cheftel JC et al.: 1997, 211-236] (S 213-4).

Inaktivierende Effekte von Hochdruck auf Mikroorganismen sind auch durch die Inaktivierung wichtiger Enzyme bedingt. So kommt es zu einer reversiblen Denaturierung verschiedener Enzyme zwischen 1000 und 3000 bar und zu einer irreversiblen Denaturierung über 3000 bar [Jaenicke: 1981, 1-67] (S 50). Jedoch gibt es hier sehr unterschiedliche Effekte auf verschiedene Enzyme in der gleichen Zelle. Diese sind noch nicht endgültig erforscht [Hoover et al.: 1989, 99-107; Hoover: 1993, 150-155] (S 153/102).

Weiterhin kommt es durch die Einwirkung des Drucks zu einer Zerstörung der sekundären und tertiären Struktur von Makromolekülen, die so zu einer veränderten strukturellen und funktionellen Integrität der Proteine und Polysaccharide führt [Kalchayanand et al.: 1998, 207-214] (S 207). In diesem Zusammenhang sei die Entfaltung, Aggregation und Gelation von Proteinen genannt [Cheftel JC et al.: 1997, 211-236] (S 214). Die Primärstruktur der Proteine, die durch kovalente Bindungen gehalten ist, wird durch den Hochdruck nicht angegriffen.

Bei Triglyzeriden bewirkt steigender Druck einen reversiblen Anstieg der Schmelztemperatur [Cheftel JC et al.: 1997, 211-236] (S 213).

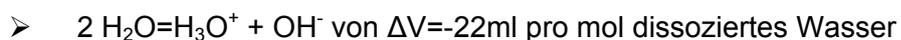
Nukleinsäuren zeigen sich sehr viel barotoleranter als Proteine [Suzuki et al.: 1972, 1087-1091] (S 1087), weil sie einerseits durch hydrophile Bindungen zusammengehalten werden und diese bekanntlich durch den Druck stabilisiert werden. Andererseits wirken kovalente Bindungen, die druckresistent sind. Die enzym-gebundene Replikation der DNA wird aber durch den Hochdruck beeinträchtigt, ebenso auch die Translation und Transkription [Hoover et al.: 1989, 99-107] (S 102).

Allgemein geht man davon aus, dass der wichtigste Ort der druckinduzierten Schäden bei Mikroorganismen Membransysteme wie die Zellmembran sind [Hoover et al.: 1989, 99-107; Perrier-Cornet et al.: 1999, 1-7] (S 103/7). So konnte in Experimenten an Hefezellen gezeigt werden, dass der Druck nicht nur zu einer Kompression mit Volumenverlust von bis zu 35% der Zelle führt, sondern auch zu einem Transfer von Masse aus der Zelle heraus. Dies wurde bestätigt durch das Entweichen von Ionen und intrazellulärem Glycerol aus den Hefezellen. Dieses Phänomen beruht wahrscheinlich auf einer Permeabilitätssteigerung der

Zellmembran [Perrier-Cornet et al.: 1999, 1-7] (S 7), wobei diese wohl nicht Folge des Zelltods ist, sondern eher durch einen direkten Druckschaden an der Zellmembran bedingt ist [Perrier-Cornet et al.: 1999, 1-7] (S 6). Hauben et al. beobachteten einen Austritt von periplasmatischer beta-Lactamase bei einem ampicillinresistenten Stamm von *E. coli* unter Hochdruck und folgerten daraus, Hochdruck steigere vorübergehend die Permeabilität der äußeren Membran und somit die Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Stoffen wie Lysozym, Nisin und EDTA. Tatsächlich wurde die Wirksamkeit dieser toxischen Produkte auf die Zelle erhöht. Dies könnte ein interessanter Ansatz sein um die Effektivität der Hochdruckbehandlung zu steigern [Hauben et al.: 1996, 350-355] (S 350,354). Shigehisha et al. beobachteten eine Permeabilisierung von Bakterienzellen unter Druck und den Austritt zytoplasmatischer RNA [Shigehisa et al.: 1991, 207-215] (S 207). Anzeichen für Membranschäden entdeckten auch Benito et al., die eine vermehrte Anfärbbarkeit druckbehandelter Zellen von *E. coli* mit fluoreszierenden Farbstoffen beobachteten [Benito et al.: 1999, 1564-1569] (S 1566). Tsuchido et al. sehen einen Einfluss einer veränderten Membranfluidität im Absterbeprozess unter Hochdruckeinwirkung. Der Einfluss des Hochdrucks auf die Membranfluidität ist hierbei ähnlich wie der von Hitze, der bereits in früheren Untersuchungen aufgezeigt wurde [Tsuchido T et al.: 1996, 185-188] (S 185).

Shimada et al. beobachteten mittels Elektronenmikroskopie zuerst Veränderungen an der Kernmembran, dann an anderen Organellen wie Mitochondrien, Endoplasmatischem Retikulum und Vakuolen [Shimada S et al.: 1993, 123-131] (S.123,126). Außerdem stellten sie – ähnlich Perrier-Cornet et al. [Perrier-Cornet et al.: 1999, 1-7] (S 1) – ein Austreten von Aminosäuren, Peptiden und Metallionen aus der unter Druckeinwirkung stehenden Zelle fest [Shimada S et al.: 1993, 123-131] (S 123).

Beträchtliche Auswirkungen durch Hochdruck im Bereich von 100 bis 1000 MPa ergeben sich auch für die physikochemischen Eigenschaften des Wassers wie die Dichte, die ionische Dissoziation (und den pH-Wert) und den Schmelzpunktes von Eis. Diese sind jedoch reversibel. So führt die adiabatische Kompression von Wasser zu einer Temperaturerhöhung von zwei bis drei Grad Celsius pro 100 MPa. In der Praxis werden Temperaturveränderungen jedoch in der Regel durch Wärmeaustausch mit der Umgebung kompensiert [Chefftel JC et al.: 1997, 211-236] (S 213). Der pH-Wert fällt um 0,2-0,5 Einheiten pro 100 MPa. Dies ist bedingt durch die Volumenminderung der Reaktion:



[Chefftel JC et al.: 1997, 211-236] (S 213), eine Reaktion die unter Hochdruck wegen der Volumenreduktion vermehrt abläuft. Druck beeinflusst auch die Phasenübergänge des Wassers: bei 210 MPa bleibt Wasser bis zu $-22 \text{ }^\circ\text{C}$ flüssig. Der Grund dafür ist, dass Druck dem Volumenanstieg bei der Eiskristallbildung entgegenwirkt. Dies ermöglicht z.B.

Anwendungen wie das Auftauen bei Temperaturen von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Druck oder das Aufbewahren von biologischen Proben in diesem Temperaturbereich ohne Gefrieren [Cheftel JC et al.: 1997, 211-236] (S 213).

Unbestritten ist der antibakterielle Effekt des Hochdrucks, welcher in der Lebensmitteltechnik bereits eine breite Anwendung findet und auch in der Medizin Indikationen haben könnte [Hayashi Rikimaru: 1996, 1-6] (S 4,5).

5.3.2 Inaktivierung von Bakterien durch hydrostatischen Hochdruck

Die Grundlagen der bakteriellen Inaktivierung durch HHD wurden bereits in der Einleitung abgehandelt. Zusammenfassend kann man sagen, dass Zellsuspensionen der folgenden Mikroorganismen bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 10 Minuten Einwirkdauer des Hochdrucks bei den genannten Druckstufen abgetötet werden: Hefen bei Drücken von 300 MPa, gramnegative Bakterien und Schimmelpilze bei 350 MPa, für grampositive Bakterien sind Drücke bis 600 MPa und mehr notwendig [Alpas et al.: 1999, 4248-4251; Arroyo et al.: 1997, 735-742; Shigehisa et al.: 1991, 207-215] (S 4248/S 735/S 207). Die Inaktivierung der Keime kann jedoch durch Veränderung verschiedener Umgebungsparameter wie zum Beispiel der Temperatur, deren Einfluss sehr komplex ist (Steigerung der Inaktivierung in der Regel bei Temperaturen $>37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $<4\text{ }^{\circ}\text{C}$), der Druckhaldedauer [Ludwig H et al.: 1994, 193-197] (S 194-5), sowie des Umgebungsmediums verbessert werden [Mackey BM et al.: 1995, 1-11] (S 1). Auf den genauen Einfluss dieser Parameter wird weiter unten eingegangen.

Reduktionen der Keimzahl durch HHD um 8-11 log-Stufen wurden beschrieben [Kalchayanand et al.: 1998, 207-214; Ludwig H et al.: 1994, 193-197] (S 210/194) Insgesamt handelt es sich bei HHD also um ein sehr effektives Verfahren. Dennoch wurden auch für hohe Druckstufen von barotoleranten Bakterien berichtet, so wurde eine Druckresistenz bis zu 1600 MPa bei verschiedenen sehr spezialisierten Bakterien (in der Tiefsee) beobachtet [Sharma et al.: 2002, 1514-1516] (S 1514).

5.3.3 Biomechanische Eigenschaften vom Knochen unter HHD – Ergebnisse mit Tumorzellen

Seit über 5 Jahren gibt es an der Technischen Universität München (Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie, Lehrstuhl für Energie- und Umwelttechnik der Lebensmittelindustrie) Untersuchungen mit dem Ziel, die hydrostatische Hochdrucktechnologie in die Medizin

einzuführen, insbesondere in die Orthopädie [Diehl et al.: 2001, 121; Diehl et al.: 2003, 1851-1855; Meyer-Pittroff: 2003, 295-305].(S 121/1851/295).

In einem ersten Schritt wurde die mechanische Stabilität des Knochens nach Hochdruckbehandlung bestimmt. Hierzu wurden aus paarigen humanen Femora Knochenzylinder gewonnen (jeweils eine zu untersuchende Probe und eine Kontrolle) und hochdruckbehandelt. Anschließend wurden das E- Modul, die Bruchlast und die Bruchdehnung geprüft, sowie der Druck- und 4-Punkt- Biegeversuch durchgeführt. Nach Hochdruckbehandlung von spongiösen Zylindern mit 300 MPa und 600 MPa ergab sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ebenfalls kein signifikanter Unterschied bestand bei den kortikalen Segmenten nach Behandlung mit 300 MPa, mit 600 MPa kam es zu einem signifikanten Abfall des E- Moduls um 15 %. So folgerte man, dass die Hochdruckbehandlung im untersuchten Druckbereich nicht zu einer entscheidenden mechanischen Schwächung des Knochens führt [Diehl et al.: 2001, 121; Steinhauser et al.: 2006, 130-135] (S 121/130). Sehnen zeigten bei 200 und 400 MPa keine signifikanten Veränderungen [Diehl et al.: 2006].

Später wurde das Verhalten von verschiedenen osteoinduktiven Proteinen unter Hochdruck untersucht. So zeigten Fibronectin, Vitronectin sowie Kollagen Typ- I in vitro keinen Abfall Ihrer Aktivität, sondern einen leichten Anstieg [Diehl et al.: 2006, 285-289] (S 285). Dies steht im Gegensatz zu anderen Verfahren wie dem Autoklavieren oder der Bestrahlung, wo es zu einem Abfall der Osteoinduktion sowie der biomechanischen Stabilität des Knochens kommt. Hier könnte ein entscheidender klinischer Vorteil bei der (Re)Integration des behandelten Knochens liegen [Knaepler H et al.: 1994, B-798-B-802; Knaepler H et al.: 1994, 1-101; Kohler et al.: 1986, 141-145] (S B-800/84/142-3).

Ferner zeigte sich, dass hydrostatischer Hochdruck in vitro zu einem Abtöten von Tumorzellen ab einer Druckstufe von 350 MPa führte, die sich dabei leicht druckresistenter zeigten als nicht entartete eukaryote Zellen [Diehl et al.: 2003, 1851-1855] (S 1851).

Der hochdruckbehandelte Knochen besitzt also viele Eigenschaften, die es ermöglichen ihn als Reimplantat (autogen oder allogene) zu benutzen. Er muss dazu jedoch keimfrei sein, insbesondere bei Osteomyelitispatienten.

5.4 Diskussion der vorliegenden Ergebnisse

5.4.1 Voruntersuchungen von Referenzkeimen in Suspension

Zunächst wurde das Verfahren an Referenzkeimen der häufigsten Erreger von Osteitis, Osteomyelitis und periprotetischer Osteitis in Suspension untersucht.

P.aeruginosa (ATCC 27853) zeigte nach Hochdruckbehandlung mit 600 MPa in unseren Versuchen kein Wachstum mehr (>4 log- Stufen Reduktion des Wachstums, statistisch signifikant). In mehreren anderen Untersuchungen zeigten sich ähnliche Ergebnisse, so werden gramnegative Keime sogar bei geringeren Drücken als die in dieser Arbeit applizierten abgetötet [Alpas et al.: 1999, 4248-4251; Arroyo et al.: 1997, 735-742; Ludwig H et al.: 1994, 193-197; Shigehisa et al.: 1991, 207-215] (S 4250/740/194/ 213).

S. aureus (ATCC 25923) als grampositives Bakterium zeigte ebenfalls eine statistisch signifikante Reduktion des Wachstums um ~1,5 log Stufen nach Behandlung mit 600 MPa. Es zeigte sich also eine Inaktivierung von einem Großteil der Keime, jedoch keine komplette Abtötung oder Sterilisation. Allgemein werden in der Literatur höhere Inaktivierungsraten beschrieben als in unseren Ergebnissen. So wurde bei den Experimenten von Shigesia et al. *S. aureus* bei 600 MPa abgetötet (Reduktion > 5 log- Stufen), jedoch unterhalb dieser Druckstufe nicht [Shigehisa et al.: 1996, 273-278] (S 273). Ludwig et al. zeigten auch eine höhere Inaktivierungsrate als in unserer Studie, aber auch ihre Experimente führten nicht zu einer kompletten Inaktivierung des Keimes. Die Autoren sahen bereits voraus, dass die Inaktivierung von Staphylokokken kompliziert ist [Ludwig H et al.: 1994, 193-197] (S 194). Ferner berichtete Ludwig, dass Drücke unter 350 MPa absolut ineffektiv sind und solche von mehr als 500 MPa notwendig sind um *S. aureus* abzutöten, ohne sich hierbei auf eine endgültige Zahl festzulegen [Ludwig H: 2002, 259-265] (S 261). Andere Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe, die auch über eine komplette Abtötung von *S. aureus* berichteten hatten das Wachstum nur für 24 Stunden beobachtet [Gollwitzer et al.: 2006,].

In den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich ebenfalls nach 24 Stunden kein Wachstum hochdruckbehandelter Proben von *S. aureus* im Gegensatz zu den nicht behandelten Kontrollen, also ähnlich wie bei den anderen Untersuchungen. Erst nach 48 Stunden zeigte sich auch bei den behandelten Proben bakterielles Wachstum. Diese Beobachtungen unterstützen die Ergebnisse anderer Autoren, die eine „injury recovery“ bei den Bakterien nach Hochdruckbehandlung beschreiben [Bozoglu et al.: 2004, 243-247] (S 243), oder die inkomplette Abtötung als „sublethal injury“ bezeichnen [O'Reilly et al.: 2000, 4890-4896] (S 4890). Diese Autoren zeigten, dass ein Teil der Bakterien nur verletzt ist und nach einer

längeren Inkubationszeit auf verschiedenen Medien wieder vermehrungsfähig ist [O'Reilly et al.: 2000, 4890-4896] (S 4892). So ist es wichtig, das Wachstumsverhalten hochdruckbehandelter Bakterien ausreichend lange und auf den richtigen Kulturmedien zu beobachten, um sicher zu sein, dass die Keime inaktiviert und nicht nur subletal verletzt sind [Bozoglu et al.: 2004, 243-247] (S 246). Die im Vergleich zur Literatur etwas geringeren Inaktivierungsraten der vorliegenden Untersuchungen können durchaus durch die längere Beobachtungszeit des Wachstums in unseren Experimenten bedingt sein.

S. epidermidis (ATCC 35984) zeigte eine durchschnittliche statistisch signifikante Reduktion des Wachstums um 2,5 log Stufen nach Hochdruckbehandlung, bei 2 von 3 Proben konnte kein Wachstum mehr festgestellt werden. Der Keim zeigte eine höhere Inaktivierungsrate als *S. aureus*, man kann also davon ausgehen, dass er drucksensibler ist als letzterer. In der Literatur gibt es bisher keine Untersuchungen über das Verhalten dieses Keims unter hydrostatischem Hochdruck, wohl weil er in der Infektion von Lebensmitteln keine Rolle spielt.

E. faecium (ATCC 6057) – ein äußerst hitzeresistentes Bakterium zur Testung von Thermosterilisationsverfahren – zeigte sich gegenüber der Behandlung mit hydrostatischem Hochdruck absolut resistent, er wurde nicht inaktiviert. In der Literatur gibt es bisher sehr wenige Beschreibungen von Untersuchungen über Enterokokken, in diesen wird er jedoch immer als druckresistent beschrieben. So fanden Wuytack et al. bei 400 MPa respektive 300 MPa fast keine Reduktion der Keimzahl von *E. faecium* [Wuytack et al.: 2002, 205-212; Wuytack et al.: 2003, 918-923] (S 208/ 920). Eine andere Untersuchung zeigte, dass eine hydrostatische Hochdruckbehandlung mit 500 MPa auch fast keinen Effekt auf das Überleben von *Enterococcus hirae* hatte [Szcawinski et al.: 2003, 267-269] (S 267). Enterokokken sind sehr resistent gegenüber der Technologie des hydrostatischen Hochdrucks und somit Problemkeime, wohl auch wegen ihrer dicken Zellwand und der gegen äußere Druckeinwirkung günstigen Kugelform.

Insgesamt bestätigen unsere Ergebnisse, dass grampositive Keime deutlich druckresistenter sind als gramnegative. Diese Resistenz der grampositiven im Vergleich zu den gramnegativen Bakterien ist wohl durch den unterschiedlichen Aufbau der Zellwand bedingt [Shigehisa et al.: 1991, 207-215; Wuytack et al.: 2002, 205-212] (S 214/210).

Es muss jedoch hier auch bemerkt werden, dass jeweils ein Referenzkeim der verschiedenen Bakterienspezies untersucht wurde, und dass eine deutliche Varianz der Barotoleranz zwischen den einzelnen Stämmen einer Spezies bekannt ist [Benito et al.: 1999, 1564-1569] (S 1564).

Aufgrund dieser Ergebnisse, die den bereits bekannten abtötenden Effekt des Hochdrucks auf Bakterien bestätigten, wurde in einer nächsten Stufe das Verfahren an Knochenproben von Patienten, die an einer Osteitis erkrankt waren, getestet, um eine Art „proof- of- principle“ durchzuführen. Bisher existieren in der Literatur noch keine Ergebnisse über die Behandlung von infiziertem Knochen mit hydrostatischem Hochdruck.

5.4.2 Behandlung der Knochenproben von an Osteitis/ Osteomyelitis erkrankten Patienten

5.4.2.1 Behandlung ohne vorherige Anreicherung (Methode 1)

Insgesamt wurde mit dieser Methode (10 Minuten Haltedauer des Drucks auf den jeweiligen Druckstufen ohne vorherige Anreicherung) ein Erfolg, also eine Sterilisation bei 12 von 17 Proben erzielt (71 %), jedoch waren auch 3 von 8 Kontrollen steril (38 %). Man sieht also den deutlichen Effekt der Methode, wenn auch statistisch nicht signifikant. Die Keime wurden auf mehreren Knochenproben inaktiviert. Die aus der Literatur bekannten Erkenntnisse, dass eine Steigerung des Drucks zu einer höheren Sterilisationsrate führt [Hoover et al.: 1989, 99-107; Ludwig H et al.: 1994, 193-197; Ludwig H: 2002, 259-265] (S 101/194/260) wurden auch hier bestätigt: so waren bei 300 MPa 67% der Proben steril, ebenso bei 450 MPa, bei 600 MPa waren es 80 % wobei man diese Ergebnisse aufgrund der geringen Fallzahl nur als Tendenz ansehen darf.

Der hydrostatische Hochdruck zeigte also einen inaktivierenden Effekt auf das Wachstum der Bakterien, auch im Knochen. Bei den erfolgreich behandelten Proben wurde das Wachstum 5 Tage lang nach HHD- Behandlung beobachtet. Die Limitation dieser Methode waren jedoch die negativen Kontrollen (also nicht behandelte Proben bei denen kein Wachstum von Keimen nachweisbar war). Mit dieser Methode bestand die Gefahr, dass Proben bereits zu Behandlungsbeginn keimfrei waren und somit falsch negative Ergebnisse interpretiert wurden. Eine statistische Signifikanz zwischen beiden Versuchsgruppen könnte wohl durch eine größere Fallzahl erreicht werden. Allerdings wird für eine klinische Relevanz eine sichere Sterilisation aller Proben gefordert, so dass die Behandlungsmethode verbessert werden musste.

Ferner sollte das Verfahren an einer höheren Keimlast auch Erfolg zeigen, damit es maximalen Anforderungen an die Sterilisationssicherheit gerecht werden kann. Deshalb wurde der Versuchsaufbau im Folgenden modifiziert.

5.4.2.2 Behandlung mit vorheriger Anreicherung

Die bei den Operationen gewonnenen Proben wurden bei den weiteren Versuchen erst in TSB- Bouillons bebrütet, mikrobiologisch analysiert und die Proben mit negativem Keimnachweis verworfen. Dadurch bestand Sicherheit, dass sämtliche ausgewertete Knochenproben zu Behandlungsbeginn tatsächlich mit einer hohen Bakterienzahl infiziert waren. Die lange Beobachtungszeit wie auch die hohe Keimlast vor Hochdruckbehandlung stellten also maximale Anforderungen an das Verfahren.

5.4.2.2.1 Behandlung mit einer Druckhaltezeit von 10 Minuten nach vorheriger Anreicherung (Methode 2)

Alle Kontrollen (25/25) waren positiv. Das methodische Problem falsch negativer Ergebnisse (mit negativen Kontrollen) wurde also durch die Änderung der Methode erfolgreich gelöst. Es zeigte sich jedoch eine erfolgreiche Sterilisation der Knochenproben nur in 2 von 37 Fällen (5 %). Kein Sterilisationserfolg zeigte sich bei den beiden unteren Druckstufen von 300 und 450 MPa, so dass diese Druckstufen in der Behandlung von infizierten Knochenstücken keine weitere Rolle spielen dürften. Bei 600 MPa zeigte sich eine erfolgreiche Sterilisation bei 7 % der Proben (statistisch nicht signifikanter Unterschied zu den Kontrollen).

Insgesamt bestätigte sich auch hier, dass gramnegative Keime (*E. coli*) tendenziell drucksensibler waren.

Die TSB- Bouillons der nicht behandelten Proben waren bereits nach 24 h Bebrütung durch Bakterienwachstum getrübt, die nicht behandelten Knochenstücke zeigten also ein schnelles Wachstum der Infektionserreger. Die Bouillons der behandelten Proben hingegen wurden erst verzögert nach 48- 96 h positiv. Man darf davon ausgehen, dass der Hochdruck auch auf die Bakterien im Knochen einen inaktivierenden Effekt hatte mit deutlich vermindertem und verzögertem Wachstum. Zu einer Sterilisation reichte es aber nur selten.

Diese Beobachtungen kann man durch zwei Hypothesen interpretieren: Einerseits erleiden die Keime durch die Hochdruckbehandlung eine „sublethal injury“. Es kann also im weiteren Verlauf zu einer „injury recovery“ kommen, wie bereits weiter oben beschrieben [Bozoglu et al.: 2004, 243-247; O'Reilly et al.: 2000, 4890-4896] (S 243/4890). Auch Ritz et al. gehen davon aus, dass in einer Zellgemeinschaft eine gewisse Heterogenität besteht. So sind verschiedene Keime nach der Hochdruckbehandlung abgetötet, andere können aber wieder Wachstum nach einer gewissen Zeit zeigen [Ritz et al.: 2001, 2240-2247] (S 2246).

Die zweite Hypothese geht davon aus, dass die Keime auf der Knochenoberfläche durchaus abgetötet werden, die in der Tiefe vom Knochen durch den Hochdruck wahrscheinlich nur gering geschädigt werden. Womöglich bietet die Struktur des Knochens einen Schutz für diese Keime. Der Nachweis der Keime aus der Tiefe vom Knochen dauert mit den konventionellen Methoden nur längere Zeit.

Da die Methode nur einen geringen Erfolg zeigte, wurde die Technik der Hochdruckbehandlung im Folgenden weiter modifiziert

5.4.2.2.2 Repetitive Hochdruckbehandlung: 2x30 Minuten Druckhaltezeit (Methode 3)

Es wurde ausschließlich mit der Druckstufe von 600 MPa gearbeitet. Ferner wurde die Druckhaldedauer repetitiv auf insgesamt 60 Minuten (2 x 30) gesteigert. Hier zeigte sich eine unwesentlich bessere Inaktivierungsrate als bei der Methode 2 (statistisch nicht signifikant): bei 2 von 18 Proben erfolgte durch den hydrostatischen Hochdruck eine erfolgreiche Sterilisation (11%), wobei alle Kontrollen positiv waren (ebenfalls statistisch nicht signifikant). Im Vergleich zu den Ergebnissen aus Methode 2 sieht man, dass die Steigerung der Druckhaldedauer nur einen kleinen Effekt hatte, wie bereits aus der Literatur bekannt. So konnten O'Reilly et al. zeigen, dass ein Anstieg des Drucks von 300 auf 400 MPa einen deutlich größeren Effekt auf die Inaktivierung von Bakterien hat, als die Druckhaltezeit zu steigern [O'Reilly et al.: 2000, 4890-4896] (S 4892). Ähnliche Beobachtungen machte auch Arroyo, der keinen Einfluss der Druckhaldedauer auf die Abtötung von grampositiven Keimen beobachtete, jedoch einen geringen Einfluss bei gramnegativen Bakterien [Arroyo et al.: 1997, 735-742] (S 737-8). Andere Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe konnten nur eine gering erhöhte Inaktivierungsrate durch Steigerung der Druckhaldedauer beobachten, im Gegensatz dazu zeigte eine Erhöhung des Druckniveaus eine deutliche Erhöhung der Inaktivierungsrate, wie auch weiter oben in vorliegender Arbeit beschrieben [Gollwitzer et al.: 2006,].

Auch bei diesen Experimenten zeigte sich wiederum die aus den Vorergebnissen bekannte große Druckresistenz von *E. faecium* [Szcawinski et al.: 2003, 267-269; Wuytack et al.: 2002, 205-212; Wuytack et al.: 2003, 918-923] (S 267/208/ 920). Keine der 4 mit diesem Keim infizierten Proben konnte durch den Hochdruck sterilisiert werden. Dieser Keim wird also ein Problemkeim in der Hochdrucktechnologie bleiben, an der die Methode ihre Effektivität zeigen müssen. Sicher gehört dieser Keim nicht zu den häufigsten Erregern von Knocheninfektionen. Für eine Desinfektion müssen aber auch solche Problemkeime sicher inaktiviert werden.

Für die reduzierte Wirkung des hydrostatischen Hochdrucks auf Bakterien in Osteitis-Knochenproben verglichen mit Bakterien in Suspension kommen mehrere Erklärungen in Frage:

-Die komplexe und kompakte Struktur des Knochens könnte den Bakterien in der Tiefe einen Schutz gegen den HHD bieten. Dabei besteht die Möglichkeit, dass sich der Druck nicht homogen bis in die Tiefe des Knochens verteilen kann und die hier ansässigen Keime nicht abtötet.

- Ferner reduziert die lange Beobachtungszeit von 5 Tagen in unseren Experimenten das Risiko einer unbemerkten „sublethal injury“ . So wird der Effekt des Hochdrucks in unseren Experimenten im Vergleich zu Kurzzeituntersuchungen reduziert. Solch strenge Kriterien sind aber notwendig und gerechtfertigt. Schließlich gilt es diesen Knochen später wieder bei Menschen zu reimplantieren.

- Die wichtigste Erklärung für den mäßigen Erfolg des Verfahrens ist, dass in unseren Untersuchungen ein „worst- case- scenario“ vorlag. Durch die Vorabbebrütung der Keime über 5 Tage wurde für eine große Zahl an pathogenen Bakterien die stationäre Wachstumsphase erreicht. In dieser Phase sind die Keime deutlich weniger drucksensibel als in einer exponentiellen Wachstumsphase [Mackey BM et al.: 1995, 1-11] (S 5). Klinische Anwendung des Verfahrens ohne vorherige Bebrütung könnte also zu höheren Sterilisationsraten führen, was die deutliche bessere Inaktivierungsrate aus Methode 1 ohne vorherige Anreicherung zeigte (Sterilisationsrate von 80% bei 600 MPa).

- Ein weiterer Effekt auf die Inaktivierungsrate beim Hochdruckverfahren hat das Umgebungsmedium, in dem die Untersuchungen stattfinden. So konnten Hauben et al. zeigen, dass ein kalziumhaltiges Medium einen baroprotektiven Effekt auf *E. coli* bei der Anwendung von hydrostatischem Hochdruck hat [Hauben et al.: 1998, 678-684] (S 678). Sie gehen davon aus, dass Ca^{2+} auf die zellulären Ziele des Hochdrucks einen stabilisierenden Effekt ausübt [Hauben et al.: 1998, 678-684] (S 682). Da Knochen bekanntermaßen kalziumreich ist, könnte Ca^{2+} auch im Knochen einen baroprotektiven Effekt auf die Keime haben und somit zu einer geringeren Inaktivierung führen. Andere Knochenbestandteile wie Fett oder Kollagen könnten ebenfalls einen baroprotektiven Effekt auf die Bakterien haben.

In der vorliegenden Arbeit konnten somit gramnegative Bakterien sowohl in Suspension, als auch in Knochen sicher inaktiviert werden, während eine Sterilisation grampositiver Bakterien nicht erfolgreich war. Hier könnte bereits jetzt ein möglicher klinischer Einsatz bei

Monoinfektionen mit gramnegativen Bakterien liegen. Bei bioptischen Nachweis der singulären Infektion mit gramnegativen Bakterien bzw. dem extrakorporalen Nachweis einer Infektion mit barosensiblen Bakterien, könnte die extrakorporale Inaktivierung des betroffenen Knochenareals mit konsekutiver Reimplantation möglich werden. Die Inaktivierung grampositiver Bakterien erfordert jedoch eine weitere Verbesserung des Behandlungsprotokolls.

5.4.3 Beobachtung von hochdruckbehandelten Knochenstücken und Bakterien unter dem REM

Unter dem REM wurden die morphologischen Veränderungen von *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* und *E. faecium* im Knochen nach HHD- Behandlung mit 600 MPa beobachtet. Bei *P. aeruginosa*, einem gramnegativen Stäbchen, zeigten sich nach HHD- Behandlung deutliche Membranveränderungen im Sinne von einer unregelmäßigen, löchrigen Membran mit Bläschenbildung und Deformierungen. Diese Beobachtungen ähneln denen von Kaletunc et al., die bei hochdruckbehandelten *Leuconostoc mesenteroides* (500 MPa) eine unebene, rissige Membran ebenfalls mit Bläschenbildung beobachteten. Diese Veränderungen vermehren sich mit der Höhe des Drucks. So wurden bei 250 MPa ähnliche Veränderungen beobachtet, jedoch deutlich weniger ausgeprägt [Kaletunc et al.: 2004, 1116-1122] (S 1118). Ritz und Mitarbeiter beobachteten die Membranveränderungen unter dem REM nach HHD- Behandlung von *Listeria monocytogenes*, einem grampositiven Stäbchen. Im Unterschied zu den nicht behandelten Zellen sahen sie knospenförmige Narben auf den Zellmembranen, vereinzelt waren die Zellen gespalten. Hieraus schlussfolgerten sie, dass die Zellmembran ein wesentlicher Angriffspunkt des Hochdrucks ist. Die beobachteten Veränderungen waren ebenfalls proportional zu der Höhe des Drucks [Ritz et al.: 2001, 2240-2247] (S 2242).

Im Gegensatz zu *P. aeruginosa* konnten in den vorliegenden Untersuchungen nach HHD- Behandlung von *S. aureus*, *S. epidermidis* und *E. faecium* im Knochen (allesamt grampositive Kokken) nur vereinzelt geringe Membranveränderungen unter dem REM beobachtet werden. Hier zeigte sich nur in wenigen Fällen eine geringe Bläschenbildung auf den Zellmembranen bzw. eine Entformung der Kokkenstruktur.

Die morphologische Betrachtung von HHD- behandelten Bakterien im Knochen bestätigt die mikrobiologischen Ergebnisse aus den Versuchen am Osteitis- Knochen aus dieser Arbeit. Es wird noch immer kontrovers diskutiert, wo der Angriffspunkt des Hydrostatischen Hochdrucks an Bakterien ist. Sicher ist aber, dass die Zerstörung der Membran eine große Rolle spielt. Mit einer derart massiven Zerstörung der Zellmembran wie sie bei *P. aeruginosa*

beobachtet wurde, ist dieser Keim sicher nicht mehr überlebens- und replikationsfähig. Bei den anderen untersuchten Bakterien - allesamt grampositive Kokken - waren meistens keine Veränderungen im Bereich der Membran zu beobachten.

Insgesamt besteht also ein kohärentes Ergebnis bei der Hochdruckbehandlung von infiziertem Knochen: Sowohl die mikrobiologischen Ergebnisse als auch die morphologische Betrachtung der Keimen zeigt, dass gramnegative Stäbchen bei 600 MPa erfolgreich abgetötet werden, während grampositive Kokken im Knochen gegenüber HHD nur teilweise sensibel sind.

5.4.4 Steigerung der Effektivität des hydrostatischen Hochdrucks auf die Inaktivierung von Keimen durch Untersuchung verschiedener Einflussfaktoren

Ein erster Ansatz zur Verbesserung der Effektivität des Verfahrens wäre die Steigerung der Druckstufe über die hier applizierten 600 MPa. Hier zeigen sich zwei wesentliche Einschränkungen:

- 1) Die Herstellung von Hochdruckanlagen mit Druckstufen von 800-1000 MPa – insbesondere mit entsprechend großen Autoklaven zur Behandlung größerer Knochenblöcke – ist kostenintensiv und damit im klinischen Alltag nur vereinzelt einsetzbar.
- 2) Die biomechanischen Effekte hydrostatischen Hochdrucks auf Knochen wurde nur bis zu einer Druckstufe bis 600 MPa untersucht [Diehl et al.: 2001, 121] (S 121). Negative Einflüsse auf die Knochenqualität bei höheren Druckstufen sind hier nicht auszuschließen.

Der Einfluss des Zeitfaktors (Druckhaldedauer) ist eher gering. So zeigten unsere Ergebnisse nur eine unwesentlich verbesserte Inaktivierungsrate durch Steigerung der Druckhaldedauer. Diese Beobachtungen sind in der Literatur bekannt, insbesondere bei subletalen Druckstufen [Arroyo et al.: 1997, 735-742; Kalchayanand et al.: 1998, 207-214] (S 737/211). Bei letalen Druckstufen kann durch Steigerung der Druckhaldedauer eine gering erhöhte Inaktivierungsrate erreicht werden [Arroyo et al.: 1997, 735-742; Ludwig H et al.: 1994, 193-197] (S 737/196). So kann die verlängerte Anwendung des Hochdrucks sicher in Kombination mit anderen Parametern ein adjuvanter Ansatz zur Verbesserung der Effektivität des Verfahrens sein.

Ein weiterer Einflussfaktor auf die bakterielle Inaktivierung ist die Temperatur während der Hochdruckbehandlung. Grundsätzlich scheint die Aussage zu gelten, dass besonders Temperaturen in Bereichen höher als 50°C bzw. im Bereich von -30 bis +5°C einen positiven Einfluss auf die Sterilisation haben [Arroyo et al.: 1999, 544-556; Cheftel JC: 1995,

75-90; Ludwig H et al.: 1994, 193-197] (S 544/76/195) [Linton et al.: 2000, 175-182] (S 178). Ludwig et al. erklärten den Einfluss der Temperatur in einer geänderten Membranzusammensetzung bei den verschiedenen Temperaturen, wodurch Bakterien mehr oder weniger druckempfindlich werden [Ludwig H et al.: 1992, 25-32] (S 27). Auch der Einfluss der Temperatur ist bei den verschiedenen Bakterienstämmen unterschiedlich ausgeprägt [Ludwig H et al.: 1994, 193-197] (S 196). So wäre eine Behandlung der infizierten Knochenproben mit einer Temperatur von $<4^{\circ}\text{C}$ ein Erfolg versprechender Ansatz, weil hier kein Risiko einer Destruktion des Knochens wie durch Hitze zu erwarten ist. Mit diesem Behandlungsschema konnten gute Ergebnisse in unserer Arbeitsgruppe bei Untersuchungen von künstlich infiziertem Knochen erzielt werden [Gollwitzer et al.: 2006,].

Eine letzte sehr wichtige Rolle spielt das Umgebungsmedium, in dem die Hochdruckbehandlung stattfindet. Hohe Salz- oder Zuckerkonzentrationen und geringer Wassergehalt können einen baroprotektiven Effekt auf die Keime ausüben [Cheftel JC: 1995, 75-90] (S76). Andere Autoren konnten beobachten, dass die Präsenz von Bakteriziden wie Nisin, Lysozym, Pediocin AcH oder EDTA während der Hochdruckbehandlung zu einer vermehrten Abtötung von Keimen in Suspension führte [Hauben et al.: 1996, 350-355; Kalchayanand et al.: 1998, 207-214] (S 350/213). Der pH-Wert des umgebenden Mediums scheint auch einen Einfluss zu haben: *E. coli* wurde bei niedrigem pH vermehrt inaktiviert als bei höheren pH-Werten [Linton et al.: 2000, 175-182] (S 179). Weiterhin scheinen hohe Calcium- Spiegel im Umgebungsmedium einen baroprotektiven Effekt auf die Inaktivierung von Keimen auszuüben [Hauben et al.: 1998, 678-684] (S 678). Das Umgebungsmedium hat einen Effekt auf die Inaktivierung von Keimen wenn diese sich in einem flüssigen Umgebungsmedium, also in Suspension befinden. Ob dies auch beim Knochen der Fall ist, bleibt fraglich. Hier kann durchaus das Problem bestehen, dass Bakterizide und andere Zusätze nicht homogen in den Knochen eindringen können, um die Bakterien zu erreichen, insbesondere wenn es sich um chronisch infizierten Knochen handelt, der von Nekrosezonen und Sequestern durchsetzt ist. Trotzdem kann es ein sehr interessanter Ansatz sein, ein bakterizides Umgebungsmedium mit der hydrostatischen Hochdruckbehandlung von Knochen zu kombinieren.

Zur Verbesserung der Effektivität des Hochdruckverfahrens müssen also die oben genannten Einflussfaktoren wie die Druckstufe, die Zeit, die Temperatur und das Umgebungsmedium auch in ihrem Effekt bei der Hochdruckbehandlung von Knochen weiter untersucht und anschließend berücksichtigt werden.

5.5 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnten gramnegative Bakterien durch die Anwendung von hydrostatischem Hochdruck sowohl in Suspension, als auch in Knochen sicher inaktiviert werden. Die Sterilisation grampositiver Bakterien war hingegen nur selten erfolgreich.

Durch die Bebrütung der Knochenproben vor HHD-Behandlung über 5 Tage wurde ein „worst- case- scenario“ mit sehr hoher Keimlast und Bakterien in der barotoleranten stationären Wachstumsphase erreicht. Die Technologie des Hochdrucks konnte diesen hohen Anforderungen bei der Sterilisation vom Knochen nur bei gramnegativen Bakterien am ehesten gerecht werden, auch wenn sich bei grampositiven Keimen regelrecht ein inaktivierender Effekt auf sämtliche Bakterienstämme zeigte.

In weiteren Untersuchungen gilt es nun die Behandlungseffektivität durch Modifikation von Druckhaltezeit, Druckstufe, Temperatur und Umgebungsmedium in Kombination mit dem Hochdruckverfahren zu steigern. Ob man letztlich mit hydrostatischem Hochdruck eine sichere Sterilisation von allogenen Knochen zur Reimplantation erreichen kann, ist derzeit noch unsicher. Eine adjuvante Behandlung zur Erhöhung der Transplantatsicherheit ist jedoch denkbar.

Die Zukunft des HHD könnte auch in der Therapie der chronischen Osteitis liegen. Ähnlich wie bei der beschriebenen extrakorporalen Tumordevitalisation könnte man bei schwierigen und langwierigen Osteitis- Verläufen den infizierten Knochen explantieren, ihn intraoperativ einer hydrostatischen Hochdruckbehandlung unterziehen und anschließend wieder reimplantieren. Weil es jedoch sehr große Unterschiede in der Hochdrucksensibilität verschiedener Bakterienspezies und Bakterienstämmen einer Spezies gibt, müsste man zuvor die Hochdrucksensibilität des jeweiligen Keimes überprüfen. So könnte man über eine Probeexzision die Barotoleranz der infizierenden Erreger überprüfen und damit die Anwendbarkeit des HHD auf das infizierte Knochengewebe feststellen. Gerade für Monoinfektionen mit gramnegativen oder anderen barosensiblen Bakterien und Hefen könnte hier eine klinische Indikation entstehen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Problem des Knochendefekts bei Tumor und Knocheninfektion ist in der Orthopädie bisher nur unzureichend gelöst. Die heutigen Methoden wie die autologe, allogene und alloplastische Knochentransplantation, der Segmenttransport sowie die Endoprothetik sind allesamt mit wesentlichen Limitationen behaftet. Bei der allogenen Knochentransplantation ist das Hauptproblem die Infektion. Kein bisher etabliertes Sterilisationsverfahren kann dabei die Transplantate sicher sterilisieren, ohne den Knochen in biologischer oder biomechanischer Art und Weise zu kompromittieren.

Hydrostatischer Hochdruck (HHD) wird in der Lebensmitteltechnologie bereits erfolgreich zur Haltbarmachung von Lebensmitteln durch Abtötung von Mikroorganismen eingesetzt. HHD führt beim Knochen nur zu einem geringen Festigkeitsverlust und zu keinem Aktivitätsverlust der osteoinduktiven Proteine. Somit könnte er zur schonenden Sterilisation von allogenen Knochen in der Medizin eingesetzt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Referenzkeime in Suspension mit HHD behandelt. Gramnegative Keime (*P. aeruginosa*) zeigten sich deutlich sensibler gegenüber dem Verfahren als grampositive (in absteigender Reihenfolge: *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. faecium*), und konnten in Suspension sicher abgetötet werden. Anschließend wurde ein „proof- of- principle“ des Verfahrens bei Knochenproben verschiedener Patienten mit Osteitis durchgeführt, und sowohl die Methodik als auch die Behandlungsparameter weiterentwickelt. Bei der direkten Behandlung der explantierten Knochenproben konnten 80% der Präparate sterilisiert werden. Aufgrund mikrobiologischer Unsicherheiten zum Infektstatus vor Behandlungsbeginn mussten die Proben im weiteren Verlauf vor der Druckapplikation bis zum sicheren Infektnachweis mit den infizierenden Bakterien angereichert werden. Nach vorheriger Anreicherung der Bakterien in den Knochenproben zeigten alle Kontrollen positives bakterielles Wachstum (33/33). Allerdings konnte eine komplette Sterilisation nur noch in 4 von 55 Fällen erreicht werden. Auch hier zeigten gramnegative Bakterien eine geringere Barotoleranz als grampositive Spezies.

Schließlich erfolgte eine morphologische Betrachtung von artifiziell kontaminierten Knochenproben nach HHD- Behandlung unter dem REM. Die morphologischen Beobachtungen bestätigten die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen: Große Risse und Bläschenbildungen konnten an der Membran von gramnegativen Stäbchen beobachtet werden, grampositive Kokken blieben hingegen zu größtenteils unversehrt.

Die Zukunft des hydrostatischen Hochdrucks könnte in der Behandlung der Osteitis liegen. Dann würde lediglich Knochen welcher mit barosensitiven Bakterien infiziert ist einer extrakorporalen HHD- Behandlung unterzogen werden. Eine präoperative mikrobiologische Probenentnahme mit Inaktivierungstestung durch HHD könnte die Vulnerabilität der jeweiligen Erreger bestätigen. Zudem muss eine Weiterentwicklung der HHD-Technik zur Effektivitätssteigerung bei grampositiven Erregern unter Einbeziehung von Behandlungstemperatur, Druckhaldedauer, Druckhöhe und Umgebungsmedium mit entsprechenden synergistisch wirkenden Zusätzen erfolgen.

7 LITERATUR

1. Abudu, A.; Carter, S.R.; Grimer, R.J.: "The outcome and functional results of diaphyseal endoprostheses after tumour excision" *J. Bone Joint Surg. Br.* 78 (1996): 652-657
2. Alpas, H.; Kalchayanand, N.; Bozoglu, F.; Sikes, A.; Dunne, C.P.; Ray, B.: "Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens" *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999): 4248-4251
3. Aro, H.T. and Aho, A.J.: "Clinical use of bone allografts" *Ann. Med.* 25 (1993): 403-412
4. Arroyo, G.; Sanz, P.D.; Prestamo, G.: "Effect of high pressure on the reduction of microbial populations in vegetables" *J. Appl. Microbiol.* 82 (1997): 735-742
5. Arroyo, G.; Sanz, P.D.; Prestamo, G.: "Response to high-pressure, low-temperature treatment in vegetables: determination of survival rates of microbial populations using flow cytometry and detection of peroxidase activity using confocal microscopy" *J. Appl. Microbiol.* 86 (1999): 544-556
6. Asada, N.; Tsuchiya, H.; Kitaoka, K.; Mori, Y.; Tomita, K.: "Massive autoclaved allografts and autografts for limb salvage surgery. A 1-8 year follow-up of 23 patients" *Acta Orthop. Scand.* 68 (1997): 392-395
7. Basset, J.; Lepine, P.; Chaumont, L.: "[Effects of high pressures on the poliomyelitis virus (Lansing strain)]" *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 90 (1956): 575-593
8. Bauer, T.W. and Muschler, G.F.: "Bone graft materials. An overview of the basic science" *Clin. Orthop.* (2000): 10-27
9. Benito, A.; Ventoura, G.; Casadei, M.; Robinson, T.; Mackey, B.: "Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high hydrostatic pressure, mild heat, and other stresses" *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999): 1564-1569
10. Bohm, P.; Fritz, J.; Thiede, S.; Budach, W.: "Reimplantation of extracorporeal irradiated bone segments in musculoskeletal tumor surgery: clinical experience in eight patients and review of the literature" *Langenbecks Arch. Surg.* 387 (2003): 355-365
11. Bohm, P.; Springfield, R.; Springer, H.: "Re-implantation of autoclaved bone segments in musculoskeletal tumor surgery. Clinical experience in 9 patients followed for 1.1-8.4 years and review of the literature" *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 118 (1998): 57-65
12. Bozoglu, F.; Alpas, H.; Kaletunc, G.: "Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage" *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 40 (2004): 243-247
13. Bradley, D.W.; Hess, R.A.; Tao, F.; Sciaba-Lentz, L.; Remaley, A.T.; Laugharn, J.A., Jr.; Manak, M.: "Pressure cycling technology: a novel approach to virus inactivation in plasma" *Transfusion* 40 (2000): 193-200

14. Bucholz, R.W.: "Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes" Clin. Orthop. (2002): 44-52
15. Buck, B.E.; Malinin, T.I.; Brown, M.D.: "Bone transplantation and human immunodeficiency virus. An estimate of risk of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)" Clin. Orthop. (1989): 129-136
16. Buck, B.E.; Resnick, L.; Shah, S.M.; Malinin, T.I.: "Human immunodeficiency virus cultured from bone. Implications for transplantation" Clin. Orthop. (1990): 249-253
17. Chapman, P.G. and Villar, R.N.: "The bacteriology of bone allografts" J. Bone Joint Surg. Br. 74 (1992): 398-399
18. Cheftel JC: "High pressure, microbial inactivation and food preservation" Food science and technology international 1(2/3) (1995): 75-90
19. Cheftel JC and Culioli J: "Effects of High Pressure on Meat: A Review" Meat Science 46 (1997): 211-236
20. Davy, D.T.: "Biomechanical issues in bone transplantation" Orthop. Clin. North Am. 30 (1999): 553-563
21. Debrunner A.M.: "Infektionen am Bewegungsapparat" in Orthopädie, orthopädische Chirurgie: die Störungen des Bewegungsapparats in Klinik und Praxis, Hsg. Debrunner A.M., Verlag Hans Huber, Bern (1994): 349-366
22. Debrunner A.M.: "Operative Therapie/ Knochentransplantation" in Orthopädie, orthopädische Chirurgie: die Störungen des Bewegungsapparats in Klinik und Praxis, Hsg. Debrunner A.M., Verlag Hans Huber, Bern (1994): 259
23. Debrunner A.M.: "Vom Leben des Knochens/ Induzierte Knochenbildung und Knochentransplantation" in Orthopädie, orthopädische Chirurgie: die Störungen des Bewegungsapparats in Klinik und Praxis, Hsg. Debrunner A.M., Verlag Hans Huber, Bern (1994): 45-47
24. Deijkers, R.L.; Bloem, R.M.; Petit, P.L.; Brand, R.; Vehmeyer, S.B.; Veen, M.R.: "Contamination of bone allografts: analysis of incidence and predisposing factors" J. Bone Joint Surg. Br. 79 (1997): 161-166
25. Dick, H.M. and Strauch, R.J.: "Infection of massive bone allografts" Clin. Orthop. (1994): 46-53
26. Diehl, P.; Höhn, G.; Hadaller, M.; Grebner, S.; Gradinger, R.; Meyer-Pittroff, R.; Mittelmeier, W.: "Einfluss der hydrostatischen Hochdruckbehandlung auf die mechanischen Eigenschaften des Knochens" BIOMaterialien 2/3 (2001): 121
27. Diehl, P.; Schmitt, M.; Blumelhuber, G.; Frey, B.; Van Laak, S.; Fischer, S.; Muehlenweg, B.; Meyer-Pittroff, R.; Gollwitzer, H.; Mittelmeier, W.: "Induction of tumor cell death by high hydrostatic pressure as a novel supporting technique in orthopedic surgery" Oncol. Rep. 10 (2003): 1851-1855
28. Diehl, P.; Schmitt, M.; Heister, C.; Lehner, S.; Steinhauser, E.; Milz, S.; Link TM.; Blümlhuber, G.; Gollwitzer, H.; Mittelmeier, W.: "Biomechanical analysis of Achilles' tendons after high hydrostatic pressure treatment as a novel supporting technique in orthopedic surgery" J. Biomed. Mat. Res. (2006)

29. Diehl, P.; Schmitt, M.; Schauwecker J.; Eichelberg K.; Gollwitzer, H.; Gradinger, R.; Göbel M.; Preissner KT; Mittelmeier, W.; Magdolen U.: "Effect of high hydrostatic pressure on biologicals properties of extracellular bone matrix proteins" *Int. J. Mol. Med.* (16) (2006): 285-289
30. Dunsmuir, R.A. and Gallacher, G.: "Microwave sterilization of femoral head allograft" *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003): 4755-4757
31. Eggen, B.M. and Nordbo, S.A.: "Transmission of HCV by organ transplantation" *N. Engl. J. Med.* 326 (1992): 411-413
32. Einhorn, T.A.: "Clinical applications of recombinant human BMPs: early experience and future development" *J. Bone Joint Surg. Am.* 85-A Suppl 3 (2003): 82-88
33. Einhorn, T.A.; Majeska, R.J.; Mohaideen, A.; Kagel, E.M.; Bouxsein, M.L.; Turek, T.J.; Wozney, J.M.: "A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair" *J Bone Joint Surg. Am.* 85-A (2003): 1425-1435
34. Faber, F.W.; Keessen, W.; van Roermund, P.M.: "Complications of leg lengthening. 46 procedures in 28 patients" *Acta Orthop. Scand.* 62 (1991): 327-332
35. Galea, G.; Kopman, D.; Graham, B.J.: "Supply and demand of bone allograft for revision hip surgery in Scotland" *J. Bone Joint Surg. Br.* 80 (1998): 595-599
36. Gebhardt, M.C.: "What's new in musculoskeletal oncology" *J. Bone Joint Surg. Am.* 84-A (2002): 694-701
37. Gollwitzer, H.; Diehl, P.; Brendle, M.; Weber, P.; Miethke, T.; Hofmann, G.O.; Gerdesmeyer, L.; Schauwecker J.; Mittelmeier, W.: "High Hydrostatic Pressure for disinfection of biomaterials and infected bone grafts: Influence of blood and human bone on inactivation of bacteria" *Journal of Medical Microbiology* submitted (2006)
38. Habal MB and Reddi AH: *Bone graft and bone substitutes*, Hsg. Saunders, Philadelphia, London, Toronto (1992) 1
39. Hallfeldt, K.K.; Stutzle, H.; Puhlmann, M.; Kessler, S.; Schweiberer, L.: "Sterilization of partially demineralized bone matrix: the effects of different sterilization techniques on osteogenetic properties" *J. Surg. Res.* 59 (1995): 614-620
40. Hauben, K.J.; Bartlett, D.H.; Soontjens, C.C.; Cornelis, K.; Wuytack, E.Y.; Michiels, C.W.: "Escherichia coli mutants resistant to inactivation by high hydrostatic pressure" *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997): 945-950
41. Hauben, K.J.; Bernaerts, K.; Michiels, C.W.: "Protective effect of calcium on inactivation of Escherichia coli by high hydrostatic pressure" *J. Appl. Microbiol.* 85 (1998): 678-684
42. Hauben, K.J.; Wuytack, E.Y.; Soontjens, C.C.; Michiels, C.W.: "High-Pressure Transient Sensitization of Escherichia coli to Lysozyme and Nisin by Disruption of Outer-Membrane Permeability" *J. Food Prot.* 59 (1996): 350-355
43. Hayashi Rikimaru: "An overview of the use of high pressure in bioscience and biotechnology" in *High pressure bioscience and biotechnology*, Hsg. Hayashi R and Balny C, Elsevier Science, Amsterdam-Lausanne-New York-Oxford-Shannon-Tokyo (1996): 1-6

44. Hendrich C.; Walther M.; Frommelt, L.: "Epidemiologie" in Septische Knochen- und Gelenkchirurgie, Hsg. Hendrich C.;Frommelt,L.;Eulert J., Springer, Berlin; Heidelberg; New York; Hongkong; London; Mailand; Paris; Tokio (2004): 2-13
45. Hipp E.G.; Burgkart R; Plötz W; Schelter R: "Knochen und Weichteiltumoren, Grundsätzliches zur Diagnose und Therapie" in Orthopädie und Traumatologie, Hsg. Hipp E.G.;Plötz W;Thiemel G, Thieme, Stuttgart;New York (2003): 197-216
46. Hite, B.H.: "The effect of pressure in the preservation of milk" Bulletin of West Virginia University of Agriculture Experiment Station Morgantown 58 (1899): 15-35
47. Hof H: "Staphylokokken" in Mikrobiologie (Duale Reihe), Hsg. Hof H;Dörries R;Müller RL, Thieme, Stuttgart (2000): 275-285
48. 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. 114 (1995): 159-166
49. Hoover, D.G.: "Pressure Effects on Biological Systems" Food Technology 47 (1993): 150-155
50. Hoover, D.G.; Metrick C; Papineau A.M.; Farkas DF; Knorr D: "Biological Effects of High Hydrostatic Pressure on Food Microorganisms" Food Technology 43 (1989): 99-107
51. Hornicek, F.J., Jr.; Mnaymneh, W.; Lackman, R.D.; Exner, G.U.; Malinin, T.I.: "Limb salvage with osteoarticular allografts after resection of proximal tibia bone tumors" Clin. Orthop. (1998): 179-186
52. Hosny, G. and Fadel, M.: "Ilizarov external fixator for open fractures of the tibial shaft" Int. Orthop. 27 (2003): 303-306
53. Houff, S.A.; Burton, R.C.; Wilson, R.W.; Henson, T.E.; London, W.T.; Baer, G.M.; Anderson, L.J.; Winkler, W.G.; Madden, D.L.; Sever, J.L.: "Human-to-human transmission of rabies virus by corneal transplant" N. Engl. J. Med. 300 (1979): 603-604
54. Husted, H. and Kramhoft, M.U.: "[Microbiology of femoral head grafts in bone banks] Ugeskr. Laeger 158 (1996): 6260-6262
55. Issack, P.S. and DiCesare, P.E.: "Recent advances toward the clinical application of bone morphogenetic proteins in bone and cartilage repair" Am. J. Orthop. 32 (2003): 429-436
56. Jaenicke, R.: "Enzymes under extremes of physical conditions" Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 10 (1981): 1-67
57. Jerosch, J.; Castro, W.H.; Granrath, M.; Rosin, H.: "[Bone banks in the FRG. Results of a survey]" Unfallchirurg 93 (1990): 334-338
58. Johnston, J.O.: "Local resection in primary malignant bone tumors" Clin. Orthop. (1980): 73-80
59. Josten Ch; Walz M; Schumann Ch; Muhr G: "Universaler Fixateur versus Ringfixateur- unterschiedliche Konsolidierung des Knochenregenerates beim Segmenttransport nach Ilizarov" in 56. Jahrestagung der deutschen

Gesellschaft für Unfallchirurgie e.V., Hsg. Rehm KE, Springer,
Berlin;Heidelberg;New York;London;Paris;Tokyo;Hong
Kong;Barcelona;Budapest (1993): 222-223

60. Kainer, M.A.; Linden, J.V.; Whaley, D.N.; Holmes, H.T.; Jarvis, W.R.; Jernigan, D.B.; Archibald, L.K.: "Clostridium infections associated with musculoskeletal-tissue allografts" *N. Engl. J. Med.* 350 (2004): 2564-2571
61. Kalchayanand, N.; Sikes, A.; Dunne, C.P.; Ray, B.: "Factors influencing death and injury of foodborne pathogens by hydrostatic pressure-pasteurization" *Food Microbiology* 15 (1998): 207-214
62. Kaletunc, G.; Lee, J.; Alpas, H.; Bozoglu, F.: "Evaluation of structural changes induced by high hydrostatic pressure in *Leuconostoc mesenteroides*" *Appl Environ. Microbiol.* 70 (2004): 1116-1122
63. 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.* 65 (2002): 1605-1609
64. Knaepler H; v.Garrel T; Gotzen L: "Untersuchungen zur Desinfektion und Sterilisation allogener Knochentransplantate" *Hefte zu der Unfallchirurg* 235 (1994): 1-101
65. Knaepler H; v.Garrel T; Gurtler, L.: "Die allogene Knochentransplantation- eine aktuelle Standortbestimmung" *Deutsch. Ärztebl.* 91 (1994): B-798-B-802
66. Knaepler, H.; von Garrel, T.; Seipp, H.M.; Ascherl, R.: "[Experimental studies of thermal disinfection and sterilization of allogeneic bone transplants and their effects on biological viability]" *Unfallchirurg* 95 (1992): 477-484
67. Kohler, P.; Kreicbergs, A.; Stromberg, L.: "Physical properties of autoclaved bone. Torsion test of rabbit diaphyseal bone" *Acta Orthop. Scand.* 57 (1986): 141-145
68. Linovitz, R.J. and Peppers, T.A.: "Use of an advanced formulation of beta-tricalcium phosphate as a bone extender in interbody lumbar fusion" *Orthopedics* 25 (2002): s585-s589
69. Linton, M. and Patterson, M.F.: "High pressure processing of foods for microbiological safety and quality (a short review)" *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 47 (2000): 175-182
70. Long, M.W.; Robinson, J.A.; Ashcraft, E.A.; Mann, K.G.: "Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors" *J. Clin. Invest* 95 (1995): 881-887
71. Lord, C.F.; Gebhardt, M.C.; Tomford, W.W.; Mankin, H.J.: "Infection in bone allografts. Incidence, nature, and treatment" *J. Bone Joint Surg. Am.* 70 (1988): 369-376
72. Ludwig H: "Effects of High Pressure on Bacteria and Fungi" in *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*, Hsg. Winter R, Springer, Berlin; Heidelberg; New York (2002): 259-265
73. Ludwig H; Bieler C; Hallbauer K; Scigalla W: "Inactivation of microorganisms by hydrostatic pressure" in *High Pressure and Biotechnology*, Hsg. Balny

C;Hayashi R;Heremans K;Masson P, Editions John Libbey Eurotext, Editions INSERM, Paris, London (1992): 25-32

74. Ludwig H; Gross P; Scigalla W; Sojka B: "Pressure inactivation of microorganisms" *High Pressure Research* 12 (1994): 193-197
75. Macewen W: "Observations concerning transplantation on bone" *Proc R Soc London* 32 (1881): 232
76. Mackey BM; Forestière K; Isaacs N: "Factors affecting the resistance of *Listeria Monocytogenes* to high hydrostatic pressure" *Food Biotechnology* 9 (1&2) (1995): 1-11
77. Malawer, M.M. and Chou, L.B.: "Prosthetic survival and clinical results with use of large-segment replacements in the treatment of high-grade bone sarcomas" *J. Bone Joint Surg. Am.* 77 (1995): 1154-1165
78. Masson P: "Action de la pression hydrostatique sur les protéines: émergence de la biotechnologie des hautes pressions, applications pharmaceutiques et médicales possibles" *Ann Pharm Fr* 57 (1999): 49-55
79. Masson, P.; Tonello, C.; Balny, C.: "High-Pressure Biotechnology in Medicine and Pharmaceutical Science" *J. Biomed. Biotechnol* 1 (2001): 85-88
80. Meadows, G.R.: "Adjunctive use of ultraporous beta-tricalcium phosphate bone void filler in spinal arthrodesis" *Orthopedics* 25 (2002): s579-s584
81. Mertens B and Knorr D: "Developments of nonthermal processes for food preservation" *Food Technology* 46 (1992): 124-133
82. Meyer-Pittroff, R.: "High Pressure Applications in Medicine" 2 (2003): 295-305
83. Mittelmeier, W.; Braun, C.; Gradinger, R.: "[Defect fractures of the tibia--various forms of bone replacement]" *Chirurg* 67 (1996): 1087-1092
84. MMWR: "Leads from the MMWR. Transmission of HIV through bone transplantation: case report and public health recommendations" *JAMA* 260 (1988): 2487-2488
85. MMWR: "Leads from the MMWR. Creutzfeldt-Jakob disease in a second patient who received a cadaveric dura mater graft" *JAMA* 261 (1989): 1118
86. 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
87. Nakagami, T.; Shigehisa, T.; Ohmori, T.; Taji, S.; Hase, A.; Kimura, T.; Yamanishi, K.: "Inactivation of herpes viruses by high hydrostatic pressure" *J. Virol. Methods* 38 (1992): 255-261
88. Norman-Taylor, F.H.; Santori, N.; Villar, R.N.: "The trouble with bone allograft" *BMJ* 315 (1997): 498
89. Norman-Taylor, F.H. and Villar, R.N.: "Bone allograft: a cause for concern?" *J. Bone Joint Surg. Br.* 79 (1997): 178-180

90. O'Reilly, C.E.; O'Connor, P.M.; Kelly, A.L.; Beresford, T.P.; Murphy, P.M.: "Use of hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese" *Appl Environ. Microbiol* 66 (2000): 4890-4896
91. 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.* 87 (1999): 1-7
92. Peters KM and Klosterhalfen B: "Osteomyelitis" in *Bakterielle Infektionen der Knochen und Gelenke*, Hsg. Peters KM, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1997): 1-51
93. Pontes, L.; Cordeiro, Y.; Giongo, V.; Villas-Boas, M.; Barreto, A.; Araujo, J.R.; Silva, J.L.: "Pressure-induced formation of inactive triple-shelled rotavirus particles is associated with changes in the spike protein Vp4" *J. Mol. Biol.* 307 (2001): 1171-1179
94. Pruss, A.; Baumann, B.; Seibold, M.; Kao, M.; Tintelnot, K.; von Versen, R.; Radtke, H.; Dörner, T.; Pauli, G.; Gobel, U.B.: "Validation of the sterilization procedure of allogeneic avital bone transplants using peracetic acid-ethanol" *Biologicals* 29 (2001): 59-66
95. Pruss, A.; Seibold, M.; Benedix, F.; Frommelt, L.; von Garrel, T.; Gurtler, L.; Dorffel, Y.; Pauli, G.; Gobel, U.B.: "Validation of the 'Marburg bone bank system' for thermosinfection of allogeneic femoral head transplants using selected bacteria, fungi, and spores" *Biologicals* 31 (2003): 287-294
96. Ranft TW; Clahsen H; Goertzen M: "Thermal disinfection of allogeneic bone grafts by microwave" *J. Bone Joint Surg. Br.* 77 (Suppl. II) (1995): 226
97. Reddi AH: "Biochemistry of Collagen" in *Biochemistry of Collagen*, Hsg. Ramachandran GN and Reddi AH, Plenum Press, New York (1976): 449-478
98. Rees, D.C. and Haddad, F.S.: "Bone transplantation" *Hosp. Med.* 64 (2003): 205-209
99. Regel, G.; Sudkamp, N.P.; Illgner, A.; Buchenau, A.; Tscherne, H.: "[15 years allogeneic bone transplantation. Indications, treatment and results]" *Unfallchirurg* 95 (1992): 1-8
100. Ritz, M.; Tholozan, J.L.; Federighi, M.; Pilet, M.F.: "Morphological and physiological characterization of *Listeria monocytogenes* subjected to high hydrostatic pressure" *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001): 2240-2247
101. Robert Koch-Institut des Bundesgesundheitsamtes: "Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes zur Prüfung von thermischen Desinfektionsverfahren in Reinigungsautomaten." *Bundesgesundheitsblatt* 23 (1980): 364-367
102. Rüter J.M.: "Allogener Knochenersatz und Knochenersatzmittel" in *Unfallchirurgie*, Hsg. Rüter A;Trentz O;Wagner M, Urban& Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore (1995): 51-65
103. Rüter J.M. and .: "Allogener Knochen und Knochenersatzmittel" in *Unfallchirurgie*, Hsg. Rüter A;Trentz O;Wagner M, Urban und Fischer, München; Jena (2004): 166-182

104. Sandhu, H.S.: "Bone morphogenetic proteins and spinal surgery" *Spine* 28 (2003): S64-S73
105. Sanjay, B.K.; Moreau, P.G.; Younge, D.A.: "Reimplantation of autoclaved tumour bone in limb salvage surgery" *Int. Orthop.* 21 (1997): 291-297
106. Schmidt, H.G.; Neikes, M.; Zimmer, W.: "[Reconstruction of tangential and circular infected bone defects]" *Aktuelle Traumatol.* 17 (1987): 257-267
107. Schnurer, S.M.; Gopp, U.; Kuhn, K.D.; Breusch, S.J.: "[Bone substitutes]" *Orthopade* 32 (2003): 2-10
108. Seeherman, H.J.; Bouxsein, M.; Kim, H.; Li, R.; Li, X.J.; Aiolova, M.; Wozney, J.M.: "Recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered in an injectable calcium phosphate paste accelerates osteotomy-site healing in a nonhuman primate model" *J Bone Joint Surg. Am.* 86-A (2004): 1961-1972
109. Seiler, J.G., III and Johnson, J.: "Iliac crest autogenous bone grafting: donor site complications" *J. South. Orthop. Assoc.* 9 (2000): 91-97
110. Sharma, A.; Scott, J.H.; Cody, G.D.; Fogel, M.L.; Hazen, R.M.; Hemley, R.J.; Huntress, W.T.: "Microbial activity at gigapascal pressures" *Science* 295 (2002): 1514-1516
111. Shigehisa, T.; Nakagami, T.; Ohno, H.; Otake, T.; Mori, H.; Kawahata, T.; Morimoto, M.; Ueba, N.: "Inactivation of HIV in blood plasma by high hydrostatic pressure" in *High Pressure Bioscience and Biotechnology*, Hsg. Hayashi R and Balny C, Elsevier Science, Amsterdam-Lausanne-New York-Oxford-Shannon-Tokyo (1996): 273-278
112. Shigehisa, T.; Ohmori, T.; Saito, A.; Taji, S.; Hayashi, R.: "Effects of high hydrostatic pressure on characteristics of pork slurries and inactivation of microorganisms associated with meat and meat products" *Int. J. Food Microbiol.* 12 (1991): 207-215
113. Shimada S; Andou M; Naito N; Yamada N; Osumi M; Hayashi M: "Effects of hydrostatic pressure on the ultrastructure and leakage of internal substances in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*" *Appl Microbiol Biotechnol* 40 (1993): 123-131
114. 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.; .: "Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor" *N. Engl. J. Med.* 326 (1992): 726-732
115. Statistical abstracts of the United States: "Organ Transplants and Grafts: 1990 to 2002" in *Statistical abstracts of the United States*, Hsg. US Census Bureau, Hoover's Business Press, Washington DC (2003): 125
116. Steinhauser, E.; Hadaller, M.; Diehl, P.; 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.* 76 (2006): 130-135
117. Sudkamp, N.P.; Haas, N.P.; Tempka, A.; Veuskens, A.; Kirchhoff, A.; Tscherne, H.: "[Indications and incidence of spongiosa transplantation in open fractures: analysis of 470 open fractures]" *Aktuelle Traumatol.* 23 (1993): 169-177

118. Suzuki K and Taniguchi Y: "Effect of pressure on biopolymers and model systems" in The effects of pressure on organisms, Hsg. Society for Experimental Biology, Oxford University Press, (1972): 103-124
119. Suzuki, K.; Taniguchi, Y.; Miyosawa, Y.: "The effect of pressure on the absorption spectra of DNA and DNA-dye complex" J. Biochem. (Tokyo) 72 (1972): 1087-1091
120. Szczawinski, J.; Stanczak, B.; Peconek, J.: "Survival of *Enterococcus hirae* in ripened cheese subjected to ultra high pressure" Pol. J. Vet. Sci. 6 (2003): 267-269
121. 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. 267 (2000): 4486-4494
122. Toma de G; Kühne JH; Refior HJ; Verpoorten V: "Klinische Ergebnisse mit wärmebehandelten homologen Knochentransplantaten" Osteologie 1 (1992): 77
123. 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, Hsg. Hayashi R and Balny C, Elsevier Science, Amsterdam-Lausanne-New York-Oxford-Shannon-Tokyo (1996): 185-188
124. Urist, M.R.: "Bone: formation by autoinduction" Science 150 (1965): 893-899
125. Urist, M.R.; Silverman, B.F.; Buring, K.; Dubuc, F.L.; Rosenberg, J.M.: "The bone induction principle" Clin. Orthop. 53 (1967): 243-283
126. Vécsei V: "Gentamicin-PMMA-Kugelketten zur Lokalbehandlung von Knocheninfektionen" in Knochen- und Gelenkinfektion, Hsg. Cotta H and Braun A, Springer, Berlin;Heidelberg;New York;London;Paris;Tokyo (1988): 90-104
127. Veen, M.R.; Bloem, R.M.; Petit, P.L.: "Sensitivity and negative predictive value of swab cultures in musculoskeletal allograft procurement" Clin. Orthop. (1994): 259-263
128. von Garrel, T. and Gotzen, L.: "[Allogenic bone transplantation and bone banking]" Unfallchirurg 101 (1998): 713-727
129. Warwick, R.M.; Eastlune, T.; Fehily, D.: "Role of the blood transfusion service in tissue banking" Vox Sang. 71 (1996): 71-77
130. Wilson, C.J.; Tait, G.R.; Galea, G.: "Utilisation of bone allograft by orthopaedic surgeons in Scotland" Cell Tissue Bank. 3 (2002): 49-53
131. Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer: "Richtlinien zum Führen einer Knochenbank" Deutsch. Ärztebl. 93 (1996): 1715-1719
132. Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer: "Richtlinien zum Führen einer Knochenbank" Deutsch. Ärztebl. 98 (2001): A1011-A1016
133. Wozney, J.M.: "Overview of bone morphogenetic proteins" Spine 27 (2002): S2-S8

134. Wuytack, E.Y.; Diels, A.M.; Meersseman, K.; Michiels, C.W.: "Decontamination of seeds for seed sprout production by high hydrostatic pressure" J. Food Prot. 66 (2003): 918-923
135. Wuytack, E.Y.; Diels, A.M.; Michiels, C.W.: "Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure" Int. J. Food Microbiol 77 (2002): 205-212
136. Ziebuhr W.: "Mikrobiologische Aspekte und Resistenzentwicklung" in Septische Knochen- und Gelenkchirurgie, Hsg. Hendrich C.;Frommelt,L.;Eulert J., Springer, Berlin; Heidelberg; New York; Hongkong; London; Mailand; Paris; Tokio (2004): 20-25

8 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN, TABELLEN UND ABBILDUNGEN

8.1 Verzeichnis der Abkürzungen

ATCC	American Type Culture Collection
BMP	bone morphogenetic proteins
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
Cfu	colony forming units
CMV	Zytomegalovirus
CNS	Coagulase- negativer Staphylococcus
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
<i>E. faecium</i>	Enterococcus faecium
Fa.	Firma
FCV	Feline calicivirus
FGF	fibroblast growth factor
h	Stunde
HAV	Hepatitis- A- Virus
HIV	human immunodeficiency virus
HMDS	Hexamethyldisilazane
HSV	Herpes- simplex Virus
IBDV	infectious bursal disease virus
KBE	Kolinie bildende Einheiten
Lsg.	Lösung
MPa	Mega- Pascal
N	Newton
N/mm	Newton/Millimeter
PDGF	platelet derived growth factor
<i>P. aeruginosa</i>	Pseudomonas aeruginosa
REM	Rasterelektronenmikroskop
<i>S. aureus</i>	Staphylococcus aureus
<i>S. epidermidis</i>	Staphylococcus epidermidis
TGF- Beta	transforming growth factor- beta
TSB	trypticase- soy- broth

8.2 Verzeichnis der Tabellen

<i>Tabelle 1 : Bei allogener Knochentransplantation übertragbare humanpathogene Erreger</i>	<i>17</i>
<i>Tabelle 2: Inaktivierung von Viren durch hydrostatischen Hochdruck</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 3: Statistische Verteilung von Alter, Leukozyten und C-RP beim Patientengut.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 4: Diagnosen und Operationsindikationen beim Patientengut</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 5: HHD- Behandlung von S. aureus in Suspension.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 6: HHD- Behandlung von S. epidermidis in Suspension.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 7: HHD- Behandlung von E. faecium in Suspension</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 8: HHD- Behandlung von P. aeruginosa in Suspension.....</i>	<i>46</i>
<i>Tabelle 9: HHD- Behandlung von Knochenstücken ohne vorherige Anreicherung</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 10: HHD- Behandlung von Knochenstücken ohne vorherige Anreicherung, aufgeteilt nach Keimen.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabelle 11: HHD- Behandlung von Knochenstücken mit vorheriger Anreicherung</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 12: HHD- Behandlung von Knochenstücken mit vorheriger Anreicherung, aufgeteilt nach Keimen.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 13: Ergebnisse der repetitiven HHD- Behandlung</i>	<i>50</i>
<i>Tabelle 14: Ergebnisse der repetitiven HHD- Behandlung, aufgeteilt nach Keimen.....</i>	<i>50</i>

8.3 Verzeichnis der Abbildungen

<i>Abbildung 1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen verschiedener Knochenersatz-materialien</i>	<i>15</i>
<i>Abbildung 2 chronische Infektion eines autologen Knochenspans (Röntgen).....</i>	<i>19</i>
<i>Abbildung 3 chronische Infektion eines autologen Knochenspans (CT).....</i>	<i>20</i>
<i>Abbildung 4 Röntgenbild einer septischen Hüft- TEP Lockerung.....</i>	<i>21</i>
<i>Abbildung 5: Schematische Darstellung der Hochdruckanlage.....</i>	<i>30</i>
<i>Abbildung 6:Photo der Hochdruckanlage.....</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 7:Probengefäße und Parafilm®.....</i>	<i>32</i>
<i>Abbildung 8: Wachstum von S. aureus auf Blut- Agar</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 9: Wachstum von S.aureus auf Agar- Platten (Müller- Hinton II Bouillon) nach HHD- Behandlung (Inkubationszeit von 24 h).....</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 10: Wachstum von S.aureus auf Agar- Platten (Müller- Hinton II Bouillon) nach HHD- Behandlung (Inkubationszeit von 48 h).....</i>	<i>44</i>

Abbildung 11: REM Aufnahmen von mit <i>S. aureus</i> infiziertem Knochen vor und nach HHD- Behandlung.....	53
Abbildung 12: REM Aufnahmen von mit <i>S. epidermidis</i> infiziertem Knochen vor und nach HHD- Behandlung.....	54
Abbildung 13: REM Aufnahmen von mit <i>P. aeruginosa</i> infiziertem Knochen vor und nach HHD- Behandlung (Übersichtsaufnahmen).....	55
Abbildung 14: REM Aufnahmen von mit <i>P. aeruginosa</i> infiziertem Knochen vor und nach HHD- Behandlung (Detailaufnahmen).....	56
Abbildung 15: REM Aufnahmen von mit <i>E. faecium</i> infiziertem Knochen vor und nach HHD- Behandlung.....	57

9 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. R. Gradinger und Herrn Prof. Dr. med. W. Mittelmeier von der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie, Klinikum Rechts der Isar der TU München für die Überlassung des Themas, die freundliche Aufnahme in die Abteilung und die Unterstützung bei dieser Arbeit.

Mein allerherzlichster Dank Herrn Dr. med. Hans Gollwitzer für die intensive Betreuung, die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, die Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit. Dank auch an Herrn Dr. med. Peter Diehl.

Dank für die gute Zusammenarbeit und die technische Betreuung beim Bedienen der Hochdruckanlage an Herrn Dr.-Ing. G. Blümelhuber, Lehrstuhl für Energie- und Umwelt-technik der Lebensmittelindustrie, TU München (Direktor: Univ.-Prof. Dr.-Ing. R. Meyer-Pittroff).

Herrn Prof. Dr. T. Miethke vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Klinikum Rechts der Isar der TU München (Direktor: Univ. Prof. Dr. med. H. Wagner, Ph.-D) sei gedankt für die produktive Zusammenarbeit und zahlreichen innovativen Anregungen. Dank an die beteiligten MTAs.

Ein ganz besonderer Dank an Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer.- nat. G. O. Hofmann und sein Team von der Abteilung für septische und Wiederherstellungschirurgie in der Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik Murnau für die Gewinnung von den Knochenproben, den persönlichen Kontakt und die Unterstützung.

Frau Dr. I. Weichenmeier vom Zentrum für Allergie und Umwelt (Direktorin: Frau Prof. Dr. H. Behrendt) an der Klinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der TU München für die Erstellung der Aufnahmen mit dem REM.

Dank an Frau Dr. med. Evelyn Hauenstein für die Durchsicht der Arbeit.

Meinen Eltern danke ich für die bedingungslose persönliche und finanzielle Unterstützung während dieser Arbeit und des gesamten Medizinstudiums.

Zuletzt danke ich meiner Freundin Bettina Spengler. Ohne ihre ständige Unterstützung, insbesondere in den schwierigsten Momenten, wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.

10 LEBENS LAUF

Geboren wurde ich am 7. November 1979 als Sohn von Cécile und Fernand Weber- Elter in Luxemburg. Von 1985 bis 1991 besuchte ich die Grundschule in Strassen, im Anschluss das Athénée de Luxembourg. Im Juni 1998 erwarb ich an dieser Schule die Allgemeine Hochschulreife. Im Jahr 1998- 99 studierte ich die beiden ersten Semester im Fach Humanmedizin am Centre Universitaire de Luxembourg. Ab dem Wintersemester 1999/2000 war ich an der Ludwig- Maximilians- Universität in München immatrikuliert, wo ich die ärztliche Vorprüfung im August 2000 ablegte. Den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung absolvierte ich im August 2001, den Zweiten Abschnitt im September 2003. Nach dem Abschluss des Studiums mit dem Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im Oktober 2004 erhielt ich meine Approbation als Arzt. Seit dem 1. Dezember 2004 bin ich als Assistenzarzt an der Orthopädischen Klinik und Poliklinik im Klinikum Großhadern der Ludwig- Maximilians- Universität München tätig.