

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

WIRKUNG
EXTRAKORPORALER HOCHENERGETISCHER STOSSWELLEN
AUF BAKTERIEN
UND DEREN
INTERAKTION MIT ANTIBIOTIKA

Carsten P. Horn

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. Priv.-Doz. Dr. L. Gerdesmeyer
2. Univ.-Prof. Dr. G. Häcker

Die Dissertation wurde am 18.06.2007 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 23.01.2008 angenommen.

*Meinen Eltern
Barbara und Axel Horn,
die mir das
Studium der Medizin ermöglicht haben*

1	Einleitung	4
1.1	Die extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWT) in der Medizin	4
1.2	Die Physik der Stoßwelle	4
1.3	Physikalische Parameter der Stoßwelle	6
1.3.1	<i>Fokus der Stoßwelle</i>	7
1.3.2	<i>Energieflussdichte</i>	7
1.3.3	<i>Erzeugung der Stoßwelle</i>	7
1.4	Physikalische Effekte der Stoßwelle	8
1.4.1	<i>Entstehung von Kavitationsblasen</i>	8
1.4.2	<i>Scherkräfte</i>	9
1.4.3	<i>Reflexion</i>	9
1.4.4	<i>Thermische Effekte</i>	10
1.5	Biologische Effekte der Stoßwelle an Zellen und Bakterien	10
1.6	Fragestellung	11
2	Material	13
2.1	Stoßwellengenerator	13
2.2	Bakterienstämme	13
2.3	Spül- und Waschflüssigkeit	13
2.4	Nährlösungen und Agarplatten	14
2.5	Farbstoffe	14
2.6	DNA- Untersuchungen	14
2.7	Gel-Elektrophorese	15
2.8	REM- Untersuchungen	15
2.9	Versuchsgefäße	16
2.10	Ausimpfen	16
2.11	Mess- und Laborgeräte	16
3	Methoden	17
3.1	Grundsätzliche Methoden der Bakterienbehandlung und Versuchsaufbau	17
3.1.1	<i>Herstellen der Nährlösungen TSB (Tryptic Soy Broth) und CAMHB (Cation Adjusted Müller Hinton Broth)</i>	17
3.1.2	<i>Herstellen der Bakterienlösung</i>	17
3.1.3	<i>Standardsuspension 1</i>	17
3.1.4	<i>Standardsuspension 2</i>	18
3.1.5	<i>Befüllen der Versuchsgefäße</i>	18
3.1.6	<i>Nachweis der Dichtigkeit der Pipetten</i>	18
3.1.7	<i>Behandlung der Bakterien</i>	18
3.1.8	<i>Ausimpfen der Bakterien</i>	20
3.1.9	<i>Wachstumskontrolle</i>	20
3.2	Entwicklung der KBE in Bakteriensuspensionen nach ESW-Behandlung	20
3.3	Extrakorporale Stoßwelle und Antibiotikum	21
3.3.1	<i>Herstellen einer Antibiotikum-Lösung</i>	21
3.3.2	<i>Wirkung von extrakorporalen Stoßwellen auf Gentamicin</i>	21
3.3.3	<i>Wirkung von Gentamicin auf vorbehandelte Bakterien</i>	23
3.3.4	<i>Zusammenwirken von Stoßwelle mit Antibiotikum</i>	24
3.4	Fluoreszenzphotometrische Messungen	26
3.4.1	<i>Färbung der behandelten Bakterien</i>	27
3.4.2	<i>Test der Aufnahme des Sytox-Farbstoffes durch vitale Zellen</i>	28
3.4.3	<i>Permeabilisierung der Zellen (Positivkontrolle)</i>	28

3.4.4	<i>Ermitteln der Fluoreszenzeigenschaften von Bakterien</i>	29
3.4.5	<i>Einfluss der ESW auf die Permeabilität der Bakterien</i>	30
3.5	Extrakorporale Stoßwellen und DNA	31
3.5.1	<i>Untersuchung des Effektes der Stoßwelle auf nackte DNA</i>	31
3.5.2	<i>Untersuchung des Effektes der Stoßwelle auf intrazelluläre Bakterien-DNA</i>	32
3.6	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Bakterien	34
3.7	Quantifizierung und Statistik	35
3.7.1	<i>Quantifizierung der Messwerte</i>	35
3.7.2	<i>Statistische Auswertung</i>	35
4	Ergebnisse	36
4.1	Nachweis der Dichtigkeit der Pipetten	36
4.2	Entwicklung der Anzahl der KBE in Bakteriensuspensionen nach Behandlung mit ESW .	37
4.2.1	<i>Abhängigkeit der KBE von der Impulszahl</i>	37
4.2.2	<i>Abhängigkeit der KBE von der Energieflussdichte</i>	39
4.2.3	<i>Abhängigkeit der KBE von der applizierten Gesamtenergie</i>	40
4.3	Extrakorporale Stoßwellen und Antibiotikum	41
4.3.1	<i>Wirkung der extrakorporalen Stoßwelle auf Gentamicin</i>	41
4.3.2	<i>Wirkung von Gentamicin auf vorbehandelte Bakterien</i>	42
4.3.3	<i>Zusammenwirken von Stoßwelle und Antibiotikum</i>	43
4.4	Fluoreszenzphotometrische Messungen	46
4.4.1	<i>Fluoreszenzeigenschaften von Bakterien</i>	46
4.4.2	<i>Einfluss der ESW auf die Permeabilität der Bakterien</i>	48
4.5	Errechnen der permeabilisierten Anteile	50
4.6	Untersuchung des Effektes der extrakorporalen Stoßwelle auf DNA	51
4.6.1	<i>Effekt der Stoßwelle auf genomische dsDNA (humane DNA)</i>	51
4.6.2	<i>Effekt der Stoßwelle auf genomische Bakterien-DNA</i>	51
4.6.3	<i>Fluoreszenz von dsDNA nach ESW-Behandlung</i>	52
4.7	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung	53
5	Diskussion	54
5.1	Stand der Forschung und bisherige Ergebnisse	54
5.2	Versuchsaufbau	55
5.3	Effekte der Stoßwelle	56
5.3.1	<i>Kavitationseffekte</i>	57
5.3.2	<i>Thermische Effekte</i>	58
5.4	Bedeutung von Impulszahl, Energieflussdichte und Gesamtenergie	58
5.5	Parallelen zwischen Stoßwelle und hydrostatischem Hochdruck	59
5.6	Bakteriostatische oder bakterizide Wirkung?	59
5.7	Stimulierende Wirkungen der ESW?	60
5.8	Rasterelektronenmikroskopische Erkenntnisse?	61
5.9	Membranschädigungen durch ESW?	62
5.10	Einfluss der ESW auf die DNA	64
5.11	Einfluss von ESW und Gentamicin auf Bakterien	66
5.11.1	<i>Einfluss der ESW auf Gentamicin</i>	66
6	Zusammenfassung	71
7	Literaturverzeichnis	73

8	Abkürzungen	79
9	Abbildungsverzeichnis	80
10	Tabellenverzeichnis	81
11	Anhang	82
11.1	Beimpfungs-Schemata der Versuche 3.4.2, 3.4.2.1 und 3.4.2.2	82
11.1.1	Versuch 3.4.2:	82
11.1.2	Versuch 3.4.4.2:	82
11.1.3	Versuch 3.4.4.2	83
11.2	Inhaltsverzeichnis der Ergebnistabellen	84
12	Lebenslauf	139
13	Danksagung	140

1 Einleitung

1.1 Die extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWT) in der Medizin

Die Therapie mit extrakorporalen Stoßwellen (ESW) ist ein vergleichsweise junges therapeutisches Verfahren in der Medizin. Erst vor einem Vierteljahrhundert wurde die Stoßwelle durch *Chaussy et al.* erfolgreich zur Behandlung von Nierensteinen eingesetzt (*Chaussy et al.* 1982) und gilt heute als Therapiestandard. Fünf Jahre später erfolgte der erste Einsatz zur Behandlung von Gallensteinleiden (*Sauerbruch et al.* 1986). Neben Nieren-, Blasen-, und Gallensteinen werden auch Pankreas- und Speichelsteine erfolgreich lithotripsiert (*Iro et al.* 1992, *Delhaye et al.* 1992).

In der Orthopädie hat die Erfolgsgeschichte der Stoßwellentherapie 1986 begonnen, als die Arbeitsgruppe um *Haupt* ihren Einfluss auf die Wundheilung an Schweinen und auf die Frakturheilung an Ratten untersuchte (*Haupt et al.* 1992). Es folgte ein Jahrzehnt der intensiven Grundlagenforschung, bei der die Stoßwelle bei einer Vielzahl von orthopädischen Fragestellungen und Leiden erprobt wurde: Entfernung von Knochenzement durch die Arbeitsgruppen um *Karpmann* und *May* (*Karpmann et al.* 1987, *May et al.* 1990), Behandlung von Pseudarthrosen durch *Schleberger und Senge* (*Schleberger und Senge* 1992), Anwendungen bei der Tendinosis calcarea durch *Loew und Jurgowski* (*Loew und Jurgowski* 1993) sowie die Behandlung des Fersensporns (*Perlick et al.* 1998) und des Tennisellenbogens.

Inzwischen ist die Stoßwellentherapie ein in der Orthopädie etabliertes Behandlungsverfahren (*Dahmen et al.* 1993, *Rompe et al.* 1997). Weitere Indikationen werden intensiv erforscht, wie z.B. die Behandlung der Hüftkopfnekrose (*Wang et al.* 2005, *Ludwig J. et al.* 2001) oder die unterstützende Anwendung bei Transplantationen von Hautlappen bei Wundheilungsstörungen (*Meirer et al.* 2005).

Gleichwohl ist der Wirkmechanismus der Stoßwelle bis heute nicht vollständig geklärt.

1.2 Die Physik der Stoßwelle

Im physikalischen Sinne ist eine Stoßwelle eine Longitudinalwelle, ähnlich einer Schallwelle. Das heißt, die Ausbreitungsrichtung der Wellenfront liegt parallel zur Schwingungsebene der Amplitude.

Kennzeichnend für eine Stoßwelle ist „eine sich räumlich ausbreitende abrupte, aber stetige Veränderung der thermodynamischen Zustandsgrößen Dichte, Druck und Temperatur eines Mediums“ (Krause 1997, S. 16).

Durchläuft eine Longitudinalwelle ein Medium, so kommt es in diesem Medium zu einer Folge von Verdichtungen im Druckanteil der Welle und zu Dilatationen im Zuganteil der Welle. Der Druck an einer bestimmten Stelle des Mediums verändert sich also stetig. Bei einer Schallwelle gegebener Frequenz entsteht so ein sinusförmiger Druckverlauf.

Kennzeichnend für die Stoßwelle sind ihre sehr kurze Periodendauer und ein extrem steiler Anstieg des Druckes. Dabei besteht eine Stoßwelle aber, anders als eine langdauernde Schallwelle, nur aus einer einzigen Periode (im Sinne eines einzigen Druckimpulses), weswegen bei einer Stoßwelle auch nicht die Frequenz der Welle als charakteristische Größe angegeben wird. Angaben zur Frequenz beziehen sich in der ESWT immer auf die Häufigkeit der Impulse pro Sekunde.

Stoßwellen dauern nur wenige Nano- oder Mikrosekunden. Innerhalb dieser Zeit erreicht der Druck im Wirkungsbereich der Welle Werte, die mehrere Megapascal (bei manchen Stoßwellengeneratoren bis zu 120 MPa) über dem Umgebungsdruck liegen. Nach Erreichen eines Spitzenwertes fällt der Druck exponentiell auf Werte, die weit unterhalb des Umgebungsdruckes liegen, also im Vergleich zum Ausgangsdruck negativ sind.

Bei einer Schallwelle hängt deren Ausbreitungsgeschwindigkeit von der Dichte und dem Druck innerhalb eines Mediums ab. In Stahl etwa (hohe Dichte) liegt die Schallgeschwindigkeit ungefähr 10-mal höher als in Luft (geringe Dichte). In tiefen Wasserschichten (hoher Druck) breitet sich der Schall schneller aus als in flachem Wasser (niedriger Druck).

Bei kleiner Amplitude einer Schallwelle ist die Geschwindigkeit der Welle im Medium konstant. Druck und Dichte des Mediums ändern sich in Abhängigkeit von der Schallenergie konstant und nahezu linear.

Bei einer Stoßwelle jedoch ändert sich der Druck im Medium extrem schnell. Nun durchläuft eine Schallwelle Bereiche eines Mediums mit hohem Druck schneller als Bereiche mit niederem Druck. Erhöhen also „frühe“ Anteile einer Schallwelle den

Druck im Medium, so werden diese Anteile durch den nun schneller laufenden „späten“ Teil der Welle eingeholt und überlagert. Durch diesen Prozess der sog. „Aufsteilung“ wird aus einer sinusförmigen Schallwelle eine sägezahnförmige Stoßwelle. Die folgende Abbildung (Abb. 1) zeigt den Druckverlauf einer Stoßwelle in Wasser:

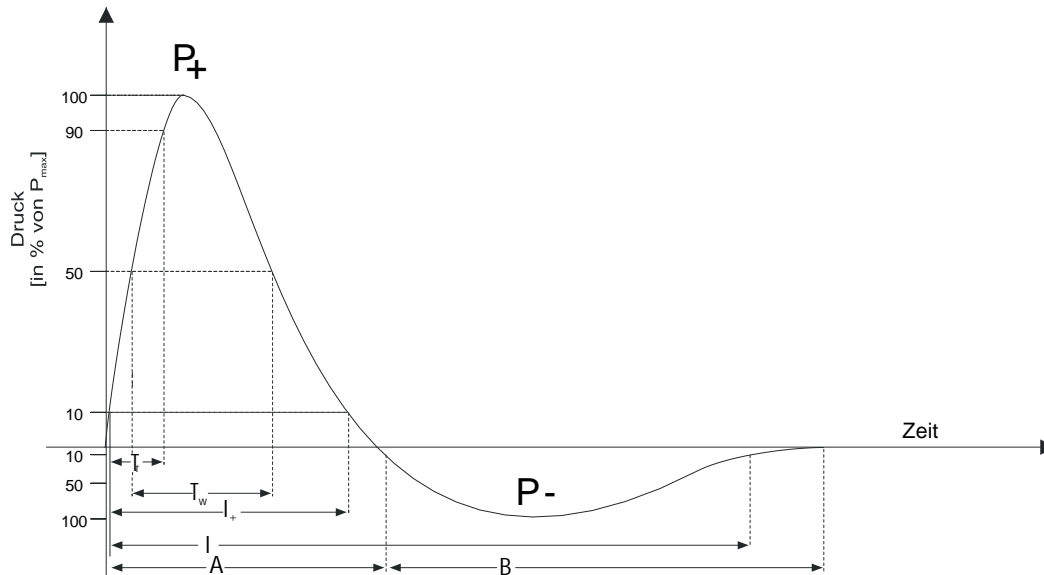


Abb. 1 Druckverlauf einer Stoßwelle in Wasser

Graphische Darstellung einer standardisierten Stoßwelle. Der Stoßwellendruck ist als Funktion der Zeit aufgetragen.

A erster Teil der Stoßwelle mit positivem Druck

B zweiter Teil der Stoßwelle mit negativem Druck

P_+ positiver Spitzendruck

P_- negativer Spitzendruck

T_r Anstiegszeit

T_w Pulsbreite

I_+ Standardzeitintervall (zur Berechnung der „positiven“ Energie)

I Standardzeitintervall (zur Berechnung der „totalen“ Energie)

1.3 Physikalische Parameter der Stoßwelle

Folgende Eigenschaften charakterisieren eine Stoßwelle und ihren Fokus (Gerdsmeyer et al. 2002, S. 612):

- **Positiver Spitzendruck:** Die Differenz zwischen dem maximalen Druck im Fokus und dem Umgebungsdruck.
- **Negativer Spitzendruck:** Die Differenz zwischen dem minimalen Druck im Fokus und dem Umgebungsdruck.

- n **Anstiegszeit:** Die Zeit, in der der Druck von 10 % auf 90 % des Spitzendruckes ansteigt (üblicherweise zwischen 1 und 500 ns).
- n **Pulsbreite:** Die Zeit, die zwischen dem Erreichen von 50 % des maximalen Druckes im Anstiegsteil der Druckkurve und dem Abfallen auf 50 % des maximalen Druckes im abfallenden Schenkel der Druckkurve liegt.

1.3.1 Fokus der Stoßwelle

Der Fokus einer Stoßwelle hat zumeist die Form eines Rotations-Ellipsoids und wird daher eindeutig durch die drei Halbachsen x , y und z beschrieben. Es existieren 3 Definitionen des Stoßwellenfokus:

Eine Definition des Fokus bezeichnet denjenigen Raum, in dem mindestens 50 % des maximalen Spitzendruckes erreicht werden. Daher wird dieser Bereich auch als -6 dB Fokus oder $f_{-6\text{dB}}$ bezeichnet.

Eine zweite Definition gibt als Fokus denjenigen Bereich an, in dem der Druck mindestens 5 MPa erreicht (und bedarf daher einer absoluten, und damit aufwändigeren Messapparatur). Dieser Fokus hat dann die Bezeichnung $f_{5\text{MPa}}$.

Der 5mm-Fokus beschreibt schließlich einen Bereich, der den Stoßwellenfokus als räumliche Ausdehnung in Bezug zu seiner Längsachse angibt. Die meisten Zielgeräte, mit denen der Stoßwellenfokus im Gewebe ausgerichtet wird, verfügen über eine Genauigkeit in dieser Größenordnung, weswegen diese Definition für den alltäglichen Gebrauch in der Praxis hilfreich ist (*Gerdesmeyer et al.* 2002, S. 612).

1.3.2 Energieflussdichte

Die Energieflussdichte (EFD), angegeben in mJ/mm^2 , ist der Energiebetrag, der während der Stoßwellendauer auf einer Fläche von 1 mm^2 im Stoßwellenfokus gemessen werden kann. Bei der Angabe der Energieflussdichte ist außerdem anzugeben, nach welcher Fokusdefinition die EFD berechnet wurde. Die EFD ist dabei das Quadrat der Fläche unter der Druck-Zeit-Kurve der Stoßwelle im Fokus.

1.3.3 Erzeugung der Stoßwelle

Die drei wichtigsten Verfahren zur Erzeugung einer Stoßwelle sind das elektrohydraulische, das piezoelektrische und das elektromagnetische Verfahren.

Gemeinsames Ziel aller Verfahren ist die Generierung eines sich extrem schnell ausbreitenden Druckimpulses.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Stoßwellengenerator „Compact Alpha“ der Firma Dornier Medtech wird das elektromagnetische Verfahren eingesetzt:

Die elektromagnetische Stoßwellenerzeugung (EMSE) funktioniert ähnlich wie ein Lautsprecher. Eine spiralförmig gewickelte Spule ist, von einer dünnen Isolierschicht getrennt, an einer dünnen, metallischen und leitenden Membran angebracht. Durch die Spule werden kurze Stromimpulse geschickt. In der metallenen Membran werden durch das in der Spule entstehende elektrische Feld Wirbelströme erzeugt, die ihrerseits ein Magnetfeld erzeugen, welches dem in der Spule herrschenden Magnetfeld entgegengesetzt ist. Die beiden Magnetfelder stoßen sich gegenseitig ab, es kommt zu einer impulsartigen Auslenkung der Membran. Diese kurze Auslenkung komprimiert das umgebende Medium so schnell, dass die Voraussetzungen zur Erzeugung einer (zunächst planen) Stoßwelle gegeben sind. Mittels parabolischer Reflektoren oder akustischer Linsen kann die plane Stoßwelle fokussiert werden.

1.4 Physikalische Effekte der Stoßwelle

Wesentlich für das Verständnis der Stoßwellenwirkung ist die Kenntnis der physikalischen Effekte, die eine Stoßwelle hervorruft:

Die Kavitation scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen (*Fischer et al.* 1988; *Coleman et al.* 1987, *Delius et al.* 1990).

1.4.1 Entstehung von Kavitationsblasen

Hervorgerufen durch den Unterdruck im Zuganteil der Welle sinkt der Siedepunkt der durchlaufenen Flüssigkeit. Es entstehen Dampfblasen, die sich mit hoher Geschwindigkeit ausdehnen. Diese Ausdehnung kann so schnell geschehen, dass sie ausreicht, um weitere Mikrostoßwellen zu generieren. Da der Umgebungsdruck der Dampfblase nach durchlaufen der Stoßwelle rasch wieder ansteigt (und die Flüssigkeit kondensiert), kollabieren die Dampfblasen extrem schnell. Dabei werden die umgebenden Wassermoleküle auf so hohe Geschwindigkeiten beschleunigt, dass im Zentrum der ehemaligen Dampfblase Energien erreicht werden, die ausreichen, freie Radikale entstehen zu lassen. Hat sich die Dampfblase an einer Grenzfläche gebildet, beispielsweise an einem Knochen, so kollabiert die Blase asymmetrisch. Es bildet sich ein so genannter „Jetstream“ aus, der von der sphärischen Seite der Blase auf die Grenzfläche hin gerichtet ist. Diese Jets sind zwar außerordentlich klein (nur wenige zehntel oder hundertstel Millimeter Durchmesser), haben aber eine Ge-

schwindigkeit, die weit über der Schallgeschwindigkeit, im Bereich von bis zu 800 m/s liegt. Dies entspricht in etwa der Geschwindigkeit einer Gewehrkugel. *Sass et al.* konnten zeigen, dass diese kavitationsbedingten Effekte bei der Steinertrümmerung neben Reflexions- und Absorptionseffekten bedeutsam sind (*Sass et al.* 1992).

Ferner kennt man indirekte kavitationsbedingte Effekte durch Ausdehnung und Oszillation gasgefüllter Hohlräume, die als Kavitationskeime vorexistieren. Dabei dehnt der Zuganteil der Stoßwelle eine Blase aus, die durch den nachfolgenden Druckanteil der nächsten Welle implosionsartig kollabiert. Haftet eine solche oszillierende Kavitationsblase an einer Oberfläche, so entstehen Scherkräfte, die das Material schwächen und zerstören.

Diese hohen Geschwindigkeiten und die dabei auftretenden Temperaturänderungen von mehreren 100 °C innerhalb sehr kurzer Zeit bedingen die Bildung von freien Radikalen (*Henglein et al* 1988, *Morgan et al.* 1988). Diese sind bekanntlich extrem reaktionsfreudig und können so organisches Gewebe erheblich schädigen (*Suhr et al.* 1991).

1.4.2 Scherkräfte

Kennzeichnend für eine Longitudinalwelle ist, dass sie ein Medium, welches sie durchläuft, in ihrem Druckteil staucht und in ihrem Zugteil dehnt. Diese Verformungen haben nur äußerst kleine Ausdehnungen. Geschehen sie jedoch schnell, häufig und in rascher Folge (d.h. in hoher Impulsfrequenz), werden Scherkräfte summativ wirksam, die ebenfalls zu Destruktionen von Materialien oder Gewebe führen können.

1.4.3 Reflexion

Durchläuft eine Stoßwelle zwei Medien unterschiedlicher Impedanz, so wird ein Teil der Welle (und damit der Energie) an der Grenzfläche der beiden Medien reflektiert.

Nach den Gesetzen von *Snellius* erhalten positive Druckanteile einer Welle ein negatives Vorzeichen, wenn die Reflexion an einer Grenzfläche erfolgt, an der die Schallwelle von einem Medium hoher Impedanz in ein Medium niedriger Impedanz läuft. In einem solchen Falle werden also Druckanteile zu Zuganteilen. Dieser Sachverhalt wird durch den Hoppkins-Effekt gekennzeichnet: Demnach löst sich ein Konkrement nicht von der Schalleintrittsstelle her auf, sondern von der Rückseite, also der Seite, von der die Welle reflektiert wird. Hier wird der Druckanteil zum Zuganteil. Die Zugfestigkeit des Steins wird überschritten, er zerfällt (*Delius et al.* 1988).

Nun haben organische Gewebe wie Knochen, Muskeln, Sehnen oder Bakterienzellen andere Impedanzen als Wasser, weswegen der Hoppkins-Effekt auch dort bedeutsam ist.

1.4.4 Thermische Effekte

Untersuchungen von *Lovasz et al.* haben gezeigt, dass sich ein Stein oder ein Gewebe während einer Stoßwellenbehandlung nur um bis zu 2 °C erwärmt (*Lovasz et al.* 1999). Thermische Effekte (hervorgerufen durch Schallabsorption) scheinen daher keine oder nur eine geringe direkte Rolle zu spielen. Allerdings kann durch die Gewebeerwärmung die lokale Durchblutung gefördert werden.

1.5 Biologische Effekte der Stoßwelle an Zellen und Bakterien

Bis jetzt gibt es nur wenige Studien, die den Einfluss der Stoßwelle auf die einzelne Zelle untersuchen. Die allermeisten Studien untersuchten dabei den Effekt auf eukaryotische Zellen. Zwar gibt es auch vereinzelte Arbeiten, in denen der Einfluss der Stoßwelle auf eine Bakteriensuspension untersucht wurde (*von Eiff et al.* 2000, *Kerfoot et al.* 1992), Studien über den Einfluss von Stoßwellen auf einzelne Bakterienzellen fehlen aber bisher.

Die Erkenntnisse, die über das Verhalten von eukaryotischen Zellen unter Stoßwellenapplikation gewonnen wurden, lassen sich nicht einfach auf prokaryotische Zellen übertragen. So konnte *Steinbach et al.* zeigen, dass die Mitochondrien von Prostatakarzinom-Zellen nach Behandlung mit extrakorporalen Stoßwellen eine deutliche Beschädigung aufweisen. Bei einer Energieflussdichte von 0,5 mJ/mm² und mehr konnten auch morphologische Veränderungen am Zellkern nachgewiesen werden (*Steinbach et al.* 1992). Bekanntlich verfügen Bakterien aber nicht über solche Zellorganellen. Andererseits verfügen die meisten bei Knocheninfektionen relevanten Bakterien über eine Mureinschicht, die bei gram-positiven und gram-negativen Zellen zudem unterschiedlich stark ausgebildet ist. Diese Mureinschicht verleiht den Bakterien im Vergleich zu eukaryotischen Zellen eine außerordentliche mechanische Stabilität.

Haake et al. konnten zeigen, dass die Anwendung von Stoßwellen auf Kulturen von Knochenmarkszellen zumindest *in vitro* eine deutliche Störung und Auflösung der Zellverbände hervorrufen kann. Die Autoren konnten nachweisen, dass die von ihnen

verwendeten Knochenmarkszellen schon bei einer niedrigen Energieflussdichte morphologisch verändert wurden (*Haake et al.* 1999). Auch wenn sie in ihrer Studie keinen Nachweis für eine direkte Zellzerstörung erbringen konnten, so wurde dieser Effekt in der Arbeitsgruppe um *Gambihler* durchaus beobachtet (*Gambihler et al.* 1990). Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass in einer Kultur aus Leukämiezellen von Mäusen (Zellen des Stammes *L1210*) die Haupteffekte der Stoßwelle auf eukaryotische Zellen in Zellzerstörung, Membrandefekten und verminderter Proliferationsfähigkeit bestehen. Zudem konnte sie beobachten, dass zytodestructive Effekte der Stoßwelle erst ab einer Energieflussdichte von $0,4 \text{ mJ/mm}^2$ auftreten. Dies steht in Einklang mit der Arbeit von *Haake*, der bei seinen Versuchen nur eine maximale Energieflussdichte von $0,25 \text{ mJ/mm}^2$ verwendet hat. *Haake* konnte daher keine primär zytodestructiven Effekte nachweisen.

Besonders zu erwähnen ist eine Studie von *Martini et al.* welche zeigen konnten, dass der Proteinmetabolismus durch die Stoßwelle sowohl positiv als auch negativ beeinflusst werden kann. In einer Kultur aus Schaf-Osteoblasten konnte nachgewiesen werden, dass die Proteinbiosynthese bei hohen Energieflussdichten (bis $0,4 \text{ mJ/mm}^2$) deutlich reduziert werden kann, während niedrigere Energieflussdichten um $0,15 \text{ mJ/mm}^2$ die Biosynthese von manchen Proteinen anregen (*Martini et al.* 2003).

Alle diese Effekte wurden bisher ausschließlich in vitro in Flüssigkeiten und an eukaryotischen Zellen untersucht. Für Bakterien gibt es diesbezüglich bislang keine Daten. Dies ist umso erstaunlicher, als gerade in der Urologie Bakterien häufig im Wirkungsbereich der Stoßwelle zu finden sind, z.B. bei Infektsteinen. Die Notwendigkeit einer antibiotischen Abdeckung bei einer Stoßwellentherapie wird dabei kontrovers diskutiert (*Deliveliotis et al.* 1997; *Pearle und Roehrborn* 1997; *Pettersson und Tiselius*, 1989; *Kullmann et al.* 1995; *Westh et al.* 1990). Zudem gilt in der Urologie wie in der Orthopädie das Vorhandensein von (manifesten) Infekten im Wirkungsbereich der Stoßwelle als klare Kontraindikation für ihre Anwendung, wie z.B. bei einer infizierten Pseudarthrose.

1.6 Fragestellung

In dieser Arbeit sollte der Einfluss der ESW auf die Vitalität von verschiedenen, in der Knochenpathologie bedeutsamen Bakterien untersucht werden. Dabei sollte speziell

die Bedeutung der beiden Größen Impulszahl und Energieflussdichte ermittelt werden. Ferner sollte untersucht werden, ob es Mindestenergien für eine Wirksamkeit der ESW gibt.

Ferner sollte untersucht werden, welche Veränderungen auf zellulärer Ebene stattfinden. Insbesondere sollten die Permeabilitätseigenschaften der Bakterienzelle nach einer Behandlung mit ESW untersucht werden.

Analog zu Untersuchungen, die Synergismen zwischen Zytostatika und ESW auf Tumorzellen untersuchten, sollte weiterhin am Beispiel des intrazellulär wirkenden Gentamicin gezeigt werden, ob Antibiotika unter Einfluss der ESW an Wirksamkeit verlieren, ob sich die Empfindlichkeit von Bakterien, die mit ESW behandelt wurden, verändert und ob ein Antibiotikum, welches während der ESW appliziert wird, synergistisch zur Stoßwelle wirkt.

2 Material

2.1 Stoßwellengenerator

- n Alpha Compact

Dornier Medtech, Weßling, Deutschland

- n Ultraschallgel

TMP Tüshaus Medical Products GmbH, Velen-Ramsdorf, Deutschland

2.2 Bakterienstämme

Referenzstämme der "American Type Culture Collection."

- n ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*
- n ATCC 35984 *Staphylococcus epidermidis*
- n ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*
- n ATCC 6057 *Enterococcus faecium*
- n ATCC 27065 *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistent (MRSA)

*Freundlicherweise durch Prof. Dr. med. Ines Kappstein,
Abteilung für Infektionshygiene des Instituts für Medizinische Mikrobiologie,
Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München, zur Verfü-
gung gestellt.*

2.3 Spül- und Waschflüssigkeit

- § Steriles NaCl, 0,9%,

B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

- § PSB-Puffer

NaCl 8 g

KCl 0,2 g

Na₂HPO₄ 1,15 g

KH₂PO₄ 0,2 g

Mit Aqua dest. auffüllen auf 1.000 ml

§ TRIS-Puffer

6,1 g Tris-hydroxymethylaminomethanat

8,8 g NaCl

ca. 37 ml 1mol HCL

Mit Aqua dest. auffüllen auf 1.000 ml

n Aqua dest.

B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

n Entgastes Wasser

Delta Select, Dreirich, Deutschland

2.4 Nährlösungen und Agarplatten

n Tryptic Soy Broth (TSB),

n Cation Adjusted Müller Hinton Broth (CAMHB),

n Müller-Hinton II Agar-Platten

n McConkey Agar-Platten

Becton Dickinson Labware, Le Pont De Claix, Frankreich

2.5 Farbstoffe

n Sytox Green Nucleic Acid Stain

Molecular Probes, Leiden, Niederlande

n Ethidiumbromid

Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.6 DNA- Untersuchungen

n Genomische humane dsDNA, 4300 bp,

Freundlicherweise durch Prof. Dr. rer. nat. M. Schmitt

Klinische Forschungsgruppe der Klinik für Frauenheilkunde

TU München, zur Verfügung gestellt.

n Lysostaphin 2000 U/mg,

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

n DNeasy® Tissue Kit

Qiagen, Versmold, Deutschland

n Im DNeasy® Tissue Kit enthaltenes Material

DNeasy Mini Spin Säulen

2 ml Sammel-Röhrchen

Puffer ATL

Puffer AL

Puffer AE

Proteinase K

Puffer AW1

Puffer AW2

Vor Gebrauch wurden die konzentrierten Puffer AW1 und AW2 mit Ethanol verdünnt (dazu ist eine Füllmarke auf den jeweiligen Flaschen angebracht).

2.7 Gel-Elektrophorese

n 10 x TBE Puffer

892 mM Tris 108 g

899 mM Borste 550 g

25 mM EDTA 9,3 g

Mit Aqua dest. auf 1.000 ml auffüllen (entspricht 1 x TBE- Puffer)

10 x TBE Puffer: 1 x TBE-Puffer 1:10 mit Aqua dest. verdünnen

§ Agarose

n Loading Buffer

n 10 kB Marker

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

2.8 REM- Untersuchungen

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

§ Lösung B: 25,2 g NaOH auf 1000ml Aqua dest.

§ Glutaraldehyd 25 %

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

§ Fixierlösung:

830 ml Lösung A und 170 ml Lösung B;

24+1 mit Glutaraldehyd mischen

2.9 Versuchsgefäße

- n Pasteurpipetten, Weichplastik 5 ml, Durchmesser 12,5 mm
Micro-Bio-Tec-Brand, Siegen, Deutschland
- n Sterile Reaktionsgefäße, 2,0 ml (Eppendorfcups)
Biozym, Oldendorf, Deutschland
- n Falcon Polypropylen Conical Tubes 15 ml und 50 ml
Becton Dickinson Labware, Le Pont De Claix, Frankreich

2.10 Ausimpfen

- n Impfschlinge 10 µl
Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
- n Zellkultur-Testplatte 96 F
Nunc, Wiesbaden, Deutschland

2.11 Mess- und Laborgeräte

- n Hettich Rotanta 46 RC (Zentrifuge für Bakteriensuspension)
- n Hettich EBA 12 (Zentrifuge für DNA- Isolierung)
Hettich, Bäch, Schweiz
- n FE REM Leo 1530
Zeiss, Oberkochen, Deutschland
- n FT-IR Infrarotspektrometer Avatar 370 FT-IR
Thermo Nicolet, Neu-Isenburg, Deutschland
- n Densimat
bioMérieux sa France, Marcy-l'Étoile, Frankreich
- n Plattenlesegerät Multiskan Ascent
Thermo LabSystems, Dreirich, Deutschland
- n Plattenlesegerät Wallac 1420 VICTOR
PerkinElmer Life and Analytical Sciences Inc. Boston, USA

3 Methoden

3.1 Grundsätzliche Methoden der Bakterienbehandlung und Versuchsaufbau

3.1.1 Herstellen der Nährlösungen TSB (Tryptic Soy Broth) und CAMHB (Cation Adjusted Müller Hinton Broth)

37g TSB-Pulver bzw. 21 g CAMHB-Pulver wurden in 1 Liter Aqua dest. aufgelöst und bei 121 °C 20 Minuten lang sterilisiert. Die fertige Lösung kann im Kühlschrank mehrere Tage aufbewahrt werden. Vor jeder Verwendung war diese Stammlösung auf sichtbare Trübung oder Flockung zu überprüfen. Im Rahmen der Qualitätskontrolle wurden bei Ansetzen der Bakteriensuspension in einem separaten Falcon-Röhrchen ca. 10 ml fertige, nicht beimpfte Nährlösung als Sterilitätskontrolle ohne Bakterienbeimpfung zusammen mit den Versuchs- und Kontrollreihen mitbebrütet.

3.1.2 Herstellen der Bakterienlösung

Sämtliche zu verwendenden Bakterienstämme wurden zunächst auf einem geeigneten Nährboden (Müller Hinton II oder McConkey oder Blutagar) für 24-36 h bei 36 °C zu sichtbaren Kolonien angezüchtet und bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C gelagert. Ein Falcon-Röhrchen wurde mit ca. 10 ml TSB befüllt. Mittels einer sterilen Impföse wurden nun 1-2 Kolonien gleicher Größe des zu behandelnden Bakterienstammes von der Agarplatte in die vorbereitete Lösung gegeben. Die Lösung wurde 20 Sekunden gevortext und sollte dann keine sichtbaren Partikel mehr aufweisen. Anschließend erfolgte die Bebrütung über 24 h bei 37 °C.

Nach Bebrütung wurde eine Kontrollausimpfung auf Müller-Hinton-Agar durchgeführt um die Lösung auf Verunreinigungen durch andere Keime zu überprüfen.

Die deutlich trübe Suspension wurde zentrifugiert (4000 rpm, 4 min), der Überstand durch sterile, physiologische Kochsalzlösung ersetzt und das Pellet durch ausreichendes Vortexen wieder in Suspension gebracht. Dieser Vorgang wurde insgesamt 3-mal wiederholt.

3.1.3 Standardsuspension 1

Ca. 0,5 ml der in 3.1.2 erstellten Suspension wurden in ein Flachboden-Reagenzglas eingefüllt. Durch Verdünnen mit sterilem NaCl (oder Nährlösung, je nach Versuch)

wurde eine Trübheit (Turbidity) von 0,5 McFarland-Einheiten eingestellt. Die optische Dichte konnte mit dem Densimaten ermittelt werden. Eine Trübheit von 0,5 McFarland-Einheiten entspricht ca. $2,5 \times 10^7$ KBE/ml Suspension. Diese Suspension wird im Folgenden als **Standardsuspension 1** bezeichnet.

3.1.4 Standardsuspension 2

Die Standardsuspension 1 wurde für einzelne Versuche mittels einer Verdünnung 1:5 auf eine endgültige Konzentration von 5×10^6 KBE/ml gebracht.

Als Verdünnungsmedium diente, abhängig vom durchzuführenden Versuch, physiologische NaCl-Lösung oder Nährlösung (siehe hierzu die entsprechenden Versuchsbeschreibungen). Diese Lösung wird im Folgenden als **Standardsuspension 2** bezeichnet.

3.1.5 Befüllen der Versuchsgefäße

Weiche Pasteurpipetten aus Kunststoff wurden mit ca. 5 ml der Versuchssuspension (Standardsuspension 1 oder 2) gefüllt und durch Zuschmelzen des Pipettenhalses wasser-, luft- und druckdicht verschlossen.

3.1.6 Nachweis der Dichtigkeit der Pipetten

Die Pipetten wurden mit hochkonzentriertem Alzerinrot befüllt, verschlossen und bei der höchstmöglichen Energieflussdichte ($0,96 \text{ mJ/mm}^2$) mit 4000 Impulsen und 2 Hz jeweils einzeln behandelt ($n = 4$). Nach Behandlung wurden die Pipetten zunächst unter leichtem Fingerdruck per Augenschein auf sichtbare Leckagen untersucht.

Vor und nach jedem Versuch wurden vier Wasserproben (je 200 μl) aus dem Wassertank des Stoßwellengenerators photometrisch auf ausgetretenen Farbstoff untersucht. Dazu wurde die Extinktion der Wasserproben mit dem Plattenlesegerät Multiskan Ascent bei 560 nm gemessen.

Nach jedem Versuch wurde der Wassertank gespült und mit frischem entgastem Wasser befüllt

3.1.7 Behandlung der Bakterien

Ein Probenbehälter gehört zur Serienausstattung des Generators. Dieser Probenbehälter besteht aus einem Wassertank, der mittels eines Kopplungsgels akustisch mit dem Kopplungskissen verbunden und am Stoßwellengenerator befestigt wird. Im Deckel des Wassertanks befindet sich der eigentliche Probenbehälter. Er fixiert ein

feines Drahtnetz so im Wassertank, dass es ein Körbchen bildet, welches genau am unteren Ende des Fokusbereichs der Stoßwelle liegt.

Die Pipetten wurden mittels eines Schaumgummiringes genau in der Mitte des Probenhalters fixiert. Die Pipetten entsprachen in etwa der Ausdehnung des Fokus. So war gewährleistet, dass die gesamte Probe während des Versuches im Fokus, und damit im Feld der maximalen Energie lag (Abb. 2 und Abb. 3)

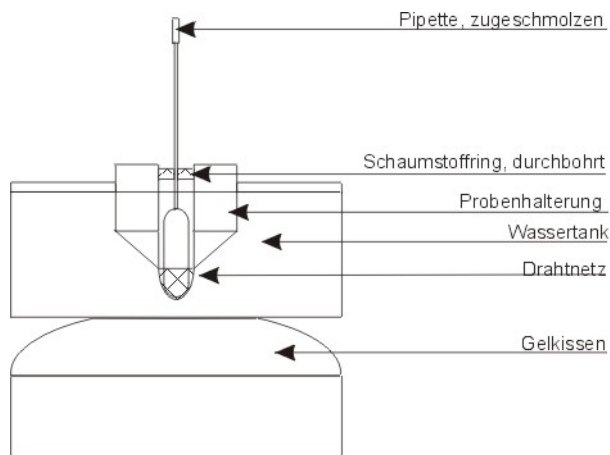


Abb. 2 Schematischer Aufbau des Probenhalters

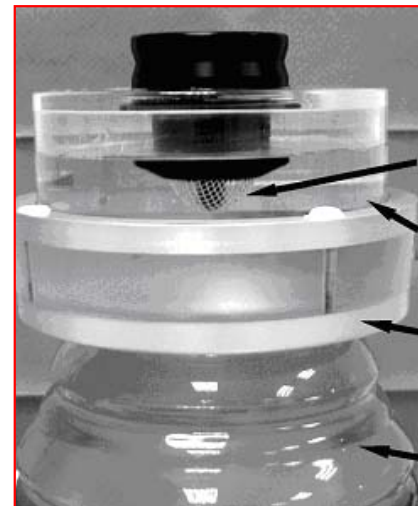


Abb. 3 Probenhalter

Die Tabelle 1 zeigt die physikalischen Parameter der verwendeten Energiestufen. Die Impulszahl konnte frei gewählt werden. Bei allen durchgeführten Versuchen wurde eine Impulsfolgefrequenz von 2 Hz, also 120 Impulsen pro Minute gewählt.

Tabelle 1 Physikalische Parameter der Stoßwelle

Energiestufe	Maximaler Druck P+ (MPa)	Energieflussdichte ED (mJ/mm ²)	Energie E(12mm) (mJ)
1	16,0 MPa	0,11 mJ/mm ²	7,0 mJ
2	22,5 MPa	0,22 mJ/mm ²	15,3 mJ
3	41,0 MPa	0,38 mJ/mm ²	25,5 mJ
4	48,0 MPa	0,59 mJ/mm ²	39,0 mJ
5	52,0 MPa	0,72 mJ/mm ²	52,0 mJ
6	55,0 MPa	0,96 mJ/mm ²	70,0 mJ

3.1.8 Ausimpfen der Bakterien

Wenn in den folgenden Versuchsbeschreibungen nicht anders erwähnt, wurden alle Suspensionen nach der Stoßwellenbehandlung nach der folgenden Art und Weise verdünnt und ausgeimpft.

Nach dem Öffnen der Pipetten durch Abschneiden des versiegelten Halses wurden zunächst einige Tropfen Suspension verworfen. Dadurch wurde vermieden, dass Flüssigkeit, die während des Beschusses im Pipettenhals aufgestiegen war und damit nicht mehr im Fokus der Stoßwelle lag, das Ergebnis verfälscht.

Beide Suspensionen (Kontrolle und Versuch) wurden dann auf einer Zellkulturplatte im Verhältnis 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 und 1:100.000 mit steriler isotoner Kochsalzlösung verdünnt. Jeweils 100 µl einer jeden Verdünnungsstufe wurden auf eine Hälfte einer Agarplatte ausgeimpft. Nach einer Bebrütung über 48 h bei 37 °C wurden die Kolonien ausgezählt.

3.1.9 Wachstumskontrolle

Um die Zeit zu bestimmen, nach der kein Wachstum mehr statt findet, wurden Platten mit behandelten und unbehandelten Bakterien (0,96 mJ/mm², 4000 Impulse, n=5, unbehandelte Kontrollgruppe) über insgesamt 5 Tage bebrütet und die Kolonienzahl regelmäßig überprüft.

3.2 Entwicklung der KBE in Bakteriensuspensionen nach ESW-Behandlung

Bei den Versuchen, die den Einfluss der ESW auf die Anzahl der KBE in einer NaCl-Suspension untersuchen, wurde folgendermaßen verfahren:

Mit der angefertigten Suspension (Standardsuspension 2) wurden 10 Pipetten (5 Kontrollen, 5 Versuche) befüllt und in 4 °C kaltem Wasser gelagert um eine Proliferation der Bakterien zu vermeiden.

Nacheinander wurden die Pipetten dann der ESW-Behandlung zugeführt (s. o.). Während der Behandlung einer Pipette befand sich eine Pipette der Kontrollgruppe ebenfalls im Wassertank, aber außerhalb des Fokus. Unmittelbar nach der Behandlung erfolgte die Ausimpfung der Kontroll- und Versuchsgruppen auf Agarplatten.

Bei Übersteigen der Wassertemperatur im Wassertank (Abwärme des Generators) von 20 °C wurde das Wasser gewechselt.

Die folgenden Tabellen zeigen eine Übersicht über die verwendeten Keime und die jeweils verwendeten physikalischen Parameter.

Tabelle 2 Übersicht über Keime und verwendete Parameter

EFD	Impulszahl					
	1000	2000	3000	4000	5000	6000
0,96 mJ/mm ²	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>		
				<i>S. epidermidis</i>		
				<i>E. faecium</i>		<i>E. faecium</i>
				MRSA		

Impulszahl	EFD			
	0,38 mJ/mm ²	0,59 mJ/mm ²	0,72 mJ/mm ²	0,96 mJ/mm ²
4000	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
12000		<i>S. aureus</i>		

3.3 Extrakorporale Stoßwelle und Antibiotikum

3.3.1 Herstellen einer Antibiotikum-Lösung

Das Gentamicin lag in kliniküblicher Menge und einer Konzentration von 40 mg/ml in einer Glasampulle vor. Davon wurde durch 1:40 Verdünnung eine Lösung in isotoner NaCl-Lösung hergestellt, die eine Konzentration von 1 mg Gentamicin pro ml Lösung enthielt. Diese Stammlösung wurde in allen folgenden Versuchen verwendet.

3.3.2 Wirkung von extrakorporalen Stoßwellen auf Gentamicin

Bei diesem Versuch sollte untersucht werden, ob Gentamicin in seiner biologischen Wirksamkeit verändert wird, wenn es der ESW ausgesetzt wird.

5 Pasteurpipetten wurden mit einer Gentamicinlösung (1mg / ml) befüllt und wie folgt behandelt:

- 3 Pipetten wurden mit 4000 Impulsen bei 0,38 mJ/mm² behandelt,
- 3 Pipetten wurden mit 4000 Impulsen bei 0,96 mJ/mm² behandelt,
- 1 Pipette wurde während der Behandlung im Wassertank außerhalb des Fokus gehalten
- 1 Pipette wurde während der Versuche bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Nach der Behandlung wurde das Gentamicin den im Folgenden beschriebenen Untersuchungen unterzogen (3.3.2.1 und 3.3.2.2) um die antibiotische Wirksamkeit im Vergleich zu unbehandeltem Gentamicin zu untersuchen.

3.3.2.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die hier geschilderte „Macrodilution Method“ ist ein etabliertes Verfahren, um die minimale Hemmkonzentration eines Antibiotikums zu ermitteln. Die MHK ist die niedrigste Konzentration einer antibakteriellen Substanz, bei der unter definierten Bedingungen kein Wachstum der Bakterien in Suspension mehr stattfindet, die Bakterien aber noch nicht abgetötet werden.

Die Versuchsreihen wurden 2-mal durchgeführt, dabei erfolgte je Probe eine 3-fach-Bestimmung. Die Bestimmung der MHK erfolgte nach den Richtlinien der NCCLS (NCCLS, 2000). Da die NCCLS als wirksamen Bereich von Gentamicin gegenüber *S. aureus* eine Konzentration von $< 4 \mu\text{g/ml}$ angibt, wurden die Konzentrationen $0,063 - 16 \mu\text{g/ml}$ getestet.

Zunächst wurden 15 Reihen mit je 11 Reagenzgläsern aufgestellt. In Glas 1 jeder Reihe wurden 1,968 ml CAMHB gefüllt. In die Gläser 2 bis 11 jeder Reihe wurde jeweils nur 1 ml CAMHB gefüllt. Für die Reihen 1-3 wurden 3 Proben gekühltes, nicht behandelte Gentamicin verwendet. Für die Reihen 4-6 wurde das unbehandelte Kontroll-Gentamicin, welches im Wassertank außerhalb des Fokus lag, verwendet. Für die Reihen 7-9, 10-12, und 13-15 wurde das behandelte Gentamicin verwendet. Dabei wurde jede Probe 3-mal getestet.

Nun wurde bei allen 15 Reihen wie folgt vorgegangen: In Glas 1 wurden $32 \mu\text{l}$ Gentamicin ($C=1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) gegeben. Nach gründlichem Mischen wurde aus diesem Glas 1 ml entnommen und in Glas 2 gegeben. Hieraus wurde wieder nach gründlichem Mischen 1 ml in Glas 3 gefüllt. Nacheinander wurde dieser Schritt bis zum Glas 9 wiederholt. Die Gläser 10 und 11 blieben als Sterilitätskontrolle bzw. Wachstumskontrolle frei von Antibiotikum.

Von einer Blutagar-Platte wurde eine Kolonie *S. aureus* (ATCC 25923) in ca. 5 ml CAMHB gegeben, und unter langsamem Schütteln im Brutschrank bei 37°C bebrütet, bis sich eine sichtbare Trübung eingestellt hatte. Von dieser Suspension wurde mittels physiologischer Kochsalzlösung eine Suspension mit 0,5 McFarland Einheiten (entsprechend ca. $2,5 \times 10^7$ KBE/ml) erstellt und diese mit CAMHB weiter auf $5 \cdot 10^6$ KBE/ml verdünnt.

Aus dieser Lösung wurden jeweils $100 \mu\text{l}$ zu den Reagenzgläsern 1-10 aller Reihen zugegeben. Das 11. Glas wurde nicht beimpft, sondern diente zur Sterilitätskontrolle

(Negativkontrolle). Das 10. Glas, welches kein Gentamicin enthielt, diente zur Wachstumskontrolle (Positivkontrolle). Zur Befüllung wurde die Pipettenspitze knapp unterhalb des Meniskus ausgepresst; für jede Beimpfung wurde eine neue Pipettenspitze genommen.

Unmittelbar nach Beimpfung derjenigen Gläser, die der Wachstumskontrolle dienen, wurden daraus je 100 µl entnommen, im Verhältnis 1:500 mit NaCl verdünnt und davon 2 mal 100 µl auf zwei Agarplatten (Eichplatten) ausgeimpft. Nach Bebrütung über 48 h sollten die Agarplatten ca. 75-150 Kolonien zeigen. Dies entspricht einer Bakterienzahl von 5×10^5 KBE/ml - $7,5 \times 10^5$ KBE/ml in den Reagenzgläsern.

Alle Gläser wurden über 20 h bei 37 °C bebrütet. Nach 20 h wurde jedes Glas sanft gevortext, um Keime, die sich knapp unterhalb oder direkt am Meniskus festgesetzt hatten, wieder in Lösung zu bringen. Nach weiteren 4 Stunden Bebrütung wurde der Versuch ausgewertet. Jedes Glas wurde mit der Sterilitätskontrolle verglichen.

Die MHK war nun diejenige Konzentration, unter der sich kein sichtbares Bakterienwachstum und damit keine sichtbare Trübung im Vergleich zur sterilen Negativkontrolle mehr zeigte.

3.3.2.2 Physikalische Analyse des behandelten Gentamicins

Von den behandelten Gentamicinproben (0,38 mJ/mm² und 0,96 mJ/mm², jeweils 4000 Impulse, n=3) sowie von einer unbehandelten Probe wurden wenige µl auf einen Objektträger gegeben und bei Raumtemperatur eingetrocknet. Als Blindwert wurde ebenfalls eine Probe NaCl (die Trägerlösung) getrocknet. Die so getrocknete und kristallisierte Lösung wurde dann bei einer Wellenlänge von 542 nm - 4500 nm infrarotspektroskopisch untersucht. Dabei wurde die Absorption gemessen, die die zu untersuchende Probe bei jeder applizierten Wellenlänge hervorruft. Von diesen Messwerten wurden die Messwerte der eingetrockneten NaCl-Probe (Leerwert) subtrahiert. Durch Vergleich der Absorptions-Spektren konnte eine qualitative Aussage über die in der Probe vorhandenen Gentamicin-Moleküle und deren kovalente Bindungen getroffen werden.

3.3.3 Wirkung von Gentamicin auf vorbehandelte Bakterien

Mit diesem Versuch wurde getestet, ob sich die Empfindlichkeit von *S. aureus*, der mit der geringsten beginnend letalen Energiedosis behandelt wurde, gegenüber Gentamicin verändert. Als Kontrolle diente eine unbehandelte Bakteriensuspension.

Zunächst wurde eine Bakteriensuspension in NaCl erstellt, die ca. $5 \cdot 10^6$ KBE enthielt. Zunächst wurde der Bakteriengehalt dieser Suspension durch Ausplattieren verifiziert. Anschließend wurde diese Suspension auf 5 Kontroll- und 5 Test-Suspensionen aufgeteilt und in entsprechend viele Kunststoffpipetten gefüllt. Diese wurden verschlossen und bei $0,59 \text{ mJ/mm}^2$ mit 4000 Impulsen behandelt. Die unbehandelte Probe befand sich während der Behandlung im Wassertank, außerhalb des Fokus.

Sofort nach Behandlung wurde wiederum der Bakteriengehalt jeder Probe bestimmt. Durch Vergleich der Werte vor und nach der Stoßwellenbehandlung konnte untersucht werden, inwieweit sich die Anzahl an KBE in der Suspension durch die ESW-Applikation verändert hatte. Dies war bedeutsam, da die NCCLS definierte Bakterienkonzentration für die MHK-Bestimmung vorsieht, und gewährleistet sein musste, dass diese Konzentration trotz der Behandlung erreicht wurde. Mit der nun behandelten Probe wurde die MHK der Bakterien gegenüber Gentamicin getestet und mit der unbehandelten Kontrolle verglichen (vgl. 3.3.2.1). Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

3.3.4 Zusammenwirken von Stoßwelle mit Antibiotikum

Mit diesem Versuch sollte untersucht werden, ob sich bei der Anwendung von Antibiotikum und einer letalen Stoßwellenbehandlung synergistische Effekte hinsichtlich der Bakterizidität erreichen lassen. Dazu wurden zunächst die Einzelwirkungen von Antibiotika und ESW abgeschätzt, und schließlich kombinierte Versuche durchgeführt.

3.3.4.1 Bakterizide Wirkung von Gentamicin während der ESW- Applikationszeit

Zunächst wurden Antibiotikum-Lösungen in NaCl hergestellt. In diesem Versuch wurden stichprobenartig die Konzentrationen $0,25 \text{ } \mu\text{g/ml}$, $0,5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ und $2 \text{ } \mu\text{g/ml}$ getestet.

Aus dem vorliegenden frischen Gentamicin wurden zunächst durch Verdünnung mit NaCl Proben der Konzentration $100 \text{ } \mu\text{g/ml}$, $50 \text{ } \mu\text{g/ml}$ und $25 \text{ } \mu\text{g/ml}$ erstellt.

Synergistische Effekte zwischen Stoßwelle und Antibiotikum könnten vor allem während der Dauer der Stoßwellenbehandlung wirken. Bei den hier durchgeführten Behandlungsversuchen mit 4000 Impulsen lag die Versuchsdauer bei 2000 Sekunden,

also bei 33 Minuten und 20 Sekunden. Um zu überprüfen, ob das Antibiotikum in dieser Zeit auch allein einen bakteriziden Effekt entwickeln kann, wurden Suspensionen von *S. aureus* mit verschiedenen Konzentrationen des Gentamicins versetzt und für 33 Minuten bei 35 °C bebrütet.

Für diesen Versuch wurde eine Bakteriensuspension in CAMHB mit ca. 10^6 Keimen erstellt. Sodann wurde eine Zellkulturplatte mit 24 Wells vorbereitet: In die Wells der Reihe A wurden jeweils 0,25 µg Gentamicin (10 µl der Lösung mit 0,025 µg/µl), in die der Reihe B 0,5 µg Gentamicin (10 µl der Lösung 0,05 µg/µl) und in die der Reihe C 2 µg Gentamicin (20 µl der Lösung 0,1 µg/µl) gegeben. Reihe D enthielt kein Gentamicin (Wachstumskontrolle). In jedes Well der Reihen A und B wurden nun 890 µl, in die Wells der Reihe C 880 µl und in Reihe D 900 µl CAMHB gegeben. Anschließend wurde jedes Well mit 100 µl der vorbereiteten Bakteriensuspension aufgefüllt. Bei 35 °C wurde die Platte sodann 33 Minuten lang bebrütet, die Suspension anschließend seriell verdünnt, ausgeimpft und quantifiziert.

3.3.4.2 Wirkung der ESW auf Bakterien unter wachstumsfördernden Bedingungen

Bei diesem Versuch wurden nun Bakteriensuspensionen untersucht, die einer Behandlung mit 4000 Impulsen bei 0,59 mJ/mm², 0,72 mJ/mm² und 0,96 mJ/mm² in CAMHB einer Temperatur von ca. 35 °C ausgesetzt waren. Mit den korrespondierenden Parametern sollten im Anschluss die Effekte einer gleichzeitigen ESW- und Antibiotika-Applikation ermittelt werden. Der Stoßwellengenerator ist in der Lage, die Wassertemperatur im Wassertank konstant bei ca. 35 °C zu halten. Der Wassertank des Stoßwellengenerators wurde vor dem Versuch mit angewärmtem entgastem Wasser gefüllt.

Zunächst wurde eine Bakteriensuspension aus *S. aureus* in CAMHB mit einer Konzentration von ca. 10^6 KBE/ml erstellt. Durch Ausplattieren wurde der tatsächliche Bakteriengehalt dieser Lösung bestimmt. Sodann wurden 2 Pipetten mit dieser Lösung befüllt. Eine der beiden Pipetten wurde mit der Stoßwelle bei o. g. Parametern behandelt, während die andere Pipette (sie stellt die Kontrollprobe dar) im Wasser des Wassertanks außerhalb des Fokus gehalten wurde. Die Wassertemperatur wurde durch den Stoßwellengenerator bei 35 °C gehalten. Sofort nach dem Versuch wurden die Kontrollprobe und die Versuchsprobe wie beschrieben ausgeimpft und quantifiziert.

3.3.4.3 Kombinierte Applikation von ESW und Antibiotikum

Ausgangslösung war eine Suspension von *S. aureus* in CAMHB mit einer Konzentration von ca. 10^6 KBE/ml. Für jede zu testende Antibiotikums-Konzentration (siehe Tab. 3) wurden Proben nur mit Antibiotikum und 5 Proben mit Stoßwelle und Antibiotikum behandelt. Zunächst wurde die Stammsuspension auf 5 Falcon-Röhrchen (jeweils 10 ml) aufgeteilt. Daraus wurde die Bakterienkonzentration durch ausplattieren bestimmt. Anschließend wurde zu dieser Suspension die entsprechende Menge an Gentamicin (1 mg/ml) hinzugegeben (siehe Tab. 3). Sofort danach wurde die Suspension auf eine Kontroll- und eine Versuchspipette aufgeteilt.

Jede Versuchspipette (n=5) wurde bei $0,59 \text{ mJ/mm}^2$ mit 4000 Impulsen behandelt während sich die Kontrollprobe im Wassertank, jedoch außerhalb des Fokus befand. Nach Behandlung wurden die Suspensionen doppelt ausgeimpft und quantifiziert.

Die Mittelwerte jeder Versuchsprobe wurden mit den Werten der Stammsuspension, der Kontrollprobe und denen der alleinigen ESW-Applikation (vgl. 3.3.4.2) verglichen

Tabelle 3 Verwendete Antibiotikamengen und daraus resultierende Konzentrationen

Gruppen- Nummer	Gentamicin-Konzentration in der Bakteriensuspension	hinzugegebene Menge an Antibiotikumlösung (1 mg/ml)
1	8 µg/ml	80 µl
2	4 µg/ml	40 µl
3	2 µg/ml	20 µl
4	1 µg/ml	10 µl
5	0,5 µg/m	5 µl

3.4 Fluoreszenzphotometrische Messungen

Es sollte untersucht werden, ob die Einwirkung der ESW die Permeabilität der Bakterienwand (ir-)reversibel verändern kann. Ändert sich die Permeabilität irreversibel, so wäre dies ein Hinweis auf den bakteriziden Effekt der Stoßwelle. Um dies zu überprüfen, wurden Bakterien nach ESW-Behandlung mit dem Farbstoff Sytox Green gefärbt und fluoreszenzphotometrisch vermessen. Sytox Green bindet an intrazelluläre DNA unter starker Zunahme der Fluoreszenz, kann jedoch Bakterienzellwände nur nach deren Zerstörung bzw. Permeabilisierung durchdringen.

Dazu mussten einige Eigenschaften der Interaktion zwischen dem Farbstoff und den Bakterien bekannt sein: Es musste geklärt werden, ob sich durch langes Einwirken des Farbstoffes auf die Bakterien die Fluoreszenz verändert. Ferner musste eine

Eichkurve erstellt werden, die die Fluoreszenz von Bakteriensuspensionen unterschiedlicher Konzentration zeigte. Eine zweite Eichkurve musste zeigen, wie Suspensionen verschiedener Konzentration fluoreszieren, wenn sie zu verschiedenen hohen Anteilen aus permeabilisierten und intakten Bakterien zusammengesetzt waren. Über die Fluoreszenz-Werte in der Suspension ESW-behandelter Bakterien konnte so über die Eichkurven auf die Anzahl der Bakterien mit gestörter Zellwand geschlossen werden.

3.4.1 Färbung der behandelten Bakterien

Alle in den folgenden Versuchen gefärbten Bakteriensuspensionen (behandelte Standard 1- und Standard 2- Lösungen, unbehandelte Kontrolle, permeabilisierte Bakterien etc.) wurden mit einer 5 μM Lösung Sytox-Green (Stammlösung mit Aqua dest. verdünnt) gefärbt und photometrisch untersucht und nach dem hier geschilderten Schema vermessen.

Die zu untersuchenden Bakteriensuspensionen wurden auf klare, durchsichtige Zellkulturplatten ausgeimpft. Zunächst wurde das zu beimpfende Well mit 40 μl Farbstoff befüllt. Im zweiten Schritt wurden 160 μl der Bakteriensuspension hinzugegeben. Dadurch wurde der Farbstoff nochmals 1:5 verdünnt (und lag damit in einem Konzentrationsbereich, der der Hersteller des Farbstoffs für die Bakterienfärbung empfiehlt). Zwischen den befüllten Wells blieb jeweils ein Well frei, um Überstrahlungseffekte zu vermeiden.

In jeder Platte wurden zusätzlich die Leerwerte der bakterienfreien Lösungen (je nach Versuch bestehend aus 160 μl NaCl und 40 μl Sytox bzw. 160 μl Isopropylalkohol und 40 μl Sytox) gemessen. Mit diesen Leerwerten konnten die Messungen korrigiert werden.

Das Ausmessen erfolgte im Plattenlesegerät Viktor. Die Platten wurden im Durchlichtverfahren 3 mal vermessen. Angeregt wurde der Farbstoff mit 485 nm, die Emission wurde kumulativ 1 Sekunde lang bei 535 nm gemessen. Das Messergebnis stellt also den über die Zeit $t=1$ s integrierten Emissionsverlauf dar. Von den 3 Messergebnissen wurde das arithmetische Mittel gebildet und hiervon der Leewert (Trägerlösung mit Farbstoff ohne Bakterien) subtrahiert.

3.4.2 Test der Aufnahme des Sytox-Farbstoffes durch vitale Zellen

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um festzustellen, ob das Fluoreszenzverhalten der getesteten Bakterien durch lange Einwirkzeiten des Farbstoffes (ohne ESW oder sonstige Verfahren der Permeabilisierung) beeinflusst werden kann.

In 6 Eppendorf-Cups wurden zunächst 1000 µl der Standardsuspension 2 von *S. aureus* ATCC 25923 gegeben und schließlich wie folgt weiterbehandelt:

- Cup 1 und 2 wurden mit 250 µl NaCl zu 1250 µl aufgefüllt (Negativkontrolle).
- Cup 3-6 wurde mit je 250 µl Sytox Green (5 µM) zu 1250 µl aufgefüllt (entspricht einer Farbstoffkonzentration von 1µM).

Zu den Zeitpunkten $t=10$; 20; 30; und 40 Minuten wurden aus jedem Eppendorf-Cup 200 µl frische Suspension entnommen und jeweils ein Well einer Spalte einer 96-Well Zellkulturplatte befüllt. Jedem neuen Zeitpunkt wurde eine neue Reihe zugeordnet (siehe Anhang: Schema 1).

Nach jeder Probenentnahme wurden die Cups bis zum nächsten Testzeitpunkt in einer Dunkelbox im Brutschrank bei 35 °C gelagert.

3.4.3 Permeabilisierung der Zellen (Positivkontrolle)

Die Membranen von Bakterien lassen sich zu mehr als 99,99 % permeabilisieren (und die Zellen damit abtöten), wenn sie für ca. 1 h mit Isopropylalkohol (70 %) versetzt werden (*Roth et al.* 1997).

Eine so hergestellte Suspension aus permeabilisierten Bakterien diene als 100 %-Kontrolle bei jedem Versuch, bei dem mittels Sytox Green die Permeabilisierung von Bakterien durch ESW untersucht werden sollte. Alle im Folgenden verwendeten 100%-Kontrollen wurden nach dem folgenden Schema erstellt:

Zunächst wurde eine in NaCl gewaschene Standard suspension 1 von *S. aureus* ATCC 25923 in logarithmischer Wachstumsphase hergestellt. Nach dem letzten Waschvorgang wurde etwa die Hälfte der Suspension entnommen und in ein eigenes Falcon-Röhrchen überführt (vitale Bakterien, Negativkontrolle).

Die andere Hälfte wurde ein zweites Mal zentrifugiert und das Pellet in Isopropylalkohol (70 %) in Lösung gebracht (permeabilisierte Bakterien, Positivkontrolle). Beide Suspensionen wurden für ca. 70 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Messen der Extinktion während des Permeabilisierungsvorganges konnte ausgeschlossen werden, dass sich die Extinktionseigenschaften der Bakterien durch die Permeabilisierung änderten. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass sich die optischen Ei-

genschaften der permeabilisierten Bakterien nicht änderten und das Verfahren der Densimetrie zur Einstellung weiterer Konzentrationen weiterhin tauglich war.

Nach 70-min Einwirkzeit wurden beide Lösungen erneut 2-mal zentrifugiert, der Überstand jeweils verworfen, das Pellet in NaCl gelöst und eine Konzentration von 0,5 McFarland-Einheiten eingestellt. Anschließend wurde durch genaues Messen des Extinktionswertes beider Lösungen (es wurden jeweils 3 mal 200 µl Lösung in insgesamt 6 Wells einer Zellkulturplatte gegeben und mit dem Plattenlesegerät Multiskan Ascent vermessen) und dosiertes Hinzugeben von NaCl die Bakterienkonzentration beider Lösungen genau angeglichen. Dadurch stand eine Versuchs- und Kontrolllösung exakt gleicher Konzentration zur Verfügung.

3.4.4 Ermitteln der Fluoreszenzeigenschaften von Bakterien

3.4.4.1 Fluoreszenz von Bakteriensuspensionen unterschiedlicher Konzentration

Mit dem folgenden Versuch wurde eine Eichkurve erstellt, um die Fluoreszenz permeabilisierter Bakterien und nicht-permeabilisierter (vitaler) Bakterien unterschiedlicher Konzentration darzustellen.

Aus beiden Suspensionen (permeabilisiert und vital) wurde mittels des Densimatens Lösungen mit 1,5; 1,0; 0,6; 0,3 und 0,1 McFarland-Einheiten hergestellt. Anschließend wurden die Konzentrationen durch photometrische Feinkorrektur, wie unter 3.4.3 beschrieben, exakt aufeinander eingestellt. Aus der Sytox-Stammlösung wurde ferner eine Gebrauchslösung der Konzentration 5 µmol hergestellt.

Sodann wurden zwei Zellkulturplatten vorbereitet. In jedes zu befüllende Well wurden zunächst 40 µl des Sytox und anschließend 160 µl der Bakteriensuspension gegeben. Platte 1 wurde dabei mit den nicht-permeabilisierten, Platte 2 mit den permeabilisierten Bakterien beimpft (siehe Anhang: Schema 2).

Beide Platten wurden nach einer Einwirkungszeit des Farbstoffes von 10 min im Plattenlesegerät Viktor ausgelesen (Parameter: Anregung bei 485 nm, Emission gemessen bei 535 nm, Auslesedauer 1 s)

3.4.4.2 Fluoreszenz von Suspensionsgemischen

Im nächsten Schritt wurde eine zweite Eichkurve erstellt, die das Fluoreszenzverhalten von Suspensionen darstellt, die zu unterschiedlich hohen Anteilen aus permeabilisierten und nicht-permeabilisierten (also vitalen) Bakterien bestehen. Dabei wurden

Suspensionen mit 3 verschiedenen Konzentrationen untersucht. Dieser Versuch entsprach in der Vorbereitung dem oben geschilderten Versuch.

Aus Suspensionen permeabilisierter und nicht-permeabilisierter Bakterien wurden Suspensionen mit 1,5; 1,0; und 0,5 McFarland-Einheiten hergestellt (siehe 3.4.3).

Von jeder Konzentration wurden sodann Gemische aus permeabilisierten und nicht-permeabilisierten Bakterien erstellt, die folgenden Anteil an permeabilisierten Bakterien enthielten: 100%; 80%; 60%; 40%; 20%; 0%.

Ähnlich wie oben beschrieben wurden nun 3 Platten mit Sytox-Farbstoff (5 µmol) vorbereitet und anschließend mit den Bakteriensuspensionen befüllt (siehe Anhang: Schema 3). Die Auslesung erfolgte wie unter 3.4.1 beschrieben)

3.4.5 Einfluss der ESW auf die Permeabilität der Bakterien

Im folgenden Versuch wurde schließlich mit Hilfe der beiden erstellten Eichkurven der Einfluss der ESW auf die Integrität der bakteriellen Zellwand und die intrazelluläre Aufnahme von Sytox Green untersucht. Als variable Parameter der ESW-Applikation wurden die EFD und die Impulszahl unterschiedlich gewählt. Wie beschrieben wurde aus der Standardlösung 2 eine Suspension lebender und eine Suspension permeabilisierter Bakterien hergestellt (vgl. 3.4.3).

Die Suspension nicht permeabilisierter Bakterien wurde in die Versuchs- und Kontrollpipetten gefüllt. Jede Versuchsprobe wurde behandelt (Parameter siehe Tab. 4)

Dabei befand sich die Kontrollgruppe im Wassertank außerhalb des Fokus (Negativkontrolle, nicht permeabilisierte Bakterien). Die Suspension mit den permeabilisierten Bakterien wurde während des Versuches bei Raumtemperatur gelagert. Nach der Behandlung erfolgte die photometrische Ausmessung wie beschrieben. Dabei wurden von jeder einzelnen Probe (Versuch, 0%- und 100%- Kontrollen) jeweils 3 Proben photometrisch ausgemessen.

Tabelle 4 Stoßwellenparameter bei der Untersuchung der Permeabilitätsänderung

<i>EFD</i>	<i>Impulse</i>	<i>Versuch 1</i>	<i>Versuch 2</i>
0,38 mJ/mm ²	4000	3	
0,59 mJ/mm ²	2000		5
0,59 mJ/mm ²	4000	3	5
0,59 mJ/mm ²	8000		5
0,59 mJ/mm ²	12000		5
0,96 mJ/mm ²	4000	4	

Zur Kontrolle des photometrischen Messverfahrens wurden die Versuchs- und Kontroll suspensionen sowohl derjenigen Versuche, die mit $0,59 \text{ mJ/mm}^2$ und 12.000 Impulsen als auch derjenigen, die mit $0,96 \text{ mJ/mm}^2$ und 4000 Impulsen behandelt wurden, ausgeimpft und die Anzahl der verbliebenen KBE bestimmt (vgl. 3.1.8).

3.5 Extrakorporale Stoßwellen und DNA

Nach dem Nachweis der bakteriziden Wirkung von ESW auf Bakterien suspensionen im Wachstumsmodell und der Untersuchung der bakteriellen Zellwandpermeabilität nach ESW-Applikation sollten in den folgenden Versuchen die Auswirkungen der Stoßwellen auf intrazelluläre und nackte DNA ermittelt werden. Als Methoden wurden ein photometrisches Verfahren mittels Sytox Green und die Gel-Elektrophorese eingesetzt.

3.5.1 Untersuchung des Effektes der Stoßwelle auf nackte DNA

Es sollte untersucht werden, wie nackte DNA auf die Behandlung mit Stoßwellen reagiert. Dafür wurde genomische, humane dsDNA (6000 bp, $0,12 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ in TRIS) verwendet. Es wurden zwei Gruppen (bestehend aus 3 Versuchsproben und einer unbehandelten Kontrolle) mit $0,38 \text{ mJ/mm}^2$ bzw. $0,96 \text{ mJ/mm}^2$ (je 4000 Impulse) behandelt.

Vorbereiten des Agarose-Gels

1g Agarose wurde mit 100 ml TBE-Puffer gemischt und in einem handelsüblichen Mikrowellenherd so lange erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nach Abkühlen auf handwarme Temperatur wurden $25 \mu\text{l}$ Ethidiumbromid hinzugegeben. Die Lösung wurde unter ständigem Rühren mit einem Magnetrührer sorgfältig gemischt. Das Gel wurde nun in eine vorbereitete Gussform (mit je nach Versuch unterschiedlicher Anzahl von Probestaschen) gegossen. Das verfestigte Gel wurde in eine Elektrophorese-Kammer gelegt, diese Kammer dann mit TBE-Puffer gefüllt, bis der Flüssigkeitsspiegel das Gel ca. 3 mm hoch überdeckte.

Vorbereiten der DNA

Für jede Versuchsgruppe wurden insgesamt 15 ml DNA-Lösung in TRIS-Puffer benötigt. Um später ein ausreichendes Mischungsverhältnis zwischen dem Sytox-

Farbstoff und der DNA zu gewährleisten, wurden jeweils 150 µl DNA 1:100 mit 14,85 ml TRIS gemischt. Anschließend wurde die Lösung in 8 Pipetten gefüllt (6 Versuchsproben, zwei Kontrollproben).

3 Versuchsproben wurden bei 0,38 mJ/mm², 3 weitere Proben bei 0,96 mJ/mm² jeweils 4000 Impulsen ausgesetzt. Aus den behandelten Probe und der unbehandelten Kontrolle wurden jeweils 160 µl entnommen und auf einer Zellkulturplatte mit 40 µl Sytox-Farbstoff (5 µM) gemischt. Als Leerkontrolle diente 160 ml TRIS ohne DNA. Die Platten wurden sodann wie beschrieben fluorezenzphotometrisch vermessen.

Die behandelte DNA sollte ferner mittels Gel-Elektrophorese untersucht werden. Dazu wurden aus den behandelten und der unbehandelten Probe jeweils 400 µl abgenommen und in einem Eppendorf-Cup mit 100 µl Loading-Buffer gemischt.

Die auf dem Agarose-Gel vorbereiteten Probentaschen (s. o.) wurden nun mit der Kontrolle, den 3 behandelten Proben und einem 10 kb-Marker gefüllt. Bei 90 Volt wurden die Proben ca. 90 min. lang elektrophoretisch aufgetrennt. Über einer UV-Lampe wurde das Gel fotografiert und die Bilder anschließend digitalisiert.

3.5.2 Untersuchung des Effektes der Stoßwelle auf intrazelluläre Bakterien-DNA

Mit diesem Versuch wurde untersucht, ob die ESW einen Einfluss auf DNA in Bakterienzellen hat.

Vorbereiten des Lysostaphins (Enzym zum Aufbrechen von *S. aureus*)

Das vorhandene Lysostaphin (0,5 µg, gefriergetrocknet, 2000 Units/mg), wurde zunächst in 5 ml TRIS-Puffer gelöst. Dies ergab eine Lösung, die 0,001 U Lysostaphin enthielt.

Vorbereiten der Bakterien

Jeweils 5 Proben der Standardlösung 1 wurden mit 0,96 mJ/mm² bzw. 0,38 mJ/mm² und 4000 Impulsen behandelt.

Die zu untersuchenden Zellen wurden zunächst zentrifugiert, der Überstand verworfen, und durch Zugabe des vorbereiteten TRIS-Puffers eine Suspension mit einer optischen Dichte von ca. 2,0 McFarland-Einheiten erstellt. Anschließend wurden die Zellen mit Lysostaphin lysiert.

900 µl der Bakterien-Suspension wurde mit 100 µl der vorbereiteten Lysostaphin-Lösung gemischt, und bei 37 °C inkubiert, bis die Lösung vollständig klar war (McFarland-Wert < 0,1).

Isolierung der DNA (mittels des DNeasy Tissue Kit)

Pro 180 µl lysierter Bakterien jeder Probe und Kontrolle wurden 25 µl Proteinase K sowie 200 µl Puffer AL hinzugegeben und durch Vortexen gemischt. Diese Mischung wurde für 30 Minuten bei 70 °C inkubiert. Danach wurden 200 µl dehydriertes Ethanol (100%) hinzugegeben und erneut durch Vortexen gemischt.

Die Mischung wurde in die DNeasy Mini Spin-Säule gefüllt und in das mitgelieferte Sammelröhrchen gestellt.

Eine Minute lang wurde die Säule bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss und das Sammelröhrchen wurden verworfen, die Säule erneut in ein frisches Sammelröhrchen gestellt. In die Säule wurden 500 µl des Puffers AW1 gefüllt. Erneut wurde die Säule bei 8000 rpm für eine Minute lang zentrifugiert. Für die Weiterverarbeitung wurden 500 µl Puffer AW2 in die Säule gefüllt und diese in ein frisches Sammelröhrchen gestellt. Durchfluss und Sammelröhrchen auch des zweiten Durchganges wurden verworfen.

Die mit dem Puffer AW2 befüllte Säule wurde nun 3 Minuten lang bei 14.000 rpm zentrifugiert. Dadurch wurde die Membran getrocknet und der noch vorhandene Alkohol aus der Membran entfernt. Wiederum wurden Röhrchen und Durchfluss verworfen. Vorsichtig wurde nun die fertige Säule aus dem Sammelröhrchen entnommen und in ein 2 ml fassendes Eppendorf-Cup gestellt. 200 µl Puffer AE wurden in die Säule gefüllt und eine Minute lang bei 8000 rpm zentrifugiert. Der im Eppendorf-Cup gesammelte Durchfluss enthielt nun die gereinigte, isolierte DNA.

Elektrophorese

Nach Extraktion der DNA wurden in einem Eppendorf-Cup jeweils 160 µl DNA mit 20 µl Loading Buffer gemischt. 100 µl dieser DNA wurden dann in die einzelnen Geltaschen gefüllt. Dabei wurden Probe und Kontrolle folgendermaßen aufgeteilt:

Taschen 1 und 2: unbehandelte Kontroll-Proben

Taschen 3-7: behandelte Bakterien DNA

Tasche 8: Marker, 10 kb

Die DNA wurde 90 Minuten lang bei 90 V aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel auf eine UV-Lampe (280 nm) gelegt und abfotografiert.

3.6 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Bakterien

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von mit Stoßwellen behandelten Bakterien und unbehandelten Kontrollen sollte klären, ob strukturelle Beeinträchtigungen an den Bakterienzellen nach ESW-Applikation festzustellen sind.

Dazu wurden mit Stoßwellen behandelte Bakterien auf ein Filterpapier gebracht, fixiert und rasterelektronenmikroskopisch untersucht.

Die folgenden Proben wurden untersucht:

- 3 Proben der Standardlösung 1; 4000 Impulsen bei 0,96 mJ/mm²
- 3 Proben der Standardlösung 1; 4000 Impulsen bei 0,38 mJ/mm²
- 3 Proben als unbehandelte Kontrolle

Nach dem Beschuss wurden die Bakterien durch Bakterienfilter (0,2 µm Porengröße) gefiltert. Das Filterpapier mit den anhaftenden Bakterien wurde dann in die frisch vorbereitete Fixierlösung gegeben.

Nach Fixation (24 h bei 4 °C) wurden die Proben 3-mal jeweils 15 min in Aqua dest. gewässert.

Anschließend wurden die Präparate in aufsteigender Alkoholverdünnung (50%, 70% und 80%) entwässert und konnten in 80%-igem Alkohol gelagert werden.

Vor der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung erfolgten eine weitere Dehydrierung mit Alkohol (90% und 100%) und schließlich die Kritisch-Punkttrocknung über 3 Zyklen mit flüssigem CO₂. Abschließend erfolgte noch der Überzug mit einem dünnen Goldfilm (Sputter, 10nm).

Die Aufnahmen wurden mit einem FE-Rasterelektronenmikroskop angefertigt.

3.7 Quantifizierung und Statistik

3.7.1 Quantifizierung der Messwerte

Alle Agarplatten wurden nach einer Bebrütung über 48 h ausgezählt. Statistisch verwertet wurden Verdünnungsstufen, die auf der Agarplatte mindestens 10 Kolonien zeigten. Verdünnungen, die aufgrund eines überschießenden Wachstums keine genaue Differenzierung einzelner Kolonien mehr zuließen, wurden ebenfalls nicht gewertet. Ausgehend von den gezählten Kolonien wurde entsprechend der jeweiligen Verdünnungsstufen die Anzahl an KBE in 1 ml Suspension berechnet.

Von den Ergebnissen einer jeden Testreihe wurden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Der Mittelwert der Kontrollgruppe in jedem Versuch wurde als 100 % definiert. Nun wurde der prozentuale Anteil jeder Versuchsgruppe an dem durchschnittlichen Bakteriengehalt der Kontrollgruppe berechnet. Aus diesen nun erhaltenen Einzelwerten wurde wiederum das arithmetische Mittel gebildet und im Vergleich zur mittleren Anzahl an KBE der Kontrollgruppe dargestellt.

Ähnlich wurde bei der Auswertung der Fluoreszenz-Messungen vorgegangen:

Von den gemessenen Werten der Versuchs- und Kontrollgruppe wurde der Leerwert der Messungen subtrahiert. Sodann wurde von den Ergebnissen der Versuchs- und Kontrollgruppen jeweils der arithmetische Mittelwert gebildet. Auch hier wurde das Ergebnis der Kontrollgruppe (in diesem Fall das Ergebnis der mit Alkohol permeabilisierten Kontrollgruppe) als 100 % definiert. Der Anteil der Fluoreszenz der behandelten und unbehandelten Versuchsgruppe wurde jeweils prozentual als Anteil der 100%-Gruppe berechnet.

Die genauen Ergebnisse und Zahlenwerte sind für jeden Versuch im Anhang aufgelistet

3.7.2 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung wurden statistisch aufgearbeitet. Hierbei wurde auf Grund des kleinen, nicht normalverteilten Stichprobenvolumens der Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben angewendet. Ein P-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistik-Programm SPSS.

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis der Dichtigkeit der Pipetten

Tabelle 5 zeigt die Extinktion des Wassers im Wassertank des Stoßwellengenerators vor und nach Behandlung von Pipetten, die mit Alzerinrot gefüllt waren.

Die Behandlung erfolgte bei 0,96 mJ/mm² und 4000 Impulsen. 4 Versuche wurden durchgeführt und das Wasser im Wassertank nach jedem Versuch jeweils 4-mal ausgemessen. Von diesen 4 Messwerten wurde das arithmetische Mittel gebildet. Aus der Tabelle ist zu ersehen, dass sich die mittlere Extinktion des Wassers nicht änderte. Die Pipetten erwiesen sich somit als dicht und für den geplanten Versuchsaufbau geeignet.

Tabelle 5 Extinktion des Wasserbades vor und nach Applikation der ESW

V-Nr-1	Behandlung		V-Nr-2	Behandlung		V-Nr-3	Behandlung	
	vor	nach		vor	nach		vor	nach
1	0,039	0,035	1	0,039	0,035	1	0,039	0,035
2	0,037	0,038	2	0,037	0,038	2	0,037	0,038
3	0,035	0,038	3	0,035	0,037	3	0,035	0,038
4	0,035	0,033	4	0,034	0,035	4	0,035	0,034
Mittelwert	<i>0,037</i>	<i>0,036</i>	Mittelwert	<i>0,036</i>	<i>0,036</i>	Mittelwert	<i>0,037</i>	<i>0,037</i>

4.2 Entwicklung der Anzahl der KBE in Bakteriensuspensionen nach Behandlung mit ESW

4.2.1 Abhängigkeit der KBE von der Impulszahl

Das folgende Diagramm (Abb. 4) zeigt, wie sich die Zahl der vermehrungsfähigen Keime in einer Suspension aus *S. aureus* in NaCl entwickelt, wenn diese Suspension mit der Stoßwelle behandelt wird (n=5). Dabei bezieht sich der in Prozent angegebene Anteil in der Versuchssuspension auf die in der unbehandelten Kontrollgruppe enthaltenen KBE. Insgesamt wurden die Versuche zur Impulszahl mit *S. aureus* dreimal durchgeführt.

Man erkennt, dass der Anteil der vermehrungsfähig gebliebenen KBE mit steigender Impulszahl kontinuierlich abfiel. Bei mehr als 4000 Impulsen gelang es, nahezu sterile Verhältnisse zu erzeugen.

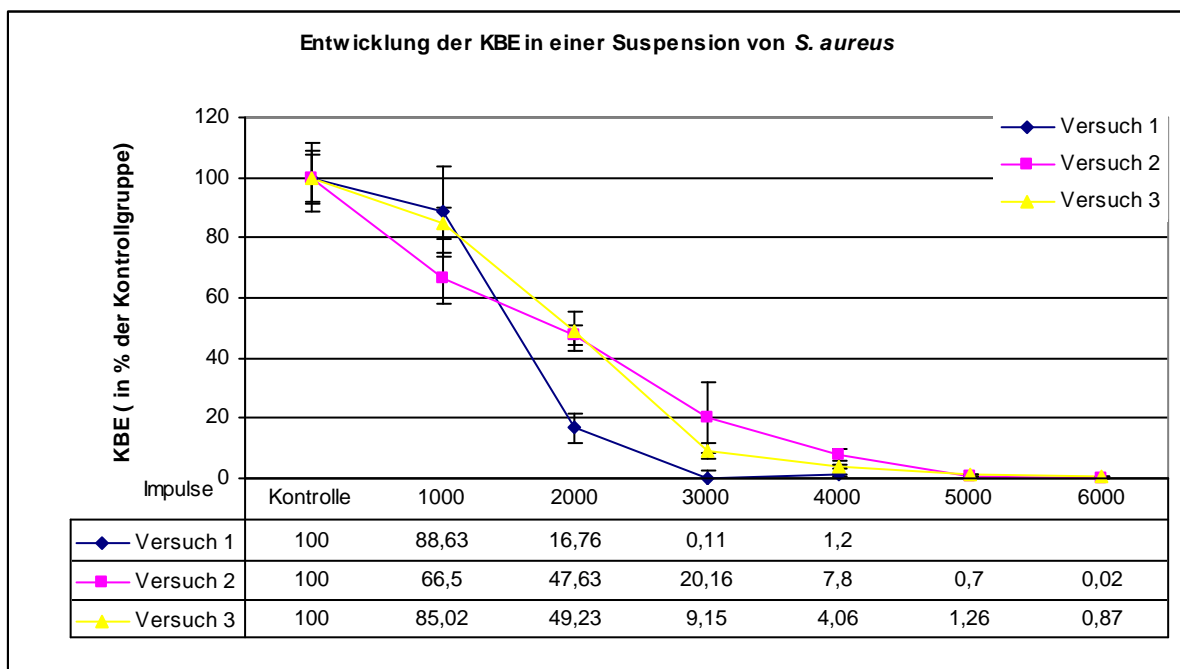


Abb. 4 Entwicklung der KBE in einer Suspension aus *S. aureus* in Abhängigkeit der Impulszahl

Tabelle 6 p-Werte zu Abb.4

Die P-Werte stellen das Signifikanzniveau der einzelnen Versuchsgruppen zu den jeweiligen Kontrollgruppen dar.

p-Werte	1000	2000	3000	4000	5000	6000
Versuch 1	0,7540	0,0090	0,0090	0,0090		
Versuch 2	0,0090	0,0090	0,0090	0,0088	0,0090	0,0090
Versuch 3	0,0282	0,0090	0,0090	0,0090	0,0088	0,0090

Ebenso wurde *P. aeruginosa* mit unterschiedlich hohen Impulszahlen beschossen (n= 5; 0,96 mJ/mm², 0-4000 Impulse). Im Diagramm (Abb. 5) erkennt man in, dass es erst ab einer Impulszahl von > 2000 Impulsen zu einer signifikanten Reduktion der KBE kam. Auch in diesem Diagramm illustriert jeder Datenpunkt den durchschnittlichen Gehalt an vermehrungsfähigen KBE in der behandelten Bakteriensuspension im Verhältnis zur Anzahl der unbehandelten KBE in Prozent.

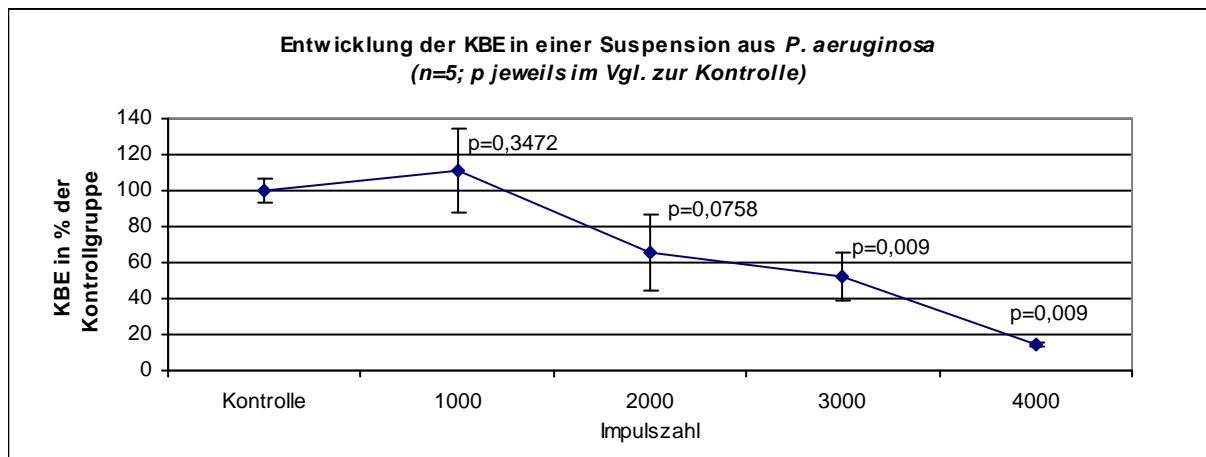


Abb. 5 Entwicklung der KBE in einer Suspension aus *P. aeruginosa* in Abhängigkeit der Impulszahl

Das nächste Diagramm (Abb. 6) illustriert die Abnahme der KBE in einer Suspension von *E. faecium*, die bei 0,96 mJ/mm² mit 4000 bzw. 6000 Impulsen behandelt wurde. Auch hier zeigen die Datenpunkte jeweils den durchschnittlichen Anteil der KBE in jeweils 5 getesteten Proben. *E. faecium* erwies sich dabei im Vergleich zu *S. aureus* als stabiler gegenüber den Einflüssen der Stoßwelle. Man erkennt dies an dem immer noch sehr hohen Anteil an KBE nach 6000 Impulsen.

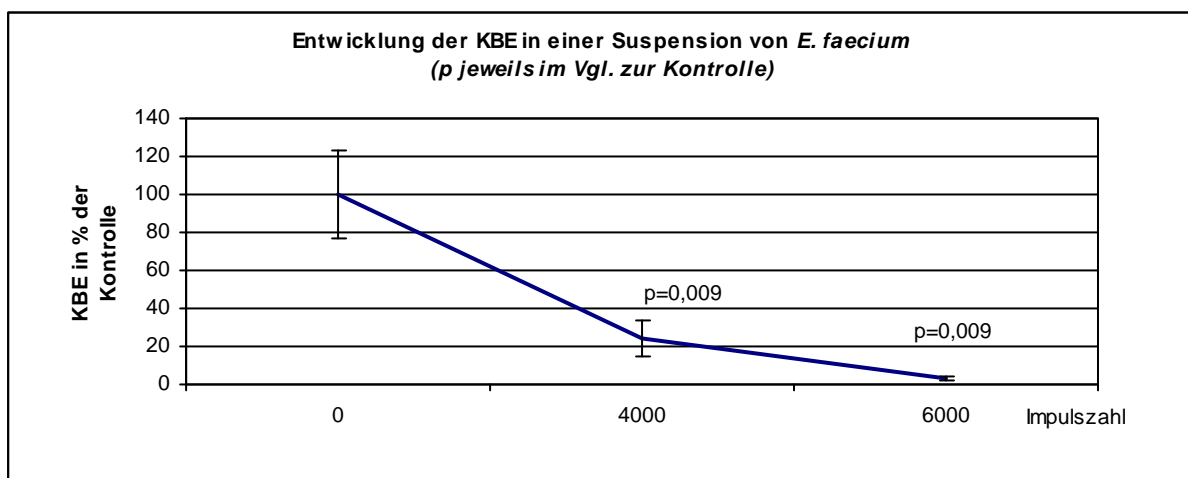


Abb. 6 Entwicklung der KBE in einer Suspension aus *E. faecium* in Abhängigkeit der Impulszahl

Abb. 7 zeigt einen Überblick über das Verhalten verschiedener Bakterienstämme bei Behandlung mit ESW. Das Diagramm zeigt den durchschnittlichen Anteil der vermehrungsfähig gebliebenen KBE einer Bakteriensuspension, die mit 4000 Impulsen bei 0,96 mJ/mm² behandelt wurde. Man erkennt, dass die Keime verschieden empfindlich auf die Stoßwelle reagieren.

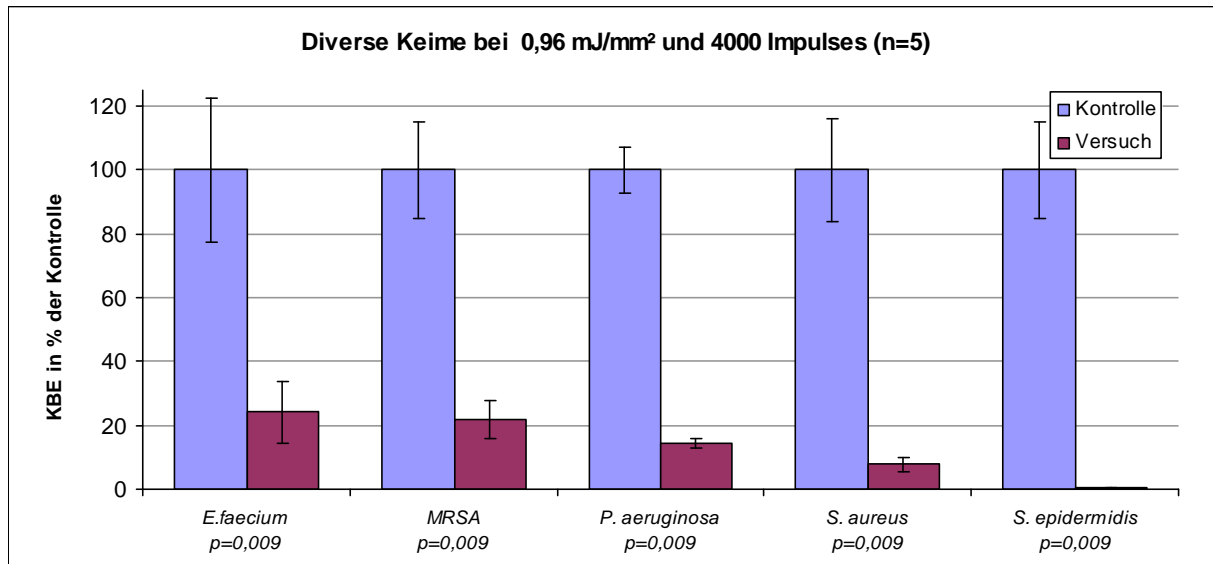


Abb. 7 Übersicht über die Abnahme der KBE verschiedener Keime bei gleichen physikalischen Bedingungen

4.2.2 Abhängigkeit der KBE von der Energieflussdichte

Abb. 8 zeigt die Abnahme der KBE in einer Suspension mit *S. aureus*, die mit 4000 Impulsen, bei verschieden hoher EFD behandelt wurde (n=5). Es zeigte sich bei einer EFD von 0,38 mJ/mm² eine statistisch signifikante leichte Zunahme der KBE im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zu statistisch signifikanten Abnahmen kommt es, wenn eine EFD von mindestens 0,59 mJ/mm² appliziert wird.

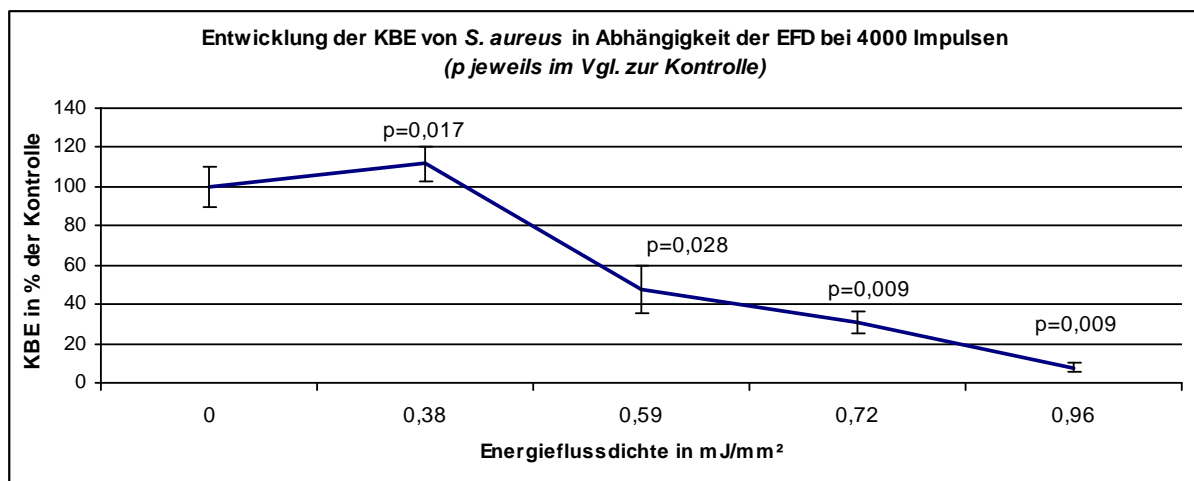


Abb. 8 Entwicklung der KBE in einer Suspension aus *S. aureus* unter verschieden hoher EFD

4.2.3 Abhängigkeit der KBE von der applizierten Gesamtenergie

In diesen Versuchen wurde untersucht, wie sich die Zahl der KBE in einer Suspension in Abhängigkeit der applizierten Gesamtenergie entwickelt. Es wurden 3 Versuche mit jeweils 5 Proben einer Suspension aus *S. aureus* durchgeführt.

Das folgende Diagramm (Abb. 9) zeigt, dass der Anteil der KBE in einer Suspension, die mit 0,59 mJ/mm² und 12000 Impulsen behandelt wurde, ähnlich niedrig war wie bei einer Suspension, die lediglich 4000 Impulsen, aber 0,96 mJ/mm² ausgesetzt wurde. Hingegen nimmt die Zahl der KBE in einer Suspension, die mit 4000 Impulsen bei 0,59 mJ/mm² behandelt wurde, nur um ca. 57 % ab. Eine niedrigere Energieflussdichte konnte somit durch eine höhere Impulszahl kompensiert werden.

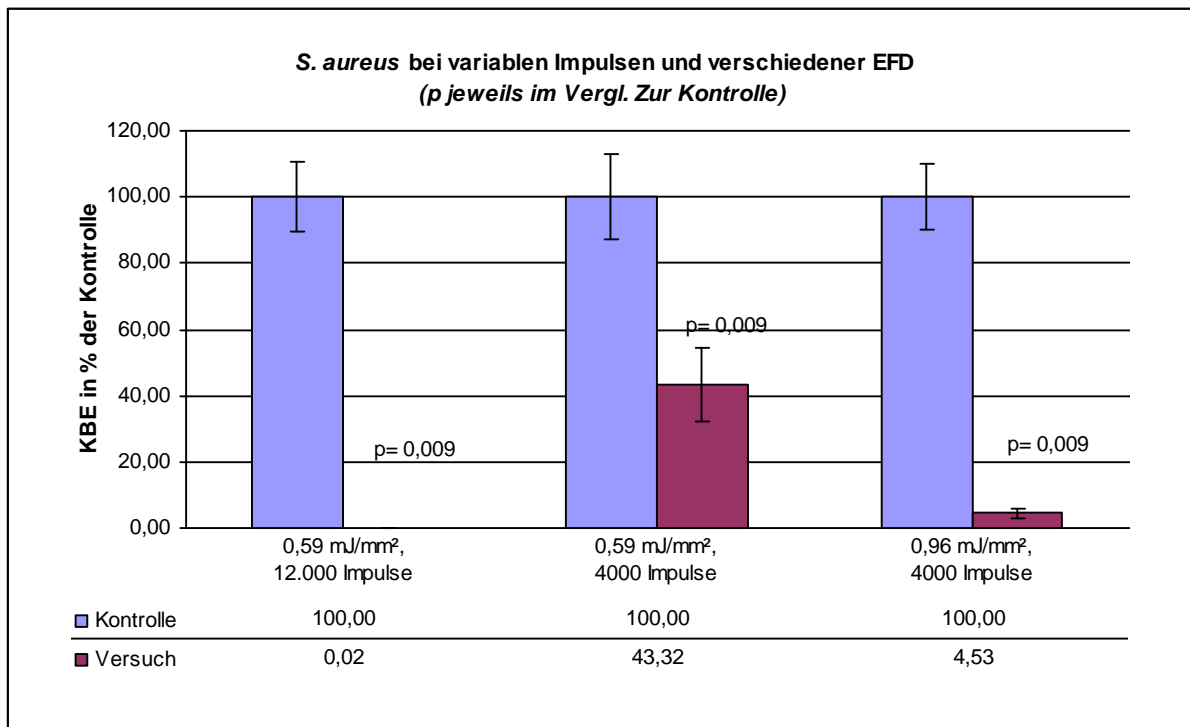


Abb. 9 Abnahme der KBE in Abhängigkeit von der Gesamtenergie

4.3 Extrakorporale Stoßwellen und Antibiotikum

4.3.1 Wirkung der extrakorporalen Stoßwelle auf Gentamicin

4.3.1.1 Bestimmung der MHK von unbehandeltem und behandeltem Gentamicin

3 Proben behandelten Gentamicins (4000 Impulse, 0,96 mJ/mm²) und eine Probe unbehandelten Kontroll-Gentamicins, welches sich während der Behandlung im Wassertank außerhalb des Fokus befand, wurden zusammen mit einer Probe frisch aus einer Ampulle entnommenen Gentamicins verglichen. Von jeder Probe wurde 6 mal die MHK bestimmt.

Nach 6 Bestimmungen konnte sowohl für das Kontroll-Gentamicin, das frische Gentamicin, als auch für das mit ESW behandelte Gentamicin eine durchschnittliche MHK von 0,125 µg/ml ermittelt werden (Tabelle 7). Die MHK des behandelten Gentamicins unterschied sich somit nicht von derjenigen der unbehandelten und frischen Kontroll-Probe.

Tabelle 7 *MHK von behandeltem und unbehandeltem Gentamicin gegenüber S. aureus; die Zahl in Klammern gibt an, in wie vielen der 6 Tests die entsprechende Konzentration als MHK bestimmt wurde*

	<i>MHK min.</i>	<i>MHK max.</i>
<i>Versuch 1</i>	0,125 µg (2)	0,25 µg (4)
<i>Versuch 2</i>	0,125 µg (6)	
<i>Versuch 3</i>	0,125 µg (6)	
<i>Kontroll-Gentamicin</i>	0,125 µg (5)	0,25 µg (1)
<i>Frisches Gentamicin</i>	0,125 µg (6)	

4.3.1.2 Physikalische Analyse des behandelten Gentamicins

Abb. 10 zeigt das Infrarotspektrogramm der behandelten Gentamicinproben im Vergleich zur Kontrollprobe. Die Kurve gibt dabei für jede Wellenlänge die Absorption des Lichtes in % an. Das Kurvenmuster entspricht für jede Probe dem der Kontrollprobe. Dies zeigt, dass das Molekül in allen Proben intakt geblieben ist.

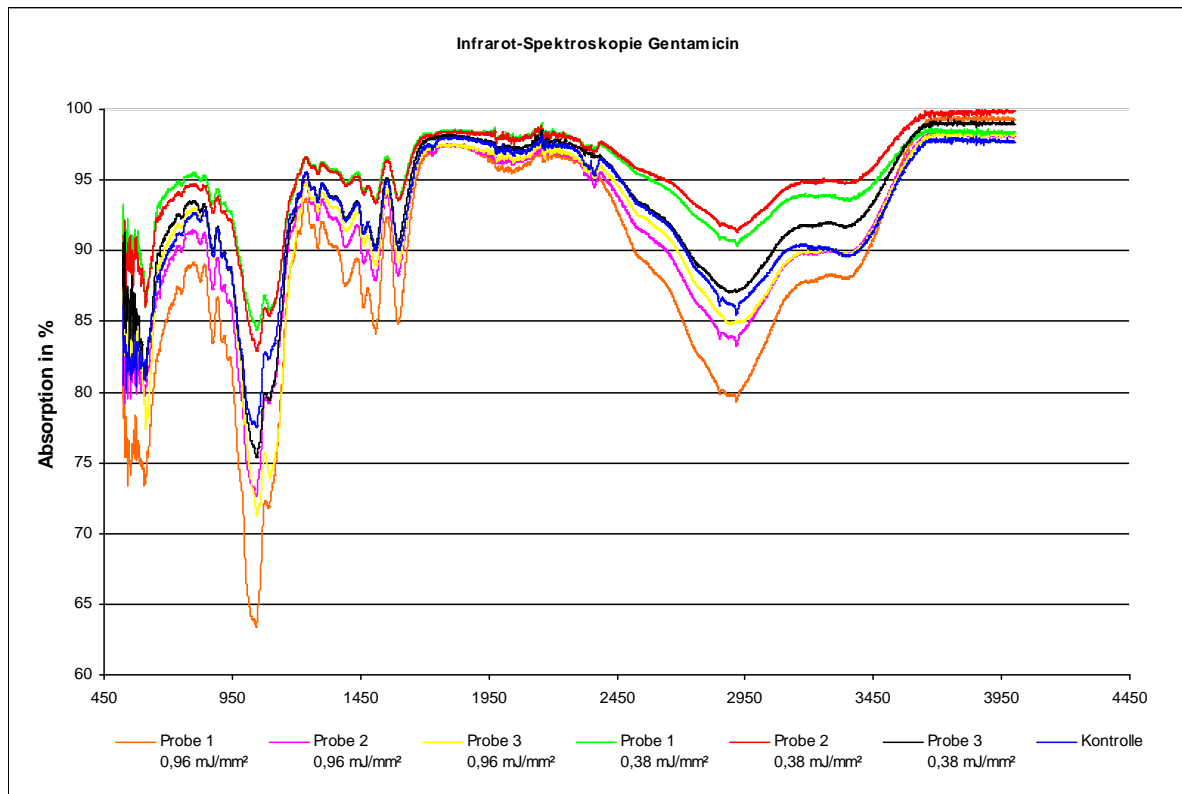


Abb. 10 Absorptionsspektren von ESW behandelten Gentamicinproben und unbehandelter Kontrolle

4.3.2 Wirkung von Gentamicin auf vorbehandelte Bakterien

Es sollte geklärt werden, ob Bakterien in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Gentamicin beeinflusst werden, wenn sie einer Stoßwellenbehandlung ausgesetzt wurden. Dazu wurde die MHK von Gentamicin an behandelten Bakterien ($n=5$, $0,59 \text{ mJ/mm}^2$, 4000 Impulse) bestimmt und mit derjenigen von unbehandelten Bakterien verglichen. Die MHK wurde pro Versuch jeweils doppelt bestimmt.

Die Ergebnisse beider Bestimmungen sind in Tabelle 8 dargestellt. Bakterien, die mit ESW behandelt wurden, wiesen keine relevante Änderung der MHK gegen Gentamicin auf.

Tabelle 8 MHK von ESW-behandelten Bakterien und unbehandelten Bakterien im Vergleich

Probe	1	2	3	4	5
ESW-behandelte Bakterien	0,50 $\mu\text{g/ml}$	0,25 $\mu\text{g/ml}$	0,50 $\mu\text{g/ml}$	0,50 $\mu\text{g/ml}$	0,25 $\mu\text{g/ml}$
	0,50 $\mu\text{g/ml}$	0,50 $\mu\text{g/ml}$	0,25 $\mu\text{g/ml}$	0,50 $\mu\text{g/ml}$	0,25 $\mu\text{g/ml}$
unbehandelte Bakterien(Kontrolle)	0,25 $\mu\text{g/ml}$	0,50 $\mu\text{g/ml}$	0,50 $\mu\text{g/ml}$	0,50 $\mu\text{g/ml}$	0,25 $\mu\text{g/ml}$
	0,25 $\mu\text{g/ml}$	0,50 $\mu\text{g/ml}$	0,50 $\mu\text{g/ml}$	0,50 $\mu\text{g/ml}$	0,125 $\mu\text{g/ml}$

4.3.3 Zusammenwirken von Stoßwelle und Antibiotikum

4.3.3.1 Bakterizide Wirkung von Gentamicin während der ESW- Applikationszeit

Abb. 11 illustriert, wie die Zahl der KBE in einer Suspension aus *S. aureus* über einen Zeitraum von 33 Minuten bei 35 °C abnimmt, wenn Gentamicin in Konzentrationen angewandt wird, die in der Größenordnung der MHK von Gentamicin gegen *S. aureus* liegen (n=5). Man erkennt, dass bereits diese relativ geringen Konzentrationen in dieser kurzen Zeit ausreichen, um eine signifikante Abnahme der KBE hervorzurufen.

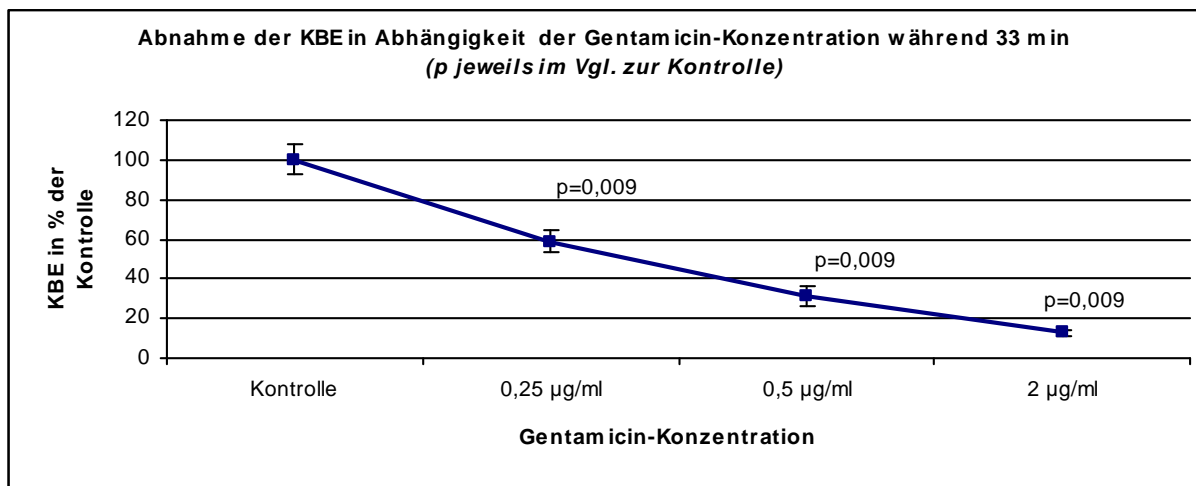


Abb. 11 Abnahme der KBE nach einer Einwirkzeit des Antibiotikums von 33 Minuten

4.3.3.2 ESW-Wirkung auf Bakterien bei wachstumsfördernden Bedingungen

Das folgende Diagramm (Abb. 12) zeigt, wie sich die KBE in einer Suspension entwickelt, wenn die Bakterien optimale Bedingungen (Nährlösung, 35 °C) vorfinden. Die Ursprungssuspension im Diagramm bezeichnet den Gehalt an KBE zu Beginn des Versuches. Aus dieser Lösung wurden die Versuchs- und Kontrollproben entnommen. Bei der Anwendung von 0,59 mJ/mm² und 4000 Impulsen kam es zu einer signifikanten Zunahme der KBE in der so behandelten Versuchssuspension im Vergleich zur unbehandelten Kontroll suspension, die völlig identischen Rahmenbedingungen (Nährlösung und Temperatur) ausgesetzt war. Dagegen zeigte die Suspension, die 0,96 mJ/mm² bei 4000 Impulsen ausgesetzt war eine signifikante Abnahme der KBE, wenngleich diese auch geringer ausfällt, als bei Suspensionen mit kalter NaCl-Lösung (vgl. Abb. 4).

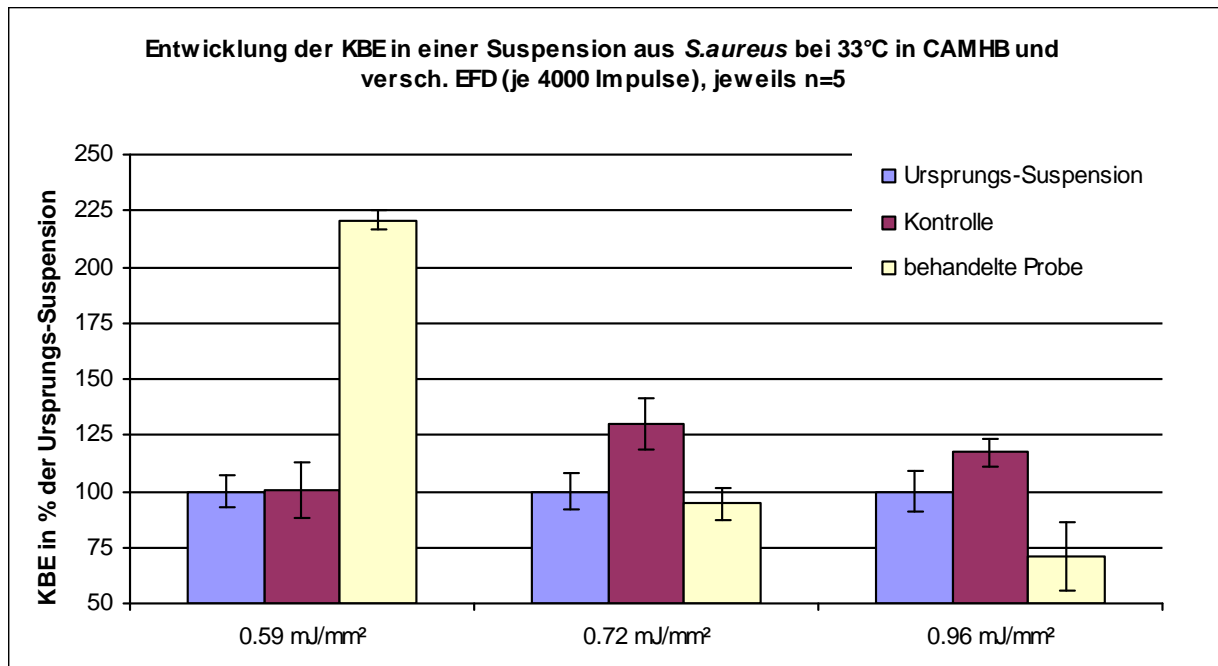


Abb. 12 Entwicklung der KBE einer Bakteriensuspension in warmer Nährlösung unter Einwirkung der ESW

Tabelle 9 p-Werte zu Abb. 12

Signifikanzen	0,59 mJ/mm ²		0,72 mJ/mm ²		0,96 mJ/mm ²	
	Ursusp.	ESW	Ursusp.	ESW	Ursusp.	ESW
ESW	0,009		0,46		0,009	
Kontrolle	0,6	0,009	0,009	0,009	0,01	0,009

Für die 5 behandelten Proben der Versuchsreihe 0,59 mJ/mm² wurde der Vermehrungsfaktor der KBE gegenüber der unbehandelten Kontrolle berechnet: Danach vermehren sich die Bakterien unter ESW-Einfluss um das 2,19-fache. Dies ist für die Interpretation der Ergebnisse des folgenden Versuches (Vgl.3.3.4.3) notwendig. Mit seiner Hilfe können der Einfluss der ESW und der Einfluss des Antibiotikums auf die Bakteriensuspension voneinander getrennt werden (Vgl. 04.3.3.3).

4.3.3.3 Kombinierte Applikation von ESW und Antibiotikum

Abb. 13 zeigt die Entwicklung der KBE in einer Suspension aus *S. aureus* in CAMHB, die Antibiotika enthielt und der ESW ausgesetzt war (gelbe Balken, *ESW und Gentamicin*). Die roten Balken (*unbehandelt*) zeigen die völlig unbehandelte Stammsuspension. Die blauen Balken (*nur Gentamicin*) zeigen die Entwicklung der KBE in der Vergleichsgruppe dar, die mit Antibiotika aber ohne ESW behandelt wurde. Die Division der Werte der Versuchsgruppe durch den in 4.3.3.2 ermittelten Vermehrungsfaktor ergab die orangenen Balken (*Gentamicin, ESW, korrigiert*): Dadurch wurde der Anteil derjenigen Bakterien herausgerechnet, der durch die stimulierenden Effekte der ESW entstanden war. Man erkennt, dass die Abnahme der KBE im korrigierten Versuch und in der Kontrolle (nur mit Gentamicin behandelt) nahezu identisch sind: Nach Herausrechnen des stimulierenden Effektes aus der Versuchsgruppe zeigt die Abnahme der KBE durch das Antibiotikum in der Versuchs- und Kontrollgruppe keinen statistisch signifikanten Unterschied. Die p-Werte zeigen die Signifikanz zwischen der Gruppe, die nur Gentamicin erhielt, und der Gruppe, die zusätzlich Stoßwelle ausgesetzt wurde, jedoch rechnerisch korrigiert wurde.

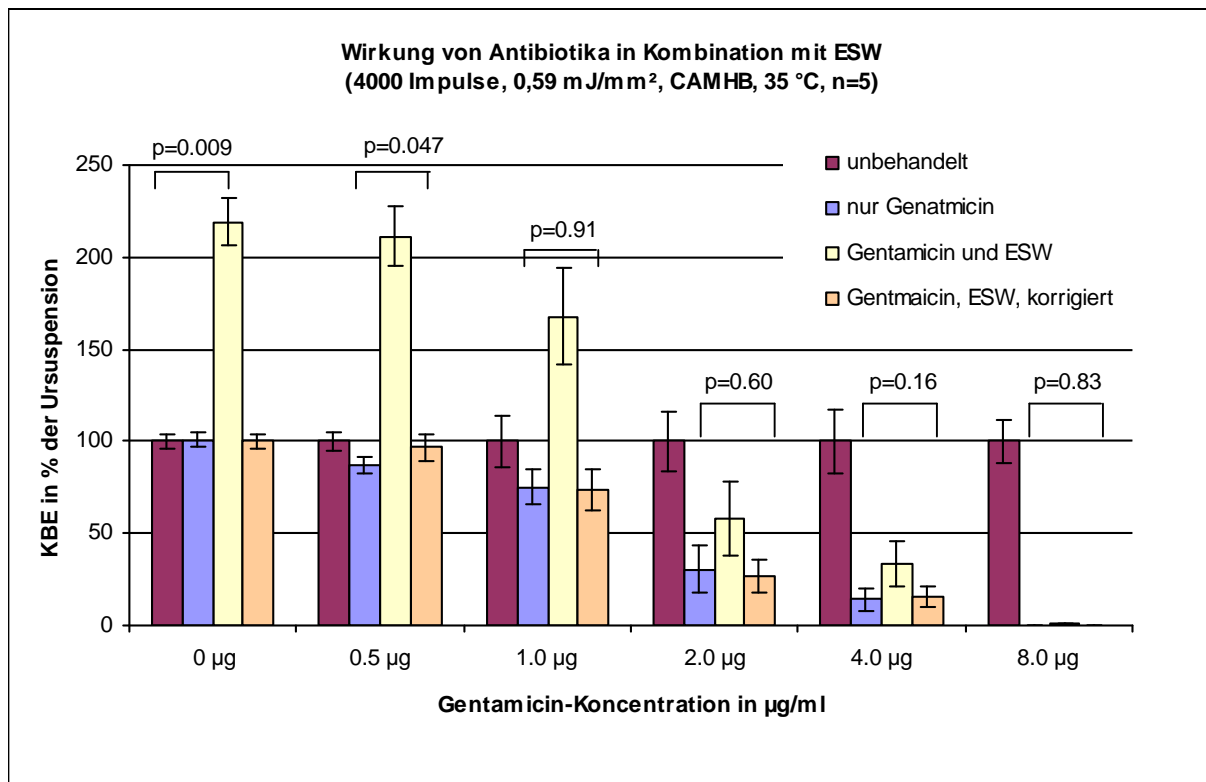


Abb. 13 Kombinierte Effekte durch Stoßwelle und Antibiotikum auf *S. aureus*

4.4 Fluoreszenzphotometrische Messungen

4.4.1 Fluoreszenzeigenschaften von Bakterien

4.4.1.1 Test der Aufnahme des Farbstoffes durch vitale Zellen

Abb. 14 zeigt die Fluoreszenz von Bakterien in Abhängigkeit der Einwirkzeit des Farbstoffes bei 37 °C. Die Fluoreszenzintensität nahm mit längerer Einwirkzeit um wenige Prozent ab. Bei keiner der Messungen kam es im Vergleich zur ersten Messung (t=10 min) zu einer Zunahme. Vitale Zellen nehmen Sytox nicht auf. Die Abnahme der Fluoreszenz ist am ehesten auf die Instabilität des Farbstoffes zurückzuführen. Dieser zersetzt sich bei längerer Licht- oder Wärmeeinwirkung.

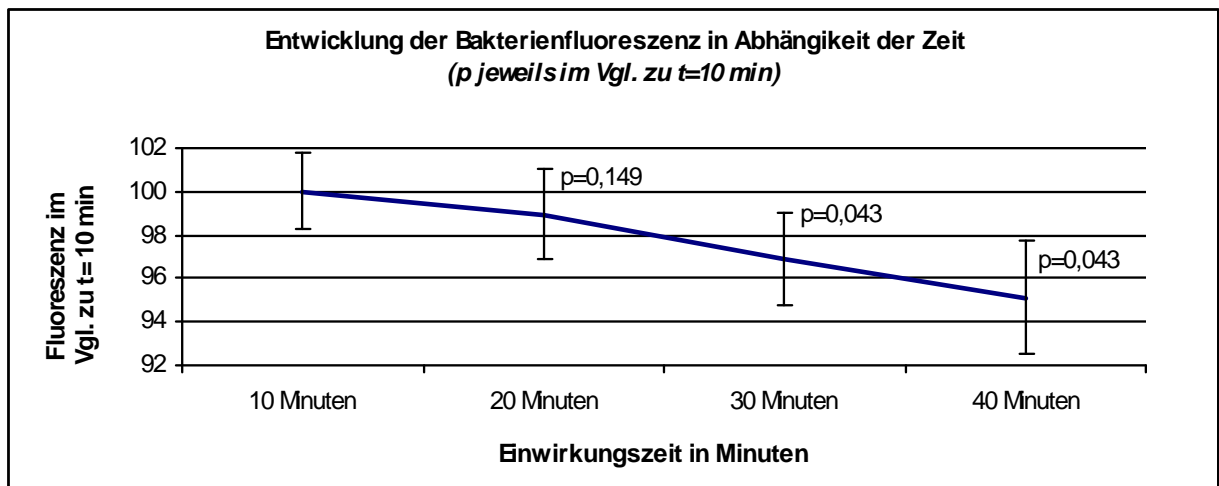


Abb. 14 Entwicklung der Bakterienfluoreszenz während eines Zeitraumes von 40 Minuten

4.4.1.2 Fluoreszenz von Bakteriensuspensionen verschiedener Konzentration

Abb. 15 zeigt die Fluoreszenz von Bakterien, die zu 100% durch permeabilisiert wurden im Vergleich zu intakten Bakterien. Beide Bakteriengruppen wurden mit Sytox Green Nucleic Acid Stain gefärbt. Erst bei Bakterienkonzentrationen über 0,2 McFarland-Einheiten (ca. 10^7 KBE/ml), zeigt sich eine deutlich unterscheidbare Fluoreszenz zwischen permeabilisierten und vitalen Bakterien.

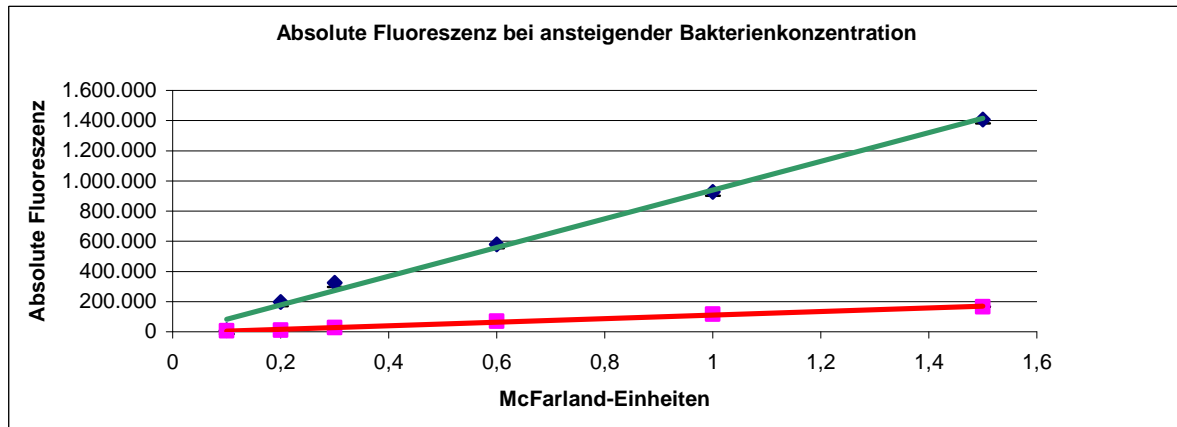


Abb. 15 Fluoreszenz permeabilisierter und vitaler Bakterien unterschiedlicher Konzentration
blaue Datenpunkte permeabilisierte Bakterien; **rosa Datenpunkte** nicht permeabilisierten Bakterien
grüne Gerade interpolierte Gerade der blauen Datenpunkte; **rote Gerade** interpolierte Gerade der rosa Datenpunkte

4.4.1.3 Fluoreszenz von Suspensionsgemischen

Abb. 16 zeigt die Fluoreszenz bei graduell ansteigendem Anteil permeabilisierter Bakterien in einer Suspension. Die Fluoreszenz steigt proportional zum Anteil permeabilisierter Bakterien. Die Steigung der Geraden ist umso größer, je höher die Bakterienkonzentration ist. Die Unterschiede zwischen minimaler und maximaler Fluoreszenz hängen also wesentlich von der Ausgangskonzentration an Bakterien ab.

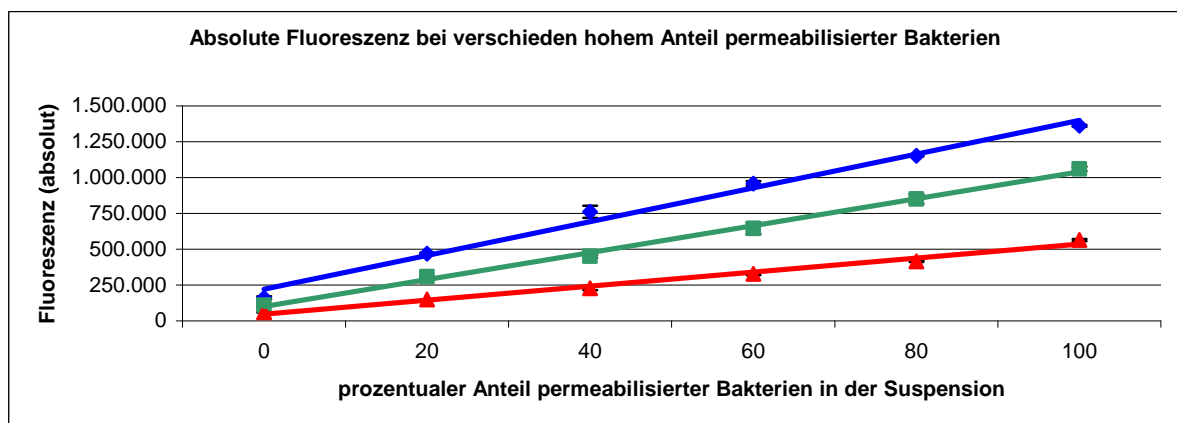


Abb. 16 Fluoreszenz in Abhängigkeit des Anteils an permeabilisierten Bakterien
Blau: Interpolation für C= 1,5 McF; **Grün:** Interpolation für C= 1,0 McF **Rot:** Interpolation für C= 0,5 McF

4.4.2 Einfluss der ESW auf die Permeabilität der Bakterien

Das nächste Diagramm (Abb. 17) zeigt das Fluoreszenzverhalten einer Bakterien-suspension von *S. aureus*, von der mehrere Versuchsproben jeweils 4000 Impulsen bei unterschiedlichen Energiefussdichten ausgesetzt waren. Nur bei einer sehr hohen EFD konnte eine statistisch signifikante Erhöhung der Fluoreszenz ermittelt werden. Abb. 18 zeigt das Ergebnis der Wachstumskontrolle für die Parameter 0,96 mJ/mm² und 4000 Impulse. Die KBE nehmen um über 95% ab, obgleich die Fluoreszenz nur um wenige Prozent ansteigt.

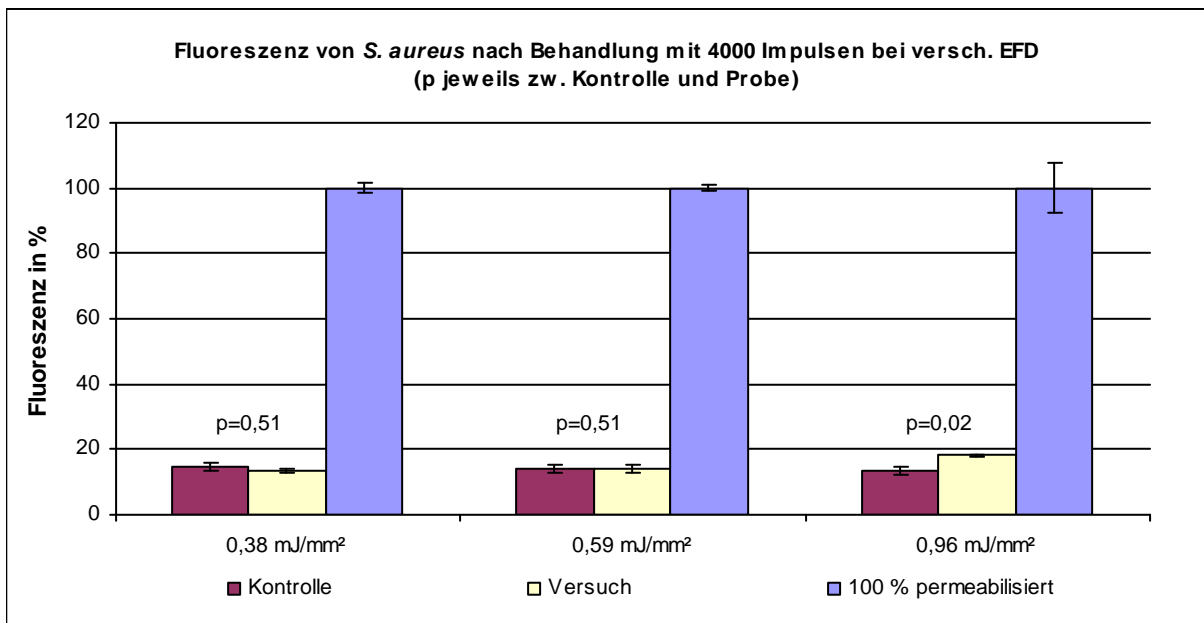


Abb. 17 Fluoreszenz einer Bakteriensuspension nach ESW-Behandlung verschiedener Parameter

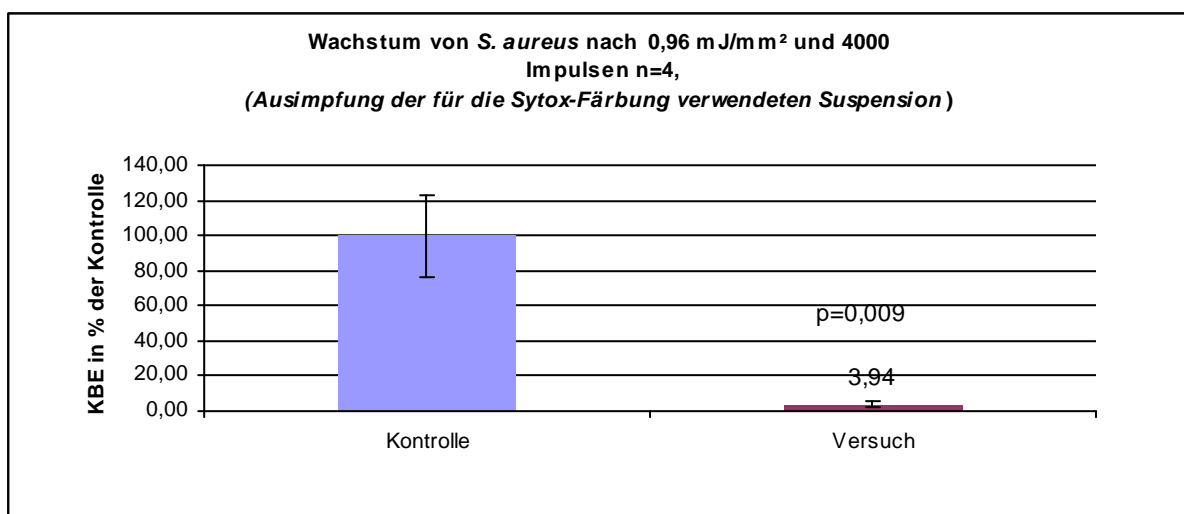


Abb. 18 Quantifizierung der KBE der zur Permeabilitätsmessung verwendeten Suspension

Das folgende Diagramm (Abb. 19) zeigt, wie sich die Fluoreszenz der Suspension in Abhängigkeit von verschiedenen hohen Impulszahlen bei relativ geringer EFD (0,59 mJ/mm²) änderte. Bei sehr hohen Impulszahlen (die genügen, um mehr als 99 % der Keime zu hemmen, vgl. 4.2.3), war im Vergleich zu geringen Impulszahlen (die kaum Bakterien abtöten) nur eine geringe Zunahme der Fluoreszenz zu erkennen.

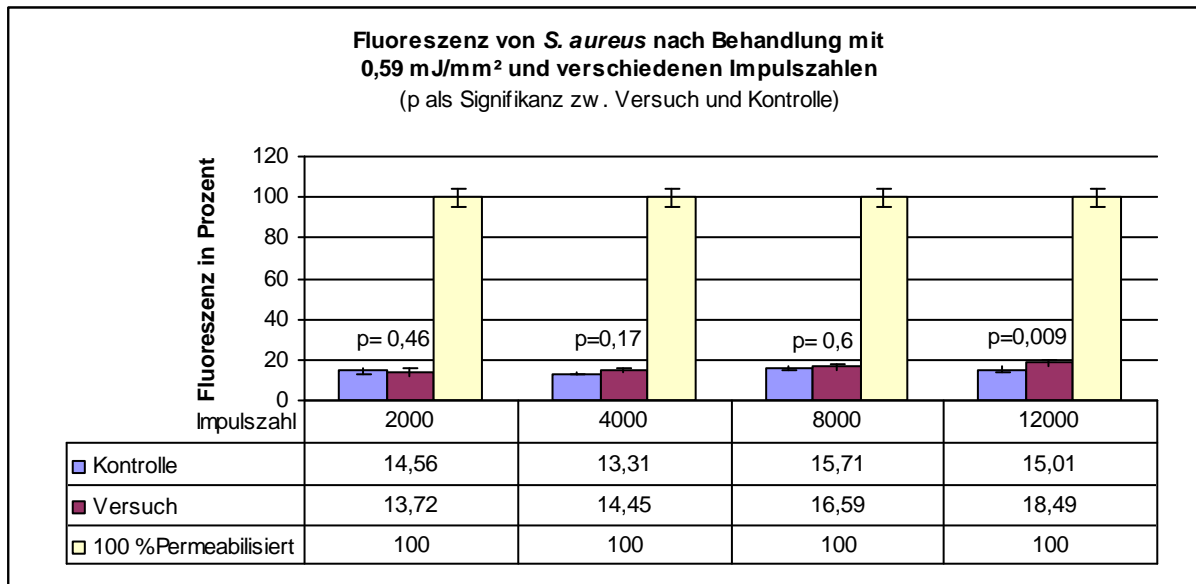


Abb. 19 Fluoreszenz von *S. aureus* nach Behandlung mit verschiedenen Impulszahlen bei 0,59 mJ/mm²

Zur Wachstumskontrolle wurden Proben der zu färbenden Bakterien ausgeimpft und das Wachstum wie beschrieben quantifiziert. Abb. 9 zeigt das Ergebnis (vgl. 4.2.3). Trotz massiver Hemmung des bakteriellen Wachstums durch die ESW konnte nur bei 12.000 Impulsen eine geringe, jedoch statistisch signifikante, Zunahme der Fluoreszenz im Sinne einer Schädigung der Zellwand beobachtet werden

4.4.2.1 Erstellen der Fluoreszenzgeraden

Betrachtet man noch einmal Abb. 16, erkennt man, dass die Fluoreszenz proportional zur Menge der permeabilisierten Bakterien an Intensität zunimmt.

Dabei ist die Fluoreszenz der zu 100 % permeabilisierten Bakterien durch die Fluoreszenz der zu 0% permeabilisierten Bakterien charakterisiert (vgl. Abb. 15 und Abb. 16). Aus diesen Werten lässt sich dann mit dem Wissen, dass die Fluoreszenz in linearem Bezug zur Bakterien-Konzentration steht, eine Gerade und die dazugehörige Geradengleichung erstellen. Das folgende Diagramm (Abb. 20) illustriert die Geraden für die durchgeführten Versuche aus 4.4.2.

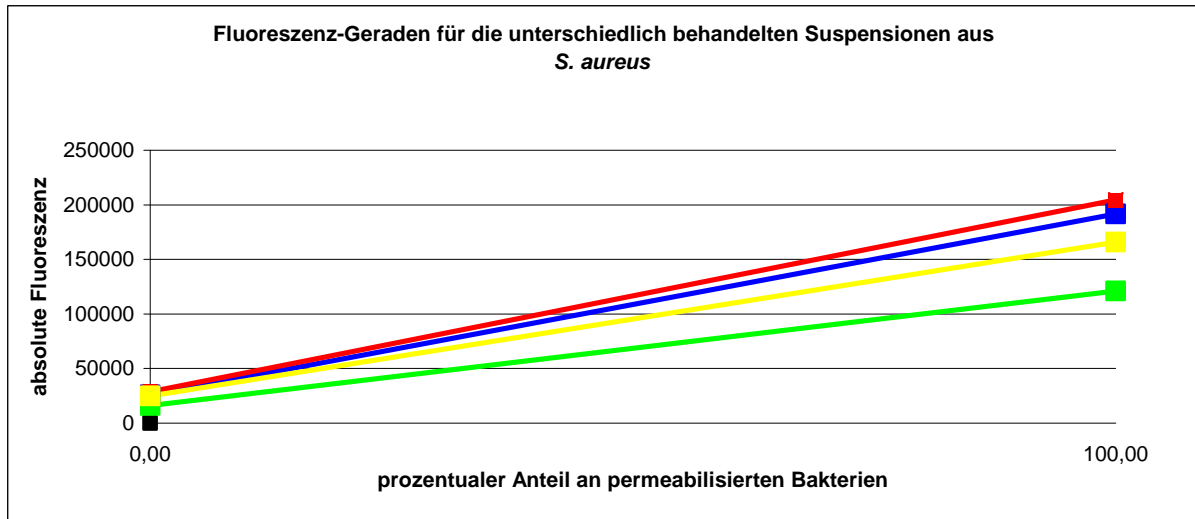


Abb. 20 Fluoreszenzgeraden für die verschiedenen Versuche

Blau: 0,38 mJ/mm², 4.000 Impulse ; Rot: 0,59 mJ/mm², 4.000 Impulse ; Grün: 0,96 mJ/mm², 4.000 Impulse, Gelb: 0,59 mJ/mm², 12.000 Impulse

4.5 Errechnen der permeabilisierten Anteile

Die folgenden beiden Tabellen (Tabelle 10 und Tabelle 11) zeigen für jeden durchgeführten Versuch aus 4.4.2 die Fluoreszenz der Kontrolllösung (0 %), die der permeabilisierten Lösung (100 %) sowie die dazugehörige Geradengleichung an (Fluoreszenz eine Suspension in Abhängigkeit des Anteils permeabilisierter Bakterien). In der letzten Spalte ist der rechnerisch ermittelte Anteil permeabilisierter Bakterien in der Versuchssuspension nach ESW dargestellt (Werte in %).

Tabelle 10 Errechneter Anteil an permeabilisierten Bakterien (4000 Impulse, versch. EFD)

Versuch	Fluoreszenz		Geradengleichung	perm. Anteil in der Versuchslösung [%]
	0 %	100 %		
0,38 mJ/mm ²	25831,67	191603,43	$f(x)=1657,72x + 25831,67$	1,14
0,59 mJ/mm ²	28771,67	204579,78	$f(x)=1758,08x + 28771,67$	0,17
0,96 mJ/mm ²	16230,08	121084,59	$f(x)=1048,55x + 16230,08$	5,43

Tabelle 11 Errechneter Anteil an permeabilisierten Bakterien (jeweils 0,59 mJ/mm²)

Versuch	Fluoreszenz		Geradengleichung	perm. Anteil in der Versuchslösung [%]
	0 %	100 %		
2000 Impulse	24173	165965,56	$f(x)=1417,93x + 24173$	-0,99
4000 Impulse	22094	165965,56	$f(x)=1438,71x + 22094$	1,31
8000 Impulse	26075	165965,56	$f(x)=1398x + 26075$	1,05
12000 Impulse	24911	165965,56	$f(x)=1410,55x + 24911$	4,09

4.6 Untersuchung des Effektes der extrakorporalen Stoßwelle auf DNA

4.6.1 Effekt der Stoßwelle auf genomische dsDNA (humane DNA)

Die beiden folgenden Abbildungen zeigen das gelelektrophoretische Muster von isolierter genomischer dsDNA, die der ESW ausgesetzt war (Abb. 21 bei 0,38 mJ/mm², Abb. 22 bei 0,96 mJ/mm², je 4.000 Impulse).

Während die unbehandelte Kontrolle als deutlich sichtbare Bande bestehen blieb, zeigten die 3 Versuchsgruppen schon bei einer geringen EFD von 0,38 mJ/mm² einen Schmierfilm, der auf eine völlige Zerstörung der DNA schließen lässt.

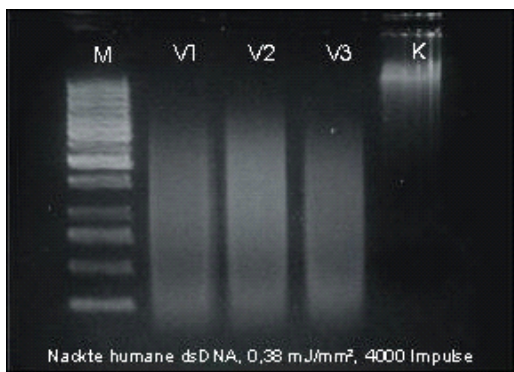


Abb. 21 humane dsDNA bei 0,38 mJ/mm²

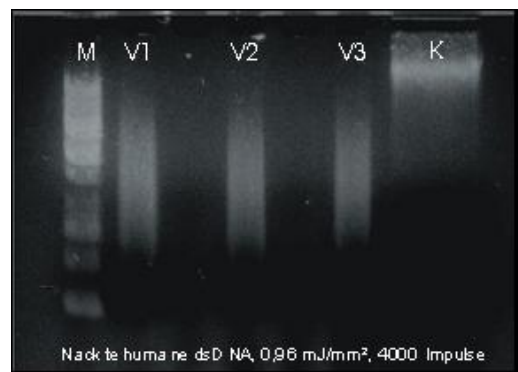


Abb. 22 humane dsDNA bei 0,96 mJ/mm²;

K = unbehandelte Kontrolle, V1-V3 = ESW-behandelte Proben; M = 10 kb Marker

4.6.2 Effekt der Stoßwelle auf genomische Bakterien-DNA

Die Abbildungen Abb. 24 und Abb. 23 zeigen das gelelektrophoretische Muster genomischen DNA des Bakteriums *S. aureus*, welche nach einer Stoßwellenbehandlung isoliert wurde. (Abb. 24 bei 0,38 mJ/mm², Abb. 23 bei 0,96 mJ/mm², je 4.000 Impulse). Die DNA zeigt in der Kontrolle und Probe eine scharf begrenzte Bande.

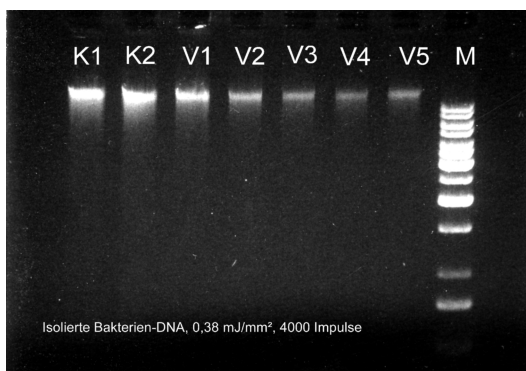


Abb. 24 bakterielle DNA bei 0,38 mJ/mm²

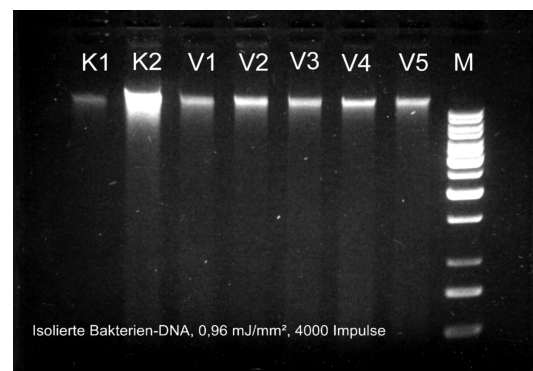


Abb. 23 bakterielle DNA bei 0,96 mJ/mm²

K1 und K2 = unbehandelte Kontrollen V1- V5 ESW-behandelte Bakterien M = 10 kb Marker

4.6.3 Fluoreszenz von dsDNA nach ESW-Behandlung

Das Fluoreszenzverhalten von nackter dsDNA, die zuerst mit der Stoßwelle behandelt wurde (0,96 mJ/mm², 4000 Impulse) und anschließend mit Sytox Green Nucleic Acid Stain gefärbt wurde, zeigt Abb. 25. Man sieht, dass die Fluoreszenz der behandelten DNA um ca. 40 % abnahm.

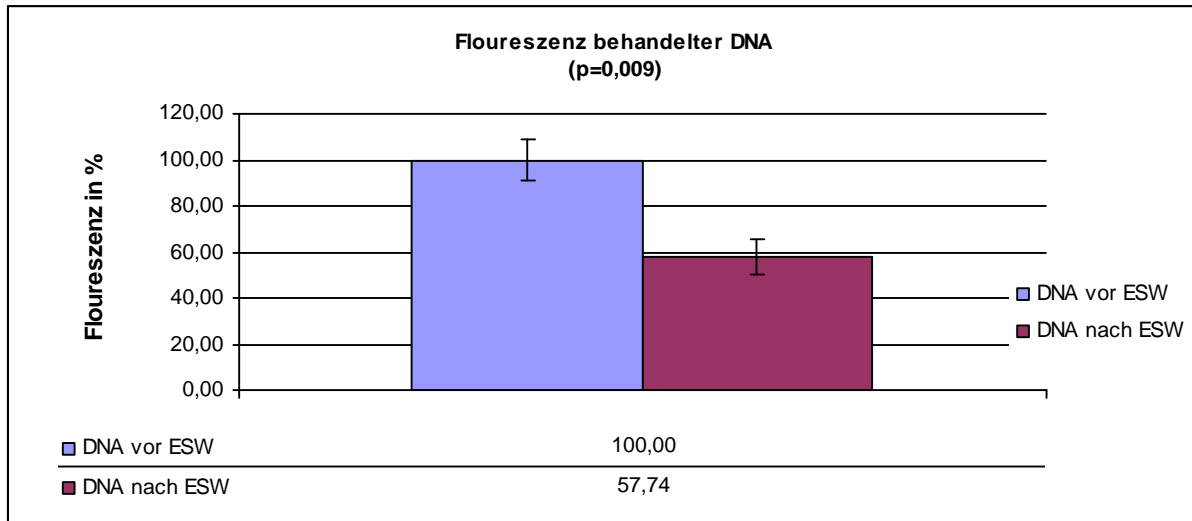


Abb. 25 Fluoreszenz von behandelter (zerstörter) und unbehandelter DNA (p= 0,009)

4.7 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung sollte Aufschluss darüber geben, ob die Stoßwelle Veränderungen an der Membran oder der strukturellen Integrität der Bakterien hervorruft.

Dazu wurden Bakterien, die 4000 Impulsen bei $0,38 \text{ mJ/mm}^2$ und $0,96 \text{ mJ/mm}^2$ ausgesetzt waren, mit Kontrollbakterien verglichen.

Im Rahmen der möglichen Auflösung waren keine morphologischen Veränderungen der Bakterienstruktur zu beobachten.

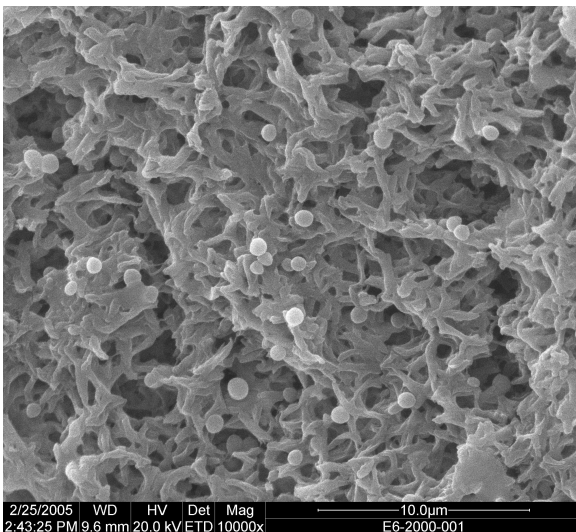


Abb. 26 Bakterien nach $0,96 \text{ mJ/mm}^2$

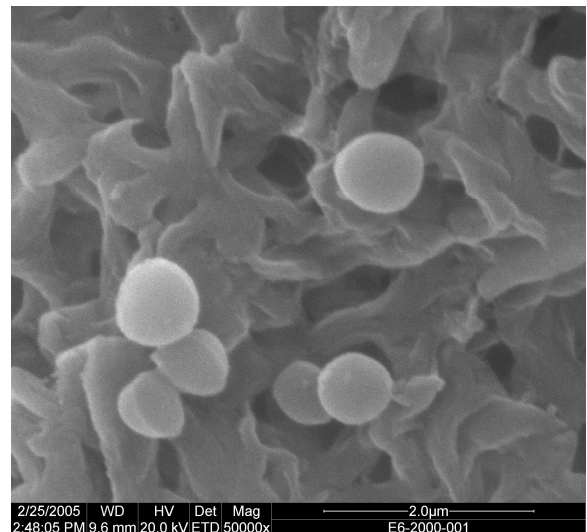


Abb. 27 Ausschnittsvergrößerung

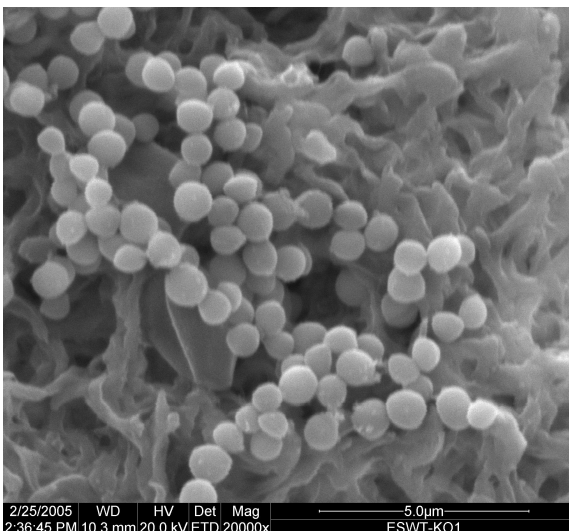


Abb. 29 Kontrollbakterien

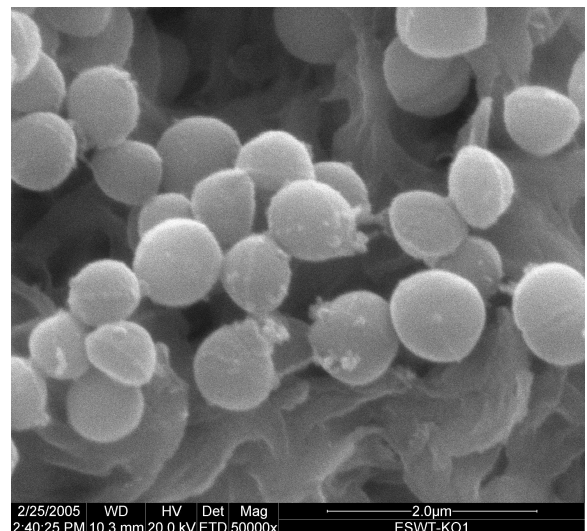


Abb. 28 Ausschnittsvergrößerung

5 Diskussion

5.1 Stand der Forschung und bisherige Ergebnisse

Bei knochenahnen Infektionen oder infizierten Pseudarthrosen gilt die Therapie mit extrakorporalen Stoßwellen heute allgemein als kontraindiziert (*Rompe 2002*).

Gerät bei der Behandlung eines Steinleidens mit hochenergetischen Stoßwellen die Welle in lokal infizierte Bereiche, so wird die Komplikation von Bakteriämien diskutiert: *Deliveliotis et al.* und *Pearle und Roehrborn* haben bei der Behandlung von Nierensteinleiden mit der Stoßwelle Bakteriämien beobachtet. (*Deliveliotis et al. 1997*, *Pearle und Roehrborn 1997*).

Bei der hochenergetischen Stoßwellentherapie zur Behandlung infizierter Pseudarthrosen konnten zwar derartigen Nebenwirkungen noch nicht beobachtet werden (*Schaden 2000*). Dennoch fürchtet man auch hier eine Streuung der Bakterien, die im schlimmsten Fall zu einer Sepsis führen kann.

Um den direkten Einfluss hochenergetischer Stoßwellen auf Bakterien zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Bakterienstämme, welche bei Knochen- und Implantat-assoziierten Infektionen klinisch relevant sind, hochenergetischen Stoßwellen ausgesetzt. Grundlage waren frühere Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (*von Eiff et al. 2000*, *Kerfoot et al. 1992*). Zwar untersuchten beide Arbeitsgruppen den Einfluss der ESW auf Bakterien bei relativ geringem Stoffwechsel (beide behandelten Bakteriensuspensionen mit NaCl als Trägerlösung, *von Eiff* bei Raumtemperatur, *Kerfoot* bei 37 °C), jedoch waren sie zu grundlegend verschiedenen Ergebnissen gelangt: Während *von Eiff et al.* eine Reduktion der KBE in einer ESW-behandelten Suspension von über 99 % nachweisen konnten, zeigte sich bei *Kerfoot et al.* kein signifikanter Unterschied. Allerdings ist für beide Arbeiten ungeklärt, wie hoch die applizierte Gesamtenergie und die EFD im Fokusbereich waren. Beide Autoren geben als Stoßwellenparameter lediglich eine Elektrodenspannung von 20 kV an. Dies erlaubt keinen Vergleich ihrer Daten untereinander oder mit der vorliegenden Arbeit, da die Elektrodenspannung, die zur Stoßwellenerzeugung verwendet wird, geräteabhängig mit der EFD in Bezug steht.

Zudem waren Probenvolumina und Versuchsaufbau in beiden Arbeiten unterschiedlich gewählt, so dass ein direkter Vergleich der Ergebnisse beider Arbeitsgruppen nur bedingt möglich ist.

Entsprechend der gültigen Norm kann bei den hier dargestellten Versuchen die EFD mit einem Maximalwert von $0,96 \text{ mJ/mm}^2$ angegeben werden. Zwar werden im klinischen Einsatz bei diesen Energien Nebenwirkungen wie Weichteilschäden oder Knochenfragmentation befürchtet, es liegen dazu jedoch noch keine weiterreichenden klinischen Untersuchungen und Daten vor. Gerade bei der Behandlung von Pseudarthrosen wurde lange Zeit der Einsatz möglichst hoher Energieflussdichten gefordert, allerdings konnten *Maier et al.* im Tiermodell bei derart hohen EFD Knochenfragmente in Lungengefäßen nachweisen (*Maier et al.* 2003). Deshalb stand die antibakterielle Wirkung der ESW bei unterschiedlichen Energieflussdichten und Impulsraten besonders im Blickfeld dieser Arbeit.

Um ein besseres Verständnis der Wechselwirkung zwischen ESW und Bakterienzelle zu erhalten, wurden außerdem die Wirkungen auf einzelne Bakterienzellen untersucht. Damit sollte erforscht werden, ob es möglich ist, die Stoßwellentherapie in niederenergetischen Dosierungen gezielt antibakteriell einzusetzen.

5.2 Versuchsaufbau

Kerfoot et al. untersuchten die Interaktion verschiedener Bakterienstämme mit Stoßwellen in Suspension in relativ starrwandigen Gefäßen und konnten dabei keinerlei bakteriziden Effekt nachweisen (*Kerfoot et al.* 1992). Auch bei im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mittels starrwandiger Eppendorf-Cups bestätigte sich, dass es zu keiner darstellbaren Reduktion der Keimzahl kam. Die deutlichen Unterschiede in den Ergebnissen der bisherigen In-Vitro-Untersuchungen zeigen, dass die bakterizide Wirkung wesentlich vom Versuchsaufbau abhängt. Es erscheint daher logisch, für einen In-vitro-Versuch ein Probengefäß zu wählen, das die applizierten Energien zu einem möglichst geringen Teil reflektiert oder absorbiert, damit auch nahezu 100 % der applizierten Energie bei der behandelten Probe wirksam wird.

Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurden, einer Empfehlung des Herstellers des Stoßwellengenerators (Fa. Dornier Medtech) folgend, Pasteurpipetten als Versuchsgefäße verwendet. Der Hersteller bedient sich für Vermessungszwecke schon seit mehreren Jahren solcher Gefäße. Messungen, deren Ergebnisse die Firma Dornier Medtech freundlicherweise zugänglich gemacht hat, bestätigen, dass die gewählten Versuchsgefäße die geforderten Bedingungen erfüllen. Auch *von Eiff et al.* und *Ueberle et al.* haben sich bei ihren Untersuchungen dieser oder vergleichbarer Probengefäße bedient (*von Eiff et al.* 2000, *Ueberle et al.* 2002).

Als Versuchsmedium wurde zunächst reine, physiologische NaCl-Lösung gewählt. Bakterien aus einer Übernacht-Kultur wurden in NaCl gelöst und dann darin mit der ESW behandelt. NaCl wurde gewählt, um die Vergleichbarkeit mit der durch *von Eiff et al.* angefertigten Arbeit zu ermöglichen. Außerdem ist nicht davon auszugehen, dass sich Bakterien in NaCl während der 33-minütigen Behandlungszeit übermäßig stark vermehren. Gerade die Wachstumshemmung der Bakterien war bei der Durchführung der Versuche erwünscht, da sonst die Stoßwelleneffekte auf die Bakterienzahl durch Überwucherung verdeckt werden könnten. Erst die Verwendung von NaCl ermöglichte die Beobachtung von antibakteriellen Effekten auf die Zelle, da aktiver Stoffwechsel möglicherweise Reparaturvorgänge in Gang setzt, die den grundsätzlich möglichen bakteriziden Effekt der Stoßwelle ebenso überdecken könnte. Weiterhin darf nicht vergessen werden, dass auch Bakterien in Infektherden bei ungenügender Versorgung mit Nährstoffen in eine statische Phase des Wachstums geraten, in welcher der Stoffwechsel wie auch die Teilungsrate im Vergleich zu optimalen Wachstumsbedingungen stark vermindert sind. Eine Verwendung von NaCl als Trägersubstanz stellt daher für die hier durchgeführten Versuche, bei denen nur der Effekt der Stoßwelle auf die Keimzahl und die Zellintegrität untersucht werden sollte, ein zwar deutlich vereinfachtes aber legitimes Modell dar.

Hingegen musste bei den Versuchen, die die Untersuchung synergistischer Effekte zwischen Stoßwelle und Antibiotika zum Gegenstand hatten, der Stoffwechsel der Bakterien aufrechterhalten werden. Dies war notwendig, da das verwendete Gentamicin aktiv unter Sauerstoffverbrauch in die Bakterienzelle gelangt und dort die Proteinbiosynthese durch Anlagerung an die Ribosomen hemmt. Um die Stoffwechselaktivität der Bakterien zu erhalten, wurde für diese Versuche CAMHB (Cation Adjusted Müller-Hinton-Broth) verwendet, und die Temperatur im Wassertank des Stoßwellengenerators auf ca. 33-35 °C gehalten.

5.3 Effekte der Stoßwelle

In der vorliegenden Arbeit konnte nunmehr reproduzierbar gezeigt werden, dass die Stoßwelle tatsächlich einen signifikanten antibakteriellen Effekt auf die Bakterien hat. Dieser Effekt trat umso deutlicher zu Tage, je höher die applizierte Impulszahl war. Es konnte jedoch kein eindeutig linearer Bezug zwischen der applizierten Impulszahl und der Reduktion der KBE festgestellt werden (Abb. 4 - Abb. 9).

Gänzlich anders zeigt sich aber das Ergebnis, wenn die Bakterien während der ESW-Behandlung in der Lage zum aktiven Stoffwechsel waren: In den Versuchen, die mit warmem CAMHB als Trägersubstanz durchgeführt wurden, zeigte sich für niedrigere EFD eine Zunahme der KBE im Vergleich zur Kontrolle. Erst bei sehr hoher EFD konnte ebenfalls eine (wenn auch geringere) Abnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden (Abb. 12).

Als zugrunde liegende Mechanismen der *antibakteriellen* Wirkung können verschiedene Stoßwelleneffekte diskutiert werden.

5.3.1 Kavitationseffekte

In flüssigen Medien (wie dem hier verwendeten NaCl, TSB, bzw. CAMHB) treten während des Einwirkens von Stoßwellen Kavitationsblasen auf (*Kuttruff et al.* 1988; *Colemann et al.* 1987), und zwar umso mehr und umso schneller, je höher die Applikationsfrequenz ist. Dies findet seine Begründung in der Tatsache, dass die Kavitationsblasen eine gewisse Zeit zum vollständigen Kollabieren benötigen. Wird diese Zeit durch eine hohe Applikationsfrequenz unterschritten, so zerfallen die Blasen nicht vollständig, sondern beginnen zu oszillieren, und in rascher Folge ihre Größe zu ändern. Dadurch entstehen immer neue Blasen, während die schon entstandenen Blasen mitunter gar nicht mehr kollabieren können. Der Effekt der Stoßwelle wird dadurch geschwächt, dass die Stoßwelle zunehmend an den Blasenrändern gestreut wird. Liegt nun eine Blase an einer Grenzfläche auf, ist sie also nicht vollständig symmetrisch, so zerfällt sie auch asymmetrisch. Dabei zerfällt die Blase von der Seite der Flüssigkeitsgrenzfläche her. Dabei entstehen Materialströme (Jetstreams) mit sehr hoher Geschwindigkeit. Diese Jetstreams könnten zusätzlich antibakteriell wirken.

Es wurde zwar versucht, diesen sich überlagernden Kavitationseffekt durch luftfreien Einschluss der Suspensionen und eine geringe Frequenz von 2 Hz möglichst klein zu halten, gänzlich verhindern lässt er sich aber nicht. Für einen Einfluss der Kavitation auf die antibakterielle Wirkung der ESW spricht auch die Tatsache, dass antibakterielle Effekte in Steinkonkrementen ohne Flüssigkeit -und somit auch ohne Kavitation nicht beobachtet wurden (*Stoller und Workman* 1990). Allerdings stellt sich hier die Frage, ob die Stoßwelle überhaupt in der Lage ist, innerhalb einer eingeschlossenen Bakterienzelle zu zerstören, da auch hier wieder große Teile der Stoßwellenenergie an der Grenzfläche Stein-Bakterienzelle reflektiert werden, und zwar umso

mehr, je unterschiedlicher die Impedanz des harten Steines (hohe Impedanz) und die der weichen Bakterienzelle (niedrige Impedanz) sind.

5.3.2 *Thermische Effekte*

Steine und Zellen erwärmen sich nur um wenige Grad Celsius (*Lovasz et al.* 1999). Bei den hier durchgeführten Untersuchungen war jedoch zu beobachten, dass das Wasser im Wassertank (und somit auch die Probenflüssigkeit in den Pipetten) nach mehreren Versuchsdurchläufen (zu 4000 Impulsen oder 33 Minuten) auf bis zu 35°C erwärmt wurde. Ein Wechsel des Wassers war deshalb bei Versuchen in NaCl-Suspension regelmäßig notwendig. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Erwärmung großteils nicht stoßwellenbedingt induziert war, sondern durch die Abwärme des Stoßwellengenerators hervorgerufen wurde.

Da durch Erwärmung der Suspension und durch Auftreten von Kavitationsblasen die physikalischen Eigenschaften der Flüssigkeiten verändert werden, kann nicht gewährleistet werden, dass die im Fokus ankommende Energie zu Beginn und Ende der Behandlung exakt gleich groß ist. Dies umso weniger, je länger die Behandlung dauert. Es erscheint daher weniger wahrscheinlich, dass sich eine lineare Dosis-Wirkung-Beziehung einstellt.

5.4 *Bedeutung von Impulszahl, Energieflussdichte und Gesamtenergie*

Interessant war auch die Beobachtung, dass niedrigere Energieflussdichten durch hohe Impulszahlen kompensiert werden können. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich bei einer EFD von 0,59 mJ/mm² und 12000 Impulsen und einer EFD von 0,96 mJ/mm² und 4000 Impulsen in beiden Fällen über 99% der koloniebildenden Einheiten abtöten lassen. Dies ist umso bedeutsamer, als man versucht, bei der Anwendung der ESW am Patienten auf hohe Energien zu verzichten, um das Risiko von Nebenwirkungen im Gewebe möglichst klein zu halten. Zudem erscheint es fraglich, welcher Anteil der applizierten Gesamtenergie tiefere Gewebeschichten oder Pseudarthrosen überhaupt erreicht. Bei der Durchdringung des Weichteil-Gewebes bis zur Pseudarthrose durchdringt die Stoßwelle zahlreiche andere Gewebeschichten. An jeder Grenzfläche zwischen benachbarten Schichten geht aber ein Teil der Schallenergie durch Reflexion verloren, da sich die Impedanzen der Gewebe (Fett, Muskel, Sehne, Haut etc.) deutlich voneinander unterscheiden (*Krause* 1997).

Dennoch: Auch wenn ein großer Teil der applizierten Energie auf dem Weg zum Behandlungsort verloren geht, zeigen die Versuchsergebnisse, dass man bei Verwen-

derung hoher Energieflussdichten auch in der Tiefe des Gewebes durch kompensatorisch erhöhte Impulszahlen eine antibakterielle Gesamtenergie applizieren kann, vorausgesetzt, die Bakterien befinden sich nicht in einer proliferativen Wachstumsphase. Es hängt wesentlich von der Stoffwechsellage der Bakterien ab, ob die ankommende Energie tatsächlich eine antibakterielle Wirkung entfalten kann, oder die Bakterien im Wachstum stimuliert.

5.5 Parallelen zwischen Stoßwelle und hydrostatischem Hochdruck

Auch für andere physikalische Verfahren wurde eine antibakterielle Wirkung dokumentiert. So ist die Inaktivierung von Bakterien mittels hydrostatischen Hochdrucks (200 bis 600 MPa) in der Lebensmittelindustrie ein etabliertes Verfahren (*Hoover et al.* 1989; *Ludwig H. et al.* 1994). Die dort beobachteten starken interindividuellen Schwankungen zwischen einzelnen Bakterienstämmen in der Sensibilität um mehrere Logarithmusstufen konnten in der vorliegenden Arbeit für extrakorporale Stoßwellen jedoch nicht bestätigt werden. Dennoch zeigte auch in der vorliegenden Arbeit der Referenzstamm *E. faecium* ATCC 6057 (wie von der Anwendung von hydrostatischem Hochdruck bekannt) eine hohe Widerstandskraft gegenüber mechanischen Einflüssen. Bei maximaler Energieflussdichte von 0,96 mJ/mm² und 4000 Impulsen bzw. bei 6000 Impulsen zeigte *E. faecium* nur eine Abnahme der vermehrungsfähigen Keime in der behandelten Suspension von ca. 50 % bzw. 80 % (Abb. 6), während bei *S. aureus* unter diesen Bedingungen nahezu sterile Verhältnisse erzeugt werden konnten (Abb. 4) Wesentlicher Unterschied zwischen Stoßwelle und hydrostatischem Hochdruck ist der schnelle Wechsel zwischen Druck- und Zuganteil während einer Stoßwellenperiode. Dabei sind Bakterienzellen (da flexibel und kugelförmig) gegenüber Druckbelastungen weitaus resistenter als gegenüber Zugbelastungen. Zudem wird bei der Applikation von hydrostatischem Hochdruck kein Unterdruck im vgl. zum Umgebungsdruck erzeugt. Bei der Stoßwelle ist dies jedoch eine wesentliche Eigenschaft (vgl. Abb. 1).

5.6 Bakteriostatische oder bakterizide Wirkung?

Zwar zeigte sich bei allen in dieser Arbeit untersuchten Bakterienstämmen eine deutliche Reduktion der vermehrungsfähigen Bakterien, also der KBE. Unklar bleibt dabei jedoch noch, ob es sich bei dieser Beobachtung tatsächlich um einen irreversiblen bakteriziden Effekt handelt, oder ob sich letztendlich nur eine subletale Hemmung der Bakterien mit temporärer Wachstums-Stase einstellt. Auch für den hydrostati-

schen Hochdruck wurden so genannte „sublethal injuries“, also eine subletale Schädigung der Bakterien mit anschließender Erholung beobachtet (*O'Reilly et al, 2000*). Als Erklärung für die Wirkung der Stoßwelle sind sowohl bakterizide als auch bakteriostatische Effekte denkbar. *Martini* konnte in einer Studie zeigen, dass die ESW an eukaryotischen Zellen die Synthese bestimmter Proteine (und damit die Genaktivität) inhibiert und bei anderen Proteinen aktiviert (*Martini et al. 2003*). Dieser Effekt konnte von *Yeung-Jen* bestätigt werden (*Yeung-Jen et al. 2000*).

Möglicherweise lässt sich dieser Effekt auf Bakterien übertragen. Allerdings konnten *Martini* und *Yeung-Jen* in ihren Arbeiten auch zeigen, dass dieser Effekt der Genregulierung reversibel ist.

Nach Anwendung der Stoßwelle wuchsen die überlebenden Bakterien innerhalb der ersten 48 h relativ schnell zu sichtbaren Kolonien aus, während sich bei Langzeitinkubation kaum zusätzliche Kolonien bildeten: Während einer Bebrütung von *S. aureus* über 5 Tage nach einer Behandlung mit 0,96 mJ/mm² und 4000 Impulsen (eine Dosis, die ausreicht, mehr als 99 % der Keime am Wachstum zu hindern) waren bereits nach 36 h über 99 % aller vermehrungsfähig gebliebenen KBE sowohl der Kontroll- als auch der Versuchsgruppe zu einer sichtbaren Kolonie ausgewachsen.

Einschlägige Literatur (*NCCLS, 2000*) gibt als Wachstumszeit für *S. aureus* ca. 48 h bei 37 °C an, bevor Kolonien auf einer Agar-Platte ausgezählt werden sollen. Die Tatsache, dass *nach* den ersten 36 h der insgesamt 5-tägigen Bebrütungszeit praktisch keine weitere Bakterienzelle der Versuchs- und Kontrollgruppe zu einer Kolonie herangewachsen war, spricht für einen bakteriziden Effekt der ESW gegenüber den behandelten Bakterien.

5.7 Stimulierende Wirkungen der ESW?

Es mag ein Widerspruch sein, dass die ESW bei Bakterien, die (im Vergleich zu Bakterien in kaltem NaCl) in warmer Nährlösung der ESW ausgesetzt war, eine Vermehrung der KBE zumindest für niedere EFD hervorrufen konnte. Die ESW zeigte unter adäquaten Wachstumsbedingungen und niedriger EFD einen stimulierenden Effekt auf die Staphylokokken-Proliferation (Vgl. Abb. 12). Dennoch konnte selbst unter optimalen Wachstumsbedingungen bei sehr hohen Energieflussdichten ein antibakterieller Effekt beobachtet werden. Bei einer EFD von 0,96 mJ/mm² nahm die Zahl der KBE in einer warmen Nährlösung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ab, jedoch waren die Reduktionsraten deutlich geringer als in kalter Kochsalzlösung (Abb. 4 und Abb. 12).

Im ersten Versuchs-Setting (NaCl) war es das Ziel, grundsätzliche physikalische Effekte der ESW auf die Bakterienzelle zu erforschen, ohne Berücksichtigung von möglichen Reparatureffekten. Im zweiten Versuchs-Setting sollten direkt stoffwechselaktive Vorgänge untersucht werden. Da auch bei Osteoblasten unter ESW eine Zunahme der Stoffwechselaktivität und des Proliferationsverhalten beobachtet werden konnte (Martini et al. 2003), mag es durchaus sein, dass Bakterien unter optimalen Bedingungen ebenfalls zum Wachstum angeregt werden und über Reparaturmechanismen eine höhere ESW-Toleranz zeigen. Ferner verfügt eine lebende, stoffwechselaktive Bakterienzelle über verschiedene Mechanismen, um freie Radikale im Zytoplasma abzufangen; so verfügt *S. aureus* beispielsweise über das Enzym Superoxid-Dismutase (Karavolas et al. 2003) und spezielle Stoffwechselwege, um oxidativem Stress zu begegnen (Horsburgh et al. beide 2001).

5.8 Rasterelektronenmikroskopische Erkenntnisse?

Überraschend in diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen und der fluoreszenzchemischen Untersuchungen zur Zellmembranintegrität. Selbst unter einer 100.000-fachen Vergrößerung konnte keine sichtbare Beschädigung der Bakterien festgestellt werden. Hingegen zeigten Bakterien, die mit hydrostatischem Hochdruck behandelt worden waren, deutliche Veränderungen in ihrer Mikrostruktur. Ihr Aussehen gleicht dem eines U-Bootes, das von hohem Wasserdruck zerdrückt wurde (Weber 2006). Einschränkend muss hier allerdings erwähnt werden, dass fragmentierte Bakterien möglicherweise nicht auf dem verwendeten Filterpapier anhaften und somit im REM nicht zur Darstellung kommen.

Bei *S. aureus* konnte jedoch bei einer Behandlung mit 4000 Impulsen weder bei Verwendung einer EFD von $0,38 \text{ mJ/mm}^2$ noch bei $0,96 \text{ mJ/mm}^2$ eine Beschädigung der Zellen beobachtet werden. Dabei ist natürlich festzuhalten, dass bei hydrostatischem Druck ein Vielfaches des Druckes wirkt, der bei der Stoßwelle als Spitzendruck gemessen werden kann. Zudem wirkt der Spitzendruck bei der Stoßwelle nur außerordentlich kurz, allerdings mit schneller Druckaufbau- und Abbauezeit.

Offenbar entfaltet sich die Wirkung der Stoßwelle nicht in einer Zerstörung der Morphologie der Bakterienzelle. Die Ergebnisse der Fluoreszenz-Untersuchung bestätigen diese Vermutung.

5.9 Membranschädigungen durch ESW?

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Stoßwelle bei eukaryotischen Zellen eine Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran hervorruft (*Steinbach et al.* 1992; *Delius und Adams* 1999; *Gambihler et al.* 1992 und 1994). Diesen Effekt macht man sich zum Beispiel für einen gezielten Molekültransfer zu Nutze (*Kodama et al.* 2002). *Kodama* zeigte, dass sich Farbstoffmoleküle mittels ESW in intakte eukaryotische Zellen transfizieren lassen.

Aber auch hier gilt, dass diese Erkenntnisse nicht auf Bakterienzellen übertragen werden dürfen. Im Aufbau ihrer strukturgebenden Bestandteile unterscheiden sich eukaryotische und prokaryotische Zellen grundlegend voneinander. Sowohl gram-negative, als auch gram-positive Bakterienzellen verfügen über eine stabile Mureinschicht aus Proteoglykanen. Sie fehlt bei eukaryotischen Zellen. Ein wesentlicher Unterschied besteht ferner darin, dass die Lipid-Doppelmembran eukaryotischer Zellen hauptsächlich durch van-der-Waals-Kräfte zusammengehalten wird, wohingegen die Stabilität der Mureinschicht auf kovalenten Bindungen beruht.

Bei dem hier beschriebenen Versuch, wurden die Bakterienzellen nach der Stoßwellenbehandlung mit Sytox Green Nucleic Acid Stain gefärbt. Dabei handelt es sich um einen Farbstoff, der sich sehr spezifisch an Nukleinsäuren bindet und dabei sein Fluoreszenzverhalten ändert. Ungebunden fluoresziert er (nach Anregung durch Licht einer Wellenlänge von 485 nm) im Bereich von 485 nm, während an DNA gebundener Farbstoff im Bereich von 535 nm fluoresziert.

Der Sytox Green Farbstoff zeichnet sich dadurch aus, dass er die Zellwand und Zellmembran von lebenden Bakterien nicht durchdringen kann. Ferner fluoresziert der Farbstoff nur geringfügig, wenn er sich an intakte Zellwände bindet.

Bei der Färbung und anschließenden Untersuchung der Fluoreszenz dienten die Arbeiten von *Roth et al* und *Lebaron et al* als Grundlage (*Lebaron et al.* 1998). *Roth et al.* konnten zeigen, dass dieser Farbstoff ein geeignetes Mittel ist, um permeabilisierte Bakterien in einer Population mit intakten Bakterien zu markieren (*Roth et al.* 1997). Ferner konnte in der Studie gezeigt werden, dass sich Bakterien, die thermisch, mit Alkohol oder mit einem zellwand-zerstörenden Antibiotikum behandelt waren, im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe deutlich in ihrem Fluoreszenzverhalten unterscheiden, nachdem sie mit Sytox Green angefärbt wurden.

Sytox Green hat aber einen wesentlichen Nachteil: Da er ein überaus empfindlicher Farbstoff ist, der sich schon bei Einwirkung von normalem Tageslicht zu zersetzen beginnt, musste überprüft werden, ob er sich durch den Einfluss der Stoßwelle verändert. Dabei war festzustellen, dass Sytox Green schon bei der niedrigsten in dieser Arbeit verwendeten Energieflussdichte ($0,38 \text{ mJ/mm}^2$) seine Eigenschaften verliert und zerstört wird. Deshalb ist er nicht geeignet, um reversible Permeabilitätsänderungen *während* der Stoßwellen-Applikation nachzuweisen. Bei allen Versuchen wurde daher zunächst eine Bakterien-Suspension mit ESW behandelt und anschließend mit Sytox Green gefärbt. Dadurch konnte zumindest erkannt werden, ob eine irreversible Permeabilisierung (vergleichbar einer Permeabilisierung durch Alkohol, Antibiotika etc.) auftrat.

Überraschenderweise konnte gezeigt werden, dass eine Suspension von Bakterienzellen selbst nach Applikation von $0,96 \text{ mJ/mm}^2$ und 4000 Impulsen, also einer Dosierung, die ausreicht, um mehr als 95 % der KBE am Wachstum zu hindern (Abb. 18), eine Fluoreszenz aufwies, die nur wenige Prozent über derjenigen der unbehandelten Kontrollgruppe lag (Abb. 17. und Abb. 19). Auch bei Applikation von 12.000 Impulsen bei $0,59 \text{ mJ/mm}^2$ zeigte die Versuchssuspension eine Fluoreszenz, die nur wenig über der der unbehandelten Kontrollgruppe lag. Zwar ist der Unterschied in der Fluoreszenz statistisch signifikant, allerdings werden die Bakterien offensichtlich nicht nur durch Änderung der Permeabilität geschädigt: Vergleicht man die Fluoreszenz mit dem tatsächlichen Überleben der Keime, also mit der Anzahl der vermehrungsfähigen KBE in der behandelten Bakteriensuspension, so sieht man, dass bei $0,96 \text{ mJ/mm}^2$ nur zwischen 1,2% und 4,8 % der Keime vermehrungsfähig geblieben sind. Dies würde bedeuten, dass über 95 % der Keime permeabilisiert sein müssten. Der berechnete Anteil an permeabilisierten Bakterien lag jedoch je nach Versuch und EFD nur zwischen 1,14 % (für $0,38 \text{ mJ/mm}^2$, 4000 Impulse) und 5,4 % (für $0,98 \text{ mJ/mm}^2$, 4000 Impulse), wie die Tabelle 10 und Tabelle 11 zeigen.

Es erscheint in diesem Zusammenhang auch wenig wahrscheinlich, dass die niederen Fluoreszenz-Werte dadurch zustande kamen, dass die Bakterien vollständig zerstört wurden und die DNA freigelegt und ebenfalls zerstört wurde. Wie die Untersuchung von nackter, stoßwellenbehandelter DNA zeigt (Abb. 21 und Abb. 22), wird die DNA zwar zerstört und in kleine Bruchstücke zerlegt, dennoch zeigt sie noch eine Fluoreszenz, die etwa 60% derjenigen von intakter DNA entspricht. Da die DNA von

Bakterien ungleich länger und stabiler verpackt ist, und dadurch der ESW gegenüber weniger anfällig sein dürfte als die untersuchte kurze dsDNA, würde bei vollständiger Destruktion der Bakterien eine Fluoreszenz zu erwarten sein, die weit über den gefundenen Werten liegen müsste (Abb. 25).

Eine dauerhafte Zerstörung der Zellintegrität oder Erhöhung der Zellpermeabilität, die das deutliche Abnehmen der Vermehrungsfähigkeit erklären würde, wird bei hoher EFD oder bei niedriger EFD und kompensatorisch erhöhter Impulszahl offenbar zu einem geringen Maße erreicht. Dieser Effekt scheint allerdings nur eine untergeordnete Rolle zu spielen und betrifft nur wenige Bakterien der Suspension.

Dies wird auch durch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigt, die keine Zerstörung der Bakterienzellen erkennen lassen. Daraus muss gefolgert werden, dass es sich bei der antibakteriellen Wirkung der ESW neben einem geringen, die Permeabilität ändernden Effekt auch um einen wesentlich ausgeprägteren, bislang noch nicht nachgewiesenen Effekt handelt.

5.10 Einfluss der ESW auf die DNA

Nachdem Effekte auf die Zellmembranintegrität weitgehend ausgeschlossen werden konnten, sollten Einflüsse auf die DNA behandelter Bakterien untersucht werden. Auch andere Autoren untersuchten den Effekt der extrakorporalen Stoßwelle auf intrazelluläre DNA eukaryotischer Zellen. Dabei wurde festgestellt, dass DNA in wässriger Lösung bei Spitzendrücken zwischen 16 und 30 MPa und negativen Spitzendrücken von bis zu 9 MPa deutliche Schäden aufwies (*Kochaniski et al., 2001*).

Dagegen zeigte DNA, die aus Lymphozyten extrahiert wurde, welche die Behandlung mit extrakorporalen Stoßwellen in vitro überlebt hatten, keine Beschädigung, wohingegen die DNA, die aus toten Zellen gewonnen wurde, sichtbar zerstört war (*Bird et al. 1995*).

Zunächst wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Stoßwelle auf nackte, humane, genomische dsDNA untersucht. Dabei wurden DNA-Fragmente mit einer Länge von 4300-6000 bp verwendet. Dabei konnte festgestellt werden, dass die DNA unspezifisch zerstört wird. Es konnten in der anschließenden Gel-Elektrophorese keine einzelnen Banden mehr unterschieden werden (Abb. 21 und Abb. 22). Es zeigte sich ein Schmierfilm, der belegt, dass die DNA in viele verschieden große Bruchstücke zerlegt worden war.

Um nun zu untersuchen, ob auch die DNA von Bakterien intrazellulär sichtbar durch Stoßwellen geschädigt wird, wurden Suspensionen von *S. aureus* mit jeweils 4000 Impulsen bei unterschiedlichen Energieflussdichten ($0,38 \text{ mJ/mm}^2$ und $0,96 \text{ mJ/mm}^2$) behandelt. War von der niedrigen Energieflussdichte bekannt, dass sie keinen signifikanten Einfluss auf das Bakterienwachstum hat, so ist dieser Einfluss bei der hohen Energieflussdichte, wie beschrieben, sehr deutlich. Dennoch war bei der Isolierung der DNA und einer anschließenden Analyse mittels Gel-Elektrophorese kein Unterschied zwischen behandelter DNA und Kontrolle auszumachen (Abb. 23 und Abb. 24). Das Genom von *S. aureus* ist ca. 2,8 Mbp lang. Es liegt aufgewickelt als einzelnes Chromosom vor und wird zudem von Histonen geschützt. Es stellt also eine recht kompakte Einheit dar.

Wenn man sich vor Augen hält, dass die Stoßwelle Effekte wie Kavitation, Bildung freier Radikale etc. hervorruft, so müssen diese Effekte auf beide Arten DNA (genomisch, intrazellulär oder nackt in vitro) gleichermaßen wirken. Dabei ist jedoch festzuhalten, dass diese Effekte, anders als z.B. DNA-Scheren, sehr unspezifisch wirken werden, ähnlich der unspezifischen Wirkung, die UV-Licht und andere mutagene Substanzen auf die DNA haben. Auch wenn die DNA des Bakteriums aufgewickelt und in kompakter Form vorliegt, so ist sie doch den Radikalen und Kavitationskräften wegen des Fehlens einer Kernmembran frei zugänglich, vergleichbar einer Schnur, die man mit einer Schere zerschneiden kann, auch wenn sie auf einer Rolle aufgewickelt ist.

Die gegensätzlichen Ergebnisse bei der Behandlung der verschiedenen DNA-Proben mögen ihre Begründung darin finden, dass die bakterielle DNA zum einen durch die Zellwand und -membran vor den Einflüssen der ESW geschützt ist. Zum anderen können selbst Bakterienzellen eine gewisse Reparatur ihrer DNA durchführen. Ferner verfügt eine lebende Bakterienzelle (wie schon erwähnt) über verschiedene Mechanismen, um Schädigenden Momenten und aggressiven Stoffwechselprodukten begegnen zu können.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Stoßwelle auf verschiedene Bakterienstämme wachstumshemmend wirkt. Zumindest werden die Bakterien auf mindestens 5 Tage hinaus (entspricht ca. 200-250 Generationszeiten) an der Vermehrung gehindert. Das Ausmaß dieses Effektes ist jedoch vom Bakterienstamm abhängig. Aller-

dings gilt diese Aussage nur für Bakterien, die während der Stoßwellenapplikation nur einen reduzierten oder sogar keinen Stoffwechsel durchführen können, und dadurch natürlich mögliche zelluläre Reparaturmechanismen ausgeschaltet sind.

Welcher Mechanismus der Stoßwelle hinter diesem Effekt steht, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Die Permeabilität der Bakterienzellmembran zeigte sich nach Stoßwellenbehandlung nicht wesentlich verändert. Auch war kein sichtbarer Effekt im Sinne einer ungerichteten Zerstörung der DNA zu erkennen. Ebenso wenig zeigten rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen sichtbare Beschädigungen der Bakterienzellen.

Der Effekt der Stoßwelle liegt somit möglicherweise auf molekularer Ebene in der Veränderung der Zellwand oder der Membran, in der Veränderung von Membranproteinen oder in der Störung von Stoffwechselfvorgängen innerhalb der Zelle. Welcher Mechanismus letztlich für das verminderte Wachstum verantwortlich ist, sein Effekt ist allem Anschein nach irreversibel und somit bakterizid.

5.11 Einfluss von ESW und Gentamicin auf Bakterien

Bisher gibt es nur wenige Studien, die einen synergistischen Effekt zwischen der Stoßwelle und Medikamenten untersuchten. Auch hier beschränkt sich die Datenlage auf eukaryotische Zellen. *Kato et al.* konnten zeigen, dass bei In-vitro-Versuchen die Kombination von extrakorporalen Stoßwellen und Bleomycin eine deutlich gesteigerte zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen aufweist (*Kato et al.* 2000). Dieselbe Arbeitsgruppe konnte diesen Effekt auch in vivo nachweisen. Insgesamt gibt es ca. ein Dutzend Studien, die synergistische Effekte von Chemotherapeutika und Tumorzellen untersuchten. Für Bakterien und Antibiotika liegen diesbezüglich bislang keine Untersuchungen vor.

5.11.1 Einfluss der ESW auf Gentamicin

Zunächst musste der Einfluss der Stoßwelle auf das in dieser Arbeit verwendete Gentamicin untersucht werden. Da festgestellt werden konnte, dass die Stoßwelle in der Lage ist, Moleküle verschiedener Größe zu zerstören (Sytox Green, DNA) und zudem allem Anschein nach unter dem Einfluss der Stoßwelle freie Radikale auftreten (*Suhr et al.* 1991), musste die Stabilität des untersuchten Gentamicins gegenüber hochenergetischen Stoßwellen nachgewiesen werden.

Um dies zu klären, wurde Gentamicin in NaCl-Lösung 4000 Impulsen bei einer EFD von 0,96 mJ/mm² sowie einer EFD von 0,38 mJ/mm² ausgesetzt. Anschließend wur-

de durch Ermittlung der MHK die biologische Wirksamkeit geprüft. Außerdem wurde das Molekül durch Infrarotspektroskopie direkt analysiert.

Es konnte festgestellt werden, dass sich die MHK des behandelten Gentamicins gegenüber derjenigen von unbehandeltem Gentamicin nicht ändert. Bei allen getesteten Proben lag die MHK in dem von der NCCLS als Referenzwert angegebenen Bereich (vgl. Tabelle 7). Dies kann als Indiz dafür aufgefasst werden, dass die Wirksamkeit des Moleküls nach Behandlung mit der ESW erhalten bleibt.

Letztendlich kann aber nur eine Analyse auf molekularer Ebene Gewissheit darüber bringen, ob das Molekül verändert wurde oder nicht. Hierzu wurde behandeltes und unbehandeltes Gentamicin mittels Infrarotspektroskopie verglichen. Hintergrund dieser Untersuchung ist die Analyse des Absorptionsverhaltens des Moleküls gegenüber infrarotem Licht verschiedener Wellenlängen, was v. a. auf die Zusammensetzung und Anordnung der kovalenten Bindungen beruht.

Betrachtet man das Diagramm der Infrarotspektroskopie (Abb. 10), so fällt auf, dass zwar das grundsätzliche Muster der Absorption in allen Proben und Kontrollen identisch ist, die Kurven aber parallel zur x-Achse verschoben sind. Dies zeigt, dass offenbar die Konzentration des untersuchten Gentamicins unterschiedlich hoch war.

Dieser Sachverhalt findet seine Erklärung darin, dass das in NaCl gelöste Gentamicin zunächst kristallisiert (eingetrocknet) und anschließend untersucht wurde. Innerhalb der untersuchten Kristalle ist nur schwerlich von homogenen Gentamicin-Verteilungen auszugehen.

Würde das Molekül hingegen verändert werden (bspw. durch Oxidationsvorgänge), oder würde das Molekül zerstört und dadurch Bruchstücke auftreten, träte eine im Vergleich zum Kontroll-Gentamicin veränderte Absorptionslinie auf.

Der quantitative Unterschied in den untersuchten Proben ist also erklärbar, einen qualitativen Unterschied fand man aber nicht (z.B. durch Vorhandensein verschiedener Linien-Muster). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass das Gentamicin durch die Stoßwelle nicht verändert wurde.

Gentamicin ist ein intrazellulär wirkendes, bakterizides Antibiotikum. Es blockiert die Ribosomen und damit die Proteinsynthese. Dabei wirkt Gentamicin konzentrationsabhängig. Ein synergistischer Effekt wäre erklärbar, indem die Stoßwelle die Perme-

abilität der Bakterien erhöht und Gentamicin dadurch vermehrt in die Zelle einströmen könnte.

Zumindest für die Zeit nach der Behandlung konnte am Beispiel von Sytox Green eine wesentliche Permeabilitätserhöhung ausgeschlossen werden. Fraglich war jedoch noch, ob eine temporäre Permeabilitätserhöhung während der Stoßwellenapplikation auftritt oder ob Gentamicin durch ESW über andere permeabilisierte Kanäle als Sytox Green in die Bakterien transportiert werden kann. Ein synergistischer Effekt durch zusätzliche intrazelluläre Gentamicin-Präsentation wäre also in einer gesteigerten Abtötung der untersuchten Bakterien zu erkennen.

Gentamicin wird zudem von den Bakterien in einem Sauerstoff verbrauchenden Prozess in die Zelle befördert. Werden solche Prozesse während der Stoßwellenbehandlung unterbunden (ohne dass die Zelle zu Grunde geht), so könnte sich die Anwendung der Stoßwelle unter antibiotischer Abdeckung möglicherweise sogar als nachteilig erweisen, was ebenso von wesentlicher klinischer Relevanz ist.

Die bisher beschriebenen Versuche galten Bakterien, die sich während der Stoßwellenbehandlung in physiologischer NaCl-Lösung befanden, um sie während des Besusses am Wachstum zu hindern. Bei der Anwendung von Gentamicin ist jedoch ein aktiver Stoffwechsel der Bakterien notwendig und daher während des Versuches erwünscht.

Zudem musste ermittelt werden, wie hoch die Absterberate der Bakterien durch alleinige Gentamicin-Applikation während der 33-minütigen Dauer einer Stoßwellenbehandlung lag. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen von Gentamicin in CAMHB bei 35 °C mit einer bekannten Menge Bakterien versetzt. Nach 33 Minuten wurde dann ein Teil der Suspensionen ausgeimpft und die KBE in bekannter Weise quantifiziert.

Ferner musste bekannt sein, wie hoch die Absterberate unter diesen Versuchsbedingungen liegt. Überraschenderweise zeigte sich bei der gewählten EFD (0,59 mJ/mm²) und den herrschenden Bedingungen (Nährmedium, 35 °C), dass die ESW-Applikation nicht zu einer Verminderung der Bakterienzahl, sondern sogar zu einer *Vermehrung* der KBE in Suspension führte. Hingegen wurde die Wachstumszunahme bei geringer EFD durch die gleichzeitige Gabe von Antibiotika gehemmt. Die KBE nahmen um den gleichen Faktor ab, wie die KBE in einer Suspension, die zwar der Antibiose, nicht aber der ESW ausgesetzt war (Abb. 13).

Daraus kann geschlossen werden, dass die ESW keinen Einfluss auf die Wirksamkeit der Antibiose hat!

Wie lässt sich nun das in vitro gefundene Ergebnis auf eine in-vivo-Situation übertragen? Zunächst ist festzustellen, dass sich der Stoffwechsel der Bakterien in einem chronischen Infektherd (z.B. einer infizierten Pseudarthrose, eine Osteomyelitis o. ä.) in einer statischen oder annähernd statischen Phase befindet. Nährstoffmangel, gegenseitige Behinderung, saures Eitermilieu etc. hemmen Wachstum und Vermehrung der Keime. Diesem Umstand kommt die im In-vitro-Modell gewählte Trägersubstanz NaCl eher nahe. Frische Infekte finden hingegen optimale Nährbedingungen, wie sie im zweiten Teil der Arbeit simuliert wurden. Die Infektsituation wird sich also vom Standpunkt des Stoffwechsels aus betrachtet irgendwo zwischen den beiden extremen In-vitro-Modellen befinden.

Welchen Einfluss die Stoßwelle dann auf die Bakterien und ihr Wachstumsverhalten haben wird, ist schwerlich vorherzusagen. Ein hochgradiger bakterizider Effekt ist jedoch nicht unbedingt zu erwarten.

Physikalische Effekte wie Kavitation und direkte Destruktion (die in geringem Maße an Hand einer gering erhöhten Permeabilität unter bestimmten Bedingungen beobachtet werden konnte), werden auf die Bakterienzelle unabhängig von ihrem Stoffwechselstatus Einfluss haben.

Die Tatsache jedoch, dass Bakterien bei optimalen Bedingungen keine so große Empfindlichkeit gegenüber der ESW aufweisen, legt die Vermutung nahe, dass die Stoßwelle antibakterielle Effekte hervorrufen kann, denen die Bakterienzelle direkt begegnen kann. Zum Beispiel können Radikale oder andere durch die Stoßwelle erzeugten Stoffwechsel-Metabolite bei guter Stoffwechsellage von der Bakterienzelle abgebaut werden, und dadurch ihrer zerstörerischen Wirkung beraubt werden.

Aus den vorliegenden Resultaten kann abgeleitet werden, dass eine ESW-Therapie bei einem hochaktiven Infekt eher zurückhaltend eingesetzt werden soll. Hier sollte dann ggf. eine sehr hohe EFD gewählt werden.

Eine Abdeckung des Patienten mit Antibiotika ist möglich und sinnvoll. Insbesondere im Infektgebiet wurde zumindest für das knochen- und weichteilgängige Gentamicin nachgewiesen, dass es nach wie vor einen bakteriziden Effekt hat und durch die ESW nicht negativ beeinflusst wird. Auch die Bakterien verlieren weder während, noch nach der Behandlung ihre Empfindlichkeit gegenüber Gentamicin (Tabelle 8).

Außerdem wurden als Folge der Stoßwellenbehandlung an sklerosiertem Knochen Mikrofrakturen, Knochenumbauten und damit verbunden Neovaskularisationen beschrieben (*Wang et al.* 2002 und 2003). Einerseits kann dies den Bakterien als Austrittspforte dienen, um im schlimmsten Fall eine Bakteriämie mit septischer Streuung hervorzurufen. Beschrieben wurde dies im Zusammenhang mit der ESW-Anwendung bei orthopädischen Indikationen bislang nicht, wenngleich vereinzelte Fallberichte aus der Urologie existieren, die über eine septische Streuung und sogar eine Abszessbildung intracranial nach ESW-Zertrümmerung eines Nierensteines berichten (*Zannoud et al.* 2003). Andererseits dienen Neovaskularisationen nach Aufbrechen des Sklerosesaumes aber auch dem Immunsystem als neuer Angriffsweg und bieten dem Antibiotikum eine Eintrittspforte in den Infektherd.

Aus diesem Grund ist wohl eine Behandlung eines akuten oder chronischen infizierten Herdes mit der ESW unter bestimmten Voraussetzungen zwar risikoreich, aber dennoch denkbar. Auf Grund der vorliegenden Datenlage wird die direkte Behandlung der Infektsituation aber nicht zum künftigen Indikationsspektrum gehören. Vielmehr könnte bspw. eine infizierte Pseudarthrose trotz der Infektsituation der ESW-Therapie zugeführt werden.

Hier können nur weitere Versuche *in vivo* helfen, um klare Aussagen zur Behandlung von Infektionen mit der ESW treffen zu können. Die Daten der *In-vitro*-Versuche ermutigen zu solchen Versuchen. Wichtig erscheint insbesondere noch die Überprüfung, ob lokale, ruhende Infektsituationen durch niedrigere Stoßwellenenergien, welche auch das Bakterienwachstum anregen, aktiviert werden.

Ferner sollten weitere Untersuchungen angestellt werden, um die Genaktivität von Bakterien genau zu messen. Insbesondere die Beeinflussung von Resistenzgenen muss Gegenstand von genauen Untersuchungen werden.

Da sich in dieser Untersuchung abzeichnet, dass die Effekte der Stoßwelle auf Bakterienzellen streng intrazellulär ablaufen, und es dabei deutliche Unterschiede zwischen Bakterien in stoffwechselaktiver und Bakterien in ruhender Phase gibt, muss nun geprüft werden, wie sich verschiedene Suspensionen von Bakterien unter optimalen Wachstumsbedingungen verhalten, wenn sie verschiedenen EFD ausgesetzt wurden.

6 Zusammenfassung

Studienziel: Die Anwendung der Extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWT) umfasst in der Orthopädie ein breites Indikationsspektrum. Infektionen im Applikationsgebiet gelten jedoch bisher als Kontraindikation. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den grundlegenden Effekten der ESW auf Bakterien und deren Interaktion mit Antibiotika. Zudem sollte die Wirkungsweise der ESW an Hand von Untersuchungen zur Permeabilität der Bakterien sowie Effekte auf die bakterielle DNA untersucht werden.

Methode: Standardisierte Suspensionen verschiedener humanpathogener Erreger wurden mit jeweils 1000-12000 Impulsen hochenergetischer Stoßwellen mit einer mittleren Energieflussdichte von 0,38 mJ/mm² bis 0,96 mJ/mm² bei 2 Hz behandelt. Der Einfluss von Impulszahl und EFD wurde in systematischen Versuchsreihen (1000-12.000 Impulse, EFD 0,38-0,96 mJ/mm²) an *S. aureus* und *P. aeruginosa* untersucht. Der Effekt auf weitere Keime (*MRSA*, *E. faecium*, *S. epidermis*) wurde in Einzelversuchen dokumentiert.

Der Einfluss der ESWT auf die Wirksamkeit von Antibiotika wurde am Beispiel von Gentamicin untersucht, dessen Stabilität unter ESWT infrarotspektrometrisch nachgewiesen wurde. *S. aureus* in Nährbouillon (CAMHB) wurde mit 4000 Impulsen bei 0,59 mJ/mm² behandelt und die MHK gegenüber Gentamicin mit der MHK einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Zur Untersuchung synergistischer Effekte zwischen Antibiotika und ESWT wurden Bakterien in einer Lösung aus CAMHB und unterschiedlich hohen Gentamicin-Konzentrationen (0,25 - 4 µg/ml) behandelt (4000 Impulse, 0,59 mJ/mm²). Die vitalen Bakterien wurden quantifiziert und mit Kontrollgruppen, die nur ESWT bzw. nur Gentamicin ausgesetzt waren, verglichen.

Der Einfluss der Stoßwelle auf die Permeabilität von Bakterien wurde untersucht, in dem *S. aureus* mit verschiedenen hohen Impulszahlen und verschiedenen Energieflussdichten behandelt wurde. Nach Behandlung wurden die Bakterien mit Sytox Green Nucleic Acid Stain gefärbt, einem Farbstoff, der nur an die DNA toter, permeabilisierter Zellen binden kann und dabei sein Fluoreszenzspektrum und die Fluoreszenzintensität ändert. Der Anteil vermehrungsfähiger Zellen in der behandelten Suspension wurde durch Ermittlung der koloniebildenden Einheiten (KBE) bestimmt.

Der Anteil der permeabilisierten Bakterien konnte fluorometrisch gemessen und mit dem Anteil lebender, auskeimender Bakterien verglichen werden.

Die Quantifizierung der Bakterienkolonien erfolgte nach den Richtlinien der NCCLS, die statistische Auswertung mit dem Mann-Whitney-Test.

Ergebnis: Es zeigte sich eine signifikante bakterizide Wirkung ($P < 0,01$) der ESWT nach Applikation einer hohen EFD ($> 0,59 \text{ mJ/mm}^2$, 4000 Impulse) sowie hoher Impulszahlen bei niedriger EFD (bis 12.000 Impulse, $< 0,59 \text{ mJ/mm}^2$). Dabei konnte die Keimzahl um bis zu 99,9 % reduziert werden. Es zeigte sich, dass die Reduktion wesentlich von den Umgebungsbedingungen der Bakterien und ihrer Stoffwechsellage abhängt. Bei Applikation niedriger EFD ($< 0,59 \text{ mJ/mm}^2$) unter optimierten Wachstumsbedingungen zeigten die applizierten Stoßwellen sogar eine stimulierende Wirkung auf *S. aureus*.

Trotz der bakteriziden Wirkung der ESWT konnten weder eine Änderung der Bakterienzellpermeabilität noch eine Beschädigung der DNA nachgewiesen werden. Synergistische Effekte zwischen Gentamicin und ESWT waren nicht erkennbar, jedoch kam es auch nicht zum Wirkungsverlust des Gentamicins bei gleichzeitiger Applikation der ESWT ($P > 0,05$).

Schlussfolgerung: Die ESWT hat nach Überschreitung einer Schwellenenergie eine signifikante bakterizide Wirkung auf Bakterienzellen. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die applizierte Gesamtenergie für die bakterizide Wirkung verantwortlich ist und weniger Einzelparameter wie EFD und Impulszahl. Ein synergistischer Effekt gleichzeitig applizierter Antibiotika konnte nicht nachgewiesen werden. Die antibakterielle Wirkung von Gentamicin wurde durch die parallel durchgeführte ESWT nicht negativ beeinflusst.

Die gleichzeitige Applikation von ESWT und systemischer Antibiose könnte das bisherige Indikationsspektrum der ESW in der Orthopädie (nicht infizierte Pseudarthrosen, Fersensporn, Kalkschulter etc.) um infizierte Pseudarthrosen erweitern.

7 Literaturverzeichnis

1. Bird NC, Stephenson TJ, Ross B, Johnson AG
Effects of piezoelectric lithotripsy on human DNA.
Ultrasound Med Biol. 21 (1995) 399-403
2. Chaussy C, Schmiedt E, Jocham D, Brendel W, Forssmann B, Walther V.
First clinical experience with extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves.
J Urol. 127 (1982) 417-20.
3. Coleman AJ, Saunders JE, Crum LA, Dyson M.
Acoustic cavitation generated by an extracorporeal shockwave lithotripter.
Ultrasound Med Biol. 13 (1987) 69-76.
4. Dahmen GP, Nam VC, Meiss L.
Extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWT) zur Behandlung von knochenahnen Weichteilschmerzen. Indikation, Technik und vorläufige Ergebnisse.
In: Deutsche Gesellschaft für Stoßwellenlithotripsie (ed.)
Konsensus Workshop der Deutschen Gesellschaft für Stoßwellenlithotripsie.
Attempto-Verlag Tübingen, 1993; 143-148
5. Delhaye M, Vandermeeren A, Baize M, Cremer M.
Extracorporeal shock-wave lithotripsy of pancreatic calculi.
Gastroenterology. 102 (1992) 610-620.
6. Delius M, Adams G.
Shock wave permeabilization with ribosome inactivation proteins:
a new approach in tumorthrapy.
Cancer Res. 59 (1999) 5227-5232
7. Delius M, Brendel W, Heine G.
A mechanism of gallstone destruction by extracorporeal shock waves.
Naturwissenschaften. 75 (1988) 200-201.
8. Delius M, Denk R, Berding C, Liebich HG, Jordan M, Brendel W.
Biological effects of shock waves: cavitation by shock waves in piglet liver.
Ultrasound Med Biol. 16 (1990) 467-472.
9. Deliveliotis C, Giftopoulos A, Koutsokalis G, Raptidis G, Kostakopoulos A.
The necessity of prophylactic antibiotics during extracorporeal shock wave lithotripsy.
Int Urol Nephrol. 29 (1997) 517-521.
10. von Eiff C, Overbeck J, Haupt G, Herrmann M, Winckler S,
Richter KD, Peters G, Spiegel HU.
Bactericidal effect of extracorporeal shock waves on Staphylococcus aureus.
J Med Microbiol. 49 (2000) 709-712.
11. Fischer N, Müller HM, Gulhan A, Sohn M, Deutz FJ, Rubben H, Lutzeyer W.
Cavitation Effects: possible cause of tissue injury during extracorporeal shock wave lithotripsy.
J Endourol 2 (1988) 215-220
12. Gambihler S, Delius M, Brendel W.
Biological effects of shock waves: cell disruption, viability, and proliferation of L1210 cells exposed to shock waves in vitro.
Ultrasound Med Biol. 16 (1990) 587-594.

13. Gambihler S. and Delius M.
Transient increase in membrane permeability of L1210 cells upon exposure to lithotripter shock-waves in vitro
Naturwissenschaften. 79 (1992) 328-329
14. Gambihler S, Delius M, Ellwart J.W.
Permeabilization of the Plasma membrane of L1210 mouse leukemia cells using lithotripter shock waves
J Membr Biol. 141 (1994) 267-275
15. Gerdesmeyer L, Schrabler S, Mittelmeier W, Rechl H.
Tissue-induced changes of the extracorporeal shock wave
Der Orthopäde. 31 (2002) 618-622.
16. Gerdesmeyer L, Maier M, Haake M, Schmitz C.
Physikalisch-technische Grundlagen der extrakorporalen Stoßwellentherapie (ESWT)
Der Orthopäde. 31 (2002) 610 - 617
17. Haake M, Wessel C, Wilke A
Einwirkung extrakorporaler Stoßwellen auf humane Knochenmarkszellkulturen
Biomed Technik. 44 (1999) 278-282
18. Haupt G, Haupt A, Ekkernkamp A, Gerety B, Chvapil M.
Influence of shock waves on fracture healing.
Urology. 39 (1992) 529-532.
19. Henglein A, Gutierrez M, Ulrich R.
Oxidation of iodide by the intense acoustic bursts of an extracorporeal lithotripter.
Int J Radiat Biol. 54 (1988) 123-126.
20. Horsburgh MJ, Clements MO, Crossley H, Ingham E, Foster SJ. Related Articles, Links
PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*.
Infect Immun. 69 (2001) 3744-3754.
21. Horsburgh MJ, Ingham E, Foster SJ. Related Articles, Links
In *Staphylococcus aureus*, fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis.
J Bacteriol. 138 (2001) 468-475.
22. Hoover DG, Metrick C, Papineau AM, Farkas DF, Knorr D.
Biological Effects of High Hydrostatic-Pressure on Food Microorganisms.
Food Technology. 43 (1989) 99-107
23. Iro H, Schneider HT, Fodra C, Waitz G, Nitsche N, Heinritz HH, Benninger J, Ell C.
Shockwave lithotripsy of salivary duct stones.
Lancet. 339 (1992) 1333-1366.
24. Karavolos MH, Horsburgh MJ, Ingham E, Foster SJ.
Role and regulation of the superoxide dismutases of *Staphylococcus aureus*.
Microbiology. 149 (2003) 2749-2758.
25. Karpman RR, Magee FP, Gruen TW, Mobley T.
The lithotripter and its potential use in the revision of total hip arthroplasty.
Orthop Rev. 16 (1987) 38-42.

26. Kato M, Ioritani N, Suzuki T, Kambe M, Inaba Y, Watanabe R, Sasano H, Orikasa S.
Mechanism of anti-tumor effect of combination of bleomycin and shock waves.
Jpn J Cancer Res. 91 (2000) 1065-1072.
27. Kaulesar Sukul DM, Johannes EJ, Pierik EG, van Eijck GJ, Kristelijin MJ.
The effect of high energy shock waves focused on cortical bone: an in vitro study.
J Surg Res. 54 (1993) 46-51.
28. Kerfoot WW, Beshai AZ, Carson CC.
The effect of isolated high-energy shock wave treatments on subsequent bacterial growth.
Urol Res. 20 (1992) 183-186.
29. Kochaniski AM, Mejnartowicz JP, Latos-Bielenska A, Etienne J, Filipczynski L.
DNA damage induced by lithotripter generated shock waves: short report.
Int Urol Nephrol. 32 (2001) 419-422.
30. Kodama T, Doukas A, Hamblin M.R.
Shock wave mediated molecular delivery into cells
Biochimica et biophysica Acta. 1542 (2002) 186-194
31. Krause H.
"Physik und Technik medizinischer Stoßwellensysteme
In: Extrakorporale Stoßwellentherapie Grundlagen, Indikation, Anwendung"
Rompe, J-D (Hrsg.)
Chapman and Hall GmbH, Stuttgart, 1997, 15–34
32. Kullman E, Jonsson KA, Lindstrom E, Dahlin LG, Ansehn S, Borch K.
Bacteremia associated with extracorporeal shockwave lithotripsy of gallbladder stones.
Hepatogastroenterology. 42 (1995) 816-820.
33. Kuttruff H.
"Physik und Technik des Ultraschalls"
S. Hirzel Verlag Stuttgart, 1988
34. Lebaron P, Catala P, Parthuisot N.
Effectiveness of Sytox Green Stain for Bacterial Viability testing
Appl and Envir Microbiol. (1998) 2697-2700
35. Loew M, Jurgowski W.
Initial experiences with extracorporeal shockwave lithotripsy (ESWL) in treatment
of tendinosis calcarea of the shoulder
Z Orthop Ihre Grenzgeb. 131 (1993) 470-473.
36. Lovasz, Palfi, Romics
Temperature elevation of stones during extracorporeal shock wave lithotripsy: a hypothesis
for possible cause of complications.
Abstracts. Tagung der Deutschen Urologischen Gesellschaft DGU, V2.5 1999
37. Ludwig H, Gross P, Scigala W, Sojka B.
Pressure inactivation of microorganisms.
High Pressure research. 12 (1994) 193-197
38. Ludwig J, Lauber S, Lauber HJ, Dreisilker U, Raedel R, Hotzinger H.
High-energy shock wave treatment of femoral head necrosis in adults.
Clin Orthop Relat Res. 387 (2001) 119-126.

39. Maier M, Freed JA, Milz S, Pellengahr C, Schmitz C.
Detection of bone fragments in pulmonary vessels following extracorporeal shock wave application to the distal femur in an in-vivo animal model
Z Orthop Ihre Grenzgeb. 141 (2003) 223-226.
40. Martini L, Giavaresi G, Fini M, Torricelli P, de Pretto M, Schaden W, Giardino R.
Effect of extracorporeal shock wave therapy on osteoblastlike cells.
Clin Orthop Relat Res. 413 (2003) 269-280.
41. Meirer R, Kamelger FS, Huemer GM, Wanner S, Piza-Katzer H.
Extracorporeal shock wave may enhance skin flap survival in an animal model.
Br J Plast Surg. 58 (2005) 53-57.
42. May TC, Krause WR, Preslar AJ, Smith MJ, Beaudoin AJ, Cardea JA.
Use of high-energy shock waves for bone cement removal.
J Arthroplasty. 5 (1990) 19-27.
43. Morgan TR, Laudone VP, Heston WD, Zeitz L, Fair WR.
Free radical production by high energy shock waves--comparison with ionizing irradiation.
J Urol. 139 (1988) 186-189.
44. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)
Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically; Approved Standard- Fifth Edition
NCCLS-Document M7A5 [ISBN 1-56238-394-9]
NCCLS, 940 West valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, 19087-1898 USA, 2000
45. O'Reilly CE, O'Connor PM, Kelly AL, Beresford TP, Murphy PM.
Use of hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese.
Appl Environ Microbiol. 66 (2000) 66 4890-4896.
46. Pearle MS, Roehrborn CG.
Antimicrobial prophylaxis prior to shock wave lithotripsy in patients with sterile urine before treatment: a meta-analysis and cost-effectiveness analysis.
Urology. 49 (1997) 679-686.
47. Perlick L, Boxberg W, Giebel G.
High energy shock wave treatment of the painful heel spur
Unfallchirurg. 101 (1998) 914-918.
48. Pettersson B, Tiselius HG.
Are prophylactic antibiotics necessary during extracorporeal shockwave lithotripsy?
Br J Urol. 63 (1989) 449-452.
49. Rompe JD, Buch M, Gerdesmeyer L, Haake M, Loew M, Maier M, Hiene J.
Muskuloskeletal shock wave therapy-current database of clinical research.
Z Orthop Ihre Grenzgeb. 140 (2002) 267-274
50. Rompe JD, Hope C, Kullmer K, Heine J, Burger R.
Analgesic effect of extracorporeal shock-wave therapy on chronic tennis elbow.
J Bone Joint Surg Br. 78 (1996) 233-237.
51. Rompe JD, Kullmer K, Vogel J, Eckardt A, Wahlmann U, Eysel P, Hopf C, Kirkpatrick CJ, Burger R, Nafe B.
Extracorporeal shock-wave therapy. Experimental basis, clinical application
Der Orthopäde. 26 (1997) 215-228

52. Roth B, Poot M, Yue S, Millard P.
Bacterial Viability and Antibiotic Susceptibility Testing with Sytox Green Nucleic Acid Stain
Appl and Envir Microbiol 63 (1997) 2421-2431
53. Sass W, Dreyer HP, Kettermann S, Seifert J.
The role of cavitation activity in fragmentation processes by lithotripters.
J Stone Dis. 4 (1992) 193-207.
54. Sauerbruch T, Delius M, Paumgartner G, Holl J, Wess O, Weber W, Hepp W, Brendel W.
Fragmentation of gallstones by extracorporeal shock waves.
N Engl J Med. 314 (1986) 818-22
55. Schaden W
Extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWT) bei Pseudarthrosen und verzögerter Frakturheilung.
Trauma Berufskrankh. 2 (2000) 333-339
56. Schleberger R, Senge T.
Non-invasive treatment of long-bone pseudarthrosis by shock waves (ESWL).
Arch Orthop Trauma Surg. 111 (1992) 224-227.
57. Steinbach P, Hofstadter F, Nicolai H, Rossler W, Wieland W.
In vitro investigations on cellular damage induced by high energy shock waves.
Ultrasound Med Biol. 18 (1992) 691-699.
58. Stoller ML, Workman SJ
The effect of extracorporeal shock wave lithotripsy on the microbiological flora of urinary calculi
J Urol. 144 (1990) 619-621
59. Suhr D, Brummer F, Hulser DF.
Cavitation-generated free radicals during shock wave exposure: investigations with cell free solutions and suspended cells.
Ultrasound Med Biol. 17 (1991) 761-768.
60. Ueberle F, Delius M, Guo L.
Anwendung von Stoßwellen für den Transfer von Molekülen in Zellen
Biomed Technik. 47 Suppl 1 Teil 1(2002) 382-386
61. Wang CJ, Wang FS, Huang CC, Yang KD, Weng LH, Huang HY.
Treatment for osteonecrosis of the femoral head: comparison of extracorporeal shock waves with core decompression and bone-grafting.
J Bone Joint Surg Am. 87 (2005) 2380-2387.
62. Wang CJ, Huang HY, Pai CH.
Shock wave-enhanced neovascularization at the tendon-bone junction: an experiment in dogs.
J Foot Ankle Surg. 41 (2002) 16-22.
63. Wang CJ, Wang FS, Yang KD, Weng LH, Hsu CC, Huang CS, Yang LC.
Shock wave therapy induces neovascularization at the tendon-bone junction. A study in rabbits.
J Orthop Res. 21 (2003) 984-9
64. Weber, P.
Extrakorporale hydrostatische Hochdruckbehandlung als neues Verfahren zur Desinfektion infizierter Knochenpräparate
Dissertation an der TU München eingereicht

65. Westh H, Knudsen F, Hedengran AM, Weischer M, Mogensen P, Andersen JT.
Extracorporeal shock wave lithotripsy of kidney stones does not induce transient bacteremia.
A prospective study.
The Copenhagen Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy Study Group.
J Urol. 144 (1990)
66. Yeung-Jen C, Yun-Ren K, Kuender D. Y, Ching-Jen W, Shyr-Ming S, Hui-chen H, Ya-Ju Y,
Sun Y and Feng Sheng W.
Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p38 kinase in shock-wave pro-
moted bone formation of segmental defect in rats
Bone. 34 (2000) 466-477
67. Zannoud M, Ghadouane M, Kasmaoui EH, Alami M, Jira H, Abbar M.
Metastatic cerebral abscesse from Klebsiella pneumoniae after extracorporeal shockwave li-
thotrips for kidney stones (a case report)
Ann Urol (Paris). 37 (2003) 81-84

8 Abkürzungen

µl	Mikroliter
CAMHB	Cation Adjusted Müller-Hinton Broth
CFU	Colony forming Units, entspricht den KBE
dest.	destilliert, Aqua dest. =destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinacid
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EFD	Energieflussdichte
ESW	Extrakorporale Stoßwelle
ESWT	Extrakorporale Stoßwellen Therapie
KBE	Kolonie bildende Einheiten, entspricht den CFU
MBK	Mittlere bakterizide Konzentration
MHK	Mittlere Hemmkonzentration
ml	Milliliter
ng	Nanogramm
TSB	Trypticase Soy Broth
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)

9 Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1 Druckverlauf einer Stoßwelle in Wasser</i>	6
<i>Abb. 2 Schematischer Aufbau des Probenhalters</i>	19
<i>Abb. 3 Probenhalter</i>	19
<i>Abb. 4 Entwicklung der KBE in einer Suspension aus <i>S. aureus</i> in Abhängigkeit der Impulszahl</i>	37
<i>Abb. 5 Entwicklung der KBE in einer Suspension aus <i>P. aeruginosa</i> in Abhängigkeit der Impulszahl</i>	38
<i>Abb. 6 Entwicklung der KBE in einer Suspension aus <i>E. faecium</i> in Abhängigkeit der Impulszahl</i>	38
<i>Abb. 7 Übersicht über die Abnahme der KBE verschiedener Keime bei gleichen physikalischen Bedingungen</i>	39
<i>Abb. 8 Entwicklung der KBE in einer Suspension aus <i>S. aureus</i> unter verschieden hoher EFD</i>	39
<i>Abb. 9 Abnahme der KBE in Abhängigkeit von der Gesamtenergie</i>	40
<i>Abb. 10 Absorptionsspektren von ESW behandelten Gentamicinproben und unbehandelter Kontrolle</i>	42
<i>Abb. 11 Abnahme der KBE nach einer Einwirkzeit des Antibiotikums von 33 Minuten</i>	43
<i>Abb. 12 Entwicklung der KBE einer Bakteriensuspension in warmer Nährlösung unter Einwirkung der ESW</i>	44
<i>Abb. 13 Kombinierte Effekte durch Stoßwelle und Antibiotikum auf <i>S. aureus</i></i>	45
<i>Abb. 14 Entwicklung der Bakterienfluoreszenz während eines Zeitraumes von 40 Minuten</i>	46
<i>Abb. 15 Fluoreszenz permeabilisierter und vitaler Bakterien unterschiedlicher Konzentration</i>	47
<i>Abb. 16 Fluoreszenz in Abhängigkeit des Anteils an permeabilisierten Bakterien</i>	47
<i>Abb. 17 Fluoreszenz einer Bakteriensuspension nach ESW-Behandlung verschiedener Parameter</i>	48
<i>Abb. 18 Quantifizierung der KBE der zur Permeabilitätsmessung verwendeten Suspension</i>	48
<i>Abb. 19 Fluoreszenz von <i>S. aureus</i> nach Behandlung mit verschiedenen Impulszahlen bei 0,59 mJ/mm²</i>	49
<i>Abb. 20 Fluoreszenzgeraden für die verschiedenen Versuche</i>	50
<i>Abb. 21 humane dsDNA bei 0,38 mJ/mm²</i>	51
<i>Abb. 22 humane dsDNA bei 0,96 mJ/mm²;</i>	51
<i>Abb. 23 bakterielle DNA bei 0,96 mJ/mm²</i>	51
<i>Abb. 24 bakterielle DNA bei 0,38 mJ/mm²</i>	51
<i>Abb. 25 Fluoreszenz von behandelter (zerstörter) und unbehandelter DNA ($p= 0,009$)</i>	52
<i>Abb. 26 Bakterien nach 0,96 mJ/mm²</i>	53
<i>Abb. 27 Ausschnittsvergrößerung</i>	53
<i>Abb. 28 Ausschnittsvergrößerung</i>	53
<i>Abb. 29 Kontrollbakterien</i>	53

10 Tabellenverzeichnis

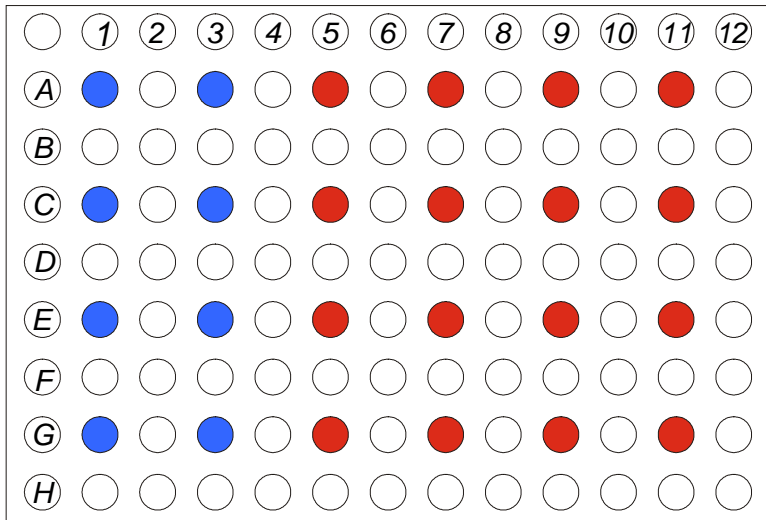
<i>Tabelle 1 Physikalische Parameter der Stoßwelle</i>	19
<i>Tabelle 2 Übersicht über Keime und verwendete Parameter</i>	21
<i>Tabelle 3 Verwendete Antibiotikamengen und daraus resultierende Konzentrationen</i>	26
<i>Tabelle 4 Stoßwellenparameter bei der Untersuchung der Permeabilitätsänderung</i>	30
<i>Tabelle 5 Extinktion des Wasserbades vor und nach Applikation der ESW</i>	36
<i>Tabelle 6 p-Werte zu Abb.4</i>	37
<i>Tabelle 7 MHK von behandeltem und unbehandeltem Gentamicin gegenüber S. aureus;</i>	41
<i>Tabelle 8 MHK von ESW-behandelten Bakterien und unbehandelten Bakterien im Vergleich</i>	42
<i>Tabelle 9 p-Werte zu Abb. 12</i>	44
<i>Tabelle 10 Errechneter Anteil an permeabilisierten Bakterien (4000 Impulse, versch. EFD)</i>	50
<i>Tabelle 11 Errechneter Anteil an permeabilisierten Bakterien (jeweils 0,59 mJ/mm²)</i>	50

11 Anhang

11.1 Beimpfungs-Schemata der Versuche 3.4.2, 3.4.2.1 und 3.4.2.2

11.1.1 Versuch 3.4.2:

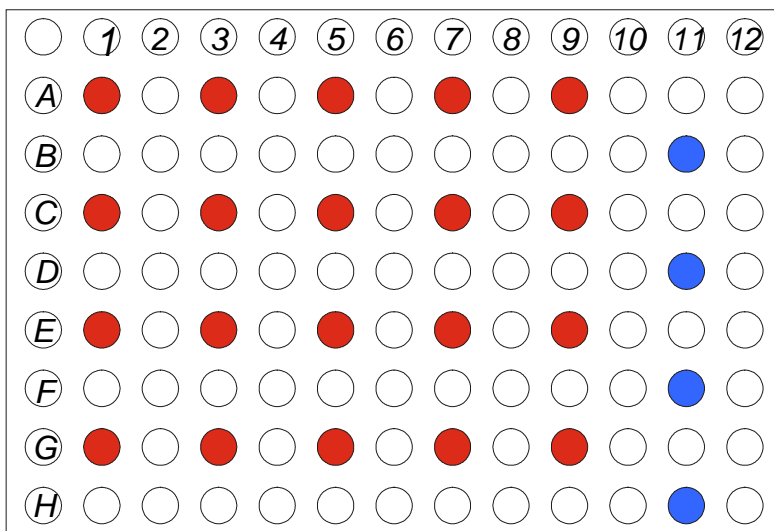
In Spalte 1 und 3 jeweils NaCl und Sytox, in den restlichen Spalten die Proben 1-4. Reihe A entspricht Zeitpunkt t=10, die Reihen C, E, und G den Zeitpunkten t= 20; 30; und 40 Minuten



Schema 1:
Platten-Impfschema für Versuch 3.4.2

11.1.2 Versuch 3.4.4.2:

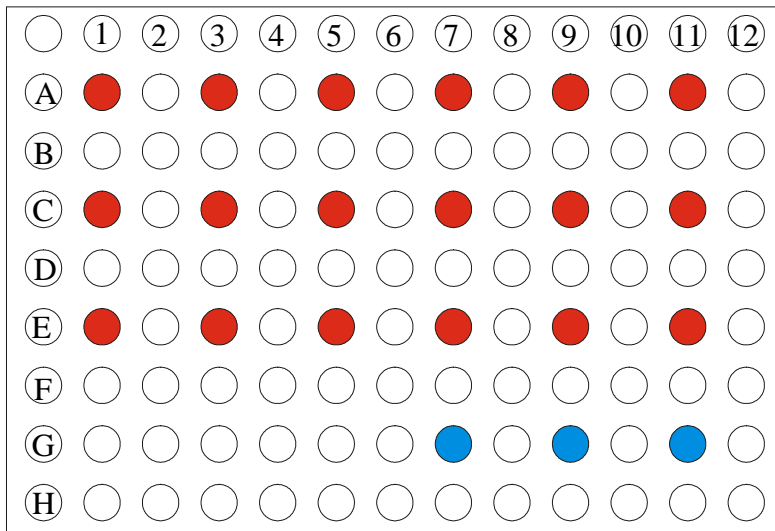
In jede Platte wurden in die Spalten 1; 3; 5; 7 und 9 der Reihen A; C; E und G jeweils 40 µl Sytox-Farbstoff gegeben. Danach wurden diese Wells bei Platte 1 mit den nicht-permeabilisierten und bei Platte 2 mit den permeabilisierten Suspensionen beimpft: Bei beiden Platten wurde die Wells der Spalte 11 in den Reihen B; D; F und H mit einem Gemisch aus 160 µl NaCl und 40 µl Sytox befüllt (Leerwert)



Schema 2
Platten-Impfschema für Versuch 3.4.4.1

11.1.3 Versuch 3.4.4.2

Platte 1 enthielt die Gemische der Konzentration 1,5; Platte 2 die der Konzentration 1,0 und Platte 3 die der Konzentration 0,5 McFarland-Einheiten. Von jeder Konzentration wurden 3 Proben ausgemessen, die sich in den Reihen A; C und E finden. In jeder zweiten Spalten 1 bis 11 finden sich die in absteigender Reihenfolge die Gemische mit 100% bis 0% permeabilisierten Bakterien. Die Wells in Reihe G enthalten ein Gemisch aus Sytox und NaCl, um den Leerwert zu ermitteln.



Schema 3:

Platten-Impfschema für Versuch 3.4.4.2

11.2 Inhaltsverzeichnis der Ergebnistabellen

<i>S. aureus</i> , 0,96 mJ/mm ² , 1000 Impulse, Versuch 1	86
<i>S. aureus</i> , 0,96 mJ/mm ² , 2000 Impulse, Versuch 1	87
<i>S. aureus</i> , 0,96 mJ/mm ² , 3000 Impulse, Versuch 1	88
<i>S. aureus</i> , 0,96 mJ/mm ² , 4000 Impulse, Versuch 1	89
<i>S. aureus</i> , 0,96 mJ/mm ² , 1000 Impulse, Versuch 2	90
<i>S. aureus</i> , 0,96 mJ/mm ² , 2000 Impulse, Versuch 2	91
<i>S. aureus</i> , 0,96 mJ/mm ² , 3000 Impulse, Versuch 2	92
<i>S. aureus</i> , 0,96 mJ/mm ² , 4000 Impulse, Versuch 2	93
<i>S. aureus</i> , 0,96 mJ/mm ² , 5000 Impulse, Versuch 2	94
<i>S. aureus</i> , 0,96 mJ/mm ² , 6000 Impulse, Versuch 2	95
<i>S. aureus</i> , 0,96 mJ/mm ² , 1000 Impulse, Versuch 3	96
<i>S. aureus</i> , 0,96 mJ/mm ² , 2000 Impulse, Versuch 3	97
<i>S. aureus</i> , 0,96 mJ/mm ² , 3000 Impulse, Versuch 3	98
<i>S. aureus</i> , 0,96 mJ/mm ² , 4000 Impulse, Versuch 3	99
<i>S. aureus</i> , 0,96 mJ/mm ² , 5000 Impulse, Versuch 3	100
<i>S. aureus</i> , 0,96 mJ/mm ² , 6000 Impulse, Versuch 3	101
<i>P. aeruginosa</i> , 0,96 mJ/mm ² , 1000 Impulse	102
<i>P. aeruginosa</i> , 0,96 mJ/mm ² , 2000 Impulse	103
<i>P. aeruginosa</i> , 0,96 mJ/mm ² , 3000 Impulse	104
<i>P. aeruginosa</i> , 0,96 mJ/mm ² , 4000 Impulse	105
<i>E. faecium</i> , 0,96 mJ/mm ² , 4000 Impulse	106
<i>E. faecium</i> , 0,96 mJ/mm ² , 6000 Impulse	107
MRSA, 0,96 mJ/mm ² , 4000 Impulse	108
<i>S. epidermidis</i> , 0,96 mJ/mm ² , 4000 Impulse	109
<i>S. aureus</i> , 0,38 mJ/mm ² , 4000 Impulse	110
<i>S. aureus</i> , 0,59 mJ/mm ² , 4000 Impulse	111
<i>S. aureus</i> , 0,72 mJ/mm ² , 4000 Impulse	112
<i>S. aureus</i> , 0,96 mJ/mm ² , 4000 Impulse	113
<i>S. aureus</i> 0,59 mJ/mm ² und 12.000 Impulse	114
<i>S. aureus</i> 0,59 mJ/mm ² und 4.000 Impulse	115
<i>S. aureus</i> unter 33-minütiger Einwirkung von Gentamicin (0,25 µg/ml)	116
<i>S. aureus</i> unter 33-minütiger Einwirkung von Gentamicin (0,5 µg/ml)	117
<i>S. aureus</i> unter 33-minütiger Einwirkung von Gentamicin (2,0 µg/ml)	118
<i>S. aureus</i> in CAMHB bei 35°C, bei 0,96 mJ/mm ² und 4000 Impulsen ohne Antibiose	119
<i>S. aureus</i> in CAMHB bei 35°C, bei 0,72 mJ/mm ² und 4000 Impulsen ohne Antibiose	120
<i>S. aureus</i> in CAMHB bei 35°C, bei 0,59 mJ/mm ² und 4000 Impulsen ohne Antibiose	121
<i>S. aureus</i> in CAMHB bei 35°C, bei 0,59 mJ/mm ² und 4000 Impulsen mit Antibiose	123
<i>S. aureus</i> in CAMHB bei 35°C, bei 0,59 mJ/mm ² und 4000 Impulsen mit Antibiose	124
<i>S. aureus</i> in CAMHB bei 35°C, bei 0,59 mJ/mm ² und 4000 Impulsen mit Antibiose	125
<i>S. aureus</i> in CAMHB bei 35°C, bei 0,59 mJ/mm ² und 4000 Impulsen mit Antibiose	126
Fluoreszenz von <i>S. aureus</i> bei unterschiedlichen Konzentrationen	127
Fluoreszenz von <i>S. aureus</i> mit unterschiedlich hohem Anteil an permeabilisierten Bakterien	128
Entwicklung der Fluoreszenz von <i>S. aureus</i> bei verschieden langer Einwirkzeit des Farbstoffes	129
Fluoreszenz von <i>S. aureus</i> nach 4000 Impulsen bei 0,38 mJ/mm ²	130
Fluoreszenz von <i>S. aureus</i> nach 4000 Impulsen bei 0,59 mJ/mm ²	131
Fluoreszenz von <i>S. aureus</i> nach 4000 Impulsen bei 0,96 mJ/mm ²	132
Fluoreszenz von <i>S. aureus</i> nach 2000 Impulsen bei 0,59 mJ/mm ²	133
Fluoreszenz von <i>S. aureus</i> nach 4000 Impulsen bei 0,59 mJ/mm ²	134
Fluoreszenz von <i>S. aureus</i> nach 8000 Impulsen bei 0,59 mJ/mm ²	135
Fluoreszenz von <i>S. aureus</i> nach 12.000 Impulsen bei 0,59 mJ/mm ²	136
Fluoreszenz von <i>S. aureus</i> nach Permeabilisierung mit Alkohol;	137
100%-Kontrolle zu den Versuchen mit 2000; 4000; 8000 und 12000 Impulsen	137
Fluoreszenz von DNA, human, mit 0,96 mJ/mm ² und 4000 Impulsen behandelt	138

Ergebnistabellen

S. aureus, 0,96 mJ/mm², 1000 Impulse, Versuch 1

Versuch mit 1000
Impulsen

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ³	480	512	636	640	700	593,6	83,47	
1: 10 ⁴	26	68	89	80	81	68,8	22,43	
1: 10 ⁵	9	7	10	7	14	9,4	2,58	
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	0	370000	596000	763000	720000	755000	640800	148045,13

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ³	750	600	700	690	640	676	51,61	
1: 10 ⁴	77	90	66	71	81	77	8,27	
1: 10 ⁵	9	4	9	9	8	7,8	1,94	
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	0	760000	750000	680000	700000	725000	723000	29933,26

Kontrolle in % des Durchschnittes	105,12	103,73	94,05	96,82	100,28	100	4,14
Versuch in % der Kontrolle	51,18	82,43	105,53	99,59	104,43	88,63	20,48

S. aureus, 0,96 mJ/mm², 2000 Impulse, Versuch 1

Versuch mit 2000 Impulsen

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung
1: 10 ³	166	80	71	73	202	118,4	54,84
1: 10 ⁴	21	9	16	13	3	12,4	6,12
1: 10 ⁵	2	3	2	0	0	1,4	1,2
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	188000	85000	115500	101500	116000	121200	35271,23

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung
1: 10 ³	750	600	700	690	640	676	51,61
1: 10 ⁴	77	90	66	71	81	77	8,27
1: 10 ⁵	9	4	9	9	8	7,8	1,94
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	760000	750000	680000	700000	725000	723000	29933,26

Kontrolle in % des Durchschnittes	105,12	103,73	94,05	96,82	100,28	100	4,14
Versuch in % der Kontrolle	26,00	11,76	15,98	14,04	16,04	16,76	4,88

S. aureus, 0,96 mJ/mm², 3000 Impulse, Versuch 1

Versuch mit 3000 Impulsen

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung
1: 10 ²	92	79	24	101	100		
1: 10 ³	3	11	4	5	0	4,6	3,61
1: 10 ⁴	0	0	1	0	0	0,2	0,4
1: 10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0
Verdünnung 2 auf 0 umgerechnet	920	790	240	1010	1000	792	287,01

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung
1: 10 ³	750	600	700	690	640	676	51,61
1: 10 ⁴	77	90	66	71	81	77	8,27
1: 10 ⁵	9	4	9	9	8	7,8	1,94
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	760000	750000	680000	700000	725000	723000	29933,26

Kontrolle in % des Durchschnittes	105,12	103,73	94,05	96,82	100,28	100	4,14
Versuch in % der Kontrolle	0,13	0,11	0,03	0,14	0,14	0,11	0,04

S. aureus, 0,96 mJ/mm², 4000 Impulse, Versuch 1

Versuch mit 4000 Impulsen

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung
1: 10 ²	98	33	171	47	86	87	48,36
1: 10 ³							
1: 10 ⁴	2	0	1	0	0	0,6	0,8
1: 10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0
Verdünnung 2 auf umgerechnet	9800	3300	17100	4700	8600	8700	4836,11

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung
1: 10 ³	750	600	700	690	640	676	51,61
1: 10 ⁴	77	90	66	71	81	77	8,27
1: 10 ⁵	9	4	9	9	8	7,8	1,94
Verdünnung 2 und 3 umgerechnet	760000	750000	680000	700000	725000	723000	29933,26

Kontrolle in % des Durchschnittes	105,12	103,73	94,05	96,82	100,28	100	4,14
Versuch in % der Kontrolle	1,36	0,46	2,37	0,65	1,19	1,2	0,67

S. aureus, 0,96 mJ/mm², 1000 Impulse, Versuch 2

Versuch mit 1000 Impulsen

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ²	768	624	1160	650	760			
1: 10 ³	120	117	113	112	100	112,4	6,83	
1: 10 ⁴	23	22	22	18	16	20,2	2,71	
1: 10 ⁵	6	4	7	5	8	6	1,41	
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	0	175000	168500	166500	146000	130000	157200	16711,07

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ²	1236	1396	1540	1400	1260			
1: 10 ³	253	201	180	230	220	216,8	24,89	
1: 10 ⁴	28	20	18	32	30	25,6	5,57	
1: 10 ⁵	1	3	3	5	4	3,2	1,33	
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	0	266500	200500	180000	275000	260000	236400	38529,73

Kontrolle in % des Durchschnittes	112,73	84,81	76,14	116,33	109,98	100,00	16,30
Versuch in % der Kontrolle	74,03	71,28	70,43	61,76	54,99	66,50	7,07

S. aureus, 0,96 mJ/mm², 2000 Impulse, Versuch 2

Versuch mit 2000 Impulsen

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ²	580	600	540	480	520			
1: 10 ³	84	113	99	100	110	101,2	10,19	
1: 10 ⁴	12	12	13	14	11	12,4	1,02	
1: 10 ⁵	4	5	4	4	4	4,2	0,4	
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	0	102000	116500	114500	120000	110000	112600	6208,06

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ²	1236	1396	1540	1400	1260			
1: 10 ³	253	201	180	230	220	216,8	24,89	
1: 10 ⁴	28	20	18	32	30	25,6	5,57	
1: 10 ⁵	1	3	3	5	4	3,2	1,33	
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	0	266500	200500	180000	275000	260000	236400	38529,73

Kontrolle in % des Durchschnittes	112,73	84,81	76,14	116,33	109,98	100,00	16,30
Versuch in % der Kontrolle	43,15	49,28	48,43	50,76	46,53	47,63	2,63

S. aureus, 0,96 mJ/mm², 3000 Impulse, Versuch 2

Versuch mit 3000
Impulsen

Versuchs-nummer	Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung
	1: 10 ²	280	323	329	330	304		
	1: 10 ³	55	78	66	58	63	64	7,97
	1: 10 ⁴	10	11	7	8	8	8,8	1,47
	1: 10 ⁵	2	0	1	1	0	0,8	0,75
Verdünnung 2 und 3 auf 0 umgerechnet	0	41500	55150	49450	45500	46700	47660	4535,13

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung
1: 10 ²	1236	1396	1540	1400	1260		
1: 10 ³	253	201	180	230	220	216,8	24,89
1: 10 ⁴	28	20	18	32	30	25,6	5,57
1: 10 ⁵	1	3	3	5	4	3,2	1,33
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	0	266500	200500	180000	275000	236400	38529,73

Kontrolle in % des Durchschnittes	112,73	84,81	76,14	116,33	109,98	100,00	16,30
Versuch in % der Kontrolle	17,55	23,33	20,92	19,25	19,75	20,16	1,92

S. aureus, 0,96 mJ/mm², 4000 Impulse, Versuch 2

Versuch mit 4000 Impulsen

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ²	223	150	270	140	130	182,6	54,62	
1: 10 ³	33	13	15	17	15	18,6	7,31	
1: 10 ⁴	2	0	1	1	2	1,2	0,75	
1: 10 ⁵	0	0	1	1	0	0,4	0,49	
Verdünnung 2 und 3 auf 0 umgerechnet	0	27650	14000	21000	15500	14000	18430	5281,06

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ²	1236	1396	1540	1400	1260			
1: 10 ³	253	201	180	230	220	216,8	24,89	
1: 10 ⁴	28	20	18	32	30	25,6	5,57	
1: 10 ⁵	1	3	3	5	4	3,2	1,33	
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	0	266500	200500	180000	275000	260000	236400	38529,73

Kontrolle in % des Durchschnittes	112,73	84,81	76,14	116,33	109,98	100,00	16,30
Versuch in % der Kontrolle	11,70	5,92	8,88	6,56	5,92	7,80	2,23

S. aureus, 0,96 mJ/mm², 5000 Impulse, Versuch 2

Versuch mit 5000
Impulsen

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung
0	520	680	1200	756	860	803,2	227,28
1: 10 ²	18	16	29	18	23	20,8	4,71
1: 10 ³	1	1	3	2	4	2,2	1,17
1: 10 ⁴	1	1	1	1	1	1	0
1: 10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0
Verdünnung 0 auf 0 umgerechnet	520	680	1200	756	860	803,2	227,28

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung
1: 10 ²	680	710	740	750	870	750	64,81
1: 10 ³	76	89	79	80	100	84,8	8,75
1: 10 ⁴	15	9	7	20	22	14,6	5,89
1: 10 ⁵	4	5	3	8	7	5,4	1,85
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	113000	89500	74500	140000	160000	115400	31444,24

Kontrolle in % des Durchschnittes	97,92	77,56	64,56	121,32	138,65	100,00	27,25
Versuch in % der Kontrolle	0,45	0,59	1,04	0,66	0,75	0,70	0,20

S. aureus, 0,96 mJ/mm², 6000 Impulse, Versuch 2

Versuch mit 6000 Impulsen

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung
0	48	26	68	45	29	43,2	15,09
1: 10 ²	1	1	5	3	2	2,4	1,5
1: 10 ³	0	0	1	0	0	0,2	0,4
1: 10 ⁴	0	0	0	0	0	0	0
1: 10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0
Verdünnung 0 auf 0 umgerechnet	48	26	68	45	29	43,2	15,09

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung
1: 10 ²	680	710	740	750	870	750	64,81
1: 10 ³	76	89	79	80	100	84,8	8,75
1: 10 ⁴	15	9	7	20	22	14,6	5,89
1: 10 ⁵	4	5	3	8	7	5,4	1,85
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	113000	89500	74500	140000	160000	115400	31444,24

Kontrolle in % des Durchschnittes	97,92	77,56	64,56	121,32	138,65	100,00	27,25
Versuch in % der Kontrolle	0,04	0,02	0,06	0,04	0,03	0,02	0,01

S. aureus, 0,96 mJ/mm², 1000 Impulse, Versuch 3

Versuch mit 1000
Impulsen

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung
1: 10 ³	640	528	612	600	552	586,4	40,76
1: 10 ⁴	59	69	53	47	51	55,8	7,65
1: 10 ⁵	8	7	11	7	12	9	2,1
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	615000	609000	571000	535000	531000	572200	35408,47

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung
1: 10 ³	670	660	640	630	590	638	27,86
1: 10 ⁴	59	63	89	58	85	70,8	13,39
1: 10 ⁵	9	7	10	7	9	8,4	1,2
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	630000	645000	765000	605000	720000	673000	59883,22

Kontrolle in % des Durchschnittes	93,61	95,84	113,67	89,90	106,98	100	8,9
Versuch in % der Kontrolle	91,38	90,49	84,84	79,49	78,90	85,02	5,26

S. aureus, 0,96 mJ/mm², 2000 Impulse, Versuch 3

Versuch mit 2000 Impulsen

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung
1: 10 ³	243	223	411	405	331	322,6	78,65
1: 10 ⁴	49	43	10	36	32	34	13,34
1: 10 ⁵	8	0	0	5	5	3,6	3,14
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	366500	326500	255500	382500	325500	331300	43960,89

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung
1: 10 ³	670	660	640	630	590	638	27,86
1: 10 ⁴	59	63	89	58	85	70,8	13,39
1: 10 ⁵	9	7	10	7	9	8,4	1,2
Verdünnung 3+4 auf 0 umgerechnet	630000	645000	765000	605000	720000	673000	59883,22

Kontrolle in % des Durchschnittes	93,61	95,84	113,67	89,90	106,98	100	8,9
Versuch in % der Kontrolle	54,46	48,51	37,96	56,84	48,37	49,23	6,53

S. aureus, 0,96 mJ/mm², 3000 Impulse, Versuch 3

Versuch mit 3000 Impulsen

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung
1: 10 ³	94	46	43	45	108	67,2	27,97
1: 10 ⁴	11	4	7	4	2	5,6	3,14
1: 10 ⁵	1	0	1	0	2	0,8	0,75
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	102000	43000	56500	42500	64000	61600	21793,12

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung
1: 10 ³	760	624	712	708	800	720,8	59,03
1: 10 ⁴	87	89	51	88	90	81	15,03
1: 10 ⁵	9	4	13	10	8	8,8	2,93
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	815000	757000	611000	794000	850000	765400	82879,67

Kontrolle in % des Durchschnittes	93,61	95,84	113,67	89,90	106,98	100	8,9
Versuch in % der Kontrolle	15,16	6,39	8,40	6,32	9,51	9,15	3,24

S. aureus, 0,96 mJ/mm², 4000 Impulse, Versuch 3

Versuch mit 4000 Impulsen

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ²	223	150	270	140	140	184,6	52,81	
1: 10 ³	33	13	15	17	17	19	7,16	
1: 10 ⁴	2	0	1	1	1	1	0,63	
1: 10 ⁵	0	0	1	1	1	0,6	0,49	
Verdünnung 2 und 3 auf 0 umgerechnet	0	27650	14000	21000	15500	15500	18730	5058,81

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ³	760	624	712	708	800	720,8	59,03	
1: 10 ⁴	87	89	51	88	90	81	15,03	
1: 10 ⁵	9	4	13	10	8	8,8	2,93	
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	0	815000	757000	611000	794000	850000	765400	82879,67

Kontrolle in % des Durchschnittes	124,29	93,22	80,04	101,22	101,22	100	14,41
Versuch in % der Kontrolle	4,44	3,95	4,27	2,16	5,49	4,06	1,08

S. aureus, 0,96 mJ/mm², 5000 Impulse, Versuch 3

Versuch mit 5000
Impulsen

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung
1: 10 ²	123	150	170	140	130	142,6	16,46
1: 10 ³	2	13	15	17	15	12,4	5,35
1: 10 ⁴	3	2	1	1	2	1,8	0,75
1: 10 ⁵	1	0	0	1	1	0,6	0,49
Verdünnung 2 und 3 auf 0 umgerechnet	7150	14000	16000	15500	14000	13330	3191,49

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung
1: 10 ³	800	750	510	750	750	712	102,84
1: 10 ⁴	184	123	119	140	140	141,2	23,06
1: 10 ⁵	3	5	12	22	32	14,8	10,87
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	1320000	990000	850000	1075000	1075000	1062000	152990,2

Kontrolle in % des Durchschnittes	124,29	93,22	80,04	101,22	101,22	100	14,41
Versuch in % der Kontrolle	0,67	1,32	1,51	1,46	1,32	1,26	0,3

S. aureus, 0,96 mJ/mm², 6000 Impulse, Versuch 3

Versuch mit 6000 Impulsen

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ²	172	96	32	88	73	92,2	45,59	
1: 10 ³	23	1	9	8	13	10,8	7,22	
1: 10 ⁴	2	1	0	1	1	1	0,63	
1: 10 ⁵	0	0	0	0	1	0,2	0,4	
Verdünnung 0 auf 0 umgerechnet	0	17200	9600	3200	8800	7300	9220	4559,12

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ³	760	624	712	708	800	720,8	59,03	
1: 10 ⁴	87	89	51	88	90	81	15,03	
1: 10 ⁵	9	4	13	10	8	8,8	2,93	
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	0	815000	757000	611000	794000	850000	765400	82879,67

Kontrolle in % des Durchschnittes	124,29	93,22	80,04	101,22	101,22	100	14,41
Versuch in % der Kontrolle	1,62	0,90	0,30	0,83	0,69	0,87	0,43

P. aeruginosa, 0,96 mJ/mm², 1000 Impulse

*Versuch mit 1000
Impulsen*

<i>Verdünnungsstufe</i>	<i>Versuch 1</i>	<i>Versuch 2</i>	<i>Versuch 3</i>	<i>Versuch 4</i>	<i>Versuch 5</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Standardabweichung</i>	
<i>1: 10³</i>	124	81	84	103	123	103	18,36	
<i>1: 10⁴</i>	13	10	5	14	10	10,4	3,14	
<i>1: 10⁵</i>	3	2	1	1	2	1,8	0,75	
<i>Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet</i>	<i>0</i>	<i>127000</i>	<i>90500</i>	<i>67000</i>	<i>121500</i>	<i>111500</i>	<i>103500</i>	<i>22097,51</i>

<i>Verdünnungsstufe</i>	<i>Kontrolle 1</i>	<i>Kontrolle 2</i>	<i>Kontrolle 3</i>	<i>Kontrolle 4</i>	<i>Kontrolle 5</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Standardabweichung</i>	
<i>1: 10²</i>	720	640	640	560	580			
<i>1: 10³</i>	97	129	144	122	126	123,6	15,24	
<i>1: 10⁴</i>	9	11	17	17	8	12,4	3,88	
<i>1: 10⁵</i>	1	2	2	1	2	1,6	0,49	
<i>Verdünnung 2 und 3 auf 0 umgerechnet</i>	<i>0</i>	<i>84500</i>	<i>96500</i>	<i>104000</i>	<i>89000</i>	<i>92000</i>	<i>93200</i>	<i>6667,83</i>

<i>Kontrolle in % des Durchschnittes</i>	<i>90,66</i>	<i>103,54</i>	<i>111,59</i>	<i>95,49</i>	<i>98,71</i>	100	7,15
<i>Versuch in % der Kontrolle</i>	<i>136,26</i>	<i>97,10</i>	<i>71,89</i>	<i>130,36</i>	<i>119,64</i>	<i>111,05</i>	<i>23,71</i>

P. aeruginosa, 0,96 mJ/mm², 2000 Impulse

Versuch mit 2000 Impulsen

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ²	61	61	85	79	46	66,4	13,99	
1: 10 ⁴	5	4	11	5	3	5,6	2,8	
1: 10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0	
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	0	55500	50500	97500	64500	38000	61200	20068,88

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ²	720	640	640	560	580			
1: 10 ³	97	129	144	122	126	123,6	15,24	
1: 10 ⁴	9	11	17	17	8	12,4	3,88	
1: 10 ⁵	1	2	2	1	2	1,6	0,49	
Verdünnung 2 und 3 auf 0 umgerechnet	0	84500	96500	104000	89000	92000	93200	6667,83

Kontrolle in % des Durchschnittes	90,67	103,54	111,59	95,49	98,71	100	7,15
Versuch in % der Kontrolle	59,55	54,18	104,61	69,20	40,77	65,67	21,53

P. aeruginosa, 0,96 mJ/mm², 3000 Impulse

Versuch mit 3000 Impulsen

<i>Verdünnungsstufe</i>	<i>Versuch 1</i>	<i>Versuch 2</i>	<i>Versuch 3</i>	<i>Versuch 4</i>	<i>Versuch 5</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Standardabweichung</i>	
<i>1: 10²</i>	412	394	320	480	332			
<i>1: 10³</i>	85	41	35	79	50	58	20,26	
<i>1: 10⁴</i>	10	6	4	10	7	7,4	2,33	
<i>1: 10⁵</i>	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Verdünnung 2 und 3 auf 0 umgerechnet</i>	<i>0</i>	<i>63100</i>	<i>40200</i>	<i>33500</i>	<i>63500</i>	<i>41600</i>	<i>48380</i>	<i>12486,7</i>

<i>Verdünnungsstufe</i>	<i>Kontrolle 1</i>	<i>Kontrolle 2</i>	<i>Kontrolle 3</i>	<i>Kontrolle 4</i>	<i>Kontrolle 5</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Standardabweichung</i>	
<i>1: 10²</i>	720	640	640	560	580			
<i>1: 10³</i>	97	129	144	122	126	123,6	15,24	
<i>1: 10⁴</i>	9	11	17	17	8	12,4	3,88	
<i>1: 10⁵</i>	1	2	2	1	2	1,6	0,49	
<i>Verdünnung 2 und 3 auf 0 umgerechnet</i>	<i>0</i>	<i>84500</i>	<i>96500</i>	<i>104000</i>	<i>89000</i>	<i>92000</i>	<i>93200</i>	<i>6667,83</i>

<i>Kontrolle in % des Durchschnittes</i>	<i>90,66</i>	<i>103,54</i>	<i>111,58</i>	<i>95,49</i>	<i>98,71</i>	<i>100</i>	<i>7,15</i>
<i>Versuch in % der Kontrolle</i>	<i>67,70</i>	<i>43,13</i>	<i>35,94</i>	<i>68,13</i>	<i>44,63</i>	<i>51,91</i>	<i>13,4</i>

P. aeruginosa, 0,96 mJ/mm², 4000 Impulse

Versuch mit 4000 Impulsen

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung
1: 10 ²	142	154	120	135	118	133,8	13,54
1: 10 ³							
1: 10 ⁴	0	3	0	1	0	0,8	1,17
1: 10 ⁵	0	1	0	1	1	0,6	0,49
Verdünnung 2 auf 0 umgerechnet	14200	15400	12000	13500	11800	13380	1354,1

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung
1: 10 ³	192	150	161	140	140	156,6	19,32
1: 10 ⁴							
1: 10 ⁵	5	1	7	2	5	4	2,19
Verdünnung 3 auf 0 umgerechnet	192000	150000	161000	140000	140000	156600	19324,6

Kontrolle in % des Durchschnittes	122,60	95,79	102,80	89,40	89,40	100	12,34
Versuch in % der Kontrolle	9,07	9,83	7,66	8,62	7,54	8,54	0,86

E. faecium, 0,96 mJ/mm², 4000 Impulse

**Versuch mit 4000
Impulsen**

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung
1: 10 ³	1000	300	675	650	753	675,6	224,93
1: 10 ⁴	180	49	95	95	205	124,8	58,31
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	1400000	395000	812500	800000	1401500	961800	388609,65

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung
1: 10 ⁴	379	273	512	343	383	378	77,76
1: 10 ⁵	41	32	57	28	52	42	11,15
Verdünnung 4 und 5 auf 0 umgerechnet	3945000	2965000	5410000	3115000	4515000	3990000	906675,25

Kontrolle in % des Durchschnittes	98,88	74,31	135,59	78,07	113,16	100	22,72
Versuch in % der Kontrolle	35,09	9,90	20,36	20,05	35,12	24,11	9,74

E. faecium, 0,96 mJ/mm², 6000 Impulse

Versuch mit 6000 Impulsen

<i>Verdünnungsstufe</i>	<i>Versuch 1</i>	<i>Versuch 2</i>	<i>Versuch 3</i>	<i>Versuch 4</i>	<i>Versuch 5</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Standardabweichung</i>
<i>1: 10²</i>	70	72	25	97	125	79,25	36,87
<i>1: 10³</i>	8	12	1	3	19	20,6	26,45
<i>1: 10⁴</i>	2		0	0	5	3,8	4,49
<i>1: 10⁵</i>	1		2	0	1	5	6,96
<i>Verdünnung 2 auf 0 umgerechnet</i>	<i>7000</i>	<i>7200</i>	<i>2500</i>	<i>9700</i>	<i>12500</i>	<i>7780</i>	<i>3310,23</i>

<i>Verdünnungsstufe</i>	<i>Kontrolle 1</i>	<i>Kontrolle 2</i>	<i>Kontrolle 3</i>	<i>Kontrolle 4</i>	<i>Kontrolle 5</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Standardabweichung</i>
<i>1: 10³</i>	194	200	128	84	202	161,6	47,55
<i>1: 10⁴</i>	47	52	27	25	37	37,6	10,65
<i>1: 10⁵</i>	48	10	8	4	3	14,6	16,89
<i>Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet</i>	<i>332000</i>	<i>360000</i>	<i>199000</i>	<i>167000</i>	<i>286000</i>	<i>268800</i>	<i>74622,78</i>

<i>Kontrolle in % des Durchschnittes</i>	<i>123,51</i>	<i>133,93</i>	<i>74,03</i>	<i>62,12</i>	<i>106,40</i>	<i>100</i>	<i>27,76</i>
<i>Versuch in % der Kontrolle</i>	<i>2,60</i>	<i>2,68</i>	<i>0,93</i>	<i>3,6</i>	<i>4,65</i>	<i>2,89</i>	<i>1,23</i>

MRSA, 0,96 mJ/mm², 4000 Impulse

Versuch mit 4000 Impulsen

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ³	700	680	700	497	624	640,2	76,82	
1: 10 ⁴	180	133	76	79	70	107,6	42,7	
1: 10 ⁵	9	19	7	11	12	11,6	4,08	
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	0	1250000	1005000	730000	643500	662000	858100	234982,21

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ⁴	365	324	420	255	284	329,6	58,48	
1: 10 ⁵	49	52	47	30	52	46	8,22	
Verdünnung 4 und 5 auf 0 umgerechnet	0	4275000	4220000	4450000	2775000	4020000	3948000	602333,79

Kontrolle in % des Durchschnittes	108,28	106,89	112,71	70,29	101,82	100	15,26
Versuch in % der Kontrolle	31,66	25,45	18,50	16,30	16,77	21,74	5,95

S. epidermidis, 0,96 mJ/mm², 4000 Impulse

Versuch mit 4000 Impulsen

<i>Verdünnungsstufe</i>	<i>Versuch 1</i>	<i>Versuch 2</i>	<i>Versuch 3</i>	<i>Versuch 4</i>	<i>Versuch 5</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Standardabweichung</i>
<i>1: 10²</i>	288	108	91	230	128	169	76,64
<i>1: 10³</i>	2	4	4	14	40	12,8	14,23
<i>1: 10⁴</i>	5	1	2	6	7	4,2	2,32
<i>1: 10⁵</i>	1	0	2	1	1	1	0,63
<i>Verdünnung 2 auf 0 umgerechnet</i>	<i>28800</i>	<i>10800</i>	<i>9100</i>	<i>23000</i>	<i>12800</i>	<i>16900</i>	<i>7663,94</i>

<i>Verdünnungsstufe</i>	<i>Kontrolle 1</i>	<i>Kontrolle 2</i>	<i>Kontrolle 3</i>	<i>Kontrolle 4</i>	<i>Kontrolle 5</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Standardabweichung</i>
<i>1: 10⁴</i>	365	324	420	255	284	329,6	58,48
<i>1: 10⁵</i>	49	52	47	30	52	46	8,22
<i>Verdünnung 4 und 5 auf 0 umgerechnet</i>	<i>4275000</i>	<i>4220000</i>	<i>4450000</i>	<i>2775000</i>	<i>4020000</i>	<i>3948000</i>	<i>602333,79</i>

<i>Kontrolle in % des Durchschnittes</i>	<i>108,28</i>	<i>106,89</i>	<i>112,72</i>	<i>70,29</i>	<i>101,82</i>	<i>100</i>	<i>15,26</i>
<i>Versuch in % der Kontrolle</i>	<i>0,73</i>	<i>0,27</i>	<i>0,23</i>	<i>0,58</i>	<i>0,32</i>	<i>0,43</i>	<i>0,19</i>

S. aureus, 0,38 mJ/mm², 4000 Impulse

Versuch mit 4000
Impulsen und 0,38
mJ/mm²

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ³	1080	808	1120	1080	1760	1169,6	315,54	
1: 10 ⁴	132	157	132	200	144	153	25,25	
1: 10 ⁵	20	12	16	13	12	14,6	3,07	
Verdünnung 3, 4 und 5 auf 0 umgerechnet	0	1466667	1192667	1346667	1460000	1466667	1386533	107158

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ³	920	880	732	506	1052	818	186,41	
1: 10 ⁴	118	149	138	116	122	128,6	12,8	
1: 10 ⁵	22	13	10	21	15	16,2	4,62	
Verdünnung 3,4 und 5 auf 0 umgerechnet	0	1433333	1223333	1037333	1255333	1257333	1241333	125902

Kontrolle in % des Durchschnittes	115,47	98,55	83,57	101,13	101,29	100,00	10,14
Versuch in % der Kontrolle	118,15	96,08	108,49	117,62	118,15	111,70	8,63

S. aureus, 0,59 mJ/mm², 4000 Impulse

Versuch mit 4000
Impulsen und 0,59
mJ/mm

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ³	540	644	848	800	550	676,4	126,77	
1: 10 ⁴	66	98	152	97	75	97,6	29,9	
1: 10 ⁵	12	4	19	6	13	10,8	5,34	
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	0	600000	812000	1184000	885000	650000	826200	206829,79

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ³	1200	1520	1600	1004	1600	1384,8	240,86	
1: 10 ⁴	114	157	200	236	180	177,4	40,96	
1: 10 ⁵	16	23	17	20	26	20,4	3,72	
Verdünnung 4 und 5 auf 0 umgerechnet	0	1370000	1935000	1850000	2180000	2200000	1907000	300925,24

Kontrolle in % des Durchschnittes	75,79	103,68	101,95	103,18	115,41	100,00	13,05
Versuch in % der Kontrolle	31,46	42,58	62,09	46,41	34,08	43,32	10,85

S. aureus, 0,72 mJ/mm², 4000 Impulse

Versuch mit 4000
Impulsen und 0,72
mJ/mm²

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ³	176	194	136	186	110	160,4	32,13	
1: 10 ⁴	27	21	19	25	16	21,6	3,98	
1: 10 ⁵	0	3	2	2	0	1,4	1,2	
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	0	223000	202000	163000	218000	135000	188200	33925,8

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ³	680	750	650	644	590	662,8	52,38	
1: 10 ⁴	65	55	56	58	50	56,8	4,87	
1: 10 ⁵	7	5	6	8	8	6,8	1,17	
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	0	665000	650000	605000	612000	545000	615400	41792,82

Kontrolle in % des Durchschnittes	108,06	105,62	98,31	99,45	88,56	100,00	6,79
Versuch in % der Kontrolle	36,24	32,82	26,49	35,42	21,94	30,58	5,51

S. aureus, 0,96 mJ/mm², 4000 Impulse

Versuch mit 4000
Impulsen und 0,96
mJ/mm²

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung
1: 10 ²	223	150	270	140	140		
1: 10 ³	33	13	15	17	17	19	7,16
1: 10 ⁴	2	0	1	1	1	1	0,63
1: 10 ⁵	0	0	1	1	1	0,6	0,49
Verdünnung 2 und 3 auf 0 umgerechnet	27650	14000	21000	15500	15500	18730	5058,81

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung
1: 10 ³	253	201	180	230	220	216,8	24,89
1: 10 ⁴	28	20	18	32	30	25,6	5,57
1: 10 ⁵	1	3	3	5	4	3,2	1,33
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umge- rechnet	266500	200500	180000	275000	260000	236400	38529,73

Kontrolle in % des Durchschnittes	112,73	84,81	76,14	116,33	109,98	100,00	16,30
Versuch in % der Kontrolle	11,70	5,92	8,88	6,56	6,56	7,92	2,14

S. aureus 0,59 mJ/mm² und 12.000 Impulse

Versuch mit 12.000
Impulsen und
0,59 mJ/mm²

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung
0	442	380	480	464	412	435,6	35,96
1: 10	82	65	117	111	98	94,6	19,06
1: 10 ²	14	9	13	17	15	13,6	2,65
Verdünnung 0 und 1 auf 0 umgerechnet	631	515	825	787	696	690,8	111,15

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung
1: 10 ²	980	920	1200	1100	1160	1072	106,28
1: 10 ³	151	170	165	185	176	169,4	11,36
1: 10 ⁴	22	29	23	28	32	26,8	3,76
1: 10 ⁵	2	3	4	4	2	3	0,89
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	1855000	2300000	1975000	2325000	2480000	2187000	233593,66

Kontrolle in % des Durchschnittes	84,82	105,17	90,31	106,31	113,40	100	10,68
Versuch in % der Kontrolle	0,03	0,02	0,04	0,04	0,03	0,03	0,01

S. aureus 0,59 mJ/mm² und 4.000 Impulse

Versuch mit 4000
Impulsen und
0,59 mJ/mm²

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ³	540	644	848	800	550	676,4	126,77	
1: 10 ⁴	66	98	152	97	75	97,6	29,9	
1: 10 ⁵	12	4	19	6	13	10,8	5,34	
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umgerechnet	0	600000	812000	1184000	885000	650000	826200	206829,79

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ³	1200	1520	1600	1004	1600	1384,8	240,86	
1: 10 ⁴	114	157	200	236	180	177,4	40,96	
1: 10 ⁵	16	23	17	20	26	20,4	3,72	
Verdünnung 4 und 5 auf 0 umgerechnet	0	1370000	1935000	1850000	2180000	2200000	1907000	300925,24

Kontrolle in % des Durchschnittes	75,79	103,68	101,95	103,18	115,41	100,00	13,05
Versuch in % der Kontrolle	31,46	42,58	62,09	46,41	34,08	43,32	10,85

S. aureus unter 33-minütiger Einwirkung von Gentamicin (0,25 µg/ml)

0,25 µg

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung
1: 10 ³	233	261	248	256	230	245,60	12,27
1: 10 ⁴	23	32	28	26	27	27,20	2,93
1: 10 ⁵							
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umge- rechnet	231500	290500	264000	258000	250000	258800,00	19262,92

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung
1: 10 ³	171	175	145	137	154	156,40	14,64
1: 10 ⁴	17	12	13	14	18	14,80	2,32
1: 10 ⁵							
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umge- rechnet	170500	147500	137500	138500	167000	152200,00	13998,57

Kontrolle in % des Durchschnittes	89,45	112,25	102,01	99,69	96,60	100,00	7,44
Versuch in % der Kontrolle	65,88	56,99	53,13	53,52	64,53	58,81	5,41

S. aureus unter 33-minütiger Einwirkung von Gentamicin (0,5 µg/ml)

0,5 µg

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ³	233	261	248	256	230	245,60	12,27	
1: 10 ⁴	23	32	28	26	27	27,20	2,93	
1: 10 ⁵								
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umge- rechnet	0	231500	290500	264000	258000	250000	258800,00	19262,92

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ³	87	103	93	104	114	100,20	9,37	
1: 10 ⁴	4	4	6	8	8	6,00	1,79	
1: 10 ⁵								
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umge- rechnet	0	63500	71500	76500	92000	97000	80100,00	12567,42

Kontrolle in % des Durchschnittes	89,45	112,25	102,01	99,69	96,60	100,00	7,44
Versuch in % der Kontrolle	24,54	27,63	29,56	35,55	37,48	30,95	4,86

S. aureus unter 33-minütiger Einwirkung von Gentamicin (2,0 µg/ml)

2 µg

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ²	233	261	248	256	230	245,60	12,27	
1: 10 ⁴	23	32	28	26	27	27,20	2,93	
1: 10 ⁵								
Verdünnung 3 und 4 auf 0 umge- rechnet	0	231500	290500	264000	258000	250000	258800,00	19262,92

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ²	321	290	303	288	262	292,80	19,38	
1: 10 ³	43	28	42	27	42	36,40	7,28	
1: 10 ⁴	7	3	3	6	2	4,20	1,94	
1: 10 ⁵								
Verdünnung 2 und 3 auf 0 umge- rechnet	0	56500	28500	36150	27900	34100	36630,00	10428,40

Kontrolle in % des Durchschnittes	89,45	112,25	102,01	99,69	96,60	100,00	7,44
Versuch in % der Kontrolle	21,83	11,01	13,97	10,78	13,18	14,15	4,03

S. aureus in CAMHB bei 35°C, bei 0,96 mJ/mm² und 4000 Impulsen ohne Antibiose

„Urs.“ bezeichnet die ursprüngliche Suspension, aus der die Kontroll- und Versuchs-Suspension entnommen wurden. „Versuch“ ist die Suspension, die der ESW ohne Antibiose ausgesetzt war.
Jede Versuch wurde zweimal auf verschiedene Agarplatten ausgeimpft.

4000 Impulse in CAMHB

Verdünnungsstufe	Urs. 1	Urs. 2	Urs. 3	Urs. 4	Urs. 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ³	92	117	119	111	103	108,40	9,91	
1: 10 ⁴	4	9	6	8	9	7,20	1,94	
Verdünnung 3 auf 0 umgerechnet	0	92000	117000	119000	111000	103000	108400,00	991,16

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ³	128	129	137	119	122	127,00	6,23	
1: 10 ⁴	9	33	32	28	24	25,20	8,7	
Verdünnung 3 auf 0 umgerechnet	0	128000	129000	137000	119000	122000	127000,00	622,9

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ⁴	46	89	91	84	75	77,00	16,46	
1: 10 ⁵	5	9	20	8	5	9,40	5,54	
Verdünnung 4 auf 0 umgerechnet	0	46000	89000	91000	84000	75000	77000,00	1645,6

Auswertung (alle Werte in %)	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabweichung
Versuch in % der Ursuspension	42,44	82,10	83,95	77,49	69,19	71,03	15,18
Kontrolle in % der Ursuspension	118,08	119,00	126,38	109,78	112,55	117,16	5,75
Versuch in % der Kontrolle	36,22	70,08	71,65	66,14	59,06	60,63	12,96

S. aureus in CAMHB bei 35°C, bei 0,72 mJ/mm² und 4000 Impulsen ohne Antibiose

„Urs.“ bezeichnet die ursprüngliche Suspension, aus der die Kontroll- und Versuchs-Suspension entnommen wurden. „Versuch“ ist die Suspension, die der ESW ohne Antibiose ausgesetzt war.
Jede Versuch wurde zweimal auf verschiedene Agarplatten ausgeimpft.

**4000 Impulse in
CAMHB**

Verdünnungsstufe	Urs. 1	Urs. 2	Urs. 3	Urs. 4	Urs. 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ³	116	129	122	148	132	129,40	10,84	
1: 10 ⁴	10	10	7	6	9	8,40	1,62	
Verdünnung 3 auf 0 umgerech- net	0	116000	129000	122000	148000	132000	129400,00	10836,97

Verdünnungsstufe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ³	166	177	137	173	176	165,80	14,91	
1: 10 ⁴	18	13	16	19	19	17,00	2,28	
Verdünnung 3 auf 0 umgerech- net	0	173000	153500	148500	181500	183000	167900,00	14301,75

Verdünnungsstufe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung	
1: 10 ³	108	122	117	135	129	122,20	9,37	
1: 10 ⁴	12	9	14	18	13	13,20	2,93	
Verdünnung 3 auf 0 umgerechnet	0	108000	122000	117000	135000	129000	122200,00	9368,03

Auswertung (alle Werte in %)	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabweichung
Versuch in % der Ursuspension	42,44	82,10	83,95	77,49	69,19	71,03	15,18
Kontrolle in % der Ursuspension	118,08	119,00	126,38	109,78	112,55	117,16	5,75
Versuch in % der Kontrolle	36,22	70,08	71,65	66,14	59,06	60,63	12,96

S. aureus in CAMHB bei 35°C, bei 0,59 mJ/mm² und 4000 Impulsen ohne Antibiose

„Urs.“ bezeichnet die ursprüngliche Suspension, aus der die Kontroll- und Versuchs-Suspension entnommen wurden. „Versuch“ ist die Suspension, die der ESW ohne Antibiose ausgesetzt war.
Jeder Versuch wurde zweimal auf verschiedene Agarplatten ausgeimpft.

keine Antibiose

<i>Ursuspension</i>	<i>Urs 1.1</i>	<i>Urs 1.2</i>	<i>Urs 2.1</i>	<i>Urs 2.2</i>	<i>Urs 3.1</i>	<i>Urs 3.2</i>	<i>Urs 4.1</i>	<i>Urs 4.2</i>	<i>Urs 5.1</i>	<i>Urs 5.2</i>
1: 10 ²	318	314	340	340	392	377	339	329	305	322
1: 10 ³	37	39	34	33	37	46	35	31	23	33
2 und 3 umgerechnet auf 0	31800	31400	34000	34000	39200	37700	33900	32900	30500	32200
Mittelwert beider Zählungen	31600		34000		38450		33400		31350	

<i>Versuch</i>	<i>Vers 1.1</i>	<i>Vers 1.2</i>	<i>Vers 2.1</i>	<i>Vers 2.2</i>	<i>Vers 3.1</i>	<i>Vers 3.2</i>	<i>Vers 4.1</i>	<i>Vers 4.2</i>	<i>Vers 5.1</i>	<i>Vers 5.2</i>
1: 10 ²	752	696					599	661		
1: 10 ³	68	72	78	76	76	79	70	74	71	79
3 umgerechnet auf 0	68000	72000	78000	76000	76000	79000	70000	74000	71000	79000
Mittelwert beider Zählungen	70000		77000		77500		72000		75000	

<i>unbehandelte Kontrolle</i>	<i>Kontr. 1.1</i>	<i>Kontr. 1.2</i>	<i>Kontr. 2.1</i>	<i>Kontr. 2.2</i>	<i>Kontr. 3.1</i>	<i>Kontr. 3.2</i>	<i>Kontr. 4.1</i>	<i>Kontr. 4.2</i>	<i>Kontr. 5.1</i>	<i>Kontr. 5.2</i>
1: 10 ²	316	307	325	375	391	377	315	320	330	342
1: 10 ³	38	31	38	49	37	46	35	31	30	27
Umgerechnet auf 0	31600	30700	32500	37500	39100	37700	31500	32000	33000	34200
Mittelwert beider Zählungen	31150		35000		38400		31750		33600	

<i>Auswertung (alle Werte in %)</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Standardabweichung</i>
<i>Ursuspension in % der Ursuspension</i>	93,60	100,71	113,89	98,93	92,86	100,00	7,57
<i>Versuch in % der Ursuspension</i>	221,52	226,47	201,56	215,57	239,23	220,87	12,41
<i>Kontrolle in % der Ursuspension</i>	98,58	102,94	99,87	95,06	107,18	100,73	4,10
<i>Vermehrungsfaktor (Versuch / Kontrolle)</i>	2,25	2,20	2,02	2,27	2,23	2,19	0,09
<i>Korrigierter Versuch (Versuch durch den Vermehrungsfaktor dividiert)</i>	98,45	102,94	99,78	94,96	107,28	100,67	4,17

S. aureus in CAMHB bei 35°C, bei 0,59 mJ/mm² und 4000 Impulsen mit Antibiose

„Urs.“ bezeichnet die ursprüngliche Suspension, aus der die Kontroll- und Versuchs-Suspension entnommen wurden. „Versuch“ ist die Suspension, die der ESW mit Antibiose ausgesetzt war.
 Jeder Versuch wurde zweimal auf verschiedene Agarplatten ausgeimpft.

0,5 µg

Ursuspension	Urs 1.1	Urs 1.2	Urs 2.1	Urs 2.2	Urs 3.1	Urs 3.2	Urs 4.1	Urs 4.2	Urs 5.1	Urs 5.2
1: 10 ²	412	400	372	376	375	390	365	362	333	347
1: 10 ³	43	52	43	60	28	34	37	34	45	17
2 und 3 umgerechnet auf 0	41200	40000	37200	37600	37500	39000	36500	36200	33300	34700
Mittelwert der beiden Zählungen	40600		37400		38250		36350		34000	

Versuch	Vers 1.1	Vers 1.2	Vers 2.1	Vers 2.2	Vers 3.1	Vers 3.2	Vers 4.1	Vers 4.2	Vers 5.1	Vers 5.2
1: 10 ²									601	624
1: 10 ³	79	90	90	103	91	93	86	85	81	79
3 umgerechnet auf 0	79000	90000	90000	103000	91000	93000	86000	85000	81000	79000
Mittelwert der beiden Zählungen	84500		96500		92000		85500		80000	

Kontrolle mit Antibiotikum	Kontr. AB 1.1	Kontr. AB 1.2	Kontr. AB 2.1	Kontr. AB 2.2	Kontr. AB 3.1	Kontr. AB 3.2	Kontr. AB 4.1	Kontr. AB 4.2	Kontr. AB 5.1	Kontr. AB 5.2
1: 10 ²	403	377	354	335	389	388	328	338	345	346
1: 10 ³	40	59	35	41	39	40	39	37	24	21
2 und 3 umgerechnet auf 0	40300	37700	35400	33500	38900	38800	32800	33800	34500	34600
Mittelwert der beiden Zählungen	39000		34450		38850		33300		34550	

Kontrolle ohne Antibiotikum	Kontr. 1.1	Kontr. 1.2	Kontr. 2.1	Kontr. 2.2	Kontr. 3.1	Kontr. 3.2	Kontr. 4.1	Kontr. 4.2	Kontr. 5.1	Kontr. 5.2
1: 10 ²	412	419	445	407	455	407	404	403	396	398
1: 10 ³	33	45	50	60	30	29	39	36	23	17
2 und 3 umgerechnet auf 0	41200	41900	44500	40700	45500	40700	40400	40300	39600	39800
Mittelwert der beiden Zählungen	41550		42600		43100		40350		39700	

Auswertung (alle Werte in %)	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabweichung
Versuch(Gentamicin und ESWT) in % der Ursuspension	208,13	258,02	240,52	235,21	235,29	235,43	16,01
Nur Gentamicin % der Ursuspension	96,06	92,11	101,57	91,61	101,62	96,59	4,36
Korrigierter Versuch (Versuch dividiert durch 2,19)	95,04	117,82	109,83	107,4	107,44	107,51	7,31
Unbehandelte Kontrolle	102,34	113,90	112,68	111,00	116,76	111,34	4,88

S. aureus in CAMHB bei 35°C, bei 0,59 mJ/mm² und 4000 Impulsen mit Antibiose

„Urs.“ bezeichnet die ursprüngliche Suspension, aus der die Kontroll- und Versuchs-Suspension entnommen wurden. „Versuch“ ist die Suspension, die der ESW mit Antibiose ausgesetzt war.
 Jeder Versuch wurde zweimal auf verschiedene Agarplatten ausgeimpft.

1,0 mg

Ursuspension	Urs 1.1	Urs 1.2	Urs 2.1	Urs 2.2	Urs 3.1	Urs 3.2	Urs 4.1	Urs 4.2	Urs 5.1	Urs 5.2
1: 10 ²	303	373	315	315	376	351	376	350	341	328
1: 10 ³	43	42	57	62	61	41	25	31	35	20
2 und 3 umgerechnet auf 0	36650	39650	44250	46750	49300	38050	31300	33000	34550	26400
Mittelwert der beiden Zählungen	38150		45500		43675		32150		30475	

Versuch	Vers 1.1	Vers 1.2	Vers 2.1	Vers 2.2	Vers 3.1	Vers 3.2	Vers 4.1	Vers 4.2	Vers 5.1	Vers 5.2
1: 10 ²	707	673	705	698	620	604	658	653	628	627
1: 10 ³	60	64	88	90	101	92	81	81	89	88
2 und 3 umgerechnet auf 0	65350	65650	79250	79900	81500	76200	73400	73150	75900	75350
Mittelwert der beiden Zählungen	65500		79575		78850		73275		75625	

Kontrolle mit Antibiotikum	Kontr. AB 1.1	Kontr. AB 1.2	Kontr. AB 2.1	Kontr. AB 2.2	Kontr. AB 3.1	Kontr. AB 3.2	Kontr. AB 4.1	Kontr. AB 4.2	Kontr. AB 5.1	Kontr. AB 5.2
1: 10 ²	324	384	336	355	280	292	344	353	290	327
1: 10 ³	17	28	44	35	29	32	21	29	25	29
2 und 3 umgerechnet auf 0	24700	33200	38800	35250	28500	30600	27700	32150	27000	30850
Mittelwert der beiden Zählungen	28950		37025		29550		29925		28925	

Kontrolle ohne Antibiotikum	Kontr. 1.1	Kontr. 1.2	Kontr. 2.1	Kontr. 2.2	Kontr. 3.1	Kontr. 3.2	Kontr. 4.1	Kontr. 4.2	Kontr. 5.1	Kontr. 5.2
1: 10 ²	360	361	355	351	301	312	281	289	356	316
1: 10 ³	40	39	60	85	53	57	25	31	54	31
2 und 3 umgerechnet auf 0	38000	37550	47750	60050	41550	44100	26550	29950	44800	31300
Mittelwert der beiden Zählungen	37775		53900		42825		28250		38050	

Auswertung (alle Werte in %)	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabweichung
Versuch(Gentamicin und ESWT) in % der Ursuspension	180,87	154,18	140,13	203,89	205,91	177,00	26,28
Nur Gentamicin % der Ursuspension	75,88	81,37	67,66	93,08	94,91	79,50	9,24
Korrigierter Versuch (Versuch dividiert durch 2,19)	82,59	70,4	63,99	93,1	94,02	77,52	11,20
Unbehandelte Kontrolle	99,02	118,46	98,05	87,87	124,86	105,65	13,79

S. aureus in CAMHB bei 35°C, bei 0,59 mJ/mm² und 4000 Impulsen mit Antibiose

„Urs.“ bezeichnet die ursprüngliche Suspension, aus der die Kontroll- und Versuchs-Suspension entnommen wurden. „Versuch“ ist die Suspension, die der ESW mit Antibiose ausgesetzt war.
 Jeder Versuch wurde zweimal auf verschiedene Agarplatten ausgeimpft.

2,0 mg

Ursuspension	Urs 1.1	Urs 1.2	Urs 2.1	Urs 2.2	Urs 3.1	Urs 3.2	Urs 4.1	Urs 4.2	Urs 5.1	Urs 5.2
1: 10 ²	289	248	325	296	377	390	245	226	228	201
1: 10 ³	43	43	43	44	52	48	24	27	23	28
2 und 3 umgerechnet auf 0	28900	24800	32500	29600	37700	39000	24500	22600	22800	20100
Mittelwert der beiden Zählungen	26850		31050		38350		23550		21450	

Versuch	Vers 1.1	Vers 1.2	Vers 2.1	Vers 2.2	Vers 3.1	Vers 3.2	Vers 4.1	Vers 4.2	Vers 5.1	Vers 5.2
1: 10 ²	197	200	162	157	217	204	260	240	124	127
1: 10 ³	28	18	17	11	44	29	24	31	17	18
2 und 3 umgerechnet auf 0	23850	19000	16600	13350	32850	24700	25000	27500	14700	15350
Mittelwert der beiden Zählungen	21425		14975		28775		26250		15025	

Kontrolle mit Antibiotikum	Kontr. AB 1.1	Kontr. AB 1.2	Kontr. AB 2.1	Kontr. AB 2.2	Kontr. AB 3.1	Kontr. AB 3.2	Kontr. AB 4.1	Kontr. AB 4.2	Kontr. AB 5.1	Kontr. AB 5.2
1: 10 ²	74	73	84	71	197	207	114	125	59	42
1: 10 ³	2	4	6	3	22	15	18	17	6	2
2 umgerechnet auf 0	7400	7300	8400	7100	19700	20700	11400	12500	5900	4200
Mittelwert der beiden Zählungen	7350		7750		20200		11950		5050	

Kontrolle ohne Antibiotikum	Kontr. 1.1	Kontr. 1.2	Kontr. 2.1	Kontr. 2.2	Kontr. 3.1	Kontr. 3.2	Kontr. 4.1	Kontr. 4.2	Kontr. 5.1	Kontr. 5.2
1: 10 ²	381	366	346	262	395	369	289	320	268	270
1: 10 ³	41	29	31	22	32	29	46	38	29	22
2 und 3 umgerechnet auf 0	38100	36600	34600	26200	39500	36900	28900	32000	26800	27000
Mittelwert der beiden Zählungen	37350		30400		38200		30450		26900	

Auswertung (alle Werte in %)	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabweichung
Versuch(Gentamicin und ESWT) in % der Ursuspension	73,93	51,37	54,89	106,16	58,51	68,97	20,13
Nur Gentamicin % der Ursuspension	27,37	24,96	52,67	50,74	23,54	35,86	13,01
Korrigierter Versuch (Versuch dividiert durch 2,19)	33,76	23,46	25,06	48,47	26,72	31,49	9,19
Unbehandelte Kontrolle	139,11	97,91	99,61	129,30	125,41	118,27	16,55

S. aureus in CAMHB bei 35°C, bei 0,59 mJ/mm² und 4000 Impulsen mit Antibiose

„Urs.“ bezeichnet die ursprüngliche Suspension, aus der die Kontroll- und Versuchs-Suspension entnommen wurden. „Versuch“ ist die Suspension, die der ESW mit Antibiose ausgesetzt war.
 Jeder Versuch wurde zweimal auf verschiedene Agarplatten ausgeimpft.

4,0 mg

<i>Ursuspension</i>	<i>Urs 1.1</i>	<i>Urs 1.2</i>	<i>Urs 2.1</i>	<i>Urs 2.2</i>	<i>Urs 3.1</i>	<i>Urs 3.2</i>	<i>Urs 4.1</i>	<i>Urs 4.2</i>	<i>Urs 5.1</i>	<i>Urs 5.2</i>
1: 10 ²	276	261	317	331	313	304	281	269	303	325
1: 10 ³	30	29	31	32	35	35	32	25	36	40
2 und 3 umgerechnet auf 0	28800	27550	31350	32550	33150	32700	30050	25950	33150	36250
Mittelwert der beiden Zählungen	28175		31950		32925		28000		34700	

<i>Versuch</i>	<i>Vers 1.1</i>	<i>Vers 1.2</i>	<i>Vers 2.1</i>	<i>Vers 2.2</i>	<i>Vers 3.1</i>	<i>Vers 3.2</i>	<i>Vers 4.1</i>	<i>Vers 4.2</i>	<i>Vers 5.1</i>	<i>Vers 5.2</i>
1: 10 ²	190	187	118	110	135	146	99	92	144	139
1: 10 ³	10	19	12	6	16	12	8	8	17	19
2 umgerechnet auf 0	19000	18700	11800	11000	13500	14600	9900	9200	14400	13900
Mittelwert der beiden Zählungen	18850		11400		14050		9550		14150	

<i>Kontrolle mit Antibiotikum</i>	<i>Kontr. AB 1.1</i>	<i>Kontr. AB 1.2</i>	<i>Kontr. AB 2.1</i>	<i>Kontr. AB 2.2</i>	<i>Kontr. AB 3.1</i>	<i>Kontr. AB 3.2</i>	<i>Kontr. AB 4.1</i>	<i>Kontr. AB 4.2</i>	<i>Kontr. AB 5.1</i>	<i>Kontr. AB 5.2</i>
1: 10	431	430			550	527	265	247		
1: 10 ²	46	51	66	69	71	72	23	29	107	78
1: 10 ³	5	6	13	10	16	14	2	4	11	15
1 und 2 umgerechnet auf 0	4455	4700	6600	6900	6300	6235	2475	2685	10700	7800
Mittelwert der beiden Zählungen	4577,5		6750		6267,5		2580		9250	

<i>Kontrolle ohne Antibiotikum</i>	<i>Kontr. 1.1</i>	<i>Kontr. 1.2</i>	<i>Kontr. 2.1</i>	<i>Kontr. 2.2</i>	<i>Kontr. 3.1</i>	<i>Kontr. 3.2</i>	<i>Kontr. 4.1</i>	<i>Kontr. 4.2</i>	<i>Kontr. 5.1</i>	<i>Kontr. 5.2</i>
2	316	336	296	272	357	368	305	315	302	312
3	43	48	72	71	40	49	33	28	33	25
2 und 3 umgerechnet auf 0	37300	40800	50800	49100	37850	42900	31750	29750	31600	28100
Mittelwert der beiden Zählungen	39050		49950		40375		30750		29850	

<i>Auswertung (alle Werte in %)</i>	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabweichung
Versuch(Gentamicin und ESWT) in % der Ursuspension	66,90	35,68	42,67	34,11	40,78	44,03	11,86
Nur Gentamicin % der Ursuspension	16,25	21,13	19,04	9,21	26,66	18,46	5,75
Korrigierter Versuch (Versuch dividiert durch 2,19)	30,55	16,29	19,48	15,58	18,62	20,10	5,42
Unbehandelte Kontrolle	138,60	156,34	122,63	109,82	0,00	131,85	17,43

S. aureus in CAMHB bei 35°C, bei 0,59 mJ/mm² und 4000 Impulsen mit Antibiose

„Urs.“ bezeichnet die ursprüngliche Suspension, aus der die Kontroll- und Versuchs-Suspension entnommen wurden. „Versuch“ ist die Suspension, die der ESW mit Antibiose ausgesetzt war.
 Jeder Versuch wurde zweimal auf verschiedene Agarplatten ausgeimpft.

8,0 mg

Ursuspension	Urs 1.1	Urs 1.2	Urs 2.1	Urs 2.2	Urs 3.1	Urs 3.2	Urs 4.1	Urs 4.2	Urs 5.1	Urs 5.2
1: 10 ²	241	240	204	206	277	248	223	228	252	273
1: 10 ³	14	15	25	26	38	26	25	26	38	26
2 und 3 umgerechnet auf 0	24100	24000	20400	20600	27700	24800	22300	22800	25200	27300
Mittelwert der beiden Zählungen	24050		20500		26250		22550		26250	

Versuch	Vers 1.1	Vers 1.2	Vers 2.1	Vers 2.2	Vers 3.1	Vers 3.2	Vers 4.1	Vers 4.2	Vers 5.1	Vers 5.2
1: 10	46	27	16	15	12	18	11	10	8	8
1: 10 ²	7	4	2	1	1	0	2	2	2	0
1 umgerechnet auf 0	460	270	160	150	120	180	110	100	80	80
Mittelwert der beiden Zählungen	365		155		150		105		80	

Kontrolle mit Antibiotikum	Kontr. AB 1.1	Kontr. AB 1.2	Kontr. AB 2.1	Kontr. AB 2.2	Kontr. AB 3.1	Kontr. AB 3.2	Kontr. AB 4.1	Kontr. AB 4.2	Kontr. AB 5.1	Kontr. AB 5.2
1: 10	17	16	8	4	7	9	2	6	3	2
1: 10 ²	1	1	0	0	0	3	0	0	0	2
1 umgerechnet auf 0	170	160	80	40	70	90	20	60	30	20
Mittelwert der beiden Zählungen	165		60		80		40		25	

Kontrolle ohne Antibiotikum	Kontr. 1.1	Kontr. 1.2	Kontr. 2.1	Kontr. 2.2	Kontr. 3.1	Kontr. 3.2	Kontr. 4.1	Kontr. 4.2	Kontr. 5.1	Kontr. 5.2
1: 10 ²	344	290	205	208	273	275	259	262	261	273
1: 10 ³	37	37	28	21	25	51	33	27	31	30
2 und 3 umgerechnet auf 0	34400	29000	20500	20800	27300	27500	25900	26200	26100	27300
Mittelwert der beiden Zählungen	31700		20650		27400		26050		26700	

Auswertung (alle Werte in %)	1	2	3	4	5	Mittelwert	Standardabweichung
Versuch(Gentamicin und ESWT) in % der Ursuspension	1,52	0,76	0,57	0,47	0,30	0,72	0,42
Nur Gentamicin % der Ursuspension	0,69	0,29	0,30	0,18	0,10	0,31	0,20
Korrigierter Versuch (Versuch dividiert durch 2,19)	0,69	0,35	0,26	0,21	0,14	0,33	0,19
Unbehandelte Kontrolle	131,81	100,73	104,38	115,52	101,71	110,83	11,74

Fluoreszenz von *S. aureus* bei unterschiedlichen Konzentrationen

Zu 100 % permeabilisierte Bakterien					
Konzentration	<i>Messung 1</i>	<i>Messung 2</i>	<i>Messung 3</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Standartabweichung</i>
McF 1,5	1385171	1410894	1448950	1415005	26199,43
McF 1,0	962225	924070	916715	934337	19947,32
McF 0,6	596101	591674	572306	586694	10332,90
McF 0,3	322699	337237	333337	331091	6143,93
McF 0,2	203463	202572	204957	203664	983,99
MCF 0,1	17664	17765	18045	17825	161,16
Leerwert	7255	6960	7025	7080	126,56

Kontrolle (vitale Bakterien)					
Konzentration	<i>Messung 1</i>	<i>Messung 2</i>	<i>Messung 3</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Standartabweichung</i>
McF 1,5	173384	171716	174363	173155	1092,77
McF 1,0	122356	122988	123269	122871	381,80
McF 0,6	78134	76937	76325	77132	751,28
McF 0,3	33538	33182	34403	33708	512,71
McF 0,2	17681	18434	17995	18037	308,82
MCF 0,1	14125	13254	12995	13458	483,35
Leerwert	7255	6960	7025	7080	126,56

Fluoreszenz von *S. aureus* in einer Suspension mit unterschiedlich hohem Anteil an permeabilisierten Bakterien

(Die Zahl in % gibt den Anteil permeabilisierter Bakterien wieder)

McF 1,5	100,00 %	80,00%	60,00%	40,00%	20,00%	0,00%
1,50	1.355.124	1.146.611	982.705	712.352	466.530	166.500
1,50	1.369.975	1.156.397	942.805	816.895	477.341	169.744
1,50	1.361.254	1.154.876	949.215	756.124	465.214	147.698
Mittelwert	1.362.117	1.152.628	958.241	761.790	469.695	161.314
Standardabweichung	6.093	4.299	17.495	42.867	5.433	9.719
McF 1,0	100,00 %	80,00%	60,00%	40,00%	20,00%	0,00%
1,00	1.041.768	887.600	690.890	463.775	307.768	110.505
1,00	1.079.682	805.849	591.857	437.157	305.149	107.283
1,00	1.057.452	856.471	654.124	448.745	310.014	108.745
Mittelwert	1.059.634	849.973	645.623	449.892	307.643	108.844
Standardabweichung	15.555	33.689	40.874	10.897	1.988	1.317
McF 0,5	100,00 %	80,00%	60,00%	40,00%	20,00%	0,00%
0,50	574.868	412.856	337.677	247.813	150.100	60.722
0,50	558.579	422.102	317.965	225.571	146.742	60.584
0,50	557.451	412.747	325.647	212.554	150.021	60.667
Mittelwert	563.632	415.901	327.096	228.646	148.954	60.657
Standardabweichung	7.957	4.384	8.112	14.557	1.564	56

Entwicklung der Fluoreszenz von *S. aureus* bei verschieden langer Einwirkzeit des Farbstoffes

Bakterien gefärbt	10 Minuten	20 Minuten	30 Minuten	40 Minuten	NaCl und Sy- tox	10 Minuten	20 Minuten	30 Minuten	40 Minuten
Messung 1	41923	41910	40362	40546	Messung 1	6391	6052	5900	5982
Messung 2	40502	39960	40779	39328	Messung 2	6479	6327	6254	6043
Messung 3	40971	40501	39401	38176					
Messung 4	41889	40457	38999	38758					
Mittelwerte	41321	40707	39885	39202		6435	6190	6077	6013
Standard- abweichung	608	726	715	876		44	138	177	31
Mittelwert abzgl. des Leerwertes	34886	34518	33808	33190					
Fluoreszenz in % des Ausgangswertes	100	99	97	95					
Standardabweichung in %	1,74	2,1	2,12	2,64					

Fluoreszenz von *S. aureus* nach 4000 Impulsen bei 0,38 mJ/mm²
alle Versuche je 3 mal gemessen;

0,38mJ/mm²	Behandelte Bakterien und Farbstoff			Unbehandelte Bakterien und Farbstoff			Leerwert NaCl und Farbstoff				
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Wert 1	Wert 2	Wert 3		
Messung 1	37068	31347	33681	Messung 1	34088	31100	31588	Messung 1	6233	6086	6109
Messung 2	36967	31042	32705	Messung 2	33850	30781	31274	Messung 2	6261	6112	6163
Messung 3	37584	31527	33252	Messung 3	33221	30493	31782	Messung 3	6216	6348	6164
Mittelwerte	37206	31305	33212	Mittelwerte	33719	30791	31548		6236	6182	6145
Standardabweichung	270	200	399	Standardabweichung	365	247	209		18	117	25
Mittelwert aller 3 Versuche abzgl. des Leerwertes	27720			Mittelwert aller 3 Kontrollen abzgl. des Leerwertes	25832			Mittelwert aller 3 Leerwerte	6188		
Standardabweichung aller 3 Versuche	2459			Standardabweichung aller 3 Kontrollen	1241			Standardabweichung aller 3 Leewerte	38		
	perm. Bakterien und Farbstoff			Leerwert Alkohol und Farbstoff							
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Wert 1	Wert 2	Wert 3					
Messung 1	198907	198907	202019	Messung 1	7023	7300	7102				
Messung 2	192529	207253	195465	Messung 2	6880	7168	7042				
Messung 3	192280	192509	208696	Messung 3	7219	7185	7213				
Mittelwerte	194571	199556	202060	Mittelwerte	7040	7217	7119				
Standardabweichung	3067	6036	5401	Standardabweichung	138	58	70				
Mittelwert aller 3 Versuche abzgl. des Leerwertes	191604			Mittelwert aller 3 Leerwerte	7126						
Standardabweichung aller 3 Versuche	3113			Standardabweichung aller 3 Leerwerte	72,42						

Fluoreszenz von *S. aureus* nach 4000 Impulsen bei 0,59 mJ/mm²
alle Versuche je 3 mal gemessen;

	0,59 mJ/mm² Behandelte Bakterien und Farbstoff				Unbehandelte Bakterien und Farbstoff				Leerwert NaCl und Farbstoff		
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3		Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3		Wert 1	Wert 2	Wert 3
Messung 1	38900	34634	32988	Messung 1	39848	34519	31681	Messung 1	6233	6261	6216
Messung 2	38518	34727	33008	Messung 2	37751	34337	31333	Messung 2	6238	6293	6142
Messung 3	38794	34546	31356	Messung 3	37805	34855	32661	Messung 3	6086	6285	6090
Mittelwerte	38737	34636	32451	Mittelwerte	38468	34570	31892		6186	6280	6149
Standardabweichung	161	73	774	Standardabweichung	976	214	562		70	13	51
Mittelwert aller 3 Versuche abzgl. des Leerwertes	29070			Mittelwert aller 3 Kontrollen abzgl. des Leerwertes	28772			Mittelwert aller 3 Leerwerte	6205		
Standardabweichung aller 3 Versuche	2606			Standardabweichung aller 3 Kontrollen	2700			Standardabweichung aller 3 Leerwerte	55		
	perm. Bakterien und Farbstoff				Leerwert Alkohol und Farbstoff						
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3		Wert 1	Wert 2	Wert 3				
Messung 1	206443	213074	209579	Messung 1	7436	7433	7102				
Messung 2	212039	211362	214276	Messung 2	7440	7324	7042				
Messung 3	217137	217369	205783	Messung 3	7347	7503	7213				
Mittelwerte	211873	213935	209879	Mittelwerte	7408	7420	7119				
Standardabweichung	4367	2527	3474	Standardabweichung	42	73	70				
Mittelwert aller 3 Versuche abzgl. des Leerwertes	204557			Mittelwert aller 3 Leerwerte	7316						
Standardabweichung aller 3 Versuche	1656			Standardabweichung aller 3 Leerwerte	139						

Fluoreszenz von *S. aureus* nach 4000 Impulsen bei 0,96 mJ/mm²
alle Versuche je 3 mal gemessen;

0,96 mJ/mm²	Behandelte Bakterien und Farbstoff				Unbehandelte Bakterien und Farbstoff				Leerwert NaCl und Farbstoff				
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Wert 1	Wert 2	Wert 3		
Messung 1	29306	26845	27904	28945	Messung 1	21473	21779	23415	21539	Messung 1	6233	6261	6231
Messung 2	30202	26642	26629	29436	Messung 2	22757	22158	22331	22591	Messung 2	6238	6293	6201
Messung 3	29856	26270	26309	29080	Messung 3	21989	24298	22999	21808	Messung 3	6086	6285	6103
Mittelwerte	29788	26586	26947	29154	Mittelwerte	22073	22745	22915	21979		6186	6280	6178
Standardabweichung.	368	238	688	207	Standardabweichung	527	1108	446	446		70	13	54
Mittelwert aller 4 Versuche abzgl. des Leerwertes	21920				Mittelwert aller 4 Kontrollen abzgl. des Leerwertes	16230				Mittelwert aller 3 Leerwerte	6198		
Standardabweichung aller 4 Versuche	1377				Standardabweichung aller 4 Kontrollen	408				Standardabweichung aller 3 Leerwerte	49		
	perm. Bakterien und Farbstoff				Leerwert Alkohol und Farbstoff								
permeabilisiert	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4		Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4				
Messung 1	110110	131335	123144	127268	Messung 1	5636	5633	5541	5302				
Messung 2	121288	144698	127473	118565	Messung 2	5640	5524	5545	5242				
Messung 3	121040	148874	125405	120175	Messung 3	5547	5703	5632	5413				
Mittelwerte	117479	141636	125341	122003	Mittelwerte	5608	5620	5573	5319				
Standardabweichung	5212	7481	1768	3781	Standardabweichung	42	73	41	70				
Mittelwert aller 4 Versuche abzgl. des Leerwertes	121085				Mittelwert aller 4 Leerwerte	5530							
Standardabweichung aller 4 Versuche	9110				Standardabweichung aller 4 Leerwerte	122,96							

Fluoreszenz von *S. aureus* nach 2000 Impulsen bei 0,59 mJ/mm²
 alle Versuche je 3 mal gemessen;

2000 Impulse	Versuch				
	1	2	3	4	5
Messung 1	30396	33224	24621	33453	25874
Messung 2	29318	32135	24915	32357	25087
Messung 3	29467	31001	25080	32333	25253
Mittelwerte	29727	32120	24872	32714	25405
Standardabweichung	476,95	907,6	189,84	522,41	338,72
Mittelwert aller 5 Versuche abzgl. des Leerwertes	22763				
Standardabweichung aller 5 Versuche	3287				

	Kontrolle						Leerwert NaCl		
	1	2	3	4	5		Wert 1	Wert 2	Wert 3
Messung 1	30460	34222	27908	34458	28100	Messung 1	6233	6261	6216
Messung 2	30576	30623	27102	32545	27289	Messung 2	6238	6293	6142
Messung 3	31192	33021	27365	33249	27554	Messung 3	6086	6285	6090
Mittelwerte	30743	32622	27458	33417	27648	Mittelwerte	6186	6280	6149
Standardabweichung	321,24	1496,13	335,6	790	337,65	Standardabweichung	70,5	13,6	51,7
Mittelwert aller 5 Kontrollen abzgl. des Leerwertes	24173					Mittelwert aller 5 Leer- werte	6205		
Standardabweichung aller 5 Kontrollen	2465					Standardabweichung aller 5 Leewerte	55		

Fluoreszenz von *S. aureus* nach 4000 Impulsen bei 0,59 mJ/mm²
 alle Versuche je 3 mal gemessen;

4000 Impulse	Versuch				
	1	2	3	4	5
Messung 1	32136	29010	30228	31254	28627
Messung 2	32078	27479	30887	31654	27116
Messung 3	32547	29577	28839	32117	29186
Mittelwerte	32254	28689	29985	31675	28310
Standardabweichung	208,77	886,13	853,61	352,63	874,36
Mittelwert aller 5 Versuche abzgl. des Leerwertes	23977				
Standardabweichung aller 5 Versuche	1568				

	Kontrolle						Leerwert NaCl		
	1	2	3	4	5		Wert 1	Wert 2	Wert 3
Messung 1	27096	28470	28874	26738	29997	Messung 1	6233	6261	6216
Messung 2	27711	29382	29287	27345	28994	Messung 2	6238	6293	6142
Messung 3	26958	29360	28704	26602	28972	Messung 3	6086	6285	6090
Mittelwerte	27255	29071	28955	26895	29321	Mittelwerte	6186	6280	6149
Standardabweichung	327,33	424,83	244,8	323,01	478,09	Standardabweichung	70,5	13,6	51,7
Mittelwert aller 5 Kontrollen abzgl. des Leerwertes	22094					Mittelwert aller 5 Leer- werte	6205		
Standardabweichung aller 5 Kontrollen	1013					Standardabweichung aller 5 Leewerte	55		

Fluoreszenz von *S. aureus* nach 8000 Impulsen bei 0,59 mJ/mm²
 alle Versuche je 3 mal gemessen;

8000 Impulse	Versuch				
	1	2	3	4	5
Messung 1	34904	30176	30484	38395	33194
Messung 2	34025	31281	31201	37428	34410
Messung 3	35577	30902	31075	39136	33993
Mittelwerte	34835	30786	30920	38320	33866
Standardabweichung	635,46	458,47	312,56	699,32	504,53
Mittelwert aller 5 Versuche abzgl. des Leerwertes	27541				
Standardabweichung aller 5 Versuche	2788				

	Kontrolle						Leerwert NaCl		
	1	2	3	4	5		Wert 1	Wert 2	Wert 3
Messung 1	29635	33402	31496	32599	34589	Messung 1	6233	6261	6216
Messung 2	29790	31993	31227	32770	35193	Messung 2	6238	6293	6142
Messung 3	29936	31765	31926	32930	34942	Messung 3	6086	6285	6090
Mittelwerte	29787	32387	31550	32766	34908	Mittelwerte	6186	6280	6149
Standardabweichung	122,9	723,96	287,88	135,16	247,75	Standardabweichung	70,5	13,6	51,7
Mittelwert aller 5 Kontrollen abzgl. des Leerwertes	26075					Mittelwert aller 5 Leer- werte	6205		
Standardabweichung aller 5 Kontrollen	1668					Standardabweichung aller 5 Leewerte	55		

Fluoreszenz von *S. aureus* nach 12.000 Impulsen bei 0,59 mJ/mm²
alle Versuche je 3 mal gemessen;

12000 Impulse	Versuch				
	1	2	3	4	5
Messung 1	39520	33224	33813	39999	33626
Messung 2	39875	35443	34069	40358	35872
Messung 3	39550	36050	35373	40029	36487
Mittelwerte	39648	34906	34418	40128	35328
Standardabweichung	160,74	1214,66	683,09	162,69	1229,37
Mittelwert aller 5 Versuche abzgl. des Leerwertes	30681				
Standardabweichung aller 5 Versuche	2473				

	Kontrolle						Leerwert NaCl		
	1	2	3	4	5		Wert 1	Wert 2	Wert 3
Messung 1	30894	31238	28517	31283	31631	Messung 1	6233	6261	6216
Messung 2	32101	31811	29287	32505	32211	Messung 2	6238	6293	6142
Messung 3	30961	31018	30518	31351	31408	Messung 3	6086	6285	6090
Mittelwerte	31319	31356	29441	31713	31750	Mittelwerte	6186	6280	6149
Standardabweichung	553,87	334,26	824,1	560,72	338,45	Standardabweichung	70,5	13,6	51,7
Mittelwert aller 5 Kontrollen abzgl. des Leerwertes	24911					Mittelwert aller 5 Leer- werte	6205		
Standardabweichung aller 5 Kontrollen	85					Standardabweichung aller 5 Leewerte	55		

Fluoreszenz von *S. aureus* nach Permeabilisierung mit Alkohol;
 100%-Kontrolle zu den Versuchen mit 2000; 4000; 8000 und 12000 Impulsen
 alle Versuche je 3 mal gemessen;

<i>permeabilisiert</i>	<i>Zu 100 % permeabilisierte und gefärbte Bakterien</i>					<i>Leerwert (Alkohol und Farbstoff)</i>					
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	
<i>Messung 1</i>	185432	169351	165946	180118	176459	<i>Messung 1</i>	7436	7433	7102	7551	7548
<i>Messung 2</i>	182212	178792	173762	190263	184858	<i>Messung 2</i>	7440	7324	7042	7555	7437
<i>Messung 3</i>	177979	156137	151902	165919	161368	<i>Messung 3</i>	7347	7503	7213	7461	7619
<i>Mittelwerte</i>	181874	168093	163870	178766	174228	<i>Mittelwerte</i>	7408	7420	7119	7522	7535
<i>Standardabweichung</i>	3051,78	9291,2	9044,32	9984,21	9718,91	<i>Standardabweichung</i>	42,93	73,65	70,84	43,4	74,9
<i>Mittelwert aller 5 Versuche abzgl. des Leerwertes</i>	165966					<i>Mittelwert aller 5 Leerwerte</i>	7401				
<i>Standardabweichung aller 5 Versuche</i>	6637					<i>Standardabweichung aller 5 Leerwerte</i>	150,01				

Fluoreszenz von DNA, human, mit 0,96 mJ/mm² und 4000 Impulsen behandelt
alle Versuche je 3 mal gemessen;

DNA in TRIS, nach Behandlung gefärbt	Versuch					DNA in TRIS, unbehandelt, gefärbt	Kontrolle				
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
Messung 1	68451	44073	43760	54265	61584	Messung 1	92908	87585	77306	91256	88987
Messung 2	63197	41717	45598	58452	62589	Messung 2	97665	86335	75880	90025	84568
Messung 3	61999	43997	43257	56985	63584	Messung 3	85768	89344	72278	93527	91520
Mittelwerte	64549	43262	44205	56567	62586	Mittelwerte	92114	87755	75155	91603	88358
Standardabweichung	2802,14	1093,16	1006,18	1734,66	816,5	Standardabweichung	4889,3	1234,26	2115,78	1450,55	2872,74
Mittelwert abzgl. des Leerwertes	58731	37444	38387	50749	56768	Mittelwert abzgl. des Leerwertes	86296	81937	69337	91603	88358

	Versuch						Leerwert				
	1	2	3	4	5	Mittelwert	TRIS und Farbstoff (Leewert)	1	2	3	4
DNA vor ESWT (Kontrolle)	86295,67	81936,67	69336,67	91602,67	88358,33	83506,00		5718	5807	5923	5824
DNA nach ESWT (Versuch)	58731,00	37444,33	38387,00	50749,33	56767,67	48415,87	Mittelwert aller Leerwerte	5818			
Standardabweichung Kontrolle	5,67	1,51	3,05	1,58	3,25	1,77	Standardabweichung Leerwerte	84,03			
Standardabweichung Versuch	3,25	1,33	1,45	1,89	0,92	3,01					

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabweichung
DNA vor ESW	103,34	98,12	83,03	109,70	105,81	100,00	9,28
DNA nach ESW	68	46	55	55	64	57,74	7,81

12 Lebenslauf

Name: Carsten Peter Horn
Geboren: 07.05.1978 in Stuttgart

Schulbildung

1984 - 1988 Grundschule Weilerhau, Filderstadt
1988 - 1997 Eduard Spranger Gymnasium Filderstadt
Juni 1997 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Dienste

1997- 1998 Wehrdienst in Halle a. d. Saale und in Laupheim

Studium

05/98- 04/00 Studium der Humanmedizin an der LMU München
April 2000 Ärztliche Vorprüfung
05/00 - 05/05 Studium der Humanmedizin an der TU München
April 2002 Erstes Staatsexamen
April 2004 Zweites Staatsexamen
April 2005 Drittes Staatsexamen
April 2005 Erhalt der Ärztlichen Approbation

Berufserfahrung

Seit August 2005 Assistenzarzt in der Klinik für Orthopädie,
Klinikum Rechts d. Isar, TU München

Praktisches Jahr

12/04 – 03/05 Kantonales Spital Herisau, Schweiz
Abteilung für Innere Medizin, Leitung: Dr. Schmidli
08/04 - 11/04 Krankenhaus Bogenhausen
Abteilung für Chirurgie, Leitung: Prof. Dr. Heitland
06/04 - 08/04 Mater Misericordiae University Hospital, Dublin
Division of Anesthesia, Leitung: Dr. Carson
04/04 - 06/04 Klinikum Rechts der Isar, München
Klinik für Anästhesiologie, Leitung: Prof. Dr. Kochs

Famulaturen

02/03 - 03/03 Ojele Memorial Hospital, Migori, Kenia
Abteilung für Innere Medizin, Leitung: Dr. Migowe
09/03 Krankenhaus Bogenhausen, München
Abteilung für Herzchirurgie, Leitung: Prof. Dr. Kemkes
02/01 - 03/01 Universitätsklinikum Großhadern, München
Abteilung für Unfallchirurgie, Leitung: Prof. Dr. Lob
08/03 Klinik Dr. Decker, München
Klinik für Innere Krankheiten, Leitung: Dr. Decker

13 Danksagung

Danken möchte ich Herrn Professor Dr. Reiner Gradinger, Direktor der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie der TU München, der mir ermöglichte die vorliegende Dissertation an seiner Klinik zu erstellen.

Ebenso möchte ich Herrn Privatdozent Dr. Ludger Gerdesmeyer danken, der mich bei der Durchführung der Arbeit unterstützte und die Kontakte zur Firma Dornier Medtech hergestellt hat. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ganz besonders möchte ich meinem Betreuer Herrn Dr. Hans Gollwitzer danken: Von Beginn an hat er mich hervorragend angeleitet. Er stand mir stets hilfsbereit zur Seite, wenn es Probleme gab. Auch fand ich bei ihm stets ein offenes Ohr für neue Ansätze und Versuche.

Frau Jutta Tübel vom Labor für Zellkultur verdient ebenso meinen besonderen Dank. Stets konnte ich bei ihr das benötigte Material beziehen. Ebenso war sie eine große Hilfe bei der Auswahl geeigneter Materialien.

Herr Prof. Manfred Schmitt von der Klinischen Forschergruppe Frauenheilkunde an der Klinik für Gynäkologie an der TU München hat mir ermöglicht, in seinen Labors die Gerätschaften für die Durchführung der Gel-Elektrophorese und der Fluoreszenzmessungen zu nutzen. Frau Dipl.-Biol. Karin Mengele hat mich dabei tatkräftig und hilfsbereit bei der Durchführung eben dieser Versuche unterstützt.

Frau Vassilia Vatou vom Institut für Infektionshygiene hatte stets ein offenes Ohr, wenn es bei den Versuchen Probleme mikrobiologischer Art gab. Zudem unterstützte sie mich großzügig bei der Beschaffung von Material und Reagenzien. Ihre Bibliothek und ihr umfangreiches Wissen waren mir eine wertvolle Hilfe. Das Institut für Infektionshygiene hat die verwendeten Keime zur Verfügung gestellt. Auch ihm gilt mein herzlicher Dank.

Der Firma Dornier Medtech habe ich für die Bereitstellung des Stoßwellengenerators zu danken. Besonders möchte ich Herrn Dr. Bernd Forßmann und Herrn Dr. Lutz danken. Beide haben mich unkompliziert bei der Durchführung meiner Versuche unterstützt.

In der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Murnau konnte ich einen Teil der Versuche durchführen. Dafür möchte ich mich herzlich bedanken. Besonders Dr. Hans Brandner, Dr. Florian Zentz und das Team des Labors für Mikrobiologie verdienen meinen Dank.

Schließlich gebührt Dank meinem Freund Dipl.-Phys. (FH) Mark Chmelik. Er hat mich bei Fahrten nach Weißling und Murnau und dem Transport großer Materialmengen stets logistisch unterstützt. Zudem war er eine große Hilfe bei der Erklärung komplexer physikalischer Zusammenhänge.