

Abschlussbericht zum Projekt  
der  
Deutschen Bundesstiftung Umwelt

**Referat Umweltchemie**

„Entwicklung einer Verfahrenstechnik zur Sterilisation von  
Medizinaltextilien und Implantaten mittels hochkomprimiertem  
Kohlendioxid und Ozon“

AZ 25131-31

Verfasser:

Claudio Cinquemani, Klaus Opwis, Dierk Knittel, Eckhard Schollmeyer\*  
Andreas Müllen\*\*

\* Deutsches Textilforschungszentrum Nord-West e.V., Krefeld

\*\*FEG Textiltechnik Forschungs- und Entwicklungsgesellschaft mbH

Projektbeginn: 01.04.2007

Projektlaufzeit: 2 Jahre

Krefeld, 22.06.2009



**Projektkennblatt**  
der  
**Deutschen Bundesstiftung Umwelt**



<b>Az</b>	<b>25131</b>	<b>Referat</b>	<b>31</b>	<b>Fördersumme</b>	<b>122.980,00 EUR</b>
<b>Antragstitel</b>		<b>Entwicklung einer Verfahrenstechnik zur Sterilisation von Medizinaltextilien und Implantaten mittels hochkomprimiertem Kohlendioxid und Ozon</b>			
<b>Stichworte</b>		CO <sub>2</sub> , Ozon, Sterilisation, Desinfektion, Hochdruck			
	<b>Laufzeit</b>	<b>Projektbeginn</b>	<b>Projektende</b>	<b>Projektphase(n)</b>	
	<b>2 Jahre</b>	<b>01.04.2007</b>	<b>31.03.2009</b>		
Zwischenberichte					
<b>Bewilligungsempfänger</b>		Deutsches Textilforschungszentrum Nord-West e.V. (DTNW) Adlerstr. 1 47798 Krefeld		Tel	02151/843-175
				Fax	02151/843-143
				Projektleitung Claudio Cinquemani M.E.	
<b>Kooperationspartner</b>		FEG Textiltechnik Forschungs- und Entwicklungsgesellschaft mbH Jülicher Str. 338a 52070 Aachen Ansprechpartner Dr. Andreas Müllen			

***Zielsetzung und Anlass des Vorhabens***

Die bisher verwendeten Sterilisationsverfahren für Implantate und Medizinaltextilien im Krankenhausbereich sind aus hygienischer sowie arbeitsschutz- und umweltschutzfachlicher Sicht unbefriedigend. Ziel des Projektes war die Entwicklung einer Niedrig-Temperatur-Sterilisationsmethode für Medizinaltextilien mit dem umweltfreundlichen und milden Lösemittel überkritisches Kohlendioxid (scCO<sub>2</sub>). Nosokomiale Infektionen zählen zu den häufigsten postoperativen Komplikationen und sind zumeist auf unsterile Arbeitsmittel zurückzuführen. Derzeit sind nur wenige, konventionelle Prozesse für die Sterilisation von Medizinaltextilien und Implantaten verfügbar. Diese können das Material durch Hitzebelastung oder Strahlung schädigen - wovon insbesondere moderne Biomaterialien betroffen sind. Beim Einsatz von Chemikalien (z.B. Ethylenoxid - ETO) hingegen kann es zu Einlagerungen von toxischen Substanzen kommen, die in Kontakt mit menschlichem Gewebe allergische Reaktionen, Entzündungen usw. hervorrufen können.

Weiterhin stellen die Methoden, die auf den Einsatz von (Radio-) Chemikalien basieren, eine erhebliche Belastung bzw. Gefährdung für Umwelt und Betreiberpersonal dar. Zielsetzung des Fördervorhabens ist die Entwicklung eines Verfahrens zur Niedertemperatursterilisation unter Einsatz von CO<sub>2</sub> und Ozon. Die Methode ist quasi emissions- und abfallfrei, da das CO<sub>2</sub> recycelt und das Ozon on-site erzeugt und auch wieder vernichtet wird. Die Bereitstellung dieser innovativen Technologie wäre eine außerordentliche Verbesserung des status quo hinsichtlich Ökologie und Arbeitssicherheit für die Sterilisation von textilen Implantaten.

Im Rahmen der Entwicklung und Optimierung des Verfahrens wird die Inaktivierung verschiedener vegetativer Mikroorganismen, Sporen und Endotoxinen untersucht. Die Verschiedenheit all dieser infektiösen Partikel stellt eine anspruchsvolle Aufgabe für jedes Sterilisationsverfahren dar und wurde

bisher noch nicht untersucht. Außerdem wird überprüft, ob die neue Behandlungsmethode die Eigenschaften der polymeren Implantatmaterialien negativ verändert. Auch hier besteht das Problem in der Heterogenität und Vielzahl der verfügbaren Implantatmaterialien, die in dieser Untersuchung erfasst werden müssen. Abschließend wird das Verfahren einer ökologischen und ökonomischen Bewertung unterzogen.

### ***Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden***

Zunächst wurden in Zusammenarbeit mit FEG Textiltechnik die zu untersuchenden Polymere ausgewählt. Diese basieren auf PVDF, PP, PLA und Silikon und liegen als Geflecht, Gewirke, Netz oder Garn vor. Der Aufbau der Sterilisationsapparatur erfolgte am DTNW und war Voraussetzung für alle nachfolgenden Arbeiten. Die Überprüfung der Inaktivierung der vegetativen Mikroorganismen (*Staphylococcus aureus* und *Candida albicans*) sowie der Sporen (*B.subtilis* und *B.stearothermophilus*) erfolgte über die konventionelle Plattiermethode und wurde am Anfang der Projektlaufzeit am DTNW erarbeitet.

Die Untersuchungen zur Faserschädigung während des Prozesses waren aufgeteilt auf Oberflächenbeurteilung mittels XPS und ESR, die vom DTNW koordiniert wurden. Die physikalischen Parameter Zugfestigkeit und die Elastizität wurden von FEG ermittelt. FEG übernahm auch die Eluierung der behandelten Textilien, um diese auf Reststoffe zu untersuchen. Weiterhin wurden LAL-Tests zur Abschätzung der Pyrogenität und ein Zytotoxizitätstest an Bindegewebszellen durchgeführt. Die Planung der Versuche mittels DoE, die Sammlung der Daten sowie deren Auswertung für die textiltechnologischen als auch die mikrobiologischen Parameter (mittels ANOVA) wurde über die gesamte Projektlaufzeit vom DTNW koordiniert.

Die dargelegten Arbeiten waren geeignet, die Auswirkungen des CO<sub>2</sub>-basierten Verfahrens auf die eingesetzten Polymermaterialien zu bewerten, die bisher noch nicht bekannt waren. Außerdem wurden neue Erkenntnisse über die Effizienz des Verfahrens hinsichtlich der Inaktivierung der genannten infektiösen Partikel gewonnen. Gegen Ende der Projektlaufzeit erfolgte der Vergleich des neuen Verfahrens mit der konventionellen ETO Sterilisation. Dabei wurden Vor- und Nachteile der Verfahren für die Umwelt gegenübergestellt und bewertet.

### ***Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation***

- "Sterilisation medizinischer Hochleistungs-Textilien mittels komprimiertem CO<sub>2</sub> und O<sub>3</sub> Techtexil, 14. Internationales Techtexil-Symposium für Technische Textilien, Vliesstoffe, und textilarmierte Werkstoffe, Frankfurt, 2007
- "Sterilise implantable high-tech (bio-) materials the eco-friendly way" 11th European meeting on Supercritical Fluids, Barcelona, 2008
- "Low-temperature sterilisation of polymers for biomedical applications using sub- and supercritical fluids" Poster Präsentation und Vortrag anlässlich des Malcom-Lilly-awards, 7th European Symposium on Biochemical Engineering Science, Faro, 2008
- "Eco-friendly sterilisation of implantable textiles - Process compatibility for high-tech (bio-) polymers" ESB European Symposium on Biomaterials, Brighton, UK, 2007 (Poster)

### ***Fazit***

Im Rahmen des durch die DBU geförderten Projektes wurde am DTNW ein umwelt- und materialschonendes Verfahren zur Niedrig-Temperatur-Sterilisation entwickelt und am Beispiel von teils thermolabilen Hightech-Implantaten auf Basis verschiedener (Bio-) Polymere untersucht. Diese werden von der FEG-Textiltechnik entwickelt, und immer häufiger eingesetzt, um menschliches Gewebe zu konservieren, wiederherzustellen oder um die Funktion von geschädigten Organen zu verbessern. In dem innovativen Verfahren wird hoch komprimiertes CO<sub>2</sub> bei Drücken bis zu 100 bar mit Ozon als Additiv zur Inaktivierung von krankenhaushausrelevanten Keimen eingesetzt. Die Prozessparameter wurden für die Abtötung humanpathogener Bakterien, Pilze sowie Sporen optimiert, wobei bei vergleichbarer Beanspruchung des Materials die Sterilisationszeit gegenüber konventionellen Verfahren verkürzt werden konnte. Darüber hinaus konnte anhand von Zellkulturversuchen gezeigt werden, dass keine Quarantänezeit notwendig ist, was Entwicklungen auf dem Gebiet der on-demand Medizintechnik gestattet. Darüber hinaus ergeben sich Möglichkeiten für einen Einsatz der Technologie in Bereichen der Pharmazeutika-Sterilisation und Biotechnologie. Sowohl seitens der Emissionen als auch der Verfahrenssicherheit werden Vorteile durch das neue Verfahren gegenüber konventionellen Prozessen erzielt, da weder mit radioaktiven mit noch giftigen Stoffen hantiert werden muss, noch fallen schädlichen Emissionen an.

# INHALT

PROJEKTKENBLATT .....	III
INHALT .....	V
ABKÜRZUNGEN.....	VII
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>11</b>
<b>2 ANLASS UND ZIELSETZUNG DES PROJEKTES .....</b>	<b>15</b>
<b>3 STAND DER FORSCHUNG.....</b>	<b>22</b>
3.1 Medizinische Polymere: Produkte, Materialien, Kontaminationen.....	22
3.2 Verfahren zur Inaktivierung von Mikroorganismen .....	28
3.3 Entwicklung alternativer Inaktivierungs-Verfahren auf Hochdruckbasis .....	31
3.4 Änderung der Polymer-Eigenschaften durch Sterilisation .....	37
<b>4 DARSTELLUNG DER ARBEITSSCHRITTE UND DER ANGEWANDTEN METHODEN .....</b>	<b>43</b>
<b>5 EXPERIMENTELLES .....</b>	<b>44</b>
5.1 Verwendete Materialien .....	44
5.2 Geräte und Methoden.....	46
5.2.1 Bestimmung der Inaktivierung vegetativer Keime und Sporen.....	49
5.2.2 Statistische Versuchsplanung und -auswertung.....	50
5.2.3 Analyse der Eigenschaften der sterilisierten Polymere .....	53
5.2.4 Analyse biomedizinischer Eigenschaften der sterilisierten Polymere.....	58
<b>6 ERGEBNISSE.....</b>	<b>61</b>
6.1 Inaktivierung von Keimen mit Hilfe von komprimiertem CO <sub>2</sub> und Ozon.....	61
6.1.1 Abtöten von vegetativen Keimen .....	62
6.1.2 Abtöten von Sporen .....	67
6.1.3 Mögliche Mechanismen und praktische Aspekte.....	72
6.2 Einfluss des Verfahrens auf die Eigenschaften der Polymere .....	75
6.2.1 Elektronenmikroskopisch detektierbare Veränderungen .....	76
6.2.2 Oberflächentopographie mittels Rasterkraftmikroskopie .....	78
6.2.3 Thermische Analyse der Polymereigenschaften mittels DSC .....	81
6.2.4 Mechanische Eigenschaften: Zugfestigkeit und Dehnung.....	86
6.2.5 FTIR-Spektroskopie chemischer Oberflächengruppen.....	89
6.2.6 Kontaktwinkelmessung zur Bestimmung der Benetzbarkeit.....	92
6.2.7 Röntgen-Photoelektronenspektroskopische Oberflächenanalyse (XPS).....	97
6.2.8 Quantitativer, nasschemischer Nachweis von Oberflächengruppen .....	102
6.2.9 Molmassenverteilung mittels GPC.....	106

6.3	Biomedizinische Eigenschaften der Polymere.....	115
6.3.1	<i>Protein- und Fibroblastenadhäsion auf Polymeroberflächen.....</i>	<i>115</i>
6.3.2	<i>Zytotoxizität der Polymeroberflächen - Fluoreszenz-Anfärbung.....</i>	<i>121</i>
6.3.3	<i>Pyrogenität der Polymere - Endotoxin-Test.....</i>	<i>123</i>
<b>7</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>126</b>
<b>8</b>	<b>ÖFFENTLICHKEITSARBEIT.....</b>	<b>131</b>
<b>9</b>	<b>FAZIT.....</b>	<b>132</b>
<b>10</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>134</b>
<b>11</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>147</b>

# ABKÜRZUNGEN

a	Irrtumswahrscheinlichkeit	DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
$\alpha$	Steigung im Mark Houwink-Plot	DIN	Deutsches Institut für Normung
$a_{ij}$	Korrekturkonstanten	DoE	statistischer Versuchsplan (Design of Experiments)
AFM	Rasterkraft-Elektronen Mikroskop (Atomic Force Microscope)	DMSO	Dimethylsulfoxid
ANOVA	Varianzanalyse (Analysis Of Variance)	DNS	Desoxyribonukleinsäure
ASTM	Internationale Standardisierungsorganisation (American Society for Testing and Materials)	DPPH	N,N-Diphenyl-N'-(2,4,6-triphenyl-)hydrazyl-Radikal
ATCC	Amerikanische Sammlung für Zellkulturen (American Type Culture Collection)	DSC	Dynamische Differenz-Kalorimetrie (differential-scanning-calorimetry)
ATP	Adenosintriphosphat	DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ATR-FTIR	Abgeschwächte Total Reflexion Fourier-Transformation-Infrarot Spektroskopie	DTNW	Deutsches Textilforschungszentrum Nord-West e.V.
$a_w$	Wasseraktivität	ETO	Ethylenoxid
$\beta$ -gal	beta-Galactosidase (Enzym)	FBS	Kälberserum (Fetal Bovine Serum)
$b_{ij}$	Konstante Koeffizienten für mathematische Darstellung	FDA	US-Behörde für Lebens- und Arzneimittelsicherheit (Food and Drug Administration)
B	Bacillus	FEG	Forschungs- und Entwicklungsgesellschaft
BCA	Bicinchoninsäure	$F_{exp}$	Schwellenwert (experimentell) für F-Test
BSA	bovines Serumalbumin	FQ	Fehlerquadratsumme
CJD	Creutzfeld-Jakob-Krankheit	$F_{th}$	F-Wert, theoretische Signifikanzgrenze für F-Test
CO	Baumwolle (cotton)	GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
CP	kritischer Punkt (critical point)	GMP	Gute Herstellungspraxis (Good Manufacturing Practice)
$c_p$	Wärmekapazität		
D	Polydispersitätsindex		
dd	doppelt destilliert		

$\eta$	intrinsische Viskosität	$N_0$	Ausgangskeimzahl
$H_m$	Schmelzenthalpie	$p$	Zahl der reduzierten Faktoren
$H_{m0}$	Schmelzenthalpie von kristallinem Polymer		im Versuchsplan
HP	Hochdruck (High-pressure)	$p_c$	kritischer Druck (critical pressure)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (High-Performance-Liquid-Chromatography)	P	Polymerisationsgrad
HSA	humanes Serumalbumin	PBS	Phosphatpuffer
ISO	Internationale Organisation für Standardisierung	PE	Polyethylen
IPOM	intraperitoneales onlay mesh	PES	Polyester
K	Achsenabschnitt im Mark-Houwink-Plot	PET	Polyethylenterephthalat
k	Faktorzahl (Parameter) im Versuchsplan	PGA	Polyglykolsäure (polyglycolic acid)
K%	Kristallinität	PHMS	Poly(hydro-methylsiloxan)
KBE	Koloniebildende Einheiten	PLA	Polymilchsäure (polylactic acid)
KW	Kontaktwinkel	PLLA	Poly-L-Milchsäure (poly-L-lactic acid)
L929	Mausfibroblastenzelllinie	PP	Polypropylen
LAL-Test	Limulus Amebozyten-Lysat Test	Prion	Proteinartiger infektiöser Partikel (proteinaceous infectious particle)
$LD_{50}$	Letale Dosis (50 %)	PTFE	Polytetrafluoroethylen
m	Gesamtzahl Versuche im Versuchsplan	PU	Polyurethan
M.	Micrococcus	PVC	Polyvinylchlorid
$M_n$	zahlenmittlere Molmasse	PVDF	Polyvinylidendifluorid
$M_w$	gewichtsmittlere Molmasse	q	Anzahl der untersuchten Faktoren im Versuchsplan
MIC	Minimale Hemmkonzentration (Minimum Inhibitory Concentration)	$R_{a/max}$	mittlere/maximale Rauheit (Übersicht)
MRSA	Methycillin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>	$r_{a/max}$	mittlere/maximale Rauheit (Detail)
n	Anzahl Wiederholungsmessungen	$R^2$	Bestimmtheitsmaß
N	Keimzahl nach Behandlung	REM	Rasterelektronenmikroskop
		RNA	Ribonukleinsäure
		RPMI	Zellkulturmedium (entwickelt am Roswell Park Memorial Institute)

SASPs	kleine, säurelösliche Sporenpoteine (Small Acid-soluble Spore Proteins)	YEPG	Hefe-Extrakt Nährmedium (Yeast Extract Peptone Glucose Growth Medium)
scCO <sub>2</sub>	überkritisches (supercritical) CO <sub>2</sub>		
SCF	Überkritisches Fluid		
SD	Standardabweichung		
$\sigma$	Oberflächenenergie		
t	Zeit (time)		
T	Temperatur		
T <sub>c</sub>	kritische Temperatur (critical temperature)		
TCB	Trichlorbenzol		
TCPS	Zellkultur (tissue culture) – Polystyrol		
$\Theta$	Kontaktwinkel		
THF	Tetrahydrofuran		
T <sub>g</sub>	Glasübergangstemperatur		
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur		
TMC	Trimethylencarbonat		
TP	Dreiphasenpunkt (triple point)		
TSA	Trypton Soja Agar		
TSB	Trypton Soja Nährlösung		
UV	Ultraviolett		
VC	Variationskoeffizient		
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)		
x <sub>i</sub> ...x <sub>j</sub>	variierte Parameter i bis j		
XPS	Röntgen-PhotonenSpektroskopie		
y <sub>i</sub> ...y <sub>j</sub>	Ergebnisse Keimzahlreduktion i bis j		
y' <sub>i</sub> ...y' <sub>j</sub>	errechnete Ergebnisse aus der mathematischen Darstellung		



# 1 Zusammenfassung

Die bisher verwendeten Sterilisationsverfahren für Implantate und Medizinaltextilien im Krankenhausbereich sind aus hygienischer sowie arbeitsschutz- und umweltschutzfachlicher Sicht unbefriedigend. Ziel des Projektes war die Entwicklung einer Niedrig-Temperatur-Sterilisationsmethode für Medizinaltextilien auf der Basis von PVDF, Polypropylen, PLA und Silikon mit dem umweltfreundlichen und milden Lösemittel überkritisches Kohlendioxid (scCO<sub>2</sub>). Die Inaktivierungsbedingungen wurden an verschiedenen Modellorganismen ermittelt und es wurde anschließend gezeigt, welche Auswirkungen die Behandlung auf die Material- und biomedizinischen Eigenschaften der sterilisierten Polymere hat. Dazu wurde die Sterilisation eines Polyolefins, eines Fluorpolymers und eines bioabbaubaren Copolymers einer Polymilchsäure betrachtet. Die in dieser Arbeit durchgeführten Materialuntersuchungen wurden jeweils mit konventionell durch Ethylenoxid (ETO) sterilisierten Polymeren verglichen.

In der Literaturstudie wurde zuvor gezeigt, dass bei der konventionellen Sterilisation oft unbeabsichtigte Modifikationen der polymeren Materialien durch Wärmeeintrag, Strahlung oder chemische Reaktion mit dem Sterilisationsmittel erfolgen. Weiterhin können Restmengen radikalisch wirksamer Substanzen aus dem Sterilisationsprozess auf dem Material verbleiben und eine mehrtägige Quarantänezeit vor dem Einsatz erfordern. Die Literaturstudie zeigte darüber hinaus, dass alternative Verfahren auf Basis von komprimiertem CO<sub>2</sub> in zahlreichen Prozessen zur Pasteurisation von flüssigen und hochviskosen Lebensmitteln erfolgreich eingesetzt werden. Dabei können jedoch nicht die inherenten Vorzüge des verdichteten Fluides voll ausgenutzt werden: Der Vorteil von Desinfektionsprozessen unter Nutzung von komprimiertem Kohlendioxid liegt vor allem darin, dass die Inaktivierung bei niedrigen Temperaturen stattfindet. Gegenüber wasserbasierten Verfahren weist Kohlendioxid außerdem eine niedrigere Oberflächenspannung, eine hohe Diffusionsrate und eine niedrige Viskosität auf. Da CO<sub>2</sub> genutzt wird, um das „Sterilisationsmittel“ Ozon zu transportieren, ist eine gute Zugänglichkeit auch kleinster Poren, gewährleistet. Der Gesamtprozess auf Basis von komprimiertem Kohlendioxid, hat gegenüber wasserbasierten Verfahren des Weiteren den Vorteil, dass Diffusionshemmnisse nur minimal sind.

Im ersten Teil wurden die Inaktivierungsbedingungen für verschiedene Modellorganismen in dem Prozess ermittelt. Die Inaktivierung der Keime *C. albicans* und *S. aureus*, die bei nosokomialen Infekten eine wichtige Rolle spielen, wurde mit komprimiertem CO<sub>2</sub> bei 80 bar nur unter Zugabe von Wasser (<< 1 % v/v) erfolgreich durchgeführt. Für Bereiche, in denen nur eine Desinfektion des Objektes gefordert ist, kann damit im Gegensatz zur Sterilisation auf

den Einsatz von Ozon komplett verzichtet werden. Unter Verwendung der statistischen Methode ANOVA konnten die Einflüsse der variierten Prozessparameter Druck, Temperatur, Ozonkonzentration und Behandlungszeit quantifiziert werden. Weiterhin wurde gezeigt, wie die Parameter das Sterilisationsergebnis wechselseitig beeinflussen. Dabei wurde nachgewiesen, dass je nach Organismenspezies unterschiedliche Parametereinstellungen nötig sind. Die Inaktivierung von Sporen nur mit CO<sub>2</sub> und Wasser unter Druck war bei den untersuchten Temperaturen nicht möglich, sondern erforderte eine Ozonzugabe. Bei 80 bar, 100 mg O<sub>3</sub>/m<sup>3</sup>, 35 °C und einer Behandlungszeit von 220 min wurde eine dem Sterilitätskriterium genügende log 6 Reduktion von *B. stearothermophilus* erreicht. Bei *B. subtilis* dauerte die Behandlung zur log 6 Reduktion doppelt so lange. Für ein CO<sub>2</sub>-basiertes Desinfektions- bzw. Sterilisationsverfahren wurde somit der Funktionsnachweis anhand der Inaktivierung der wichtigsten Modellorganismen erbracht.

Schließlich wurde unter den aus dem ersten Teil gewonnenen optimalen Parametern polymere Substrate sterilisiert und der Einfluss des Verfahrens - insbesondere des Ozons - auf deren Oberflächen- und Bulkeigenschaften untersucht. Anhand von FTIR-Messungen konnten beim PVDF keine sauerstoffhaltigen Gruppen nachgewiesen werden. Beim PLA-co-TMC war keine qualitative Veränderung oxidierter Gruppen messbar. Dagegen wurden auf den PP-Folien durch die Sterilisation Carbonylgruppen erzeugt. Mittels colorimetrischer, nasschemischer Analyse konnte konkretisiert werden, dass es sich dabei auch um Carboxylgruppen handelt, die auf Kettenbruch beim Polyolefin hinweisen. Außerdem wurde gegenüber der Kontrollprobe etwa die zehnfache Oberflächenkonzentration Hydroxylgruppen auf der sterilisierten PP-Oberfläche nachgewiesen. Bei keinem der untersuchten Polymere wurde 1 h nach der Sterilisation nasschemisch noch Oberflächenradikale detektiert. Ergebnisse der XPS-Messungen bestätigen die Oxidation der PP-Oberfläche, zeigen aber auch eine Veränderung der Oberflächen der anderen Polymere, die vermutlich auf Adsorption von niedermolekularem, oxidierten Kohlenstoffmaterial zurückzuführen sind, während die Sauerstoffbindungen auf den Oberflächen der mittels ETO sterilisierten Polymere auf Adsorption von Ethylenoxid und ggfs. auf Ethylenglykol hinweisen.

Bei Kontakt von Polyolefinen mit Ozon kommt es zur Bildung von Peroxiden, die zu Hydroxylen, Carbonylen und Carboxylen weiterreagieren. Durch die Einbindung dieser funktionellen Gruppen ist von einer Hydrophilierung der Polymeroberfläche auszugehen. Tatsächlich wurde anhand der Wilhelmy-Methode für PP eine signifikante Herabsetzung des fortschreitenden Kontaktwinkels um fast 10° mit Wasser gemessen. Unter Nutzung des Owen-Wendt-Modells wurde dabei ermittelt, dass der disperse Anteil der Oberflächenenergie leicht herabgesetzt und der polare Anteil durch die Sterilisation vervierfacht wurde. Der Kon-

taktwinkel von PVDF wurde nur geringfügig um  $4^\circ$  reduziert. In AFM-Aufnahmen wurde gezeigt, dass die Oberflächenrauheiten von PP und PVDF zwar leicht erhöht wurden, allerdings in einem Bereich (25 nm bis 100 nm), der laut Literatur auf die Benetzungseigenschaften keine Auswirkungen haben sollte, was in diesen Untersuchungen bestätigt wurde. Der disperse Anteil der Oberflächenenergie von PLA-co-TMC hingegen wurde deutlich erhöht, was mit der Erhöhung der maximalen Oberflächenrauheit von 100 nm auf 200 nm gut korreliert und laut Literatur durchaus Einfluss auf den dispersen Anteil haben kann.

Neben den Auswirkungen der Sterilisation auf die Polymeroberfläche wurden auch die Eigenschaften der Bulkphase untersucht. Mittels REM-Aufnahmen der Folienquerschnitte wurde gezeigt, dass es beim PLA-co-TMC durch die kombinierte Sterilisation mit Ozon und  $\text{CO}_2$  zu einer erheblichen, irreversiblen Schädigung des Materials kommt. Dies wird auf die Diffusion von  $\text{CO}_2$  in die Bulkphase oder in fertigungsbedingte inhomogene Bereiche des Polymers unter Druck zurückgeführt, während es beim Entspannen zum Ausgasen kommt, wobei das Material aufgrund der behinderten Diffusion aus dem Polymer irreversibel gequollen wird, was auch die veränderten Topographiewerte und Benetzungseigenschaften erklärt. GPC-Messungen wiesen beim PP einen Molmassenabbau um nahezu 90 % auf, wenn das Material mittels  $\text{CO}_2$  und Ozon behandelt wurde - wurde bei gleicher Temperatur und Behandlungsdauer nur mit Ozon begast, reduziert sich der Molmassenabbau auf etwa 70 %. Durch die ETO Sterilisation wurde immerhin noch ein 50 %-iger Abbau induziert. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es durch die kombinierte Behandlung zu einem verstärkten Transport des Ozons in die Bulkphase kommt. Die Eindringtiefe des Ozons muss deutlich über eine oberflächennahe Schicht hinausgehen - Die Folie wird vermutlich über die komplette Dicke (0,075 mm) durchdrungen. Der massive Molmassenabbau spiegelt sich auch in einer Reduktion der Maximalzugkraft und in einem um 5 K erniedrigten Schmelzpunkt des sterilisierten PP wider. Die Ermittlung des Staudinger-Index lässt keine signifikante, sterilisationsinduzierte Vernetzung des Polymers vermuten. Die Form der Molmassen-Verteilungskurven bleibt auch nach der Behandlung monomodal und zeigt nur bei der  $\text{CO}_2$ /Ozon-Behandlung eine leichte Verschiebung der Symmetrie hin zu kleineren Molmassen. Beim PLA-co-TMC konnte nur bei der kombinierten Behandlung eine geringfügige Verringerung der Festigkeit von 20 % beobachtet werden, die sich auch in einer etwa 25 %-igen Molmassenreduzierung widerspiegelt.

Die in den Materialuntersuchungen gezeigten Veränderungen hatten Auswirkungen auf die Interaktion des Materials mit dem biologischen System. Bei grundlegenden Untersuchungen zu den biomedizinischen Eigenschaften korrelierte die verbesserte Benetzung aller Folien durch Wasser gut mit einer verstärkten Adhäsion von Albumin (BSA) auf den sterilisierten

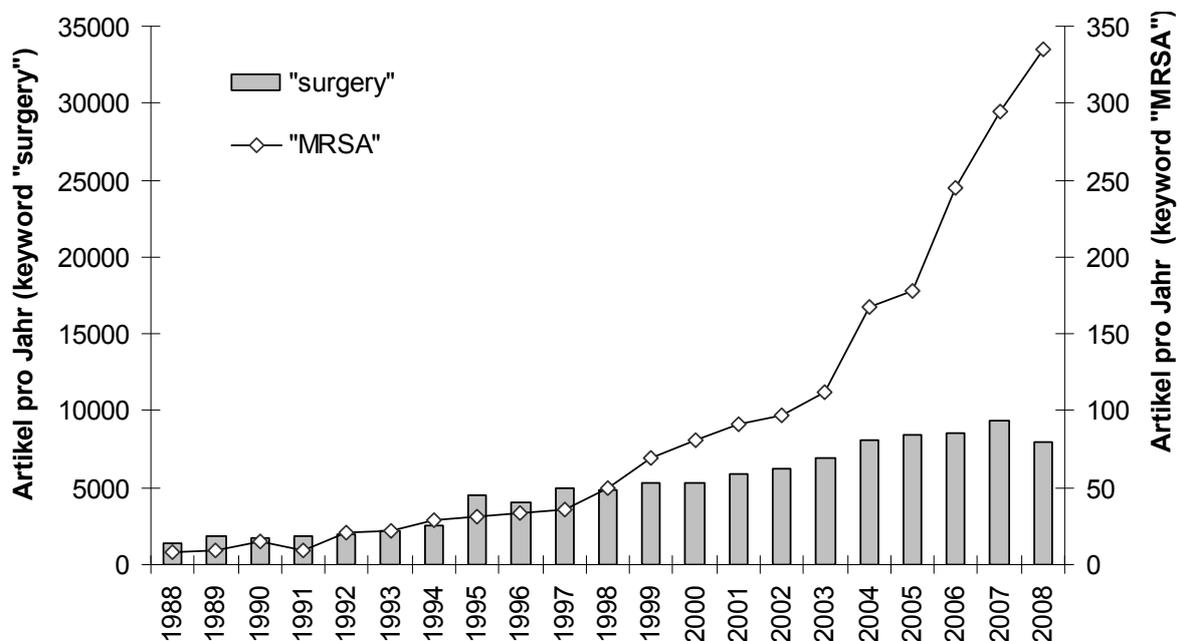
Oberflächen. Dabei wurde bei sinkendem (Wasser-) Kontaktwinkel zwischen 100° und 60° jeweils eine höhere BSA-Konzentration auf der Oberfläche nachgewiesen. Außerdem ergab sich eine erhöhte Adhäsion von Fibroblastenzellen auf PVDF und PLA-co-TMC. Allerdings konnte keine klare Abhängigkeit der Adhäsion von der erhöhten Oberflächenenergie nachgewiesen werden. Für Anwendungen im Bereich *tissue engineering* stellen diese Ergebnisse eine positive, für ein Implantat jedoch tendenziell eine negative Entwicklung dar. Die Adhäsionsraten der Fibroblasten sowohl bei den PP-Kontrollproben als auch bei den sterilisierten Proben waren äußerst gering und inhomogen. Die Messungen zur Viabilität nach 24 h und 72 h zeigten bei keinem Polymer zytotoxische Eigenschaften der sterilisierten Oberflächen an. Nach der Sterilisation verbleiben gewöhnlich noch Reste der inaktivierten Zellen auf der Oberfläche und können die Biokompatibilität des Implantats beeinträchtigen. In Versuchen zur Inaktivierung/Extraktion von Endotoxinen wurde gezeigt, dass deren Konzentration durch die Sterilisation sowohl nur mit Ozon als auch in Kombination mit CO<sub>2</sub> zwar leicht reduziert werden konnte, jedoch nicht in einem Maße, das für die Praxis von Bedeutung wäre.

Zusammenfassend wird das Projekt von den Partnern als äußerst erfolgreich bewertet. Für das untersuchte Verfahren konnten Parameter zur Inaktivierung von vegetativen Keimen und Sporen in ausreichender Konzentration ermittelt werden. Diese Bedingungen resultieren für das Fluorpolymer in keiner signifikanten Materialbeeinflussung, für das Biopolymer müssen die Druckreduktionsrate gesondert beachtet werden. Für das Polyolefin werden erhebliche Änderungen der Oberflächen- und Bulkeigenschaften ermittelt, die sich auch auf die biomedizinischen Charakteristika auswirken und insbesondere im Bereich für weitergehende Arbeiten (auch an weiteren Materialien) beachtet werden müssen.

## 2 Anlass und Zielsetzung des Projektes

Die Sorge um die unkontrollierte Verbreitung von Mikroorganismen ist in vielen industriellen und zivilen Bereichen ständig präsent. Einige vegetative Bakterien und Pilze, Sporen (die resistente Form von vegetativen Keimen) sowie Viren stellen potentielle Gefahren für die menschliche Gesundheit dar. Infektionen können durch direkten Kontakt, über den Luftweg und über gemeinsam genutzte Objekte, wie beispielsweise Besteck oder Textilien, übertragen werden [2]. Insbesondere für Krankenhäuser spielen mikrobielle Kontaminationen eine Rolle, da nosokomiale (im Krankenhaus erworbene) Infektionen nach Block [3] und Sheng et al. [4] zu den häufigsten postoperativen Infektionen zählen.

In der EU erkranken jährlich etwa 3 Millionen Menschen an im Krankenhaus erworbenen Infektionen - davon starben 2007 etwa 50.000 [5]. In den USA belief sich die Zahl der nosokomialen Infektionen 1998 auf etwa 1,8 Millionen, davon starben 20.000 Patienten unmittelbar an den Infektionen und weitere 70.000 an den nachfolgenden medizinischen Komplikationen [6]. Diese Zahlen sind nicht zuletzt auf das in den letzten 20 Jahren verstärkte Auftreten multiresistenter Keime zurückzuführen, die mit konventionellen chemischen Desinfektionsmethoden nicht mehr inaktiviert werden. Das Paradebeispiel im negativen Sinne stellt MRSA (Methycillin resistenter *Staphylococcus aureus*) dar, dem daher in den letzten zehn Jahren ein überproportionales Forschungsinteresse galt (vgl. **Abbildung 1**).



**Abbildung 1:** Vergleich der Entwicklung von in „ScienceDirect“ publizierten Artikeln betreffend „MRSA“ (Linie) und in Relation dazu gestellt Publikationen zum Thema „surgery“ (Balken). Für 2008 wurden nur Artikel gezählt, die bis September 2008 publiziert wurden. (Suchwörter: „MRSA“ = Methycillin resistenter *Staphylococcus aureus*, „Surgery“ = Chirurgie, Operation).

Nicht erst seit 1905 erfolgreich die erste Herztransplantation im Tierversuch durchgeführt wurde ist der Erfolg des Eingriffs vom Können des Arztes, der Auswahl der geeigneten Materialien sowie von der Sterilität der in den Körper eingebrachten Objekte abhängig. Die enorme Zahl an Operationen, bei denen Trans- oder Implantate zum Einsatz kommen, soll an folgenden Beispielen aus den USA verdeutlicht werden: Es werden jährlich über 500.000 Gelenke ersetzt und fast ebenso viele Fixierungen in den Körper eingebracht. An 100.000 Sehnen und Bändern werden chirurgische Eingriffe vorgenommen. Über 750.000 Herzoperationen und 600.000 Korrekturen am vaskulären System werden durchgeführt [7]. Bei den meisten dieser Eingriffe kommt synthetisches Nahtmaterial zum Einsatz und zunehmend auch polymere Funktionswerkstoffe, die auf textilen Materialien basieren [8].

Medizinische Produkte im Allgemeinen und Medizintextilien im Speziellen müssen wegen zuvor beschriebener Infektionsgefahr besonders strenge hygienische Anforderungen erfüllen [9]. Textile Gewebe, die als Implantate zum Einsatz kommen, müssen sogar vollkommen steril sein. Da die verarbeiteten Materialien häufig thermolabil sind, können Verfahren, die auf Energieeintrag durch Wärme basieren, nicht genutzt werden. Die Sterilisation wird daher mit toxischen Gasen, über ein Plasma oder durch energiereiche Strahlung durchgeführt. Dabei treten oft erhebliche Probleme auf, da viele Textilien und Medizinprodukte, wie z.B. polymere Implantate, durch diese Behandlungsprozesse beschädigt werden und erwünschte Eigenschaften verloren gehen [10]. Des Weiteren können auch Reststoffe auf der Polymeroberfläche verbleiben, die ein allergenes oder pyrogenes Potenzial aufweisen.

### ***Sterilität im medizinischen Bereich***

Als Ignaz Semmelweis um 1850 die Händereinigung für Ärzte einführte, senkte er die Sterblichkeit durch Kindbettfieber von über 10 % auf 2 %; durch eine Instrumentendesinfektion sogar auf 1 % [11]. Er erkannte jedoch noch nicht Mikroorganismen als Auslöser der tödlichen Infektion. Die gezielte Haltbarmachung von Lebensmitteln (Pasteurisation) durch partielle Keimabtötung mittels gelinden Erhitzens geht auf Louis Pasteur zurück (1874), der den Zusammenhang zwischen Mikroorganismen und Infektion entdeckte. Robert Koch, der zahlreiche Keime, wie den Milzbranderreger und die o.g. Staphylokokken, beschrieb, verfasste 1892 wohl die erste "GMP-gerechte Anleitung" zum Schutz seines Personals - die "Instruktion" für die Desinfektion von Tuberkulosebakterien mittels chemischer Agenzien. Die Sterilisation - also ein Prozess, um einen Gegenstand vollkommen keimfrei zu machen und so auch Resistenzen zu umgehen - wurde erstmals im Deutschen Arzneibuch von 1926 definiert [12]: Während die Desinfektion und Pasteurisation lediglich Verfahren zur Reduktion der Keimzahl darstellen, müssen durch die Sterilisation alle Keime abgetötet werden. Außerdem

wird hervorgehoben, dass die Sterilisation je nach Art des Gegenstandes mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt werden muss.

Nicht alle medizinischen Produkte müssen die Anforderungen der vollkommenen Sterilität erfüllen. Rutala und Weber [13] teilen die medizinischen Ge- und Verbrauchsartikel in drei Gruppen ein: Nicht-kritische, semi-kritische und kritische Objekte. Für nicht-kritische Objekte wie Alltagskleidung muss keine gezielte Keimreduktion erfolgen. Semi-kritische Objekte können beispielsweise Bettwäsche oder Bekleidung von Pflegepersonal sein und werden zumeist desinfiziert. Als kritisch werden Gegenstände eingestuft, die wie z.B. Katheder, Nadeln, OP-Besteck und Implantate ein hohes Potenzial aufweisen, Infektionen zu übertragen, da sie direkt mit einem der menschlichen Gewebearten (Epithel-, Muskel-, Nerven- bzw. Binde- und Stützgewebe) oder dem vaskulären System (Blut- oder Lymphgefäße) in Kontakt kommen. Der Sterilisation kritischer Objekte kommt daher eine besondere Bedeutung zu, um Gefahren durch Infektionen vom Menschen abzuwenden.

### ***Textile Produkte im medizinischen Bereich***

Während sich in den 1980er Jahren das Forschungsinteresse bezüglich Sterilität auf Bekleidung von OP-Personal bezog [14, 15], hat in den letzten zehn Jahren die Entwicklung von neuartigen Implantaten und das wachsende Feld des *tissue engineering* an Bedeutung für Sterilisationsverfahren gewonnen - mit dem Ziel, neues, funktionalisiertes Gewebe, zumeist auf Kunststoffbasis, zu gestalten. Weiterhin werden zunehmend zwei- und dreidimensionale Implantate aus verschiedenen Polymeren gegenüber Metallimplantaten vorgezogen [16].

In einem Übersichtsartikel von Hanker und Giammara [17] werden umfassend die o.g. Humangewebearten ihren applizierbaren Implantat-Materialarten zugeordnet, da für jede Gewebeart, entsprechend ihrer Funktionalität, andere Polymere eingesetzt werden müssen. So muss zuweilen gewährleistet sein, dass Implantate, wie z.B. permanente Neuronal- oder Gefäßprothesen, nicht abgebaut werden. Ein maßgeschneiderter Abbau von z.B. temporären Knochenimplantaten ist hingegen erwünscht. Diese verschiedenartigen Anforderungen bedingen eine große Bandbreite an polymeren Werkstoffen. Die Materialien werden an späterer Stelle in diesem Kapitel diskutiert, während auf die verschiedenen Möglichkeiten der Verarbeitungsformen direkt im Anschluss eingegangen wird.

## **Verarbeitung und Anwendung**

Durch ihre Festigkeit, bei gleichzeitig hoher Flexibilität, sind Textilien außerordentlich gut als Weichteilimplantate geeignet [18]. So werden künstliche Sehnen und Bänder aus Fasern gewoben oder geflochten. Knorpelmaterial kann aus Vliesstoff nachgestellt werden [19], wobei Vlies besonders gut als *scaffold*, d.h. als Gerüststruktur, sowohl für temporäre als auch permanente Anwendungen nutzbar ist [16]. In orthopädischen Implantaten - also dort, wo Knochen oder Gelenke ersetzt werden müssen - finden schon seit langem faserverstärkte Composit-Materialien Anwendung [20]. Typische Implantate für das Herz-Kreislauf-System sind beispielsweise rundgestrickte Gefäßprothesen, die schon seit mehreren Jahrzehnten genutzt werden [17, 21].

Implantierbare Textilien werden auch eingesetzt, um Wunden zu verschließen. So werden Mono- oder Multifilamente aus bioabbaubarem Material zumeist genutzt, wenn es sich um das Nähen einer inneren Wunde handelt. Nicht bioabbaubarem Material bedient man sich, wenn die Fäden nach der Heilung wieder entfernt werden sollen und außerhalb des Körpers einfach zugänglich sind [18]. Daher werden die implantierbaren Textilien zumeist auch in zwei Gruppen eingeteilt, die eine wichtige Rolle für die regenerative Medizin spielen: Die Gruppe der nicht-abbaubaren Polymere (u.a. PVDF, PTFE, PP, PET, PU) und die Gruppe der im Körper abbaubaren Polymere (u.a. PLA, PGA).

Außerhalb des menschlichen Körpers finden in der Medizin Textilien bzw. Fasern hauptsächlich in der Form von Filtern und Membranen Anwendung. Sie werden in der künstlichen Lunge, Leber oder Niere (Dialyse) zur Stofftrennung eingesetzt [21, 22]. Medizintextilien können aber auch beispielsweise chirurgische Abdecktücher oder Operationsmäntel sein, die früher noch aus Baumwollgewebe und später aus synthetischem Endlos Garn - überwiegend Polyester - gefertigt wurden [15]. Diese wurden aber zumeist durch beschichtete Vliesstoffe oder auf polymeres Vlies laminierte Membranfolien abgelöst [23]. Hier übernehmen die Textilien eine Barrierefunktion, um einerseits den Arzt, andererseits aber auch den Patienten vor Infektionen zu schützen. Loy [8] fasst die wichtigsten textilen Produkte für Medizin und Hygiene zusammen. Eine Übersicht gibt Tabelle A1 im Anhang sowie der „Stand der Forschung“.

## **Anforderungen**

Implantierbare Objekte müssen hohe Standards erfüllen - die Mindestanforderungen, die an Biomaterialien/Implantate gestellt werden, formuliert Zhang [7] wie folgt:

1. Das Material muss sterilisierbar sein,
2. mechanische und physikalische Eigenschaften wie Festigkeit und Elastizität müssen für die Anwendung geeignet sein,
3. die Eigenschaften müssen über die Lebensdauer des Biomaterials erhalten bleiben,
4. es darf keine gefährlichen Stoffe freisetzen und
5. das Material muss gewebekompatibel, darf aber nicht toxisch oder karzinogen sein.

Auf die Probleme, die bei der Sterilisation von medizinischen Arbeitsmitteln und auch von implantierbaren Textilien entstehen, wurde an vorheriger Stelle bereits hingewiesen. Da thermolabile Implantate gewöhnlich mittels chemischer oder strahlenbasierter Behandlungsmethoden desinfiziert bzw. sterilisiert werden und zahlreiche Mikroorganismen milderen Methoden gegenüber resistent sind, treten oft erhebliche Probleme aufgrund der aggressiven Chemikalien oder der energiereichen Strahlung auf. Bei konventionellen Niedrig-Temperatur-Methoden ist außerdem mit ernststen Gefahren für das Betriebspersonal (durch unbeabsichtigte Emission giftiger Chemikalien oder radioaktiver Strahlung) und für die Umwelt (durch kontrollierte und unkontrollierte Freisetzung radioaktiver Strahlung sowie gasförmiger und flüssiger Emissionen) zu rechnen [24].

## **Alternatives Sterilisationsverfahren**

Als Anforderungen an ein alternatives Verfahren sind daher zu nennen: Erstens: die weitgehende Erhaltung der physikalischen und thermo-mechanischen Eigenschaften des Textils, zweitens: die Sicherstellung der vollständigen Durchdringung des Objekts zur Abtötung aller Keime sowie drittens: die toxikologische Unbedenklichkeit des Sterilisationsmediums und der Zusatzstoffe; zumindest muss eine systemimmanente Überführung dieser Stoffe in eine unbedenkliche Form, sowohl bei betriebsmäßiger als auch ungewollter Freisetzung, gewährleistet sein.

Ein Verfahren, das diese Anforderungen ohne Einschränkungen erfüllt, ist für die Niedrig-Temperatur-Sterilisation von implantierbaren Materialien noch nicht bekannt und damit noch nicht auf dem Markt verfügbar. Alternative Verfahren auf Basis von Kohlendioxid unter Hochdruck (HP-CO<sub>2</sub>) zur Inaktivierung von Mikroorganismen befinden sich im Versuchsstadium und zielen zumeist auf die Pasteurisation von flüssigen Lebensmitteln ab [25]. In anderen Bereichen wird komprimiertes Kohlendioxid im industriellen Maßstab zur Extraktion oder Partikelherstellung für die Pharmaindustrie genutzt und ist im Bereich der chemischen Rei-

nigung weit verbreitet. CO<sub>2</sub> weist günstige physiko-chemische Eigenschaften auf - insbesondere niedrige kritische Daten -, ist aus sicherheitstechnischer Sicht unbedenklich und weltweit günstig marktverfügbar [26]. In vorliegender Arbeit wird die Nutzung von hochkomprimiertem Kohlendioxid mit Additiven für die Sterilisation von implantierbaren (textilen) Polymeren untersucht.

Der Stand der Forschung und die Anwendungsgebiete von konventionellen Verfahren zur Keiminaktivierung werden im nächsten Kapitel erläutert und mit dem des CO<sub>2</sub>-basierten Verfahrens verglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wird ein Verfahren untersucht, mit dem auf Basis von hochkomprimiertem CO<sub>2</sub> verschiedene Mikroorganismen inaktiviert werden sollen. Das Verfahren soll zur Niedrig-Temperatur-Sterilisation von teilweise hitzelabilen Polymeren für die Implantatchirurgie genutzt werden. Es werden die Materialien PLA-co-TMC, PP und PVDF untersucht. Die Arbeit ist in drei Teile gegliedert.

Im ersten Teil wird die Inaktivierung zweier Spezies vegetativer Mikroorganismen (*Staphylococcus aureus* und *Candida albicans*) untersucht, die auf einem Celluloseträger fixiert sind. Die medizinisch relevanten Keime werden dazu in einer Pilotanlage mit einem hoch komprimierten Fluid (-gemisch) von CO<sub>2</sub> (und anschließend unter Zugabe von Ozon) behandelt. Dabei wird der Einfluss der physikalischen und chemischen Verfahrensparameter Druck, Temperatur, Ozonkonzentration sowie Behandlungszeit auf die (Effektivität der) Inaktivierung ermittelt. Des Weiteren wird die Inaktivierung von - im Gegensatz zu vegetativen Keimen - persistenten Sporenspezies *Bacillus atrophaeus* und *Bacillus stearotherophilus* untersucht. Der Zusammenhang zwischen Keimreduktion und der Variation der genannten Verfahrensparameter wird mit der statistischen Methode ANOVA (Varianzanalyse) ebenso quantifiziert wie die Interaktion der Parameter. Das Ergebnis soll genutzt werden, um die Parametereinstellungen zu ermitteln, die für eine vollständige Keimabtötung nötig sind. Als Nebenbedingung muss eine Reduktion um mindestens 6 log-Stufen erfüllt werden. Ziel dieser Arbeit ist es nicht, die biologisch-chemischen Inaktivierungsmechanismen abschließend aufzuklären, aber es soll die Effektivität der Inaktivierung von vegetativen Keimen und der von Sporen mit den physikalischen und chemischen Einflussgrößen korreliert werden.

Im zweiten Teil wird analysiert, ob und wie die chemischen und physikalischen Eigenschaften der medizinisch relevanten Polymere PP, PVDF und PLA-co-TMC durch das neue Sterilisationsverfahren verändert werden. Dazu werden verschiedene Methoden zur Charakterisierung der Oberflächenchemie, -energie und -morphologie herangezogen. Außerdem werden thermische und mechanische Eigenschaften der Polymere (als Gewirke und Folien)

analysiert. Weiterhin werden vergleichend die Polymereigenschaften nach der Sterilisation mit dem konventionellen Niedrig-Temperatur-Verfahren auf Basis von Ethylenoxid untersucht.

Im dritten Teil werden grundlegende Versuche zu biomedizinischen Eigenschaften durchgeführt, um vorauszusagen, wie der menschliche Körper das sterilisierte Implantat akzeptiert. Hierzu wird das Anwachsverhalten von Bindegewebszellen - Fibroblasten -, deren Proliferation (Wachstum) und Viabilität im *in-vitro*-Kurzzeitversuch auf den sterilisierten Polymeroberflächen untersucht und mit einer Kontrollgruppe verglichen. Des Weiteren wird experimentell bestimmt, ob durch das untersuchte Sterilisationsverfahren (fieberauslösende) Endotoxine chemisch abgebaut oder von der Polymeroberfläche entfernt werden, wodurch die Biokompatibilität verbessert werden würde.

## 3 Stand der Forschung

Bei der Betrachtung des Stands der Forschung und Technik sind im Wesentlichen vier Themenbereiche zu beachten:

1. Die zu sterilisierenden Produkte, deren Werkstoffe und die möglichen oberflächen- gebundenen, mikrobiellen Kontaminationen,
2. der Status quo der konventionellen Sterilisationsverfahren,
3. die Entwicklung des alternativen Verfahrens unter Nutzung von CO<sub>2</sub> (und der Einsatz von Additiven) für die Keiminaktivierung sowie die modellhafte Beschreibung des Prozesses und
4. die Veränderungen von Bulkphasen- und Oberflächeneigenschaften der polymeren Implantate durch die Sterilisation. Unmittelbar damit verbunden sind die Anforderungen hinsichtlich Biokompatibilität und Zytotoxizität der sterilisierten Polymere.

### 3.1 Medizinische Polymere: Produkte, Materialien, Kontaminationen

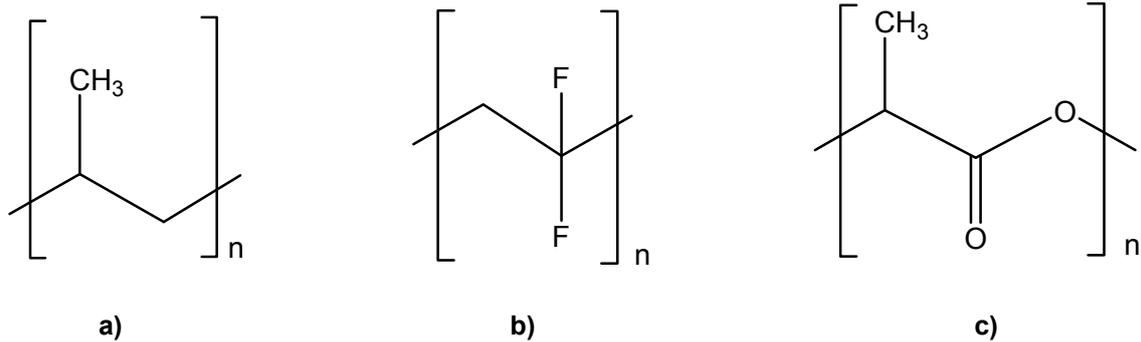
#### **Materialien für die invasive Chirurgie**

In den letzten zehn Jahren basierten viele Entwicklungen für zwei- und dreidimensionale Implantate auf temperaturempfindlichen Polymeren und bioabbaubaren Kunststoffen [16]. Dies wurde auch durch das schnell wachsende Forschungsgebiet des *tissue engineering* vorangetrieben, das durch eine Fusion von Teilaspekten der Disziplinen Zellbiologie, Materialwissenschaften und Chirurgie entstanden ist. *Tissue engineering* ist die Anfertigung natürlichen Gewebes mit Hilfe (bio-) technologischer Mittel und konzentriert sich neben geschäumten und im 3D-Printing-Verfahren hergestellten Gerüststrukturen (*scaffolds*) auf Fasermaterial, das gewoben, gewirkt oder mittels Elektrospinning hergestellt wird [27]. Spezielle *scaffolds* werden auf diesem Gebiet immer häufiger zur Gewebezüchtung eingesetzt, um menschliches Gewebe zu konservieren, wiederherzustellen oder um die Funktion von geschädigtem Gewebe oder Organen zu verbessern. Diese Kompositprodukte aus Zellen und Gerüststruktur werden unter dem Begriff „*novel organs*“, also „neuartige Organe“ zusammengefasst und sind durch die jüngsten Fortschritte in der Stammzellforschung verstärkt in das Interesse der Wissenschaft gerückt. Nuutinen [28] und Hopper [28, 29] unterstreichen unabhängig voneinander, dass Festigkeit und Oberflächeneigenschaften von Polymeren im biomedizinischen Bereich während einer Ethylenoxid (ETO)-,  $\gamma$ - und Dampfsterilisation erheblich negativ beeinflusst werden. Gerade aber der Erhalt der oft aufwändig modifizierten Oberflächen spielt insbesondere bei hydrophoben Materialien und Biopolymeren eine wichtige Rolle.

Polymere als Implantatmaterial zu nutzen, hat diverse Vorzüge. Sie haben ähnliche physikalische Eigenschaften wie menschliches Gewebe, können einfach in verschiedenen Formen und Strukturen hergestellt sowie chemisch gezielt modifiziert und funktionalisiert werden [30]. Speziell folgende Polymere finden in der Implantatchirurgie häufig Anwendung: PP (Polypropylen) ist ein Polyolefin, das als nicht abbaubar durch den menschlichen Körper gilt. PVDF (Polyvinylidendifluorid) ist ein nicht resorbierbarer Fluorcarbonkunststoff. Im Gegensatz zu diesen Materialien ist PLA (Polymilchsäure) ein Polyester-Material, das im menschlichen Körper abgebaut werden kann. In dieser Arbeit wurde das Augenmerk exemplarisch auf die Sterilisation dieser drei Polymere gerichtet.

Polypropylen (PP) (vgl. **Abbildung 2 a**), ist nach Polyethylen (PE) niedriger Dichte und Polyvinylchlorid (PVC), der wichtigste Standardkunststoff für industrielle Anwendungen und steht an zweiter Stelle für Faserkunststoffe hinter Polyester (PES) [31]. PP wird aus Propylen durch metallocenkatalysierte (Ziegler-Natta-) Polymerisation hergestellt. Das isotaktische, teilkristalline PP ist technisch von Bedeutung - die ataktische, amorphe Form ist nur als Elastomerkomponente wichtig. Als Implantat wird es seit vielen Jahren eingesetzt, auch wenn an explantierten Implantaten schon eine Zersetzung des Materials beobachtet wurde und Zweifel aufkommen, ob PP für Langzeitimplantate geeignet ist [32, 33].

Das in **Abbildung 2 b** gezeigte, teilweise fluorierte Homopolymer Polyvinylidendifluorid (PVDF) ist als Implantatmaterial erst seit relativ kurzer Zeit im Einsatz [34], da es nur eine geringe Zelladhäsion zulässt. So muss die Oberfläche des Materials oft erst aufwändig modifiziert werden, um die Anheftung von Körperzellen zu ermöglichen und keine negative Immunantwort hervorzurufen [35, 36]. Als piezoelektrisches Polymer ist es allerdings schon früh in den Fokus der biomedizinischen Forschung gerückt, um Nervenbahnen zu regenerieren [37]. Auf breiter Basis haben sich inzwischen permanente, implantierbare Hernienetze (Geflechte) aus PP und PVDF durchgesetzt, und es gibt mittlerweile umfangreiche Erfahrungen [38] über das Langzeitverhalten der Materialien im Körper. In einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2008 hat der größte Hersteller, DuPont, die Nutzung von fluorierten Polymeren allerdings eingeschränkt [39] – dies kann als eine Reaktion auf zahlreiche Untersuchungen zur Freisetzung, Bioakkumulation, Persistenz und Aufnahme von perfluorierten Verbindungen (insbesondere Perfluorcarbonsäure und Perfluorsulfonsäure) in den menschlichen Körper zu sehen sein [40-42].



**Abbildung 2:** Strukturformeln von **a)** PP, **b)** PVDF und **c)** PLA.

Milchsäure ist neben Glykolsäure das am häufigsten untersuchte und verwendete Material für bioabbaubare Polymere im Implantatbereich [30, 43, 44]. Das aus dem cyclischen Diester der Milchsäure durch Ringöffnungspolymerisation gewonnene, in **Abbildung 2 c** dargestellte PLA gehört zu den wenigen zugelassenen Polymeren für chirurgische Zwecke. Milchsäure ist ein chirales Molekül, aus dem zwei stereoreguläre Polymere - die kristallinen poly-D-LA und poly-L-LA - sowie die racemische, amorphe Form poly-DL-LA polymerisiert werden können. Da das Abbauprodukt von PLLA die natürlich vorkommende L-Milchsäure (Zwischenprodukt im Kohlenhydrat-Zyklus) ist und sich daher nicht im Körper anreichert, wird im Implantatbereich zumeist PLLA verwendet. Die Hitze- und Chemikalienbeständigkeit sowie Bioverträglichkeit dieses Materials wird zumeist über Copolymerisation beispielsweise mit Carbonaten [45-47] eingestellt. Insbesondere für Biopolymere wie PLA und PGA (Polyglycolic acid) hat schon Athanasiou [44] die Forderung nach der Entwicklung eines alternativen Sterilisationsverfahrens hervorgehoben.

Synthetische, hydrophobe Polymere wie PP und PVDF werden oft für medizinische Anwendungen mit erheblichem Aufwand so gestaltet, dass sie mit dem biologischen System interagieren und sich möglichst wie menschliches Gewebe verhalten [48]. Diese Eigenschaften dürfen bei der Sterilisation nicht verloren gehen. Die Autoren An et al. [49] ziehen im Ausblick ihres Übersichtsartikels zum Einfluss von Sterilisationsmethoden auf mechanische und Biokompatibilitäts-Eigenschaften von Implantaten explizit auch Methoden wie HP-CO<sub>2</sub> (high-pressure CO<sub>2</sub>) als alternatives Niedertemperaturverfahren in den Verfahrensvergleich mit ein.

## **Mikrobielle Kontaminationen**

Für Produkte der invasiven Chirurgie - und damit für die vorliegende Arbeit - ist nur die Sterilisation semi-kritischer und kritischer Objekte von Interesse. Bei semi-kritischen Objekten wie (recyclbaren) OP-Abdecktüchern oder Operationskitteln müssen alle vegetativen Keime (Bakterien und Pilze) inaktiviert werden, was unter dem Begriff Desinfektion zusammengefasst wird. Sporen werden bei der Desinfektion nicht inaktiviert. Die Definition von Sterilisation hingegen umfasst auch die Inaktivierung von Sporen [50]. Sterilisation ist unabdingbar für jede Form von kritischen Objekten wie Implantaten. Beim Sterilisationsprozess werden jedoch oft physikalische, chemische oder morphologische Eigenschaften zahlreicher Materialien nachteilig beeinflusst [28, 51-53]. Ein weiteres Problem sind - selbst bei inaktivierten Keimen - auf dem Material zurückbleibende Zellbestandteile, insbesondere Endotoxine, also Lipopolysaccharide, die in die Zellwand von gram-negativen Bakterien (**Abbildung 3 c**) integriert sind. Endotoxine sind extrem temperaturresistent und werden erst bei Temperaturen über 220 °C zerstört [12].

## **Mikrobielle Erreger im Krankenhaus**

Die Problematik der nosokomialen Infektionen wurde bereits in der Einleitung dargestellt. Die wichtigsten Mikroorganismen sind Prokaryonten (Bakterien) und Eukaryonten (Pilze, Hefen). Einige Mikroorganismen sind befähigt, Sporen zu bilden - diese Sporenbildner sind wegen ihres immensen Überdauerungspotenzials und ihrer Resistenz von medizinischer Bedeutung. Konventionelle Inaktivierungsverfahren werden meistens mit Bioindikatoren der genannten Mikroorganismen auf ihre Effektivität hin getestet. Subzelluläre Systeme wie Prionen, Viroide und Viren sowie einfache Tiere als Erreger von nosokomialen Infektionskrankheiten spielen zumeist nur eine untergeordnete Rolle. Von den erwähnten infektiösen Organismen sind die im nächsten Absatz genannten Spezies bzw. Gattungen wegen Ihrer Häufigkeit der Infekte, Pathogenität (Fähigkeit, Krankheiten hervorzurufen) oder Virulenz (Ausmaß der krankheitserzeugenden Eigenschaft) herauszustellen [54, 55].

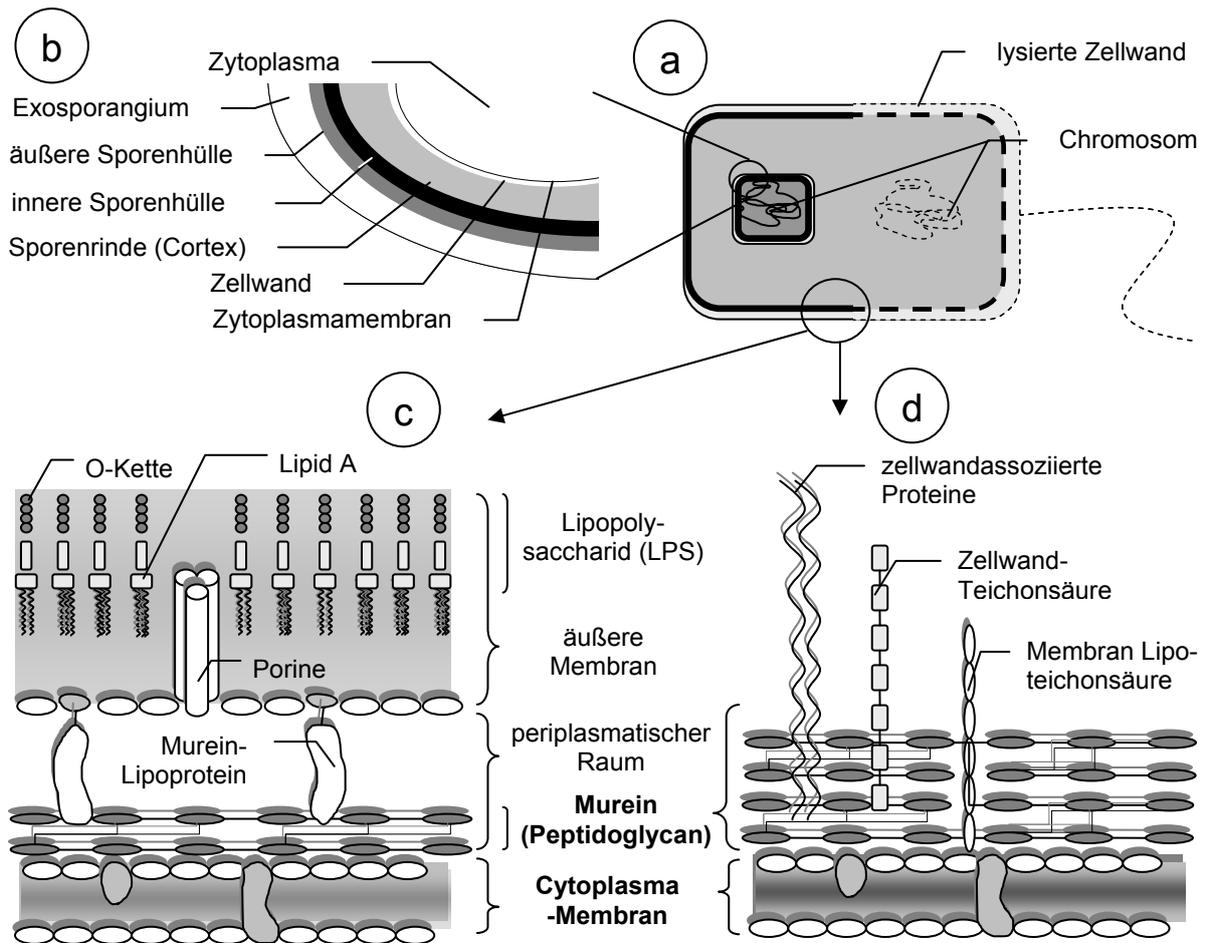
Unmittelbar nach *Escherichia coli* und Enterokokken stellt mit über 11 % *Staphylococcus aureus* einen der Erreger dar, der am häufigsten nosokomiale Infektionen in Deutschland auslöst. Davon wiederum sind die gram-positiven Kokken mit 45,5 % der mit Abstand wichtigsten Erreger für post-operative Komplikationen [54]. Staphylokokken sind klassische opportunistische Keime und können Biofilme bilden. Insbesondere bei den gegen Methycillin resistenten Stämmen des *S. aureus* (MRSA) ist bei neueren Studien zu erkennen, dass sie bei einigen im Krankenhaus erworbenen Infektionen schon jetzt die wichtigste Rolle spielen

[5] und verstärkt auf textilen und anderen Kunststoffoberflächen im Krankenhaus zu finden sind [56]. Zunehmend treten auch nosokomiale Infekte durch Pilze auf (etwa 6 % der Infektionen), wobei etwa 90 % davon durch *Candida*-Arten verursacht werden. Die Kandidose ist eine endogene opportunistische Systemmykose, also eine Infektion, die die inneren Organe von abwehrschwachen Patienten befällt. Zuverlässige Zahlen über nosokomiale Vireninfectionen sind derzeit nicht bekannt - sie werden aber auf unter 1 % geschätzt [54].

Unter den Sporenbildnern ist nur eine Spezies der gram-positiven Gattung *Bacillus* - aus der Familie der *Bacillaceae*, zu der u.a. auch *Clostridium* gehört - für die Humanmedizin von Interesse: *Bacillus anthracis*, der Erreger des Milzbrandes. Wegen seiner humanpathogenen, oft tödlichen Wirkung, verbunden mit der Persistenz der Sporenform, kommt der Mikroorganismus nicht als Bioindikator in Frage. Stattdessen wird für die Überprüfung von chemischen Sterilisationsprozessen zumeist *Bacillus atrophaeus* und für thermische Prozesse überwiegend *Bacillus stearothermophilus* eingesetzt.

### **Aufbau der vegetativen Bakterien**

Beim Aufbau der vegetativen Bakterienzelle sind insbesondere die Unterschiede zwischen gram-positiver und gram-negativer Zellwand zu beachten (vgl. **Abbildung 3 c und d**). Zunächst werden hier aber die gemeinsamen Strukturen beschrieben. Die innere Membran, die das Zytoplasma beinhaltet, besteht zumeist aus einer hydrophoben Einzel- oder Doppelschicht aus Phospholipiden und eingelagerten (Transport-) Proteinen. Diese Schicht wirkt als Permeabilitätsbarriere durch die nur wenige kleine Moleküle wie H<sub>2</sub>O, O<sub>2</sub>, und CO<sub>2</sub> diffundieren können [55]. Die meisten hydrophilen und geladenen Moleküle können nur mittels aktiver Mechanismen - auch gegen Konzentrationsgradienten - in die Zelle transportiert werden. Damit kontrolliert die Plasmamembran die Interaktionen der Zelle mit der Umgebung. [54]. Gram-positive Organismen (vgl. **Abbildung 3d**) enthalten außerdem saure Polysaccharide, die sogenannten Teichonsäuren, und weitere, zellwandassoziierte Proteine. Gram-negative Organismen haben eine zweite Zellwand, die aus einer asymmetrischen Lipiddoppelschicht besteht: eine innere Lage aus Phospholipiden und einem Lipopolysaccharid (LPS). Wegen seiner Struktur stellt dieses LPS ein wichtiges Antigen dar, auf dessen medizinische Bedeutung bereits in dieser Arbeit eingegangen wurde. Im Vergleich zur gram-positiven Zellwand ist diese Struktur komplexer und hydrophiler [57].



**Abbildung 3:** Unterscheidung von Mikroorganismen bezüglich des Zellwandaufbaus: **a)** vegetative Zelle mit Spore, **b)** Sporenhülle **c)** gram-negative, **d)** gram-positive Zellwand (modifiziert nach [58])

### **Aufbau der Sporezelle**

Die ein ringförmiges Chromosom enthaltende Sporezelle (Endospore) (**Abbildung 3 b**) ist die Überdauerungsform einiger gram-positiver Keime. Sie zeichnet sich durch signifikante Unterschiede gegenüber vegetativen Zellen aus. Vegetative Keime sind - auch in der konventionellen Sterilisation - vergleichsweise problemlos abzutöten. Sporen hingegen besitzen aufgrund ihrer Physiologie ein erheblich höheres Resistenzvermögen gegen Hitze, Strahlung und Chemikalien [59] und erschweren daher die Sterilisation medizinischer Objekte erheblich. Eine große Rolle beim Resistenzvermögen spielt dabei der um 70 % bis 90 % reduzierte Wassergehalt der Spore im Vergleich zu vegetativen Zellen, der Gehalt an säurelöslichen Sporenproteinen (SASPs) und das verstärkte Vorhandensein von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Weiterhin ist der Kern von zahlreichen Hüllen umgeben und bildet einen dicken Kortex aus. Schließlich spielt auch die Quervernetzung der Proteine durch das Calciumsalz der Pyridin-2,6-Dicarboxylsäure eine Rolle [54].

Bei klassischen Sterilisationsverfahren wird daher oft zeitintensiv zunächst das Auskeimen der Spore provoziert und die ausgekeimte Zelle dann im Wachstumsstadium inaktiviert. Es ist zu beachten, dass die genannten (Endo-) Sporen weitaus resistenter sind als die gleichnamigen Sporen von Actinomyceten oder Myxobakterien (ebenfalls Überdauerungsformen von Bakterien) und Pilzsporen, die ein Stadium in der asexuellen Vermehrung von Pilzen darstellen [58].

### **3.2 Verfahren zur Inaktivierung von Mikroorganismen**

#### ***Konventionelle Inaktivierungsmethoden***

Im Folgenden werden die Prozesse und deren Nachteile (mit besonderem Augenmerk auf Textil-Sterilisation) erläutert, die bisher dem Stand der Technik entsprechen:

Die Desinfektion (also die nicht vollständige Keimreduktion) von Textilien kann unter Zusatz von Additiven, wie z.B. dem toxischen Glutaraldehyd, in eingeschränktem Maße in haushaltsüblichen Waschmaschinen durchgeführt werden [60]. Für die Sterilisation (vollständige mikrobiologische Inaktivierung) standen zunächst auch zahlreiche Verfahren auf Basis von wässrigen Lösungen verschiedener Chemikalien oder Chemikaliengemische zur Verfügung, deren Zahl aber im Laufe der Zeit wegen der Toxizität der eingesetzten Substanzen erheblich eingeschränkt wurde. Die verwendeten bioziden Agenzien werden in 30 Klassen eingeteilt. Darunter sind u.a. Alkohole, Aldehyde, Peroxide, Säuren, Ester, Metallverbindungen, quaternäre Ammoniumverbindungen, chlorierte Verbindungen, Iod u.v.m. [3, 12, 50]. Alle diese Stoffe bergen erhebliche Gefahren für Mensch und Umwelt. Für die Sterilisation von Medizintextilien sind wasserbasierte Niedrig-Temperatur-Verfahren unzureichend [59, 61], da aufgrund der Oberflächenspannung von Wasser nicht alle Bereiche benetzt werden können bzw. aufgrund von Diffusionsbarrieren an Phasengrenzflächen eine inakzeptabel lange Behandlungsdauer angewandt werden müsste. Für die Behandlung solcher Textilien stehen alternative Verfahren zur Verfügung, die jedoch oft Nachteile für das Textil, die Biokompatibilität mit menschlichem Gewebe und fast immer für die Umwelt aufweisen. Die meisten Sterilisationschemikalien führen zur Denaturierung von Proteinen. Oberflächenaktive Substanzen hingegen schädigen die Zytoplasmamembran vegetativer Keime [54].

Die thermisch basierte Sterilisation, z.B. mittels Dampf unter Druck in einem Autoklaven, ist wohl das umweltfreundlichste konventionelle Verfahren, das bezüglich der Behandlungsdauer von ca. 60 min als ein Referenzverfahren gelten muss [3]. Der Nachteil der Hitze-sterilisation ist die hohe Temperatur von 134 °C, der nur wenige textile Materialien und

Implantatmaterialien standhalten. Für die Sporen-Inaktivierung wird auch das Tyndallisieren - das zyklische Aufheizen auf 100 °C und Abkühlen des Autoklaven - eingesetzt. Bei Anwendung von *trockener Hitze* beträgt die Temperatur 160 °C und die Behandlungszeit 180 min (170 °C und 120 min ist der WHO Standard [12]). Im Gegensatz zur Dampfsterilisation wird bei Nutzung trockener Hitze nach adäquater Einwirkzeit jede Art von Material „durchdrungen“. Papier, die meisten Textilien und Biomaterialien können jedoch mit dieser Methode nicht sterilisiert werden, da diese Werkstoffe durch hohe Temperaturen irreversibel geschädigt werden. Damit können nur Glas, Metall und andere hitzebeständige Materialien vollkommen keimfrei gemacht werden [50, 62]. Durch Hitzesterilisation werden Proteine und Enzyme irreversibel denaturiert: Zumeist finden Veränderungen in der Sekundär- und Tertiärstruktur statt.

Energiereiche Strahlung, wie z.B. ionisierende  $\beta$ - (auch e-beam genannt) oder  $\gamma$ -Strahlung, wird zur Niedrig-Temperatur-Sterilisation eingesetzt [2], wobei  $\gamma$ -Strahlen eine bessere Materialdurchdringung aufweisen. Der notwendige apparative Aufwand und die Sicherheitsvorkehrungen resultieren bei beiden Verfahren in hohen Kosten. Zudem wurden beispielsweise bei PP, PVC und Neopren signifikante Faserschädigungen festgestellt [10, 63]. Weiterhin wurde nachgewiesen [64], dass bei der  $\gamma$ -Sterilisation von beispielsweise PE, langlebige Radikale entstehen, die auch nach zwei Jahren noch 15 % bis 20 % der Ausgangskonzentration betragen können. Des Weiteren können u.a. der Polymerisationsgrad und die Festigkeit der Materialien nachteilig beeinflusst werden [28, 52]. Eine weitere Methode, die auf energiereicher Strahlung basiert, ist die UV-Bestrahlung, die inzwischen durch die Entwicklung von gepulsten Xenonlampen eine höhere Eindringtiefe hat, die aber vom Absorptionskoeffizienten des Materials abhängt. Sporen und Viren werden über dieses Verfahren nicht inaktiviert [12, 65]. UV-Licht induziert strukturelle Veränderungen an der DNS, was die Replikation verhindert. Ionisierende Strahlung hingegen führt zur Bildung reaktiver Gruppen. Im weiteren Reaktionsverlauf werden unselektiv Proteine und DNS geschädigt.

Mikrowellen sind als Sonderfall der Nutzung von energiereicher Strahlung zu sehen. Bisher wurde gezeigt, dass schon bei unter 650 W vegetative Keime [66] und Viren [67] erfolgreich abgetötet werden können. Weiterhin wurde versucht, Sporen (die quasi kein Wasser enthalten) mittels Mikrowellen zu inaktivieren. Auf trockenes Trägermaterial aufgebracht, lassen sich Sporen jedoch nicht abtöten, wohingegen sie in wässriger Lösung bei 1400 W nach 20 min inaktiviert wurden [68]. Dies deutet auf eine rein thermische Wirkung der Mikrowellen hin (aufgrund des dissipativen Effekts, der durch die phasenverzögerte Bewegung des Dipolmoleküls Wasser im Wechselfeld zustande kommt) und setzt eine homogene Verteilung des

Wassers auf dem zu sterilisierenden Objekt voraus. Eine homogene Sterilisation kann bei hydrophoben Materialien bzw. bei Objekten mit Poren und sonstigen schwer zugänglichen Bereichen, in die Wasser nur schwer oder gar nicht eindringen kann, nicht sichergestellt werden. Daher wird die Methode nur bei Produkten mit glatten Oberflächen wie z.B. Glasgeräten oder zur Pasteurisation von Flüssigkeiten eingesetzt.

Wegen der eingeschränkten Durchdringung und Benetzung der Materialien bei den o.g. Methoden werden bevorzugt gasförmige Substanzen, wie z.B. Ethylenoxid ( $C_2H_4O$ ), genutzt [69]. Das Gas ist jedoch hochentzündlich (daher wird oft  $CO_2$  als Inertgas beigemischt), reizend und wurde als karzinogen und mutagen eingestuft [2, 12]. Das Verfahren, das bei Temperaturen zwischen  $25\text{ °C}$  und  $60\text{ °C}$  (Wirkungsoptimum bei  $55\text{ °C}$ ) durchgeführt wird, ist allerdings in Ermangelung alternativer Methoden immer noch Stand der Technik. Da Ethylenoxid (ETO) die Ozonschicht schädigt, ist die Nutzung unter erhebliche Restriktionen gestellt. Dies gilt ebenso für Perchlorethylen und Formaldehyd. In einer Studie von 2002 zeigte Lohmann [24], dass die etwa 25.000 bis 35.000 Einrichtungen zur Aufbereitung von Textilien in den USA zu den Hauptverursachern für die Kontamination von Luft, Wasser und Boden mit den genannten Substanzen gehören. Für Implantate sind geringste Restmengen an ETO, die nach der Sterilisation auf dem Material verbleiben, extrem kritisch, da sie zu einer Hämolyse führen können [70]. Man nimmt an, dass ETO mit funktionellen Gruppen der Proteine reagiert bzw. eine Alkylierungsreaktion zur Inaktivierung der DNA und RNA führt. Außerdem können physiko-chemische Eigenschaften polymerer Materialien irreversibel verändert werden [28, 51].

Ein Sonderfall der Gassterilisation - und damit auch ein Niedrig-Temperatur-Verfahren - ist die Sterilisation mittels  $CF_4/CH_4$ - [71],  $N_2$ - [72], Wasserstoffperoxid- [51] oder über ein Sauerstoffplasma [53]. Jedoch werden auch bei den Plasma-Verfahren Poren und Zwickel nicht vollständig durchdrungen [73, 74]. Außerdem verbleiben – wie auch bei der Gassterilisation – oft Reststoffe oder Radikale auf dem behandelten Objekt, die allergische oder sogar Abstoßungsreaktionen beim Patienten hervorrufen können. Daher müssen die Objekte lange Zeit gelagert und regelmäßig auf Restemissionen getestet werden. Plasma-Verfahren werden oft auch zur gezielten Polymermodifizierung eingesetzt [75]. Der Inaktivierungsmechanismus beruht auf der Bildung von Radikalen und deren unspezifischem, oxidativen Angriff auf alle bakteriellen Zellbestandteile.

Man kann zusammenfassen, dass sämtliche auf dem Markt verfügbaren Sterilisationsprozesse erhebliche Nachteile haben und Gefahren bergen, die bisher nur mangels alternativer Verfahren in Kauf genommen werden. So werden die Lebenszeiten der Textilien erheblich

reduziert, oder das Material wird komplett zerstört. Aufgrund der Faser- und Gewebestruktur dauert das Eindiffundieren von sterilisierenden Fluiden in Poren und Zwickel oft extrem lange, so dass bei vielen konventionellen Verfahren der Sterilisationserfolg nicht mit ausreichender Sicherheit gewährleistet werden kann. Im Vordergrund stehen jedoch die Gefahren für Patient, Betreiberpersonal der Sterilisationsanlagen und Umwelt. Die Anforderungen an ein alternatives Verfahren sind bereits in der Einleitung ausführlicher genannt worden: Erhaltung der physiko-chemischen und thermo-mechanischen Eigenschaften des Produkts sowie toxikologisch unbedenkliche Handhabbarkeit des Sterilisationsmediums. Die Wirksamkeit des Verfahrens ist vom Eindringvermögen in das zu sterilisierende Objekt und der vollständigen Abtötung aller vorkommenden mikrobiellen Kontaminanten abhängig.

### 3.3 Entwicklung alternativer Inaktivierungs-Verfahren auf Hochdruckbasis

#### Alternative Verfahren auf Basis von hochkomprimierten Gasen

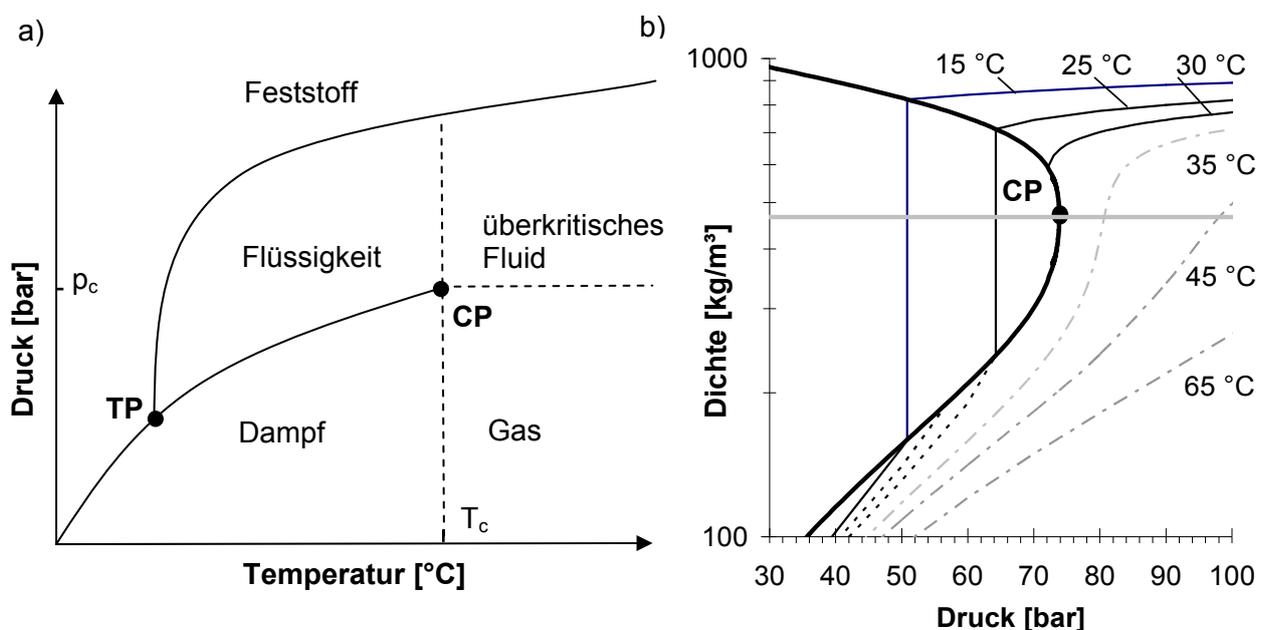
Hochkomprimiertes CO<sub>2</sub> (HP-CO<sub>2</sub>) ist seit langem als so genanntes „grünes“ Lösemittel etabliert und wird für diverse industrielle Prozesse eingesetzt [26, 76]. Die bekanntesten sind die Koffeinextraktion zur Herstellung koffeinfreien Kaffees und die Partikelherstellung im PGSS-(Particles from gas-saturated solution) oder RESS-Verfahren (rapid expansion of supercritical solution) [77]. Bedingt durch die niedrige kritische Temperatur und die vorteilhaften Diffusionseigenschaften des hochkomprimierten Gases wird es bisher vor allem in der Nahrungsmittelindustrie und in der Textilreinigung als so genanntes „green solvent“ eingesetzt. Es ist nicht brennbar, unpolar, inert und weltweit günstig in standardisierter Qualität marktverfügbar [78] (die für diese Arbeit relevanten physikalischen Daten sind in **Tabelle 1** und **Abbildung 4 a und b** dargestellt).

**Tabelle 1:** Vergleich der physikalischen Eigenschaften von Gasen, Flüssigkeiten und überkritischen Fluiden (aus [78]).

Eigenschaft	Gas	überkritisches Fluid	Flüssigkeit
Dichte (g/cm <sup>3</sup> )	10 <sup>-3</sup>	0,3	1
Viskosität (Pa·s)	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>
Diffusivität (cm <sup>2</sup> /s)	0,1	10 <sup>-3</sup>	5·10 <sup>-6</sup>

HP-CO<sub>2</sub> ist für die chemische Reinigung von Textilien schon vor mehr als drei Jahrzehnten patentiert worden - unter Nutzung von flüssigem CO<sub>2</sub> [79] und überkritischem CO<sub>2</sub> [80]. Es ist inzwischen ein anerkanntes Verfahren und wird in den USA von Hangers und General

Electric [81, 82] sowie in Europa vor allem von Electrolux eingesetzt. Man nutzt dabei vor allem die günstigen Lösungs- und Benetzungseigenschaften des CO<sub>2</sub> aus. So weist flüssiges Kohlendioxid eine Oberflächenspannung bei -25 °C von ca. 9 mN/m und bei 20 °C von nur ca. 1 mN/m auf [83] – bei überkritischem und gasförmigem CO<sub>2</sub> geht sie gegen Null, während die des Wassers etwa 72 mN/m beträgt [84, 85]. Wird CO<sub>2</sub> bei 40 °C in Wasser gelöst, nimmt dieser Wert von 72 mN/m bei 1 bar bei Annäherung an den kritischen Druck von CO<sub>2</sub> auf etwa 50 mN/m ab. Oberhalb des kritischen Punktes fällt die Oberflächenspannung sprunghaft unter 30 mN/m ab und bleibt bei weiterer Druckerhöhung nahezu konstant. Die Abnahme der Oberflächenspannung verhält sich dabei proportional zur Löslichkeit des CO<sub>2</sub> in Wasser [86]. Während unpolare Substanzen in CO<sub>2</sub> gut gelöst werden, ist die Abreinigung polarer Stoffe und größerer Partikel problematisch. Seit einiger Zeit werden daher auch oberflächenaktive Substanzen und Cosolventien zur Verbesserung dieser Prozesse untersucht und entwickelt [87-89].



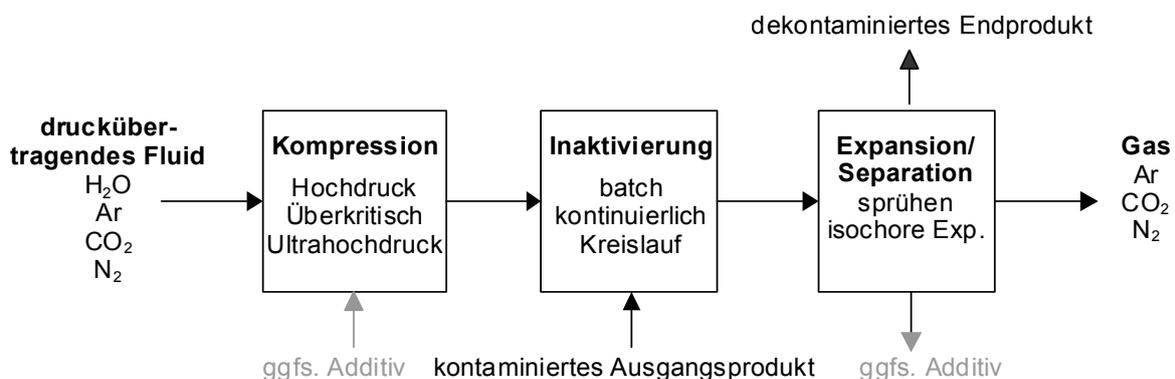
**Abbildung 4 a und b:** Schematisches Phasendiagramm einer a) reinen, generischen Substanz mit den Phasen, Tripelpunkt TP und kritischem Punkt CP, der kritischen Temperatur  $T_c$  und dem kritischen Druck  $p_c$  und b) Dichte von CO<sub>2</sub> in Abhängigkeit von Druck und Temperatur, die kritische Dichte ist als graue, die Sättigungslinie als fette, schwarze Linie dargestellt - Daten aus [90].

Bei der Nutzung von hochkomprimiertem CO<sub>2</sub> für Inaktivierungsverfahren sind zwei Betrachtungsweisen zu diskutieren: einerseits das Waschen, bei dem es sich um ein mechanisches Trennverfahren zur Separierung einer Mischung von Stoffen handelt. Dabei wird ausgenutzt, dass die gemischten Stoffe unterschiedliche chemische oder physikalische Eigenschaften aufweisen und sich nach Löslichkeit, Dichte oder Partikelgröße trennen lassen [91]. Andererseits wird HP-CO<sub>2</sub> eine desinfizierende Wirkung nicht aufgrund der Entfernung der Mikroorganismen zugeschrieben, sondern des Druckeffekts des hoch komprimierten Fluids

selbst unmittelbar auf die Zelle. Dieser Effekt ist Fokus zahlreicher Publikationen und wird an späterer Stelle in diesem Kapitel diskutiert.

### ***Inaktivierung vegetativer Zellen mit Hilfe von komprimierten Medien***

Die im Folgenden genannten Literaturstellen beziehen sich hauptsächlich auf die Inaktivierung mittels hydrostatischen Drucks, also die Inaktivierung von Keimen in flüssigem Medium (zumeist Nährlösung, Milch, Fruchtsäfte, Tomatensauce etc.). Die Verfahren werden nach dem in **Abbildung 5** dargestellten Schema mit unterschiedlichen druckübertragenden Fluiden durchgeführt. In den Prozessen muss zwischen gram-positiven Keimen (relativ dicke Zellwand) und gram-negativen Keimen (relativ dünne Zellwand) unterschieden werden, für die in der Literatur von unterschiedlich hohen Drücke zur Inaktivierung berichtet wird. So wurde die Inaktivierung von gram-positiven, vegetativen Bakterien bei 50 bar bis 400 bar [92], 1000 bar bis 6000 bar [93], 1000 bar bis 9000 bar [94] sowie gram-negativen Bakterien bei 137 bar [95] und 25 bar bis 100 bar [96] in flüssigen Medien nachgewiesen. Diverse Forschungsgruppen inaktivierten auch Pilze bei 3000 bar bis 7000 bar [97] und 2000 bar bis 6000 bar [98] in HP-CO<sub>2</sub>. Weiterhin ist das Verfahren auch für die Inaktivierung von Viren und Phagen anwendbar und wurde bei 2000 bar bis 6000 bar untersucht [99-101]. Die Inaktivierungsmechanismen sind bei noch keinem der genannten Mikroorganismen abschließend aufgeklärt worden.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung von hydrostatischen Hochdruckverfahren zur Keiminaktivierung.

Die Nutzung von komprimiertem Kohlendioxid für Desinfektionsverfahren erwies sich als besonders vorteilhaft und ist inzwischen in Standardwerken zur Keiminaktivierung beschrieben [3, 12, 102]. Im Labormaßstab wurde bereits nachgewiesen, dass sowohl flüssiges als auch überkritisches Kohlendioxid ( $T_c > 31 \text{ °C}$ ,  $p_c > 74 \text{ bar}$ ) zur Abtötung von Keimen genutzt werden kann. Die Wirksamkeit wurde bei Ultrahochdruck (UHT) von 1000 bar bis 3000 bar [103] und bei moderaten Drücken von 69 bar bis 206 bar [104, 105] nachgewiesen. Für zahlreiche Anwendungen in Anlagen im Pilotmaßstab wurde dies auch bei 2000 bar bis 7000 bar

im flüssigen und für unter 200 bar im überkritischen Zustand im Batch- [25] und im kontinuierlichen Prozess [106] gezeigt.

Während in den genannten Arbeiten die Pasteurisation von Flüssigkeiten untersucht wurde, deren hydrostatischer Druck über ein druckübertragendes Fluid (Flüssigkeit oder Gas) erhöht wurde, wird in einem frühen Patent [107] die Inaktivierung von vegetativen Keimen auf chirurgischem Besteck mittels überkritischem CO<sub>2</sub>, Ethan und Ethylen beschrieben. Die Arbeiten wurden - mit flüssigem CO<sub>2</sub> bei 70 bar - weiter verfolgt [108], müssen aber aufgrund methodischer Unstimmigkeiten hinterfragt werden. In anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auf feuchtem Filterpapier aufgebrachte Mikroorganismen erst ab 30 bar durch CO<sub>2</sub> inaktiviert wurden [109]. Allerdings wurde nur bei Raumtemperatur gearbeitet, so dass der überkritische Bereich nicht untersucht wurde. Bei gleichen Bedingungen und einer Mischung aus N<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> wurde keine Mikroorganismenreduktion ermittelt, woraus geschlossen wurde, dass nicht allein der erhöhte Druck die Inaktivierung induziert.

In der Literatur werden die Mechanismen der Zellinaktivierung schon seit längerem diskutiert: ein „narkotischer Effekt“ [110], Behinderung des Zellmetabolismus [111], Extraktion essentieller Zellbestandteile [105] sowie die Inaktivierung von Zellenzymen [112]. Das Platzen der Zelle durch explosives Entspannen des Drucks wird ebenfalls vermutet [113]. Schließlich wird eine Kombination der genannten Effekte postuliert [93, 103, 114]. Von Spilimbergo [115] und Garcia-Gonzalez [116] werden in Übersichtsartikeln schließlich vier mögliche Mechanismen der Bakterieninaktivierung erörtert:

1. *pH-Wert Erniedrigung des Mediums*: Es ist bekannt, dass in CO<sub>2</sub> geringe Mengen Wasser (2 bis 6) mol/1000 mol CO<sub>2</sub> schon bei Drücken von 50 bar bis 200 bar und Temperaturen von 15 °C bis 40 °C löslich sind [117]. In Anwesenheit von Wasser läuft in CO<sub>2</sub> die Bildung von Kohlensäure (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) sowie deren Dissoziation in Hydrogencarbonat- (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), Carbonat- (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) und Wasserstoff-Ionen (H<sup>+</sup>) nach folgendem Schema ab (Gl. 1 + 2):



Als Folge erniedrigt sich der pH-Wert außerhalb der Zelle. So wurde bei Drücken zwischen 70 bar und 200 bar und Temperaturen zwischen 25 °C und 70 °C ein nur leicht variierender pH-Wert von 2,80 bis 2,95 experimentell ermittelt [118]. Allerdings führt im Vergleichsexperiment die Nutzung von Phosphorsäure und Hypochlorsäure zu einer geringeren Inaktivierung, was auf einen zusätzlichen Effekt des komprimierten CO<sub>2</sub> hindeutet [116]. So werden strukturelle und funktionelle Modifikationen diskutiert, die dann zu einer verstärkten Permeabilität der Membran führen.

2. *pH-Wert-Erniedrigung innerhalb der Zelle:* Als Auswirkung des erniedrigten externen pH-Wertes verstärkt sich der Energieverbrauch der zellulären Protonenpumpe zur Aufrechterhaltung des chemischen und physikalischen Gleichgewichts mit der Umwelt (Homöostase). Weiterhin wird - auch durch die o.g. verstärkte Zellpermeabilität - das Eindiffundieren von (nicht hydratisiertem)  $\text{CO}_2$  aus dem externen Medium ins Zytoplasma vermehrt. Trotz des zellulären Puffersystems sinkt der zellinterne pH-Wert. So wurde mittels Durchfluss-Zytophotometrie bei einer Drucksteigerung von 55 bar auf 80 bar eine Absenkung von pH 4,9 auf pH 3,3 beobachtet [115].

3. *Enzym-Inaktivierung und Störung des Zellmetabolismus:* In einer Arbeit wurden 13 essenzielle Enzyme identifiziert, die durch die pH-Wert Absenkung inaktiviert wurden [114, 119], während andere nicht betroffen waren [25]. Des Weiteren wird der die Enzymaktivität störende Einfluss des  $\text{HCO}_3^-$ -Ions diskutiert sowie die erhöhte  $\text{CO}_2$ -Konzentration, die Carboxylierungs-Reaktionen (der Gluconeogenese) inhibiert [111]. Ferner kann die Ausfällung intrazellulärer Elektrolyte ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) durch Carbonat stattfinden und das osmotische Gleichgewicht sowie der Zellmetabolismus gestört werden [116].

4. *Extraktion vitaler Zellbestandteile:* Lin et al. postulieren [105], dass intrazelluläre Grundstoffe wie Phospholipide oder hydrophobe Zellbestandteile durch  $\text{CO}_2$  extrahiert werden. Außerdem wird diskutiert, dass die Durchlässigkeit der Zellmembran durch die Druckbehandlung erhöht wird und damit Zytoplasma aus der Zelle austreten kann [116].

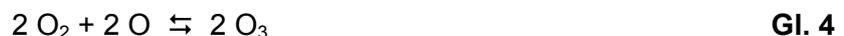
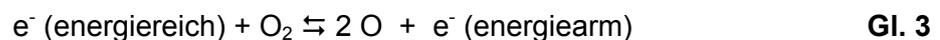
### ***Inaktivierung von Sporen mit Hilfe von $\text{CO}_2$ und Ozon***

Die Inaktivierung von Bakteriosporen wurde durch hydrostatischen Druck bei 6000 bar [120], 7000 bar [121] und 300 bar bis 2000 bar [122] nachgewiesen. Bei 75 °C und 70 bar bis 150 bar konnte nur eine Teilinaktivierung erreicht werden [123]. Pilzsporen wurden bei 2000 bar bis 6000 bar [98] und 3000 bar bis 7000 bar [97] inaktiviert. Damit ist das Hochdruckverfahren grundsätzlich sowohl zur Desinfektion als auch zur Sterilisation geeignet. Auch wird schon die Übertragung des Verfahrens von Anwendungen im Lebensmittelbereich auf biomedizinische Bereiche von Spilimbergo et al. [25] vorgeschlagen. Die Sterilisation von implantierbaren Textilien (oder sonstigem flächigem oder dreidimensionalem Polymermaterial) mittels gasförmigem oder überkritischem  $\text{CO}_2$  ist jedoch bisher noch nicht praktisch untersucht worden. Weiterhin sind nur wenige Arbeiten bekannt, die Additive wie Essigsäure [124], Triclosan und Propanol [108] zur  $\text{CO}_2$ -basierten Sterilisation nutzen. Zahlreiche Arbeiten mit Ethanol und Wasserstoffperoxid werden in einem Übersichtsartikel zusammengefasst [125]. Die Wirksamkeit korreliert dabei offensichtlich mit

der Löslichkeit des Additivs in CO<sub>2</sub>. Bei einem Gas als Additiv ist das Problem der begrenzten Löslichkeit häufig.

Der Einsatz von Ozon als Additiv zur Sterilisation erscheint vorteilhaft, wenn man sich die Oxidationspotenziale von sterilisierend wirkenden Chemikalien vor Augen führt: So hat Ozon ein Potenzial von 2,07 V, während bekannte Desinfektionsmittel wie Wasserstoffperoxid (1,78 V), Hypochlorit (1,49 V) und Chlordioxid (0,95 V) deutlich geringere Werte aufweisen [83]. Zum Vergleich wäre hier noch mit 2,8 V das Potenzial des Hydroxyl-Radikals zu nennen. Generell ist die Nutzung von Ozon zur Keiminaktivierung insbesondere in Wasser gut untersucht; die erste Arbeit zur Trinkwassersterilisation durch Ozon datiert auf Ende des 19. Jahrhunderts [126].

Die Herstellung von Ozon mittels Coronaentladung resultiert bei Luft als Einsatzgas in einer etwa 2 %-igen (v/v) Ozonkonzentration, bei Sauerstoff als Einsatzgas sind etwa 7 % (v/v) Ozon möglich. Der Energiebedarf ergibt sich dabei zu 14 W/g Ozon bzw. zu 6 W/g Ozon [127]. Bei der Ozonbildung wird zunächst ein energiereiches Elektron übertragen, anschließend reagiert ein Sauerstoffatom mit einem Sauerstoffmolekül zu Ozon [128]:



Ozon hat bei 20 °C in Wasser eine Halbwertszeit von etwa 20 min. bis 30 min. [129]. Die abtötende Wirkung von Ozon bei vegetativen Keimen wird auf dessen oxidative Wirkung zurückgeführt [130]. So wird zunächst die Zellwand oxidiert, bevor die Oxidation der essentiellen Zellbestandteile (DNS, Proteine, Enzyme) stattfindet [131-133]. Auch bei Viren bzw. Phagen wird das Proteinkapsid als primärer Angriffsort des Ozons ausgemacht [134]. Foegeding [135] unterstreicht die Schutzfunktion der Sporenhüllen gegen Inaktivierung. Auch Khadre [136] hat die sporozide Wirkung von in Wasser gelöstem Ozon für Verpackungsmaterialien untersucht und ermittelt die äußeren Sporenhüllen als möglichen Ort des oxidativen Angriffs. Ein Ozon/Sauerstoffgemisch mit 32.000 ppm Ozon wird von Ohkawa [137] eingesetzt, um erfolgreich auch Sporenbildner abzutöten. Die Zugabe von Wasserdampf, die laut der Autoren zur Bildung von Hydroxyl-Radikalen führt, halbiert die erforderliche Behandlungszeit. Die Resistenz gegenüber der Inaktivierung steigt von vegetativen Keimen über Pilze zu Bakteriosporen an, wobei Sporen von *B. stearothermophilus* als die resistentesten herausgestellt werden [138]. Die Wirksamkeit von komprimiertem Ozon (T<sub>c</sub> = 12 °C, p<sub>c</sub> = 55 bar) als oxidatives Additiv zu CO<sub>2</sub> wurde bisher nicht wissenschaftlich untersucht.

Somit ist auch nicht bekannt, ob und wie die Polymersubstrate durch die kombinierte Behandlung mit HP-CO<sub>2</sub> und Ozon verändert werden.

### ***Mathematische Beschreibung der Keim-Inaktivierung unter Hochdruck***

Um die Inaktivierung von Mikroorganismen zu verstehen, wurden schon seit längerem Modelle entwickelt, die den Mechanismus in ein mathematisches Polynom fassen. Dabei wird jedoch zumeist nur auf ein bis zwei Einflussfaktoren eingegangen - hauptsächlich Konzentrations/Zeit-Modelle. Von Zhang et al. [139] wird in einem Übersichtsartikel herausgestellt, dass die Faktoren Druck, Temperatur und Art des Mediums einen Einfluss auf die Inaktivierung von Keimen haben. Gleichzeitig unterstreicht der Autor jedoch, dass der mechanistische Hintergrund noch nicht ausreichend verstanden wurde. So liegen dem Autor dieser Arbeit nur sechs Artikel zur Modellierung von HP-CO<sub>2</sub>-basierter Sterilisation vor, von denen einer die thermodynamischen [25] und fünf die kinetischen Aspekte der Inaktivierung beleuchten. Während Karaman und Erkmen [140] eine Kinetik erster Ordnung annehmen, werden auch Modelle höherer Ordnung vorgeschlagen [141]. Ein vollkommen anderer Ansatz wird von Debs-Louka et al. [142] gewählt, die ein rein empirische Darstellung als *response surface* wählen. Die Einflüsse der verschiedenen Parameter des Inaktivierungsprozesses unter Hochdruck wurden bisher jedoch - im Gegensatz zu konventionellen Prozessen - noch nicht zufriedenstellend beschrieben.

### **3.4 Änderung der Polymer-Eigenschaften durch Sterilisation**

Neben der Inaktivierung von vegetativen Keimen und Sporen muss auch sichergestellt sein, dass weder die Oberfläche noch die Bulkphase des Materials durch die Sterilisation ihre mechanischen und physikalischen Eigenschaften sowie seine Biokompatibilität einbüßen.

#### ***Untersuchung der physikalisch-chemischen Oberflächeneigenschaften***

Die Inaktivierung von vegetativen Keimen und Sporen wird, wie bereits erläutert, unter anderem durch radikalische Mechanismen erreicht. Es wird diskutiert, dass die aus dem Ozon entstehenden Radikale nicht nur die auf der Polymeroberfläche befindlichen Keime angreifen, sondern auch auf die Polymere selbst wirken, wodurch es zur Bildung von kurz- oder langlebigen Oberflächenradikalen kommt, wie bei anderen Sterilisationsmethoden bereits beobachtet wurde [62]. So fanden Razumovskii et al. [143] heraus, dass bei Kontakt von Ozon mit olefinischen Polymeren Reaktionen mit freien Radikalen stattfinden und es simultan zur Bildung von sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppen, hauptsächlich an der Polymer-

oberfläche, kommt. Insbesondere für Implantate spielen langlebige Radikale im negativen Sinne eine wichtige Rolle, da sie ein hohes pyrogenes Potenzial besitzen [64]. Die Quantifizierung der Oberflächenradikale gelingt z.B. nasschemisch unter Nutzung des stabilen Goldschmidt-Radikals (DPPH). Das Prinzip [144, 145] beruht auf der Reaktion des DPPH mit Oberflächenradikalen. Während DPPH bei 526 nm absorbiert, ist dies bei den möglichen Reaktionsprodukten nicht der Fall.

Neben der Kenntnis der Radikalkonzentration auf der Polymeroberfläche ist es auch von Interesse, die Reaktionsprodukte zu identifizieren. Deren Entstehung ist wesentlich davon abhängig, welches Polymermaterial als Reaktionspartner zur Verfügung steht. Ebenso kann die Oberflächenstruktur durch die Behandlung verändert werden. Mittels AFM wurde untersucht [146], wie durch den kombinierten Einsatz von UV-Strahlung und Ozon eine PET-Polymer-Oberfläche modifiziert werden kann. Mit Anstieg der Behandlungszeit nahm hierbei die Oberflächenrauheit zu. Nachdem jedoch die Oberfläche gespült wurde, ergab sich eine verringerte Rauheit, was die Autoren auf ein Abwaschen einer so genannten Oberflächenkörnung und dies wiederum auf das Entfernen geringer Mengen nur locker gebundenen Oberflächenmaterials zurückführen. Mitchell und Co-Autoren [147, 148] untersuchen mittels oberflächensensitiver Analytik den Einfluss von Ozon auf Polystyrol zur gezielten Modifikation der Oberfläche (hier soll ein Oberflächenmuster erzeugt werden). Die Arbeitsgruppe weist mit XPS eine Oxidation durch Ozonbegasung nach und konkretisiert die Aussage, indem sie mittels FT-IR Carbonyl-Gruppen detektiert. Außerdem ergibt sich eine Herabsetzung des Kontaktwinkels um ca. 30 °.

### ***Untersuchungen der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Bulkphase***

Generell kann durch die Hochdruck-CO<sub>2</sub>-Behandlung auch eine Modifikation der Bulkphase insbesondere bei amorphen und teilkristallinen Polymeren stattfinden. Es ist seit langem bekannt, dass CO<sub>2</sub> mit vielen solcher Polymeren interagiert und diese auch teilweise quillt [149, 150]: So postuliert Berens [151], dass das Aufnahmevermögen mancher Polymere 10 bis 30 Gew.-% an CO<sub>2</sub> betragen kann. Des Weiteren können nur 8 bis 10 Gew.-% CO<sub>2</sub>-Aufnahme die Glasübergangstemperatur aus dem Bereich 80 °C bis 100 °C bis auf Raumtemperatur absenken. Pantoula bestätigt sorptionsinduzierte Verschiebungen der Glasübergangstemperatur für PMMA und PS [152].

Man nutzt diesen Umstand beispielsweise zum Färben von hydrophoben Polymeren [153-156]. Die Veränderungen, die bei der Hochdruckbehandlung am Polymer stattfinden, wurden ebenfalls am DTNW [157, 158] intensiv mittels DSC und Zugkraftdehnungsmessung unter-

sucht. Bei nicht thermofixierten Polyesterfasern wird durch die Behandlung mit CO<sub>2</sub> bei 280 bar der Schrumpf verstärkt, was auf einen um etwa 14 °C erniedrigten Schmelzpunkt zurückgeführt wird [153]. Bei PP-Monofilien zeigt sich, dass gegenüber Luft bei Umgebungsdruck mit steigendem CO<sub>2</sub>-Druck der Schmelzpunkt um 9 °C (bei 50 bar) und um 22 °C (bei 280 bar) abnimmt [159]. Es kann gesagt werden, dass bei semikristallinen Polymeren oberhalb der Thermofixierungstemperatur der Kristallisationsgrad geändert werden kann [156].

Auch für medizinisch relevante Polymere ist dies interessant. Die quellende Wirkung von HP-CO<sub>2</sub> wird zum Imprägnieren von Polymeren eingesetzt [160], um damit bioaktive Werkstoffe herzustellen. Für PLA ist über 80 °C gute Färbbarkeit mit Dispersionsfarbstoffen in überkritischem CO<sub>2</sub> gezeigt worden [161], wobei jedoch über 95 °C Schrumpf und Verhärtung der Faser festgestellt wurden. Es wurde mittels Zugkraftdehnungsmessung des Weiteren gezeigt, dass durch die CO<sub>2</sub>-Behandlung die Maximalzugkraft und Elastizität signifikant verändert wurden. Ein erwünschter oder unerwünschter Nebeneffekt kann auch das Aufschäumen des Materials sein [162]. Dies konnte beim Imprägnieren von PLA mit einem Wirkstoff vermieden werden, indem man unterkritisches CO<sub>2</sub> einsetzte [163]. Für PVDF konnte bei 140 °C und 84 bar keine Quellung festgestellt werden, während dies bei 283 bar sowie 476 bar eindeutig der Fall war.

Es ist bekannt, dass CO<sub>2</sub> als Transportmedium genutzt werden kann, um insbesondere kleine Moleküle in teilkristalline und amorphe Polymere zu befördern [151]. Wie oben dargelegt, ist CO<sub>2</sub> in der Lage Polymere zu quellen - somit muss geklärt werden, ob dadurch Ozon in die Bulkphase eindringen kann. Dies kann jedoch potenziell in der Zerstörung von Polymerketten in tiefer liegenden Schichten resultieren, die sich über GPC nachweisen lassen würde. Derartige Schädigungen sind für ETO- und Plasma-Sterilisation bekannt und für PLA [51] untersucht worden. Bei einer signifikanten Polymerveränderung resultiert der Angriff auch in einer verringerten Zugfestigkeit und einem veränderten Elastizitätsverhalten.

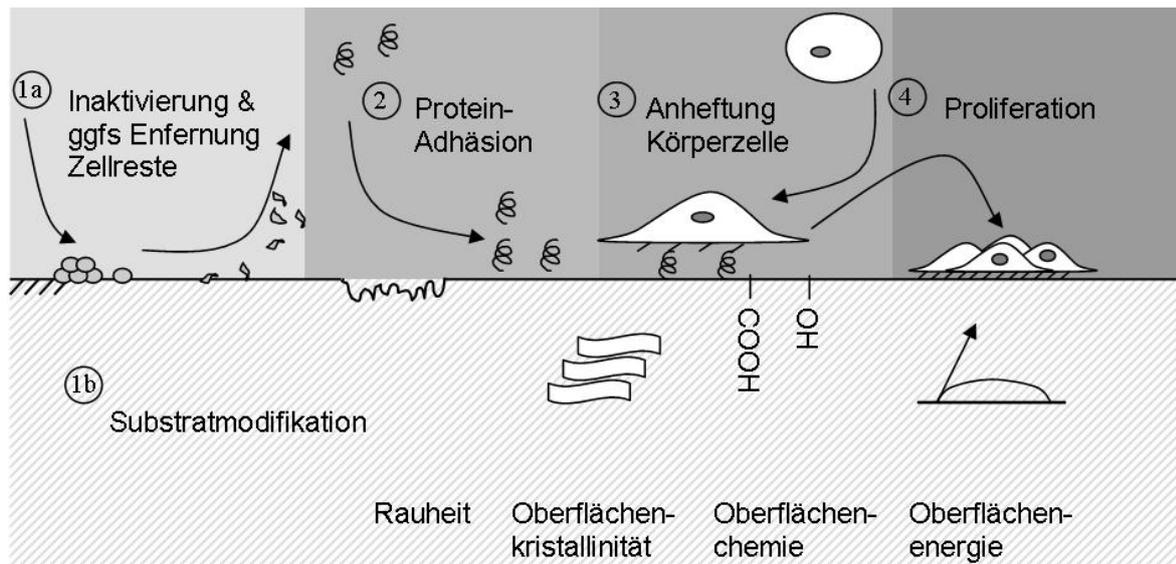
### ***Untersuchung der biomedizinischen Eigenschaften der Polymere***

Durch die Sterilisation werden auf der Oberfläche adhärierte Mikroorganismen inaktiviert, wobei jedoch gleichzeitig die Eigenschaften von Polymeren oft erheblich verändert werden (vgl. **Abbildung 6**, Schritt 1a and b). Athanasiou [44] hebt für die Behandlung mit ETO heraus, dass die Biokompatibilität des sterilisierten Objekts wegen toxischer Reststoffe nicht mehr gegeben ist und forderte schon vor mehr als zehn Jahren die Entwicklung ein alternatives Sterilisationsverfahren. Polymere für medizinische Anwendungen werden oft mit erheblichem Aufwand so gestaltet, dass sie nicht unspezifisch mit dem biologischen System interagieren und sich im optimalen Fall wie menschliches Gewebe verhalten [48]. Dass diese

Eigenschaften bei der Sterilisation nicht verloren gehen sollen, gilt sowohl aus physikochemischer Sicht als auch aus biomedizinischer. In einem Übersichtsartikel werden die biologischen Effekte von sterilisationsbezogenen Änderungen des Polymers zusammengefasst [49]. Andrews et al. [27] beispielsweise haben den Einfluss eines ETO- und eines UV/Ozonbasierten Sterilisationsverfahrens auf die Topographie und die Biokompatibilität der sterilisierten Polymere untersucht. Dabei wurde mittels AFM festgestellt, dass die Oberflächenrauheit von PU-Proben durch die Ozon-Behandlung abnahm, wofür insbesondere die chemische Oxidation verantwortlich gemacht wird. Andrews et al. können dies mit dem Anwachsen von Fibroblastenzellen von Mäusen (L929) und von Menschen korrelieren. Dabei finden die Autoren, dass mit abnehmender Rauheit das Anwachsen (Ausbildung des Zytoskeletts bzw. Bedeckungsgrad des Polymers) der menschlichen Zellen behindert ist. L929-Zellen werden in weiteren Arbeiten [16, 164] generell als Bioindikatoren für Polymerimplantate vorgeschlagen.

### ***Besiedlung der Polymere durch Zellen***

Die wichtigsten biologischen Interaktionen sowie Materialeigenschaften, die über die biomedizinische Qualität eines Implantats oder *scaffolds* entscheiden, sind schematisch in **Abbildung 6** dargestellt. Durch Sterilisation (Schritt 1a) werden oft Eigenschaften einer Polymeroberfläche (1b), wie Oberflächenenergie, Art und Quantität funktioneller Gruppen oder Rauheit, unkontrolliert verändert. Es ist bekannt, dass diese Eigenschaften die Proteinadhäsion (2) beispielsweise von Fibronektin und Fibrinogen beeinflussen, die wiederum mit verstärkter Zelladhäsion - insbesondere durch Thrombozyten - in Verbindung gebracht werden [165, 166]. Deshalb werden Oberflächen zur Verbesserung der Biokompatibilität eines Implantats oft modifiziert. Ziel ist es, eine übermäßige und unspezifische Besiedlung (3) zu verhindern, um damit der Ausbildung eines zu starken Thrombus entgegenzuwirken. Dies geschieht, indem die Oberflächenenergie des Substrats gezielt eingestellt [167], beispielsweise PEG oder Heparin auf der Oberfläche immobilisiert werden [168], oder bestimmte Proteine zur Passivierung [169, 170] auf dem Substrat fixiert werden. Implantate in durchblutetem Gewebe werden gewöhnlich von Fibroblasten in eine faserige Kapsel eingeschlossen [7]. Obwohl dieser Prozess generell erwünscht ist, resultiert eine zu schnelle Proliferation dieser Zellen (4) in einer übermäßigen Dicke der fibrotischen Schichten – vergleichbar der Thrombusbildung. Dadurch kommt es zu einer Nährstoff-Unterversorgung der Zellen in den tieferen Schichten und nachfolgend zur Abstoßung des Implantats.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Interaktion von Körperzellen mit einer Polymeroberfläche - modifiziert nach Zhang et al. [7].

Während für Implantate die unspezifische Proteinadsorption demnach reduziert werden soll, werden beim *tissue engineering* gezielt Wachstumsfaktoren und Matrixproteine auf die Oberfläche aufgebracht, um die zellulären Interaktionen zu verstärken. Vorläuferzellen sollen adhären, proliferieren (**Abbildung 6** Schritte 3 und 4), differenzieren und schließlich eine stabile Matrix gemeinsam mit der vorgegebenen Gerüststruktur aufbauen [168].

Die meisten Gewebezellen - so auch Fibroblasten - müssen auf einer festen Oberfläche anbinden, um zu überleben und sich zu vermehren. Diese Adhäsion findet über Zellrezeptoren statt, die mit Proteinen interagieren, welche auf der zu besiedelnden Oberfläche adsorbiert sind [7, 16]. Die Proteine/Glycoproteine, hochmolekulare Polyamide, die durch Copolymerisation von bis zu 20 verschiedenen Aminosäuren gebildet werden, werden durch das Serum, Plasma oder durch die interzelluläre Flüssigkeit zur Verfügung gestellt [165]. Dabei ist Albumin (HSA - Human Serum Albumin) das häufigste Protein und außerdem dasjenige, das als erstes auf der Polymeroberfläche adsorbiert wird. Im Anschluss ersetzen höhermolekulare Proteine wie Fibronectin und Vitronectin das Albumin. Die Proteinadsorption findet aufgrund von vier Effekten statt:

1. Ionische oder elektrostatische Wechselwirkung zweier funktioneller Gruppen, die unterschiedliche Nettoladungen aufweisen,
2. hydrophobe Wechselwirkungen,
3. Wasserstoff-Brückenbindungen und
4. Van-der-Waals-Kräfte,

wobei Zhang [7] die hydrophoben Wechselwirkungen als die Wichtigsten herausstellt.

Wegen der amphiphilen Natur der Proteine - sie besitzen hydrophile, hydrophobe und geladene Seitenketten - können sie an Oberflächen binden, deren Eigenschaften sich signifikant voneinander unterscheiden. Die Auswirkungen einer Substratmodifikation lassen sich daher zumeist besser mittels zellulärer Bioindikatoren *in-vitro* quantifizieren. Die Anbindung und Proliferation von Zellen lässt somit auch Rückschlüsse auf die Beschaffenheit der Polymeroberfläche zu, die durch physikalische und chemische Analysen nachgewiesen werden können.

### **Analyse der Zytotoxizität der Polymere**

Ein weiterer Indikator für die Bio-Verträglichkeit der Sterilisations-Behandlung ist ein Pyrogentest. Das wichtigste Pyrogen ist das in der Zellwand von gram-negativen Bakterien enthaltene Endotoxin - ein Lipopolysaccharid (LPS) [171]. Es wird beim Abtöten gram-negativer Zellen freigesetzt. Verbleiben diese Endotoxine auf dem Substrat, können sie das Einwachsvverhalten eines Implantats erheblich negativ beeinflussen. In hohen Konzentrationen führen sie zur Freisetzung von Zytokinen (beispielsweise Interleukin), die die Körpertemperatur steuern. Dies kann zu Fieber führen oder gar zum septischen Schock.

Die Quantifizierung dieser Endotoxine kann mittels des LAL- (Limulus Amoebocyten Lysat) Tests erfolgen. Dieser wird schon seit vielen Jahren zur Evaluierung wieder verwendbarer Medizintextilien eingesetzt [172, 173]. Er beruht darauf, dass die Hämolymphe (dem Blut vergleichbare Körperflüssigkeit wirbelloser Tiere) des Pfeilschwanzkrebse bei Kontakt mit Endotoxinen koagulierte. Während beispielsweise durch Dampfsterilisation das Endotoxin nicht entfernt werden kann [54], postulieren Rybka et al. [174], dass die Extraktion von LPS mittels überkritischem CO<sub>2</sub> möglich ist. Dieses LPS wird für Immunologiestudien oder als Hilfsmittel in Impfstoffen eingesetzt. Damit ist der LAL-Test primär für die Biokompatibilitätsbestimmung der Polymere einzusetzen, könnte aber auch einen zusätzlichen, positiven Nebeneffekt der möglichen Extraktion der LPS durch das HP-CO<sub>2</sub> Verfahren sichtbar machen.

Der aktuelle, in diesem Kapitel erarbeitete Kenntnisstand der Forschung und Technik, muss für Untersuchungen im Bereich der Implantatsterilisation als Grundlage gelten. Bei einer Verbesserung konventioneller Verfahren oder Entwicklung von Alternativen muss es das Ziel wissenschaftlicher Arbeiten sein, die Inaktivierung von Biokontaminanten zu beweisen sowie die möglichen, durch die Sterilisation hervorgerufenen Material- und Biokompatibilitätseigenschaften des Implantats durch in diesem Abschnitt gezeigte Methoden zu charakterisieren.

## 4 Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

In der ersten Projektphase wurden zunächst in Zusammenarbeit mit FEG Textiltechnik die zu untersuchenden Polymere ausgewählt. Diese basieren auf PVDF, PP sowie PLA und liegen als Geflecht, Gewirke, Netz oder Garn vor. Zur besseren Bestimmung von Oberflächeneigenschaften der Polymere wurden Folien der o.g. Materialien hinzugezogen. Der Aufbau der Sterilisationsapparatur erfolgte am DTNW und war Voraussetzung für alle nachfolgenden Arbeiten. Die Überprüfung der Inaktivierung der vegetativen Mikroorganismen (*Staphylococcus aureus* und *Candida albicans*) sowie der Sporen (*Bacillus subtilis* und *Bacillus stearothermophilus*) erfolgte über die konventionelle Plattiermethode und wurde auch am Anfang der Projektlaufzeit am DTNW erarbeitet.

Die Untersuchungen zur Faserschädigung während des Prozesses waren aufgeteilt auf Oberflächenbeurteilung mittels XPS und ESR, die vom DTNW koordiniert wurden und die physikalischen Parameter Zugfestigkeit und die Elastizität werden von FEG ermittelt. FEG übernimmt auch die Eluierung der behandelten Textilien, um diese auf Reststoffe zu untersuchen. Weiterhin werden LAL-Tests zur Abschätzung der Pyrogenität durchgeführt und - soweit die vorangegangenen Tests bei FEG erfolgreich abgeschlossen wurden- ein Zytotoxizitätstest an Bindegewebszellen. Die Planung der Versuche mittels DoE, die Sammlung der Daten sowie deren Auswertung für die textiltechnologischen als auch die mikrobiologischen Parameter (mittels ANOVA) wird über die gesamte Projektlaufzeit vom DTNW koordiniert.

Die dargelegten Arbeiten waren geeignet, die Auswirkungen des CO<sub>2</sub>-basierten Verfahrens auf die eingesetzten Polymermaterialien zu bewerten, die zuvor noch nicht bekannt waren. Außerdem wurden neue Erkenntnisse über die Effizienz des Verfahrens hinsichtlich der Inaktivierung der genannten infektiösen Partikel gewonnen. Gegen Ende der Projektlaufzeit erfolgte der Vergleich des neuen Verfahrens mit der konventionellen ETO-Sterilisation. Dabei werden Vor- und Nachteile der Verfahren für die Umwelt gegenübergestellt und bewertet. Insbesondere wird dabei das Emissionspotential der Verfahren sowie der Energie- und Chemikalienverbrauch betrachtet. Die Ergebnisse wurden bereits auf einschlägigen Konferenzen präsentiert und werden in Fachzeitschriften publiziert.

# 5 Experimentelles

## 5.1 *Verwendete Materialien*

### *Chemikalien generell*

2,6 Di-tert-butyl-4-methylphenol, p.a. (Sigma-Aldrich, Deutschland)

Borsäure p.a. (Merck, Deutschland)

CO<sub>2</sub>, 2.2 (Air Liquide, Deutschland)

Diodmethan, 99 % (Sigma-Aldrich, Deutschland)

DPPH (N,N-Diphenyl-N'-(2,4,6-triphenyl-)hydrazyl-Radikal) 95 % (Alfa Aesar, Deutschland)

Essigsäure, p.a. (Merck, Deutschland)

Ethanol, p.a. (Dilg, Deutschland)

Ethylenglykol p.a. (Riedel-de-Haën, Deutschland)

Hefeextrakt (Merck, Deutschland)

Hexan, p.a. (Roth, Deutschland)

H-Säure (4-Amino-5-hydroxynaphtalin-2,7-disulfonsäure Dinatriumsalz Hydrat), 85 %  
(Sigma-Aldrich, Deutschland)

Methanol, p.a. (Merck, Deutschland)

Methylenblau, zur Mikroskopie (Merck, Deutschland)

Natriumhydroxid, p.a. (Merck, Deutschland)

Natriumnitrit, p.a. (Merck, Deutschland)

Phosphorsäure, p.a. (Merck, Deutschland)

Salzsäure, p.a. (Merck, Deutschland)

Sauerstoff, 2.5 (Air Liquide, Deutschland)

Standard-I-Bouillon (Merck, Deutschland)

Standard-I-Agar (Merck, Deutschland)

Sulfanilsäure p.a. (Fluka, Deutschland)

Tetrahydrofuran (THF), p.a. (Fluka, Deutschland)

Trypton Soja Agar (TSA) (Oxoid, Deutschland)

Trypton Soja Bouillon (TSB) (Oxoid, Deutschland)

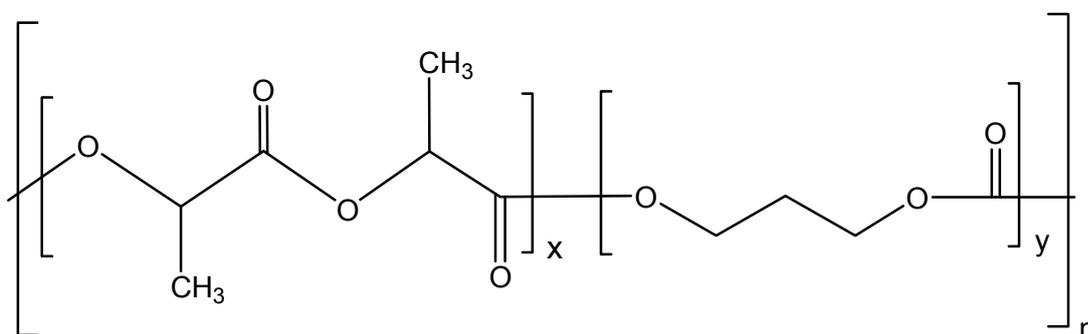
Wasser, dd (Dilg, Deutschland)

## Biomedizinische Agenzien

Alexa Fluor 568 Live/Dead Viability Kit (Molecular Probes, Deutschland)  
BCA Protein-Kit (50/1 v/v) (Pierce, USA)  
Kälberserum (FBS) (Fluka BioChemika, Deutschland)  
Medium RPMI 1640 (PAA Laboratories, Österreich)  
PBS Puffer pH 7,4 (FlukaBiochemica, Deutschland)  
Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories, Österreich)  
Permanente Mausfibroblasten Zelllinie L929 (DWI Aachen, Deutschland)  
Rinderserumalbumin (BSA) Fraktion V, 96 % (Sigma-Aldrich, Deutschland)  
Triton X-100, p.a. (Merck, Deutschland)  
Trypsin (PAA Laboratories, Österreich)

## Polymere und textile Substrate

Polypropylen (PP) -Folie mit einer Dicke von 0,075 mm wurde von Nowofol (Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Folie ist längsverstreckt. Folie aus Poly(-L-)Milchsäure-copolymer mit Trimethylencarbonat (P(L)LA-co-TMC) (vgl. **Abbildung 7**) wurde vom DWI (Deutschland), mittels an anderer Stelle beschriebenen Schmelzpressverfahren [175] hergestellt und hatte eine Dicke von 0,125 mm. Das Ausgangsgranulat Resomer LT706 wurde von Boehringer Ingelheim, Deutschland bezogen. Die Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Folie mit einer Dicke von 0,125 mm wurde von Goodfellow (UK) bezogen. Hernien-Monofilament-Netze (**Abbildung 10**), „Dynamesh®-IPOM“ [176, 177] aus PP (12 %)/PVDF (88 %), wurden von FEG Textiltechnik (Deutschland) zur Verfügung gestellt. Diese Produkte werden in der Chirurgie zum Bauchwandverschluss eingesetzt.



**Abbildung 7:** Strukturformel des Copolymers PLA-co-TMC mit x als Laktid und y als Trimethylencarbonat.

Da sowohl bei den untersuchten textilen Gebilden als auch bei den Folien davon ausgegangen werden muss, dass sich Hilfsstoffe (z.B. Weichmacher oder Spinnhilfsmittel) oder nicht umgesetzte Oligomere auf der Oberfläche befinden, wurden alle Materialien gereinigt. Dazu

wurde eine Extraktion in einer Soxhlet-Apparatur mit Ethanol/Hexan im Volumenverhältnis 21/79 durchgeführt. Die PLA-co-TMC Proben wurden nur manuell mit Hexan gewaschen und anschließend getrocknet.

## 5.2 Geräte und Methoden

Die Pilotanlage zur Sterilisation mittels hoch komprimierten Fluiden ist als Verfahrensfliessbild in **Abbildung 8** und als Fotografie in

**Abbildung 9** gezeigt. Dabei handelt es sich um eine modifizierte Anlage, die zum Färben und chemisch Reinigen von Textilien genutzt wurde [178]. Bei der zylindrischen Waschkammer handelt es sich um einen Hochdruckautoklaven (NWA, Deutschland). Dieser hat ein Volumen von 1,5 l und ist mit einer inneren, perforierten Trommel ausgestattet. Diese erlaubt es, das kontaminierte Waschgut (hier: mit Mikroorganismen kontaminierte Streifen aus Cellulosevlies als Bioindikatoren in **Abbildung 11**), ähnlich wie in einer Waschmaschine, mechanisch zu bewegen.

Mittels Coronaentladung in einem Ozonerzeuger Modular 16 HC (WEDECO, Deutschland) wurde aus Sauerstoff Ozon mit einer Konzentration von bis zu 100 g/m<sup>3</sup> erzeugt ( $\approx$  46.000 ppm) und die Waschkammer für 15 min durchströmt. Die Waschkammer wurde dann mittels einer Hochdruckpumpe (Maximator, Deutschland) mit CO<sub>2</sub> (Air Liquide, Deutschland) befüllt. Der nötige Druck und die Temperatur wurden gemäß Versuchsplan eingestellt (vgl. **Tabelle 2**).

**Tabelle 2:** Zusammenstellung der in dieser Arbeit variierten 4 Faktoren (A,B,C,D) mit 3 Faktorstufen (Maximum, Minimum, Mittel), \*für Behandlung vegetativer Keime.

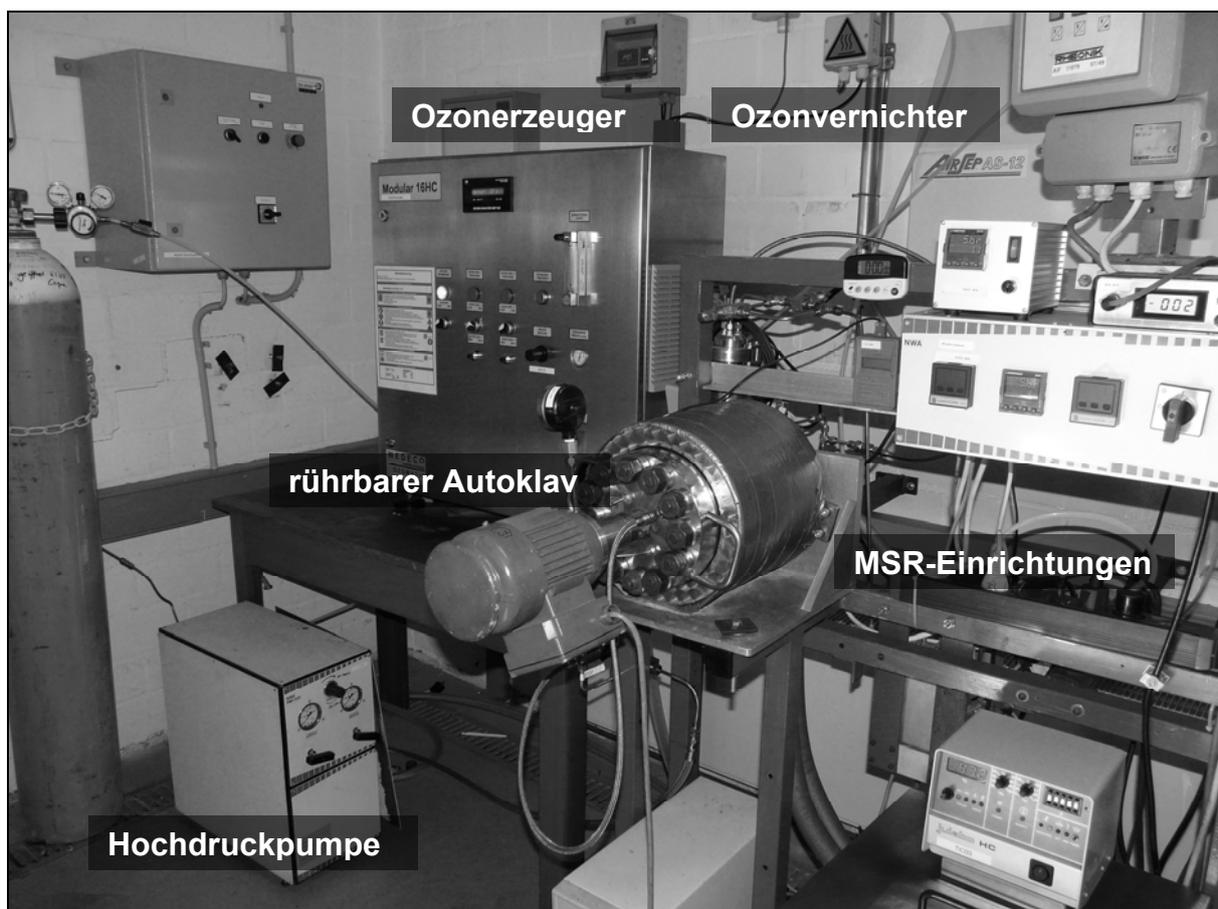
Faktor	Bezeichnung	Maximum	Minimum	Mittel
A	Druck [bar]	80	0	40
B	Ozonkonzentration [g/m <sup>3</sup> ]	100 (70*)	0	50 (35*)
C	Behandlungszeit [min]	220	20	110
D	Temperatur [°C]	50	20	35

Zur genauen Dosierung von weiteren Zuschlagstoffen in die Hochdruckkammer - hier Wasser - wurde eine HPLC-Pumpe (Gilson, Frankreich) mit Sterilfilter genutzt. Die Desinfektion wurde als Batch-Prozess durchgeführt, d.h. es gab keinen konstanten CO<sub>2</sub>-Fluss durch das System. Nach der jeweiligen Behandlungszeit wurde das Fluid auf Umgebungsdruck expandiert und die Proben direkt zur mikrobiologischen Analyse gegeben. Um einen konstanten Druckabbau zu gewährleisten, wurde mittels Massendurchflussmesser RHE 08

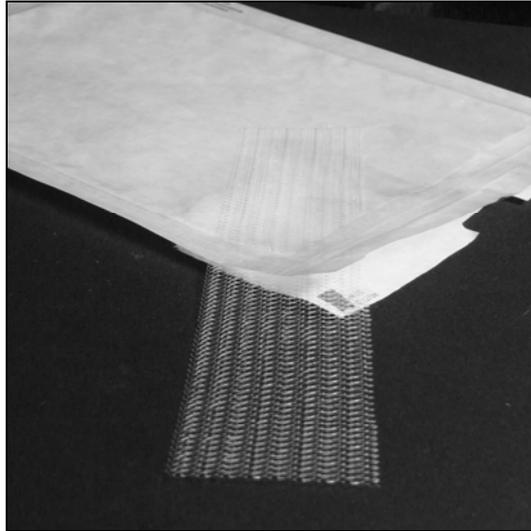


**Tabelle 3:** Geräteliste der Sterilisationsapparatur

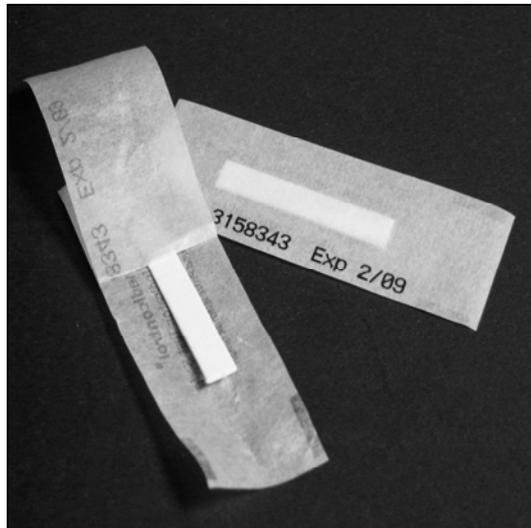
<b>Bezeichnung</b>	<b>Beschreibung</b>
HE-1	Kühlung CO <sub>2</sub> -Pumpe
HE-2	Kühlung Pumpe Flaschenbündel (fakultativ)
P-1	Pumpe CO <sub>2</sub> -Autoklav
P-2	Pumpe Flüssigkeitsadditive
P-3	Pumpe CO <sub>2</sub> -Flaschenbündel (fakultativ)
VE-1	Gasflaschenbündel CO <sub>2</sub>
VE-2	beheizter Autoklav
VE-3	Flüssigkeitsabscheider
VE-4	Additivbehälter
VE-5	O <sub>2</sub> -Gasflasche
VE-6	Restozonvernichter
E-3	Ozonerzeuger



**Abbildung 9:** Aufbau der Versuchsapparatur mit wesentlichen Anlagenbestandteilen (MSR = Messen, Steuern, Regeln).



**Abbildung 10:** Implantierbare Netze aus PP und PVDF in Sterilverpackung.



**Abbildung 11:** Biomonitore auf Cellulosemembran in Sterilverpackung.

### 5.2.1 Bestimmung der Inaktivierung vegetativer Keime und Sporen

Für die Sterilitätstests des HP-CO<sub>2</sub>-Verfahrens wurden als Biomonitore Testkeime vegetativer Bakterien, Hefen und auch Sporen eingesetzt. Diese werden sowohl in komprimiertem gasförmigem, flüssigem und überkritischem Kohlendioxid behandelt. Ziel ist es, sowohl vegetative Keime als auch Sporen bis zu einer Ausgangskonzentration (*bioburden*) von 10<sup>6</sup> koloniebildende Einheiten (KBE)/Keimträger abzutöten (für die Inaktivierung dieses *bioburden* hat sich der Begriff „Sterilisierung“ schon vor vier Jahrzehnten etabliert [179]). Vorrangig soll jedoch mittels Faktoranalyse untersucht werden, wie die Effektivität der Inaktivierung unterschiedlicher Mikroorganismen von der Variation der Einflussparameter (**Tabelle 2**) abhängt.

In dieser Arbeit wurden sowohl das gram-positive Bakterium *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) als auch der Hefepilz *Candida albicans* (ATCC 10231) separat auf Nitrocellulosemembranen (5 x 40 mm<sup>2</sup>) mit jeweils (6,5 ± 0,5) x 10<sup>6</sup> KBE/Membran ohne Schmutzballast aufgebracht, für 3 h bei 36 °C (bzw. bei *C. albicans* 30 °C) getrocknet und einzeln in sogenannte SteriBeutel (Megro GmbH & Co. KG, Deutschland) verpackt. Nach Einsatz der Biomonitore im Verfahren wurden diese einzeln in 10 ml CASO (bzw. bei *C. albicans* Malzextrakt (ME)-Bouillon) resuspendiert und auf CASO- bzw. MEA-Nährböden ausplattiert. Die CASO-Nährböden wurden bei 36 °C, die MEA-Nährböden bei 30 °C inkubiert. Die Quantifizierung erfolgte nach einer Bebrütungszeit von 2 Tagen bei 36 ± 1 °C für *S. aureus* und 30 ± 1 °C für *C. albicans*. Die Herstellung der Stamm- und Arbeitskulturen erfolgte gemäß der DGHM-Methode Nr. 6. Die Herstellung und Auswertung der Biomonitore orientierte sich an der DGHM-Methode Nr. 17. Die Biomonitore wurden am wfk-Institut für Angewandte Forschung GmbH (Deutschland) hergestellt. Dort wurde nach der Behandlung auch der Restkeimgehalt quantifiziert.

Des Weiteren wurde auch mit *Bacillus stearothermophilus* und *Bacillus atrophaeus* gearbeitet. Gram-positive, stäbchenförmige Bakterien der Spezies *B. atrophaeus* (ATCC 9372) und *B. stearothermophilus* (ATCC7953) sind Endosporenbildner. Die Sporen wurden auf Nitrocellulosemembranen (5 x 40 mm<sup>2</sup>) in jeweils Einzelstreifen mit den Konzentrationsstufen 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> und 10<sup>7</sup> KBE/Keimträger aufgebracht und als fertige Biomonitore (**Abbildung 11**) von HS System- und Prozesstechnik GmbH (Deutschland) bezogen (Restfeuchte 5,4 % ± 0,7 % w/w). Nach Einsatz der Biomonitore im Verfahren wurden diese einzeln in 10 ml TSB (Trypton Soja Bouillon, Oxoid) resuspendiert und bei 36 °C (bzw. *B. stearothermophilus* bei 58 °C) inkubiert. Nach einer Bebrütungszeit von 14 Tagen wurde anhand der Trübung der jeweiligen Konzentrationsstufen Wachstum/kein Wachstum ermittelt. Bei allen Auswertungen wurden darüber hinaus jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle berücksichtigt.

## 5.2.2 Statistische Versuchsplanung und -auswertung

### **Statistische Versuchsplanung**

Statistische Versuchsplanung und Auswertung mittels Varianzanalyse (ANOVA) haben sich in den letzten Jahren als zuverlässige Methoden sowohl in der (bio-) medizinischen Forschung [180-183] als auch in den Materialwissenschaften durchgesetzt [184, 185]. Bei der Behandlung werden die wichtigsten Versuchsparameter (Faktoren) variiert, um deren Signifikanz für die Inaktivierung der Mikroorganismen zu quantifizieren. Dazu werden in

einen Versuchsplan 1. Ordnung Maximal- und Minimaleinstellungen (Stufen) für den (CO<sub>2</sub>-) Druck, die (Behandlungs-) Zeit, die (Behandlungs-) Temperatur und die Ozonkonzentration sowie ein Zentralpunkt zur Überprüfung der Linearität gewählt. Da sich bei vier zu untersuchenden Parametern mit jeweils drei Wiederholungsmessungen und vier zu untersuchenden Mikrobenspezies ( $2^4 \times 3 \times 4 =$  ) 192 Experimente ergäben, ist es vorteilhaft, einen teilfaktoriellen Versuchsplan nach Gl. 5 einzusetzen [186]. Damit kann die Gesamtzahl der Experimente auf 96 reduziert werden. Der Zentralpunkt dient der Überprüfung der Linearität. Um die faktoriellen Versuchspläne zu erstellen und auszuwerten, wird das Statistikprogramm Minitab™ (Minitab Inc., USA) genutzt. Der Versuchsplan ist ausführlich im Anhang, **Tabelle A 2** aufgeführt. Weiterhin ist er zur Illustration in **Abbildung 12** als Würfeldiagramm dargestellt - statt aller Eckpunkte müssen nur die Werte ermittelt werden, die markiert sind:

$$m = q^{(p-r)},$$

**Gl. 5**

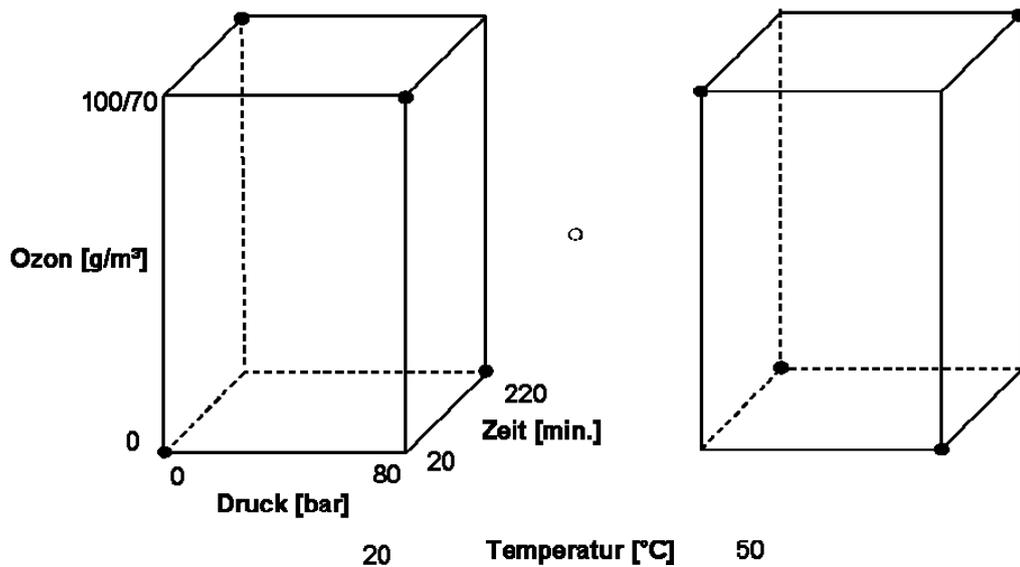
m = Gesamtzahl Experimente,

p = Anzahl untersuchter Parameter,

q = Anzahl der Einstellungen (Stufen) innerhalb eines Parameters und

r = Faktor, der m durch den Einsatz des teilfaktoriellen Versuchsplans reduziert.

Drücke zwischen 50 bar und 100 bar wurden schon als effektiv für die Inaktivierung von vegetativen Mikroorganismen ermittelt [96]. Die Minimaltemperatur wurde auf 20 °C festgesetzt. Die Maximaltemperatur wurde mit 50 °C so gewählt, dass sie noch unterhalb der Maximaltemperatur der ETO-Sterilisation (je nach Verfahrensvariante 20 °C bis 60 °C [12]) bleibt. Bei der Behandlungszeit muss ein schnelles Verfahren - wie beispielsweise die Dampfsterilisation mit 30 min und die ETO-Sterilisation mit 20 min bis 6 h - als Referenz ausgesucht werden [12]. Die gewählten Ozonkonzentrationen lagen bei 0 bis 100 mg Ozon/m<sup>3</sup>. Da die Zugabe von Wasser als essentiell für die erfolgreiche Inaktivierung ermittelt wurde [109], wird bei allen Experimenten 2 ml Wasser (dd) zugesetzt.



**Abbildung 12:** Würfelendiagramm eines  $2^{(4-1)}$  Versuchsplanes mit Faktorpunkten (●) und Zentralpunkt (○).

Mittels der Varianzanalyse ANOVA werden schließlich die optimalen Parametereinstellungen [187] der Inaktivierung ermittelt. Ein  $2^{n-1}$  Versuchsplan ermöglicht es, die Haupteinflussparameter zu bestimmen und deren Einfluss zu quantifizieren. Außerdem werden Interaktionen (Wechselwirkungen) zwischen den Parametern ermittelt und quantifiziert. Es gibt eine Wechselwirkung, wenn die Änderung im Mittelwert der Antwortvariablen von der niedrigen zur hohen Faktorstufe von der Stufe eines zweiten (dritten/vierten) Faktors abhängt. Als Antwortvariable werden die Mittelwerte für die einzelnen Stufen herangezogen.

Die Ergebnisse werden als Pareto-Diagramm dargestellt; die Einflussfaktoren werden also nach ihrer Signifikanz für die Inaktivierung geordnet. Hierbei wird ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  eingeführt – unterhalb dieses Niveaus werden die Effekte der Parameter als nicht signifikant definiert. Die Wahrscheinlichkeit, die Nullhypothese (kein Effekt) fälschlicherweise abzulehnen, liegt bei  $< 5\%$ .

Nach der Optimierung des Verfahrens für vegetative Keime wird versucht, die Ergebnisse auf Sporenteststreifen von *Bacillus stearothermophilus* und *Bacillus atrophaeus* zu übertragen. Ferner wurde ein mathematischer Term genutzt, um die Inaktivierung modellhaft darzustellen. Modelle können hilfreich sein, um einen Prozess, wie hier die Inaktivierung von Mikroorganismen, mathematisch zu beschreiben. Die einfachsten Modelle berücksichtigen nur die Behandlungszeit als Faktor für die Inaktivierung - beispielsweise Chick's law [65].

## ***Programme für Statistik und modellhafte Darstellung***

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels Origin 6.2 (Microcal, USA). Wenn nicht explizit genannt, wurden die Versuche jeweils drei Mal wiederholt, das Ergebnis als Mittelwert gebildet und mit Standardabweichung dargestellt. Versuchsplanung, Auswertung und mathematische Darstellung der Inaktivierung erfolgte mittels Minitab 15 Statistical Software (Minitab Inc., USA).

### **5.2.3 Analyse der Eigenschaften der sterilisierten Polymere**

#### ***Rasterkraft-Mikroskopie (Atomic force microscopy, AFM)***

Um detailliertere Informationen über die Oberflächentopographie der Polymere zu erhalten, wurde ein Rasterkraft-Mikroskop Typ D3100 III (Digital Instruments, USA) als bildgebendes Verfahren eingesetzt. Die Topographie der Proben wurde im Tapping-Mode untersucht. Die (Si-) Messnadel - auch Cantilever - (ULTRASHARP NSC16/50, MikroMasch, Estland) hatte eine genormte Federkonstante von 35 N/m, eine konische Spitze mit einem Winkel von 20°, einem Radius von 5 nm bis 10 nm und einem Modul von 160 GPa. Die Arbeiten wurden am Leibniz-Institut für Polymerforschung in Dresden durchgeführt.

#### ***Rasterelektronen-Mikroskopie (REM)***

Informationen über die Oberflächentopographie und Querschnitte der Polymere wurden über rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen gewonnen. Ein Rasterelektronen-Mikroskop Typ ABT-55 (Topcon, Deutschland) wurde eingesetzt, um Detailbilder von den Folienoberflächen (500-fache Vergrößerung) sowie der Schnittkanten (300-fache Vergrößerung) zu erstellen. Damit können physikalische Veränderungen, wie beispielsweise Quellung des Polymers, sichtbar gemacht werden.

#### ***Kontaktwinkel und Oberflächenenergie***

Der dynamische Kontaktwinkel (Fortschreitwinkel)  $\Theta$  wurde bei 25 °C mit destilliertem Wasser als Benetzungsmittel gemessen. Dazu wurde ein Tensiometer K14 (Krüss, Deutschland) mit der Wilhelmy-Platten-Methode [188] eingesetzt. Zusätzlich wurden die Kontaktwinkel mit den Benetzungsmitteln Ethylenglykol und Diiodmethan gemessen, um in der Lage zu sein, den polaren und dispersen Anteil der Oberflächenenergien (OFE) der Polymere zu bestimmen, die sich mittels Anpassung an einen linearen Ausgleichsterm aus dem Owens-

Wendt Modell [189] errechnen lassen. Die Oberflächenspannungen der eingesetzten Benetzungsmittel sowie deren polarer und disperser Anteil sind in **Tabelle 4** aufgeführt.

**Tabelle 4:** Oberflächenspannungen (OFS) sowie polarer und disperser Anteil der eingesetzten Benetzungsmittel.

	<b>σ Gesamt-OFS [mN/m]</b>	<b>σ<sup>P</sup> polarer Anteil [mN/m]</b>	<b>σ<sup>D</sup> disperser Anteil [mN/m]</b>
Wasser (dd) [189]	72,8	46,8	26,0
Ethylenglykol [190]	47,7	21,3	26,4
Diiodmethan [189]	50,8	6,7	44,1

Polarer und disperser Anteil verhalten sich additiv und ergeben die Gesamtoberflächenenergie  $\sigma_{l/s}$  eines Festkörpers (s) oder einer Flüssigkeit (l) (s. Gl 5 und 6).

$$\sigma_{l/s} = \sigma_{l/s}^P + \sigma_{l/s}^D \quad \text{Gl. 5}$$

$$\sigma_{sl} = \sigma_s + \sigma_l - 2\sqrt{\sigma_l^D \sigma_s^D} - 2\sqrt{\sigma_s^P \sigma_l^P} \quad \text{Gl. 6}$$

$\sigma_{l/s}^D$  = disperser Anteil der Oberflächenspannung der Flüssigkeit (l), des Feststoffes (s) und

$\sigma_{l/s}^P$  = polarer Anteil der Oberflächenspannung der Flüssigkeit (l), des Feststoffes (s)

Für die Young'sche Gleichung: wird der Kontaktwinkel benötigt:

$$\sigma_s = \sigma_{sl} + \sigma_l \cos \Theta \quad \text{Gl. 7}$$

Für den Kontaktwinkel gilt  $\cos \Theta = f(\sigma_s, \sigma_s^D, \sigma_l, \sigma_l^D)$ . Die an die allgemeine Form der Geradengleichung angepasste Form lautet nach Owens-Wendt [189]

$$y = mx + b \quad \text{Gl. 8}$$

$$\text{mit: } y = \frac{1 + \cos \Theta}{2} \frac{\sigma_l}{\sqrt{\sigma_l^D}} ; \quad x = \sqrt{\frac{\sigma_l^P}{\sigma_l^D}} ; \quad b = \sqrt{\sigma_s^D} ; \quad m = \sqrt{\sigma_s^P}$$

Die Steigung m der linearen Funktion sowie der Achsenabschnitt b werden schließlich mittels Regression aus den Mittelwerten der Kontaktwinkelmessungen gewonnen.

### ***Röntgen-Photonen Spektroskopie (XPS)***

Mit XPS werden die chemische Zusammensetzung der Polymeroberfläche und die vorliegenden Bindungszustände bis zu einer Tiefe von etwa 10 nm (entsprechend etwa 4 - 20 molekularen Monolayern [7]) untersucht. In dieser Arbeit wurde ein XP-Spektrophotometer des Typs Ultra Axis™ (Kratos Analytical, UK) eingesetzt. Die Proben wurden mit monoenergetischer Al-K<sub>1,2</sub>-Röntgen-Strahlung (1486,6 eV) bestrahlt und die Spektren bei 144 W (12 kV x 12 mA) aufgenommen. Der Übersichtsscan wurde bei 80 eV und der Detailscan bei 20 eV durchgeführt. Als Referenzpeak wurde aliphatischer Kohlenstoff (C-C/C-H) mit einer Bindungsenergie von 285,0 eV gewählt und alle weiteren Bindungszustände darauf normiert. Die Peaks wurden nach der Gauss-Verteilung gefittet. Die Elementkonzentration wird in Atom-% angegeben. Es wird aber an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass mit der Methode alle Elemente bis auf Wasserstoff und Helium detektiert werden können, so dass diese beiden Elemente nicht für die Gesamtzusammensetzung des Polymers hinzugezogen werden. Die Arbeiten wurden am Deutschen Wollforschungsinstitut in Aachen durchgeführt.

### ***Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FTIR)***

Mittels FTIR wurden im ATR-Modus (Abgeschwächte Total Reflektion) Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung der Polymeroberfläche untersucht, die z.B. auf die Ozonbehandlung zurückzuführen sind. Das Spektrometer IR Prestige-21 (Shimadzu, Deutschland) misst im Bereich von 600 bis 4000 cm<sup>-1</sup> bei einer Spiegelgeschwindigkeit von 2,8 mm/s und einer Auflösung von 2,0 cm<sup>-1</sup>. Aus 40 Messungen wurden die Mittelwerte berechnet. Zur vergleichenden Darstellung wurden alle Spektren geglättet. Es wurde jeweils eine Vier-Punkt-Basislinie eingeführt (4000, 3500, 1500, 600 cm<sup>-1</sup>) und schließlich wurde auf den höchsten Peak normiert.

### ***Nasschemische Oberflächenanalyse***

Zum Nachweis von Radikalen auf der Polymeroberfläche wurde das Goldschmidt-Radikal (N,N-Diphenyl-N'-(2,4,6-triphenyl-)hydrazyl-Radikal; DPPH) genutzt, das in Lösung in einem Redoxgleichgewicht mit Polymerradikalen vorliegt. Zu den Polymerproben (Durchmesser 1,1 mm entsprechend 1,91 mm<sup>2</sup>) wurden jeweils 2 ml einer Lösung (10 mg DPPH/l Methanol) gegeben. Durch die Protonierung mittels Methanol verschiebt sich das Gleichgewicht zum DPPH-Anion, wobei das ungepaarte Elektron vom Polymer übertragen wird. Nach einer Reaktionszeit von 1 h bei 7 °C entsteht bei vorhandenen Polymerradikalen das farblose Diphenylpicrylhydrazin, und die purpurfarbene Lösung wird entfärbt. Die prozentuale

Abnahme der Extinktion der DPPH-Lösung wurde mittels eines UV-VIS-Spektrophotometer, Cary 5E (Varian, Deutschland) bei 526 nm bestimmt und Mittelwerte aus 3 Messungen gebildet.

Der Nachweis von Carboxylgruppen auf der Oberfläche wurde mittels Methylblau geführt. Dazu wurden die Proben in einem Phosphat-Borat-Acetat-Puffer bei pH 7,2 mit 0,05 % Methylblau für 10 min gerührt, wobei sich der kationische Farbstoff an die Carboxylat Funktion bindet. Zum Entfernen überschüssigen Methylblaus wurde anschließend im Überlauf mit Wasser dd gespült, bis dieses vollkommen klar war. Die Proben wurden luftgetrocknet. Dann wurden 0,1 g – 0,2 g Probe in 20 ml 84 %-iger Essigsäure für 1 h oder bis zur vollständigen Entfärbung geschüttelt, wobei durch den Überschuss an Acetat-Ionen das Methylblau-Kation vom Polymer abgelöst wird. Die Extinktion der Lösung wurde dann bei 650 nm im Spektrophotometer Cary 5E (Varian, Deutschland) gemessen und die mittlere Oberflächenkonzentration als  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$  Probe aus 3 Proben bestimmt.

Hydroxylgruppen wurden ebenfalls nasschemisch nachgewiesen: Dazu wurden die oberflächengebundenen OH-Gruppen auf ca. 0,2 g Probe zunächst mittels 10-minütigem Schütteln in 2,5 ml 1 M HCl und 1 ml 15 %-iger Natriumnitritlösung (Entstehung von  $\text{HNO}_2$ ) zum Ester der salpetrigen Säure verestert. Die Flüssigkeit wurde abdekantiert und die Probe für 10 min in 1 %-iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und weitere 10 min in Wasser dd gewaschen. Dann wurde die Ester-Gruppe durch Zugabe von HCl abgespalten. Die dabei entstehende salpetrige Säure wurde nach Zugabe von 1 ml 1 %-iger Sulfanilsäure und 9 min Schütteln sofort mit der Aminofunktion der Sulfonsäure in ein Diazonium-Salz umgesetzt. Nach Zugabe von 1 ml 0,5 %-iger H-Säure wurde noch einmal 1 h geschüttelt, wobei durch Azokupplung mit dem Salz ein roter Farbstoff entsteht, dessen Extinktion bei 510 nm im UV-VIS-Spektrophotometer Cary 5E (Varian, Deutschland) bestimmt wurde. Die mittlere Oberflächenkonzentration wurde aus 3 Ergebnissen in  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$  Probe errechnet.

Der qualitative Nachweis peroxidischer Gruppen auf ozonbehandeltem Material kann durch Umsetzung mit Kaliumiodid bestimmt werden, wobei nicht zwischen Hydroxyperoxid oder Dialkylperoxid zu unterscheiden ist. Die Proben (0,5 g) wurden dazu in 2,5 ml Wasser unter Inertgas mit 1 ml wässriger Stärke- (5 % m/m) und zur besseren Benetzung mit 0,5 ml Natriumdodecylsulfatlösung (1 % m/m) versetzt. Dann wurde 0,5 ml Essigsäure (10 % v/v) und 0,5 ml Kaliumiodidlösung zugegeben und 15 min auf 80 °C erhitzt, wobei vorhandene Peroxide das Kaliumiodid zu Iod oxidieren, das mit der Stärke einen blauen Komplex bildet. Abschließend wurde titrimetrisch mit Natriumthiosulfatlösung (0,1 mol/l) die Lösung entfärbt und somit der Peroxidgehalt der Oberfläche in  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$  ermittelt.

### ***Gelpermeations-Chromatographie (GPC)***

Mittels GPC ist es möglich, den Einfluss der Behandlung auf das Molekulargewicht der Polymere zu bestimmen. Für PLA-co-TMC wurde die Messung bei 35 °C durchgeführt und eine LC Hochdruckpumpe (ERC HPLC) sowie ein Brechungsindexdetektor (ERC-7215a) eingesetzt. Als Lösemittel wurde Tetrahydrofuran (THF) mit 250 µg/ml 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol verwendet. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Das System besteht aus fünf Säulen mit MZ-Gel und Porendurchmessern von 50, 50, 100, 1.000 und 10.000 Å. Kalibriert wurde mittels PMMA. Die Arbeiten wurden am Deutschen Wollforschungsinstitut in Aachen durchgeführt.

Die Molekulargewichtsbestimmung von PP wurde mittels Hochtemperatur-GPC in der Anlage GPC V 2000 (Waters, USA) durchgeführt. Als Lösemittel wurde Trichlorbenzol (TCB) verwendet. Die Säulentemperatur betrug 175 °C. Es wurde mit der Pumpe Waters GPC 2000 (Waters, USA) und einer Flussrate von 1 ml/min gearbeitet. Das System besteht aus drei Säulen mit 1.000, 100.000 und 1.000.000 Å sowie einer Vorsäule. Die Bestimmung der Molmassen erfolgte mittels Brechungsindexdetektor und Viskosimeter. Für die Universalkalibration wurde Polystyrol genutzt. Die Arbeiten wurden an der Universität Paderborn durchgeführt.

### ***Dynamische Differenz-Kalorimetrie (DSC)***

Mittels DSC wurden die Glasübergangs- und Schmelztemperaturen behandelter und unbehandelter Polymere gemessen und verglichen. In dem Gerät DSC 204 Phoenix (Netzsch, Deutschland) wurden zwei Zyklen mit linearem Temperaturprogramm bei einer Heiz-/Kühlrate von 10 K/min gemessen. Die Arbeiten wurden am Deutschen Wollforschungsinstitut in Aachen durchgeführt. Bei Bedarf wurden andere Heizraten gewählt, um eine höhere Auflösung zu erhalten. Dazu wurde eine DSC Q 20 (TA Instruments, USA) eingesetzt. Der untersuchte Temperaturbereich lag für PVDF bei -150 °C bis 250 °C, für PP bei -50 °C bis 200 °C und für PLA-co-TMC bei -50 °C bis 180 °C. Für die Detailuntersuchungen wurde jeweils 30 °C als Starttemperatur gesetzt.

### ***Zugfestigkeitsanalyse***

Mittels Festigkeitstest - angelehnt an die ISO-Norm 13934 zum Streifenzugversuch [191] - können mechanische Eigenschaften wie maximale Dehnung sowie maximale Zugkraft der Polymerimplantate bestimmt werden. Dazu wurde eine Probe auf eine Einspannlänge von

160 mm und in der Mitte der Längsachse auf 25,4 mm Streifenbreite fadengerade zugeschnitten - angelehnt an die Norm zur Untersuchung von Kunststofffestigkeiten [192]. Dieser Streifen wurde in eine Zugdehnungsmaschine (Uster Tensorapid I, USA) mit einer Vorspannkraft von 0,5 cN eingespannt. Liegt Anisotropie vor, also ändern sich die Eigenschaften der untersuchten Polymerflächengebilde, werden beide Richtungen untersucht. Die Prüfungsgeschwindigkeit betrug 300 mm/min, der Maximalwert des Messbereichs für den Messkopf 250 N. Die Arbeiten wurden bei der FEG Textiltechnik in Aachen durchgeführt.

## **5.2.4 Analyse biomedizinischer Eigenschaften der sterilisierten Polymere**

### ***Protein-Test***

Die Adhäsion von Proteinen auf den Polymeren wurde exemplarisch anhand des Modellproteins Rinderserumalbumin (BSA) (Sigma-Aldrich, Deutschland) untersucht. Zur Quantifizierung der Adhäsion an Oberflächen wurden 3 Proben mit jeweils 4 cm<sup>2</sup> für 30 min in einer Lösung von etwa 4,6 mg/ml BSA in Phosphatpuffer (PBS) (FlukaBiochimica, Deutschland) inkubiert. Danach wurden die Proben in frischer PBS gespült. Zum Ablösen der Proteine von der Oberfläche wurde zu den Proben ein Lysepuffer - 3 ml PBS mit 0,1 % Triton X-100 (Merck, Deutschland) gegeben und weitere 15 min inkubiert. Anschließend wurde eine Farbstofflösung, BCA-Kupfersulfat (50/1 v/v) (Pierce, USA) zugegeben und bei 60 °C für 30 min inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Proben anschließend im Eisbad für 5 min abgekühlt. Die grünliche Cu(II)-Lösung wird in Gegenwart von Proteinen zu Cu(I) reduziert und bildet einen violetten Bicinchoninsäurekomplex, dessen Absorption bei 620 nm gemessen werden kann. Es wurde ein Mikrotiterplattenreader Genios (Tecan, Deutschland) mit 96-well-Platten und 200 µl Füllung eingesetzt.

### ***Fibroblastenadhäsion und Proliferation***

Fibroblasten werden als Indikator eingesetzt, um die Nutzung von Polymeren als Implantatmaterial beurteilen zu können. Dabei gibt die biologische Reaktion der Zellen auf Kontakt mit (sterilisiertem) Polymermaterial *in-vitro* einen Hinweis auf Zytotoxizität des Materials. Die Tests wurden in dieser Arbeit auf Polymerfolie durchgeführt, da nur auf glatten Oberflächen die Nutzung des bildbasierten Auswerteverfahrens möglich ist. Um die Biokompatibilität der Materialien zu testen, wurden behandelte (n = 2) und unbehandelte (n = 2) Polymerproben mit Fibroblasten besiedelt und deren initiale Adhäsion nach 24 h und Wachstum nach 72 h beurteilt. Konkret wurde hier eine permanente L929 Fibroblasten-Zellkultur aus der 7. Passage als Bioindikator eingesetzt, wie in [27] vorgeschlagen.

Adhärente Zellen wurden nach 24 h Inkubation in RPMI-Medium (FlukaBiochemika, Deutschland), 50 ml FBS (PAA Laboratories, Österreich), Penicillin/Streptomycin- unter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre mittels Zugabe von Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Das Medium wurde abzentrifugiert (10 min, 4 °C, 13.000 rpm) und das so gewonnene Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Mittels Verdünnung in Medium wurde die Zellkonzentration auf ca. 60.000 Zellen/ml eingestellt. Es soll hier noch darauf hingewiesen werden, dass das Medium jeweils mit 1 Units/ml Penicillin und 1 mg/ml Streptomycin versetzt wurde, um die Kontamination durch Mikroorganismen während der Zellversuche zu unterdrücken. Die Polymerproben (10 mm Durchmesser) wurden in sterilen TCPS- (tissue culture Polystyrol) 6-well-Platten fixiert. Die unsterilen Kontrollproben wurden dreimal mit PBS-Puffer (FlukaBiochemica, Deutschland) gespült, die sterilen Proben nicht. Alle Proben wurden mit 250 µl Medium mit ca. 60.000 Fibroblasten-Zellen/ml für ein Stunde bei 37 °C vorbesiedelt, dann wurden die Proben mit Medium bedeckt und bei 37 °C unter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre für 24 h bzw. 72 h inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Proben mit PBS-Puffer gespült, es wurde ein Live/Dead Anfärbekit (Molecular Probes, Deutschland) zugegeben und für weitere 10 min inkubiert. Die Färbung der Zellen mit Live-Dead-Farbstoff erlaubt es, zwischen lebenden und toten Zellen zu unterscheiden [193]. Das Kit enthält Calcein AM in einer Konzentration von 4 mmol in DMSO. Die nicht fluoreszierende, zellwandpermeable Chemikalie wird durch Esteraseaktivität der lebenden Zelle in das intensiv fluoreszierende Calcein (Anregung/Emission 495 nm/515 nm) umgewandelt. Weiterhin enthält das Kit 2 mmol Ethidium homodimer-1, das nicht durch die intakte Zellwand in die Zelle eindringen kann. Wird jedoch die Zellwand geschädigt, kann es eindringen und an Nukleinsäure binden - dadurch ist es (bei Anr./Em. 495 nm/617 nm) zu detektieren. Mittels Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2 Imaging, Carl Zeiss, Deutschland – Anr./Em. 494 nm/517 nm bzw. 495 nm/636 nm) wurden die Bilder der Fibroblastenanheftung aufgenommen. Die Bilder wurden bei 100-facher Vergrößerung erstellt und die angefärbten Zellen gezählt. Die Durchschnittszahl (als Zellen pro 1 mm<sup>2</sup>) wurde aus drei Bildern errechnet.

### ***Endotoxin-Test***

Der LAL-Test auf Endotoxininaktivierung wurde direkt auf den Implantatnetzen (vgl. **Abbildung 10**) durchgeführt, da ein Einfluss des Trägermaterials auf die Inaktivierung ausgeschlossen wird. Die Proben wurden mit 1 ml einer Endotoxinlösung mit einer Konzentration von 10<sup>5</sup> EU/ml des Endotoxins von *E. coli* 055:B5 beaufschlagt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet (1 EU = 1 Endotoxin Unit entspricht 1 ng Endotoxin). Die Proben

wurden anschließend in Steri-Beutel verpackt und der CO<sub>2</sub>/Ozon-Behandlung unterzogen. Zur Auswertung wird die kinetisch-turbidometrische Methode eingesetzt. Dabei wird ausgenutzt, dass die Zeit, in der eine festgelegte Trübungsveränderung unter Zugabe des Lysates von Pfeilschwanzkrebs-Blutzellen stattfindet, sich proportional zum Endotoxingehalt der Probe verhält. Die sterilisierten Proben wurden in 100 ml Wasser dd gegeben, um das verbliebene Endotoxin zu resuspendieren. Nach Zugabe des Lysates wurde die Zeit bis zur Gelbildung mit einhergehender Trübung ermittelt und mit Hilfe der vorher erstellten Standardkurve die Konzentration bestimmt. Der Test wurde nach der Methode C der Europäischen Pharmakopöe durchgeführt. Die Herstellung der Proben und die Quantifizierung der verbleibenden Endotoxinkonzentration fanden durch die Gesellschaft für Produktionshygiene und Sterilitätssicherung (Gfps), Aachen, statt.

## 6 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit ist in drei Teile gegliedert, die einerseits zwar alleine stehend ein abgeschlossenes Kapitel bilden, andererseits aber jeweils mit den nachfolgenden Kapiteln in unmittelbarer - zumeist kausaler - Verbindung stehen.

1. Mit der Sterilisation unter Einsatz von hochkomprimiertem CO<sub>2</sub> und Ozon (wird in Kapitel 6.1 behandelt) wird die erste Bedingung geschaffen, die an ein Material für die Disziplinen *tissue engineering* oder Implantation gestellt wird - vegetative Keime und Sporen müssen inaktiviert werden.
2. Bei der Sterilisation können topographisch-strukturelle, thermo-mechanische und chemische Veränderungen der Polymere induziert werden, die der späteren Anwendung abträglich sein können. Ob derartige Änderungen durch das Verfahren eintreten und ob diese im Vergleich zu dem gewählten Referenzverfahren Ethylenoxid-Sterilisation wesentlich sind, wird in Kapitel 6.2 untersucht.
3. Die genannten Änderungen wiederum können biomedizinische Eigenschaften, wie Protein- und Zelladhäsion beeinflussen. Des Weiteren soll in Kapitel 6.3 auch geklärt werden, ob durch das Verfahren die Langzeitviabilität der Zellen auf der Oberfläche und die Pyrogenität beeinflusst wird.

### 6.1 Inaktivierung von Keimen mit Hilfe von komprimiertem CO<sub>2</sub> und Ozon

Bei der Inaktivierung muss zwischen vegetativen Keimen (Abschnitt 6.1.1), die vergleichsweise einfach abzutöten sind und Sporen (6.1.2), die gegenüber allen bekannten Sterilisationsverfahren vergleichsweise resistent sind, unterschieden werden. Ziel der Desinfektion ist die Keimzahlreduktion unter ein infektiöses Niveau, während bei der Sterilisation alle Keime - inklusive Sporen - inaktiviert werden müssen. Die experimentell ermittelte Keimzahlreduktion  $y$  wird als log-Reduktion dargestellt, die sich aus der Ausgangskeimzahl  $N_0$  (in KBE = koloniebildende Einheiten) und der Keimzahl nach Behandlung  $N$  mittels Gl. 9 errechnet [12]:

$$\text{Keimzahlreduktion } y = \log \left( \frac{N_0 [\text{KBE} / \text{Keimträger}]}{N [\text{KBE} / \text{Keimträger}]} \right) \quad \text{Gl. 9}$$

Zunächst wird hier auf Basis früherer Ergebnisse gezeigt, welche Faktoren die Keimzahlreduktion auf trockenen Oberflächen mittels Hochdruckverfahren beeinflussen. Dazu wurden nicht-pathogene, vegetative Keime (*Escherichia coli* und *Micrococcus luteus*) in Konzentra-

tionen von bis zu  $10^4$  KBE/Keimträger genutzt. Die Reduktion dieser Keime wurde in Abhängigkeit vom  $\text{CO}_2$ -Druck, der Behandlungstemperatur und -zeit sowie der Zugabe von Wasser quantifiziert.

Im nächsten Schritt wurden krankenhaushausrelevante Keime (*Staphylococcus aureus* und *Candida albicans*) jeweils in hoher Ausgangskeimzahl von  $10^6$  KBE/Keimträger genutzt (die Inaktivierung dieses *bioburden* hat sich als Nachweis der ausreichenden Keimfreiheit etabliert [179]). Zusätzlich waren diese Keime eingeschweißt, um überprüfen zu können, ob auch Gegenstände in Sterilverpackung mit dem Verfahren keimfrei gemacht werden können. Außerdem wurde analysiert, ob die Reduktion mittels Ozonzugabe signifikant verbessert werden kann. Abschließend wurde die Inaktivierung von Sporen (*Bacillus stearothermophilus* und *Bacillus atrophaeus*) mittels  $\text{CO}_2$  und Ozon untersucht. Auch diese Keime wurden in Sterilverpackung in den Prozess gegeben. Die Auswahl der zu untersuchenden Einstellungen wurde unter Zuhilfenahme von statistischer Versuchsplanung getroffen.

### 6.1.1 Abtöten von vegetativen Keimen

#### ***Nicht-pathogene, gram-positive und gram-negative Bakterien***

Der Fokus der Forschung zur Nutzung von Druckverfahren lag bisher auf der Keiminaktivierung von flüssigen und hoch viskosen Medien [3, 12, 25, 102-106, 194, 195]. Die Inaktivierung von Feststoffen mit geringem Wassergehalt wurde bisher noch nicht ausreichend experimentell betrachtet. Bereits im Rahmen von Voruntersuchungen zu dieser Arbeit [196, 197] wurde die Desinfektion von getrocknetem, Gewebe aus Baumwolle und Polyester (Restfeuchte  $< 2,5$  % m/m) in dem Prozess nur unter Nutzung von  $\text{CO}_2$  untersucht. Mittels Varianzanalyse (ANOVA) wurden aus den Haupteinflussparametern diejenigen ermittelt, die den Prozesserfolg bestimmen. Die Effizienz des Prozesses wurde sowohl für stäbchenförmige gram-negative Bakterien als auch für gram-positive Kokken mit jeweils einer Ausgangskeimzahl von  $10^4$  KBE/Keimträger demonstriert (vgl. **Abbildung 13**).

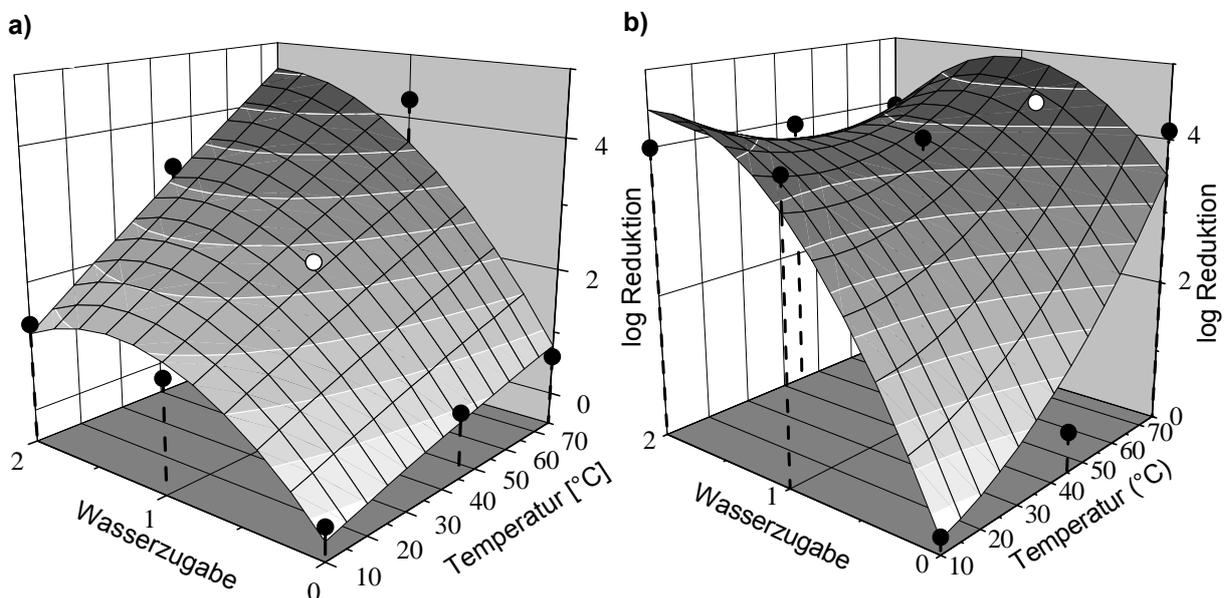
Basierend auf den experimentell ermittelten Daten wurde ein empirischer, nicht-linearer Term bestimmt, der die Keimzahlreduktion im HP- $\text{CO}_2$ -Prozess mathematisch beschreibt. Dieser Term ist eine Funktion der Einflussgrößen (Parameter)  $x_i$  und der Korrekturkonstanten  $a_i$  ( $y' = f(x_i, x_j, a_i, a_j, a_{ij})$ ). Wird der Prozess über einen Term 2. Ordnung ausgedrückt, ergibt sich die Gleichung 10, in der der Term  $a_{ij}x_i x_j$  Interaktionen zwischen zwei Einflussgrößen darstellt. Die Ermittlung der Korrekturkonstanten erfolgte über die Minimierung der Fehler-

quadratsumme FQ (Gl.11) zwischen den experimentell ermittelten Reduktionen  $y$  und errechneten Daten  $y_i'$ .

$$\log \left( \frac{N_0}{N} \right)' = y' = a_0 + \sum_{i=1}^k a_i x_i + \sum_{i < j}^{k-1} \sum_{i < j} a_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k a_{ii} x_i^2 \quad \text{Gl. 10}$$

$$FQ = \sum_{i=1}^n (y_i - f(x_i, x_j, a_i, a_{ij}, a_{ii}))^2 \quad \text{Gl. 11}$$

Es konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von gram-positivem *M. luteus* bei Wasserzugabe stärker von der Temperatur abhängt als ohne Wasser im Prozess. Eine Inaktivierung wurde bereits bei Temperaturen von 20 °C für *E. coli* und im nur geringen Maße für *M. luteus* erreicht. Die Reduktion von *M. luteus* um weitere zwei log-Stufen konnte durch Temperaturerhöhung verbessert werden. Es wurde außerdem herausgearbeitet, dass es in beiden Fällen wichtig war, zumindest ein kleines Wasser/CO<sub>2</sub>-Verhältnis (<< 1% m/m ausreichend, bis zur Sättigung [117]) im Prozess einzustellen, um eine Bakterienreduktion zu garantieren. Dies wurde in dieser Arbeit berücksichtigt und alle nachfolgenden Versuche wurden unter Zugabe von ca. 2 ml Wasser durchgeführt. Die in **Abbildung 13 a** und **b** gezeigten experimentellen Daten wurden mit Hilfe eines vollfaktoriellen Versuchsplans 2. Ordnung ermittelt.



**Abbildung 13:** Plot der Modellfunktion für die Reduktion von a) *M.luteus* und b) *E.coli* bei 50 bar und 60 min Behandlungszeit. Wasserzugabe 1 = unterhalb, 2 = oberhalb der Sättigungskonzentration bei gegebenen Temperaturen und Drücken. Die experimentell ermittelten Daten sind dem Modell gegenübergestellt. Dabei liegen (●) leicht oberhalb des surface plots und (○) leicht unterhalb [196].

Versuchspläne 1. Ordnung sind zwar einfacher und mit weniger experimentellem Aufwand auszuführen - mit diesen Plänen können allerdings nur Geraden und Ebenen als Näherung

für wahre Verhältnisse angegeben werden [186]. In den vorliegenden Untersuchungen zur Inaktivierung wurde gezeigt, dass für weitere Arbeiten Versuchspläne 1. Ordnung nicht ausreichend sind, da die experimentellen Daten am besten mit einem nicht-linearen Modell 2. Ordnung wieder gegeben werden. In Gl. 10 werden die in **Tabelle 5** angegebenen Konstanten eingesetzt und ergeben die in **Abbildung 13 a** und **b** dargestellten *surface plots*.

**Tabelle 5:** Korrekturkonstanten für die mathematische Beschreibung (nach Gl. 10) der Inaktivierung ( $\log(N_0/N)$ ) von *M. luteus* und *E.coli* für konstanten Druck (50 bar) und Behandlungszeit (60 min).

	<i>M.luteus</i>	<i>E.coli</i>		
$a_0$	+0,0599	-0,4009		
$a_1$	+0,0087	+0,0189	$x_1$	Temperatur
$a_2$	+4,8363	+2,4519	$x_2$	Wasser
$a_{12}$	-0,0304	+0,0181	$x_1x_2$	Temp./Wasser
$a_{11}$	+0,0005	-0,0004	$x_1^2$	Temperatur
$a_{22}$	-1,1915	-0,9426	$x_2^2$	Wasser

### **Pathogene Bakterien und Pilze**

Von den im Übersichtsartikel von Zhang et al. [139] genannten 50 Arbeiten zur Hochdruck-Sterilisation diskutieren 45 die Pasteurisierung von flüssigen Medien wie Wasser, Nähr- oder Pufferlösung, Saft oder Milch. In einer Arbeit werden nasse Papierproben untersucht [109], bei der nach Trocknung auf 6% Restfeuchte keine Bakterienreduktion mehr erreicht werden kann. Dillow et al. [70] führen Experimente mit getrockneten *E. coli*-Kulturen durch und finden einen "starken Einfluss der Feuchte auf die Inaktivierungskinetik". In dieser Arbeit wird weder spezifiziert, wie getrocknet wurde, noch wie hoch die Restfeuchte der Proben war, und daher wurde der Einfluss der Feuchte nicht quantifiziert.

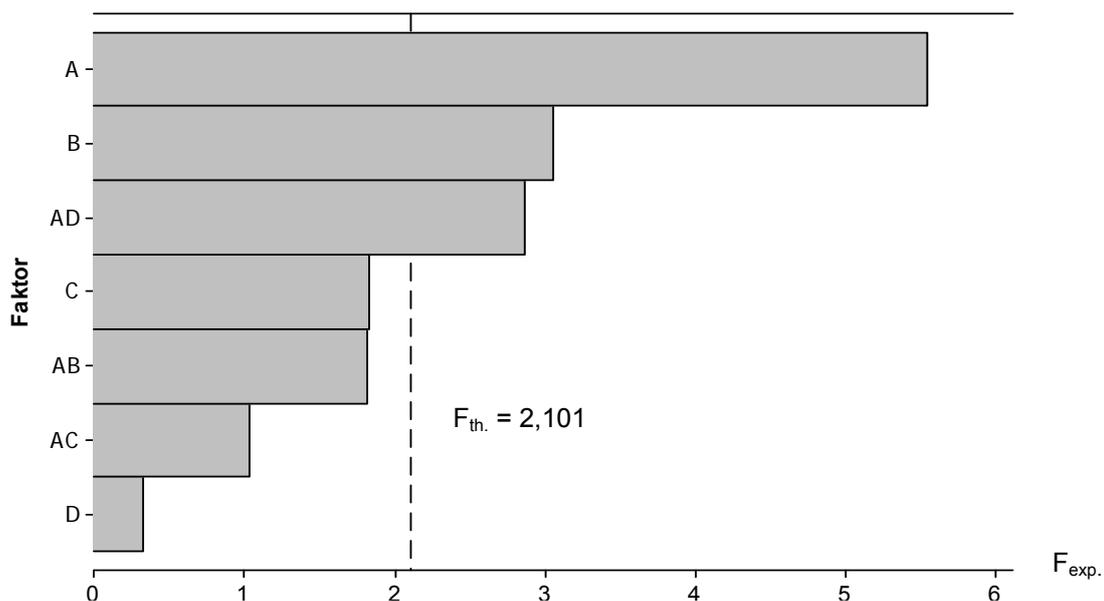
Aus den Voruntersuchungen in diesem Kapitel geht hervor, dass vegetative Keime mittels HP-CO<sub>2</sub> ohne Zugabe von Ozon mindestens bis zu einer Konzentration von 10<sup>4</sup> KBE/Keimträger inaktiviert werden können. Je nach Spezies sind zum Erreichen dieser Inaktivierung unterschiedliche Prozessparameter notwendig. In weiterführenden Arbeiten wurde die Inaktivierung krankenhaushausrelevanter Keime - dem gram-positiven Bakterium *Staphylococcus aureus* und der Hefe *Candida albicans* untersucht.

Beide Keime wurden mit einer Ausgangskonzentration von  $(6,5 \pm 0,5) \times 10^6$  KBE/Keimträger eingesetzt, deren Restfeuchte weniger als 6,5 % m/m betrug. In **Tabelle 6** wird gezeigt, dass eine Keimzahlreduktion bei *C. albicans* von log 5 durchaus ohne die Zugabe von Ozon

möglich ist, solange im überkritischen Fluid gearbeitet wurde. Im unterkritischen Zustand ergeben sich hohe Standardabweichungen bei den log-Reduktionen. Eine Reduktion um log 6 war bei den gewählten Behandlungszeiten nur unter Zugabe von 70 mg O<sub>3</sub>/m<sup>3</sup> möglich [198].

**Tabelle 6:** Auswertung des Versuchsplans zur Inaktivierung von *Candida albicans* (n = 3).

Versuchsnr.	Druck	Ozonkonz.	Zeit	Temp.	log (N <sub>0</sub> /N)	
	[bar]	[mg/m <sup>3</sup> ]	[min]	[°C]	Mittelwert	Std. Abw.
1	0	0	20	20	0,4	0,6
2	80	0	20	50	5,1	1,1
3	0	70	20	50	1,4	1,5
4	80	70	20	20	4,4	2,8
5	0	0	220	50	0,2	0,6
6	80	0	220	20	3,9	2,0
7	0	70	220	20	5,0	1,4
8	80	70	220	50	6,2	0,6
<b>Zentralpunkt</b>	40	35	120	35	<b>5,3</b>	1,1



**Abbildung 14:** Pareto-Diagramm der Effekte für die log-Reduktion von *Candida albicans* (a = 0,05): A = Druck, B = Ozonkonzentration, C = Zeit, D = Temperatur.

Im Pareto-Diagramm in **Abbildung 14** wurden die Haupteinflussparameter ihrer Bedeutung nach geordnet. Alle Parameter, deren experimentell bestimmte Werte von  $F_{exp.}$  im Rahmen der Varianzanalyse über die Referenzlinie des tabellierten  $F_{th.}$  hinaus gehen, sind bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  signifikant. Es zeigt sich ein deutlicher Einfluss des Drucks auf den Inaktivierungserfolg. Ebenso konnte auch die Ozonkonzentration im gewählten Bereich den Inaktivierungserfolg bestimmen. Der Interaktionsparameter Druck/Temperatur (AD) deutet an, dass offenbar auch die Phase (gasförmig, flüssig oder

überkritisch) in der das CO<sub>2</sub> im Prozess vorliegt, eine Rolle spielen könnte. Die Darstellung gibt zunächst noch nicht an, ob der Effekt positiv oder negativ ist.

Die Ergebnisse der Inaktivierung von *Staphylococcus aureus* unterscheiden sich nur in Details von denen der *Candida*-Spezies. *Staph. aureus* ist, wie in der Einleitung gezeigt wurde, der wichtigste Keim nosokomiale Infekte betreffend. Daher wird er in zahlreichen Forschungsarbeiten - auch zur Hochdruckinaktivierung - als Referenzmikroorganismus genutzt. Untersucht wurde bisher bei moderaten CO<sub>2</sub>-Drücken [195], in hydrostatischen Hochdruckverfahren bei 2000 bar bis 3450 bar [199]. In einer Vergleichsreihe vegetativer Keime von *Listeria*, *Bacillus*, *Salmonella* und *Escherichia* [94] sowie *Saccharomyces* und *Pseudomonas* [110, 199, 200] wurde *Staphylococcus* als der resistanteste Keim gegenüber den Hochdruckverfahren identifiziert. Diese Aussage erscheint unter Berücksichtigung der Ergebnisse vorliegender Arbeit zu undifferenziert. Die Reduktionswerte in **Tabelle 7** unterscheiden sich nicht wesentlich von denen in **Tabelle 6**, liegen sogar tendenziell etwas niedriger.

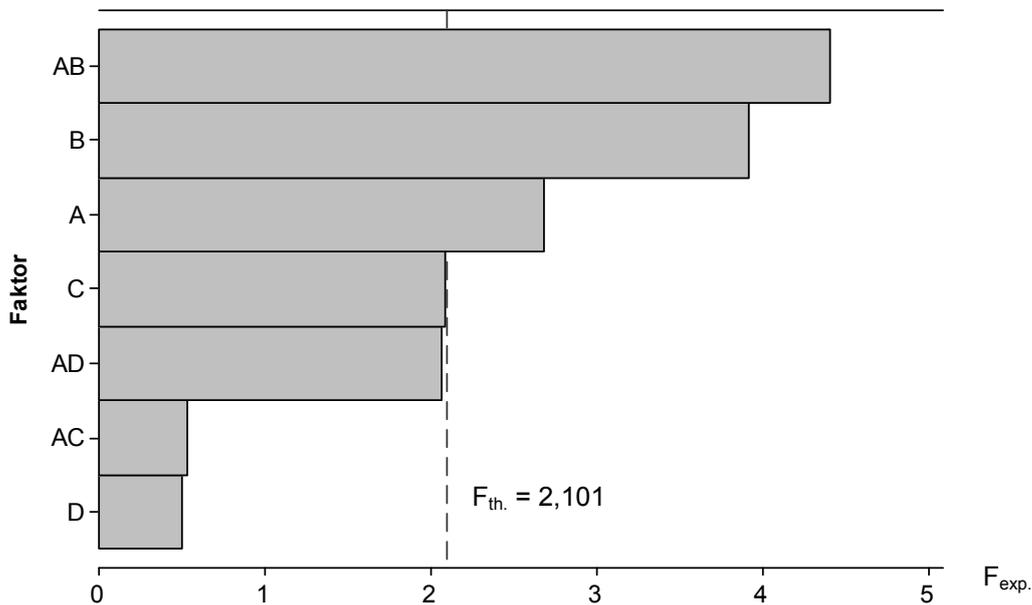
**Tabelle 7** Auswertung Versuchsplan zur Inaktivierung von *Staphylococcus aureus* (n = 3).

Versuchsnr.	Druck	Ozonkonz.	Zeit	Temp.	log (N <sub>0</sub> /N)	
	[bar]	[mg/m <sup>3</sup> ]	[min]	[°C]	Mittelwert	Std. Abw.
1	0	0	20	20	0,7	0,5
2	80	0	20	50	4,6	0,3
3	0	70	20	50	4,5	2,3
4	80	70	20	20	2,9	2,1
5	0	0	220	50	0,7	0,7
6	80	0	220	20	4,6	2,2
7	0	70	220	20	6,2	0,4
8	80	70	220	50	5,8	0,5
<b>Zentralpunkt</b>	40	35	120	35	<b>6,0</b>	0,7

Das Bakterium ist also weniger resistent gegenüber Hochdruck-Inaktivierung als die Hefe. Des Weiteren scheint ein Unterschied bei der Signifikanz der einflussnehmenden Parameter zu bestehen. So werden in **Abbildung 15** wieder die Einzelparameter Druck und Ozonkonzentration als signifikant für den Inaktivierungserfolg ermittelt, jedoch üben diese beiden Parameter auch einen wechselseitigen Einfluss auf die Inaktivierung aus.

Hier wird der Vorteil der Nutzung von statistischer Versuchsplanung in Verbindung mit der Auswertung mittels ANOVA deutlich. Während klassische, mechanistische Ansätze zwar Inaktivierungskinetiken - auch von Hochdruckprozessen [25, 140-142] - zuverlässig in einer Gleichung wiedergeben, ist die Aussagekraft zum Einfluss der Prozessgrößen zumeist sehr begrenzt [187] und für jede Änderung der Paramtereinstellungen muss eine neuer k-Wert ermittelt werden. Antagonistische oder synergetische Effekte werden meist nicht erkannt.

Demgegenüber wird bei vorliegenden Untersuchungen gezeigt, dass die gleichzeitige Erhöhung von Ozonkonzentration und Arbeitsdruck in einem synergetischen Effekt resultieren.



**Abbildung 15:** Pareto-Diagramm der Effekte für die log-Reduktion von *Staphylococcus aureus* ( $\alpha = 0,05$ ): A = Druck, B = Ozonkonzentration, C = Zeit, D = Temperatur.

In dieser Arbeit wurde eine Vielzahl von Parametereinstellungen zur Inaktivierung vegetativer Keime untersucht. Sowohl die Nutzung von komprimiertem CO<sub>2</sub> als auch von Ozon haben einen signifikanten Effekt auf die Inaktivierung. Für die weiteren Faktoren konnte - im Rahmen der zuvor gewählten Stufenhöhen - kein Einfluss gezeigt werden. Für weiterführende Arbeiten bedeutet dies, dass für die Quantifizierung des Einflusses der Behandlungszeit, also für Inaktivierungskinetiken auch Zeiten unterhalb 20 min. zu untersuchen sind, die in vorliegenden Untersuchungen wegen apparativer Restriktionen nicht zugänglich waren.

### 6.1.2 Abtöten von Sporen

Die Inaktivierung von Sporen stellt die größte Hürde bei der Sterilisation dar. Ein in Bezug auf Hochdruckinaktivierung vergleichsweise selten untersuchter Sporenbildner ist *Bacillus stearothermophilus* [92, 120-122]. Da er für auf Hitze basierende Sterilisationsverfahren jedoch ein Standardkeim ist, wurde er in die vorliegenden Untersuchungen miteinbezogen. Die Auswertung des teilfaktoriellen Versuchsplans ergab nur für drei Versuche eine Inaktivierung (vgl. **Tabelle 8**). Die Zugabe von Ozon war zur Sicherstellung der Sporenabtötung essentiell. Aufgrund bisher gewonnener Erkenntnisse wurden Temperatur sowie Behandlungszeit nicht mehr variiert. Weitere Untersuchungen mittels Auswertung eines vollfakto-

riellen Plans konzentrieren sich auf den Einfluss des Drucks und der Ozonkonzentration für die Inaktivierung (vgl. **Tabelle 9**).

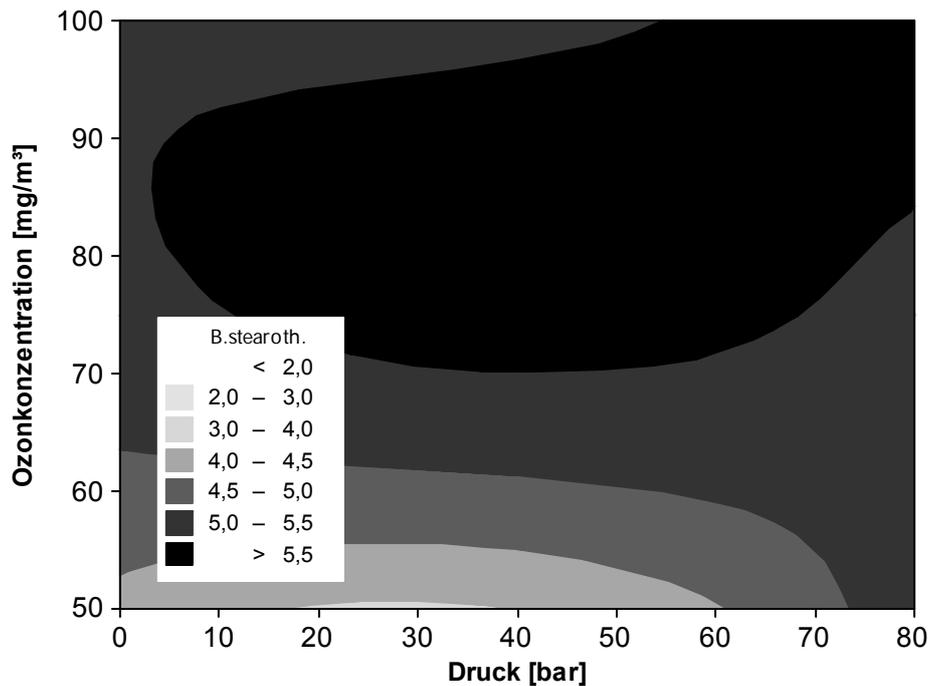
**Tabelle 8:** Ausschnitt der Auswertung des teilfaktoriellen ( $2^{4-1}$ ) Versuchsplans zur Inaktivierung von *B. stearothermophilus* (n = 3).

Versuchsnr.	Druck	Ozonkonz.	Zeit	Temp.	log (N <sub>0</sub> /N)	
	[bar]	[mg/m <sup>3</sup> ]	[min]	[°C]	Mittelwert	Std. Abw.
7	0	70	220	20	5,3	0,6
8	80	70	220	50	6,0	0,0
<b>Zentralpunkt</b>	40	35	120	35	<b>4,0</b>	0,0

**Tabelle 9:** Auswertung des vollfaktoriellen ( $3^2$ ) Versuchsplans zur Inaktivierung von *B. stearothermophilus*. Temperatur (35 °C) und Behandlungszeit (220 min) wurden konstant gehalten (n = 3).

Versuchsnr.	Druck	Ozonkonz.	Zeit	Temperatur	log (N <sub>0</sub> /N)	
	[bar]	[mg/m <sup>3</sup> ]	[min]	[°C]	Mittelwert	Std. Abw.
1	0	50	220	35	4,3	0,6
2	0	75	220	35	5,3	0,6
3	0	100	220	35	5,3	0,6
4	40	50	220	35	4,0	0,0
5	40	75	220	35	5,7	0,6
6	40	100	220	35	5,3	0,6
7	80	50	220	35	5,3	1,2
8	80	75	220	35	5,3	1,2
9	80	100	220	35	6,0	0,0

Aus **Tabelle 9** ergibt sich das folgende Konturdiagramm (vgl. **Abbildung 16**), in dem die Inaktivierung von *B. stearothermophilus* in Abhängigkeit von der Ozonkonzentration und dem applizierten CO<sub>2</sub>-Druck dargestellt ist. Die Fläche, in der eine Abtötung von > 5,5 log-Stufen erreicht wurde, erstreckt sich über einen breiten Druck- und Konzentrationsbereich. Unterhalb von 70 mg/m<sup>3</sup> Ozon wurden jedoch nur ungenügend (< 5,5 log-Stufen) Sporen inaktiviert. Der Einfluss des Drucks ist offenbar nur gering, wobei hervorgeht, dass die Inaktivierung nur unter Einsatz von Ozon nicht über eine log 5,3 Inaktivierung hinaus geht.



**Abbildung 16:** Konturdiagramm für die Keimreduktion [ $\log(N_0/N)$ ] von *B. stearothermophilus* in Abhängigkeit von der Ozonkonzentration und dem Arbeitsdruck bei 35 °C und 220 min.

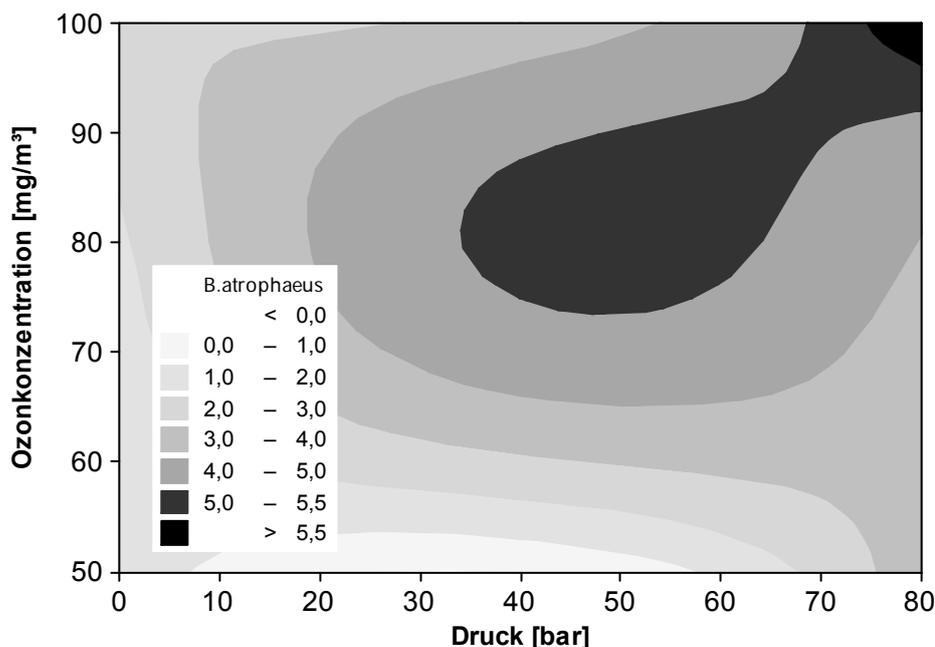
*Bacillus atrophaeus* hat sich als meistuntersuchter [139] Sporenbildner zu einem klassischen Bioindikator für die Verifikation des Sterilisationserfolges von auf Gas basierenden Verfahren entwickelt [25, 106, 115, 119, 122, 123] und wurde daher ebenfalls für vorliegende Untersuchungen ausgewählt. Eine der ersten Arbeiten zur Keiminaktivierung mittels hoch komprimiertem CO<sub>2</sub> stammt von Kamihira et al. [124], die lediglich eine Reduktion von < log 1 von *B. atrophaeus* verzeichnen konnten, während Ballestra et al. [112] etwa ein Jahrzehnt später eine Reduktion von mehr als 3 log-Stufen erreichten.

**Tabelle 10:** Auswertung des vollfaktoriellen (3<sup>2</sup>) Versuchsplans zur Inaktivierung von *Bacillus atrophaeus*. Temperatur (35 °C) und Behandlungszeit (220 min) wurden konstant gehalten (n = 3).

Versuchsnr.	Druck [bar]	Ozonkonz. [mg/m <sup>3</sup> ]	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Mittelwert	Std.Abw.
1	0	50	220	35	1,7	2,9
2	0	75	220	35	1,7	2,9
3	0	100	220	35	3,0	2,6
4	40	50	220	35	0,0	0,0
5	40	75	220	35	4,7	0,6
6	40	100	220	35	3,3	2,6
7	80	50	220	35	3,7	2,6
8	80	75	220	35	3,7	2,9
9	80	100	220	35	6,0	0,0

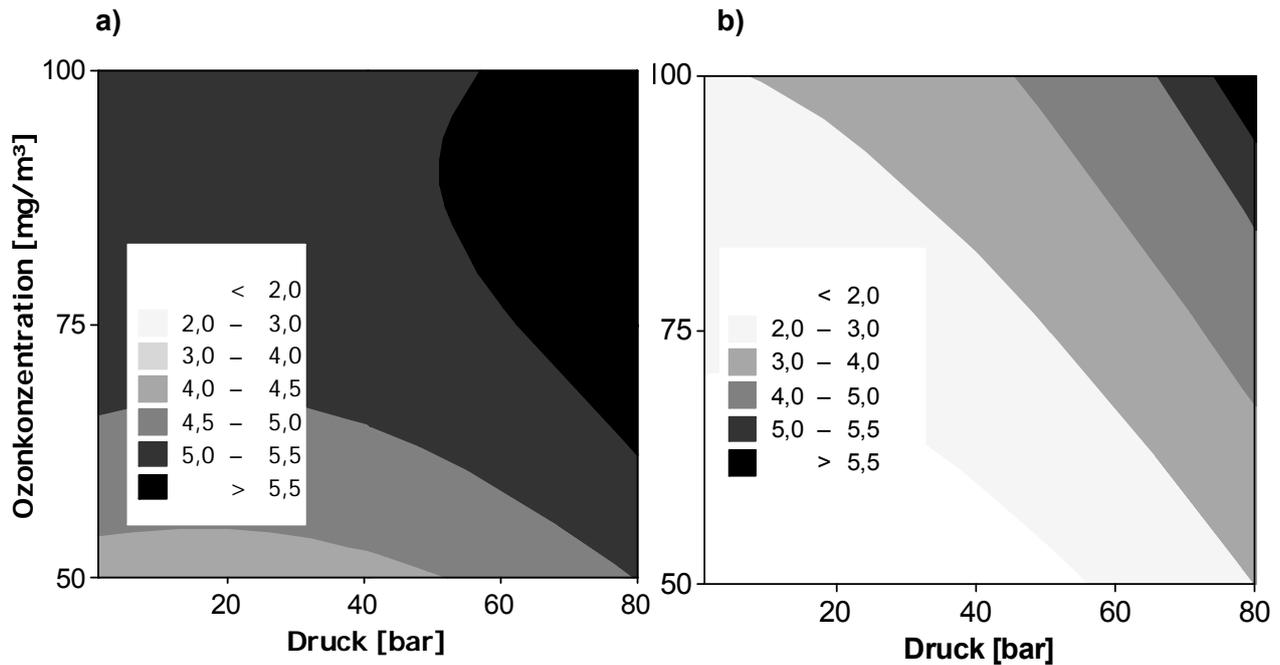
Aus dem teilfaktoriellen Plan erwies sich, ebenso wie bei *B. stearotherophilus*, dass ohne Zugabe von Ozon für keine Einstellung der weiteren ausgewählten Parameter eine Inaktivierung der Sporenkonzentration von *B. atrophaeus* registriert werden konnte. **Tabelle 10** zeigt den vollfaktoriellen Plan.

Aus **Tabelle 10** ergibt sich das Konturdiagramm in **Abbildung 17**. Es zeigt, dass erst eine Zugabe von 100 mg O<sub>3</sub>/m<sup>3</sup> zu einer Reduktion von log 6 führt, wenn bei einem Druck von mindestens 80 bar für mindestens 220 min bei 35 °C sterilisiert wird. Werden die beiden Konturdiagramme (**Abbildung 16** und **Abbildung 17**) übereinander gelegt, um den optimalen Arbeitspunkt für die Sterilisation zu ermitteln, ergibt sich, dass nur bei 80 bar und 100 mg/m<sup>3</sup> Ozon eine vollkommene Inaktivierung beider Sporenspezies erreicht werden kann. So führten zwar auch einige andere Versuche in **Tabelle 10** (Nr. 5, 6, 7 und 8) teilweise zu einer log 6 Reduktion - die hohe Standard-Abweichung unterstreicht jedoch, dass statistisch keine Sicherheit der vollkommenen Inaktivierung gegeben ist.



**Abbildung 17:** Konturdiagramm für die Keimreduktion [ $\log(N_0/N)$ ] von *B. atrophaeus* in Abhängigkeit von der Ozonkonzentration und dem Arbeitsdruck bei 35 °C und 220 min.

Der Plot des jeweiligen mathematischen Modells für die Beschreibung der Inaktivierung der beiden Sporenbildner macht deutlich, dass zwar der Punkt der vollständigen Inaktivierung korrekt berechnet werden kann, jedoch die Konturdiagramme in **Abbildungen 16** und **17** nicht detailgetreu durch **Abbildung 18 a** und **b** nachgebildet werden. Trotzdem ist neben der technischen Bedeutung und der Visualisierung der Wechselwirkungen auch anhand der Quantifizierung oft die Erarbeitung eines mechanistischen Modells erleichtert. **Tabelle 11** zeigt die berechneten Konstanten.



**Abbildung 18:** Anhand der in Tabelle 11 angegebenen Konstanten berechnete Konturdiagramme für die Keimreduktion [ $\log(N_0/N)$ ] von **a)** *B.stearothermophilus* und **b)** *B.atrophaeus* in Abhängigkeit von der Ozonkonzentration und dem Arbeitsdruck bei 35 °C und 220 min.

**Tabelle 11:** Korrekturkonstanten für die mathematische Beschreibung (nach Gl. 10) der Inaktivierung [ $\log(N_0/N)$ ] von *B. stearothermophilus* und *B. atrophaeus* für konstante Temperatur (35 °C) und Behandlungszeit (220 min).

	<i>B.atrophaeus</i>	<i>B.stearo- thermophilus</i>		Faktor
$a_0$	-0,09631	0,00000		
$a_1$	-0,00068	-0,02747	$x_1$	Druck
$a_2$	0,12012	0,02587	$x_2$	Ozon
$a_{12}$	-0,00008	0,00033	$x_1x_2$	Druck/Ozon
$a_{11}$	0,00017	0,00039	$x_1^2$	Druck
$a_{22}$	-0,00065	0,00003	$x_2^2$	Ozon

Anhand der zuvor ermittelten experimentellen Daten wurde ein mathematischer Term entwickelt, aus dem sich der Einfluss der Einzelparameter quantifizieren lässt. Ziel war es nicht, die biologisch-chemischen Inaktivierungsmechanismen abschließend aufzuklären. Da mit dem Modell die Effektivität der Inaktivierung von vegetativen Keimen und der von Sporen mit den physikalischen und chemischen Einflussgrößen korreliert werden kann, können jedoch mögliche Mechanismen diskutiert werden.

### 6.1.3 Mögliche Mechanismen und praktische Aspekte

Während thermisch basierte Sterilisationsverfahren zur Denaturierung von Proteinen führen, werden bei der  $\gamma$ - und Plasma-Sterilisation Radikale gebildet, die unselektiv Proteine, Nukleinsäuren und sonstige Zellbestandteile angreifen [29, 53, 201]. Bei der Nutzung von Ethylenoxid nimmt man an, dass die DNS und RNS irreversibel alkyliert werden [69, 202]. Werden vegetative Keime durch reines CO<sub>2</sub> inaktiviert, müssen andere Mechanismen stattfinden. Die in allen Untersuchungen gewählte Temperatur ist für die Proteindenaturierung zu niedrig. Die Voruntersuchungen zeigten des Weiteren, dass ohne Wasserzugabe keine Inaktivierung stattfindet. Die Entstehung von Kohlensäure mit einhergehender pH-Wert-Absenkung wurde in der Einleitung (Gl. 1 und Gl. 2) bereits erläutert. Die Möglichkeit der Proteindenaturierung durch pH-Wert-Absenkung wird von den Ergebnissen dieser Arbeit unterstützt. In den Arbeiten zur Inaktivierung pathogener Keime wurde jeweils der CO<sub>2</sub>-Druck als ebenso wichtig für die Inaktivierung ermittelt, wie die Konzentration des Ozons.

Es wurde des Weiteren gezeigt, dass Ozon ein sowohl in der Gasphase ohne CO<sub>2</sub> als auch in über- und unterkritischem CO<sub>2</sub> wirksames Sterilisationsmittel ist. Aus der Literatur ist bekannt, dass Glykolipide und Glycoproteine als wesentliche Zellbestandteile von Ozon oxidiert werden [203]. Giese und Christensen [131] haben gefunden, dass Ozon außerdem Pyrimidine und Purine der Nukleinsäuren angreift. Ferner zerstört Ozon die Enzymaktivität durch Reaktion an den Sulfhydryl-Gruppen einiger Enzyme [204]. Es ist daher nicht überraschend, dass Ozon alleine als Sterilisationsmittel wirkt. In den vorliegenden Untersuchungen wurde jedoch auch ein Wechselwirkungseffekt zwischen der Ozonkonzentration und dem applizierten CO<sub>2</sub>-Druck ermittelt. Deshalb könnte dieser Effekt auch pH-Wert-abhängig sein. Ob dabei die säurelöslichen Sporenpoteine (SASPs) eine Rolle spielen, wobei das komprimierte Fluid eine Aufweitung der Sporenhüllen bewirkt oder der Druckgradient die Permeabilität der Sporenmembran beeinflusst, konnte an dieser Stelle nicht geklärt werden. Dass die Inaktivierungseffektivität von Ozon in Lösung durch niedrige pH-Werte gesteigert werden kann [135], wird in der Literatur bisher noch kontrovers diskutiert [205]. Der Beitrag des CO<sub>2</sub> zur Ozon basierten Sporeninaktivierung sollte jedoch für die Zukunft Ziel weiterer Forschung sein.

Für die ermittelte Ozonkonzentration ergeben sich folgende Betrachtungen hinsichtlich der Sicherheit und der praktischen Anwendbarkeit des Verfahrens. Von der ANSI/ASTM [206] wird eine Exposition am Arbeitsplatz bei einer maximalen Konzentration von 0,1 mg Ozon/l, gemittelt über 8 h vorgeschrieben. Weiterhin darf nach derselben Richtlinie kein Arbeiter für mehr als 10 min einer maximalen Konzentration von 0,3 mg Ozon/l ausgesetzt sein. Bei

einem Reaktorvolumen von 1 m<sup>3</sup> und einer Konzentration von 100 mg Ozon/l muss der Arbeitsraum bei 2,5 m Höhe eine Grundfläche von ca. 3,5 x 3,5 m<sup>2</sup> haben, damit bei unkontrollierter Freisetzung eine Konzentration von 0,3 mg/l nicht überschritten wird.

Garcia-Gonzalez et al. [116] stellen in ihrem Übersichtsartikel fünf bisher ungelöste Probleme bezüglich der HP-CO<sub>2</sub>-Sterilisation heraus, die grundsätzlich auch für medizinische Objekte von Bedeutung sind. Neben einer weitgehenden Unkenntnis der Inaktivierungsmechanismen und dem möglichen Auftreten von hochresistenten Mutanten werden die folgenden Punkte diskutiert:

1. Die Inaktivierungsbedingungen sind vom Typ des Kontaminationskeims abhängig. Die hier gezeigten Ergebnisse unterstützen diese Aussage. So werden unterschiedliche Kombinationen von Prozessparametern benötigt, um gram-positive oder -negative Bakterien, Pilze und Sporen abzutöten. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass es möglich ist, eine optimale Einstellung für alle untersuchten Keime zu finden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Sporen von *B. atrophaeus* am schwierigsten zu inaktivieren sind. Damit eignet sich dieser Keim in Zusammenhang mit dem HP-CO<sub>2</sub>-Sterilisationsprozess als Bioindikator.

2. Die Sterilisation von festen Objekten wurde bisher noch nicht zufriedenstellend untersucht und war daher ein Hauptziel der hier vorliegenden Arbeiten. Es wurde erfolgreich gezeigt, dass nicht nur flüssige Medien desinfiziert werden können, sondern auch Materialien mit inhomogener Porenstruktur, wie Textilien und Zellulosestreifen von ca. 1 mm Dicke. Die Penetration von weiteren Materialien - auch anderer (Poren-) Struktur und Dicke - durch CO<sub>2</sub> und Ozon, sollte in weiterführenden Untersuchungen verifiziert werden.

3. Schließlich wird der Verpackungsschritt nach der Behandlung als Problem herausgestellt. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass mit dem kombinierten Einsatz von CO<sub>2</sub> und Ozon verpackte Objekte sterilisierbar sind. Geeignet sind dazu handelsübliche Hand- oder Flachverpackungen, die aus einer klaren HDPE-Folie und einer Papiermembran bestehen, die von dem Sterilisationsmedium problemlos durchdrungen werden. Die Verpackung des Objektes kann also – wie bei konventionellen Sterilisationsmethoden - vor der Behandlung erfolgen.

Damit wurde gezeigt, dass die Desinfektion von Feststoffen mittels HP-CO<sub>2</sub> als Niedrig-Temperaturprozess ohne Einsatz von persistenten, toxischen Chemikalien oder Strahlung möglich ist. Außerdem ist der relativ niedrige Druck im Vergleich zu Arbeiten im flüssigen Milieu [116, 139, 194] unter energetischen und sicherheitstechnischen Aspekten vorteilhaft. Die Sterilisation erfordert die Zugabe von Ozon, welches jedoch nach Einsatz durch Überleiten über einen Katalysator rückstandsfrei zu Sauerstoff umgesetzt wird. Die Hoch-

druck-Technologie ist marktverfügbar [26], wird aber im Textilbereich bisher nur zur chemischen Reinigung genutzt. Die biomedizinische Kompatibilität relevanter Medizinal-Textilien bzw. Implantate bedarf nach einer CO<sub>2</sub>/Ozon-Behandlung ebenso weiterer Untersuchungen, wie die strukturellen, thermo-mechanischen oder physiko-chemischen Eigenschaften der behandelten polymeren Materialien.

## **6.2 Einfluss des Verfahrens auf die Eigenschaften der Polymere**

Viele konventionelle Sterilisationsmethoden induzieren eine Veränderung, oft sogar eine Zerstörung von behandeltem polymerem Material. Generell kann der Polymerkettenabbau von Kunststoffen zum Einen nach der Ursache des Angriffs wie folgt eingeteilt werden:

1. Mechanisch,
2. thermisch,
3. chemisch, wobei Kettenmoleküle oder funktionelle Gruppen des Polymers durch Oxidationsmittel angegriffen werden können,
4. hydrolytisch, wobei Ester-Gruppen gespalten werden,
5. durch energiereiche Strahlung die zu Änderungen der Polymereigenschaften und darüber hinaus bei hohem Energieeintrag zu Kettenspaltung führen kann,
6. biologisch, über Angriff von Enzymen, die sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen wirken können.

Für den Sterilisationsprozess spielen die Punkte 2 - 5 eine wichtige Rolle.

Zum Anderen ist die Art der Zerstörung (Abspaltung von Seitenketten oder Zerstörung der makromolekularen Struktur) ein wichtiges Charakterisierungskriterium [207]. Durch den Polymerabbau kommt es zu Änderungen:

1. chemischer Natur unter Bildung funktioneller Gruppen,
2. physikalischer Natur wie Molmassenabbau und verringerter Festigkeit sowie
3. biologischer Natur, z.B. Veränderung der Proteinadhäsion oder Zellbesiedlung.

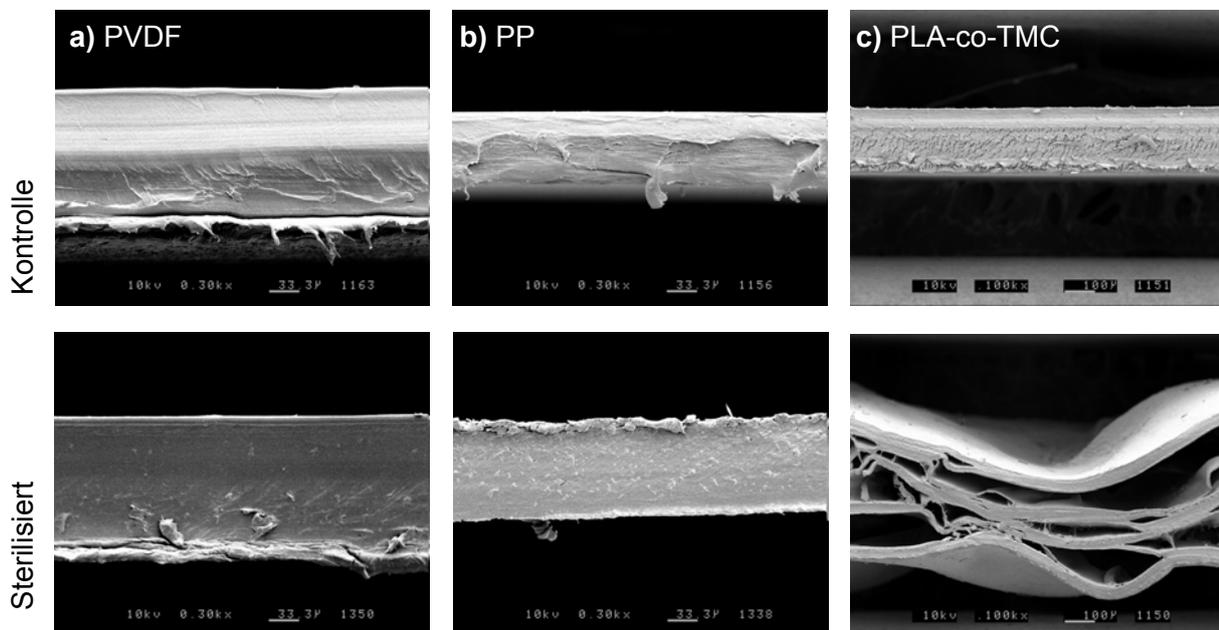
Diese Änderungen der Eigenschaften von Polymeren können mittels verschiedener Messtechniken nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Ergebnisse der Messungen werden in den nachfolgenden Abschnitten dargestellt und diskutiert. Die Ethylenoxidsterilisation (ETO) wurde als Referenzverfahren für Niedrig-Temperaturverfahren genutzt und die Polymermaterialien einem Standardzyklus ausgesetzt. Die Veränderungen werden denen des in dieser Arbeit untersuchten kombinierten Verfahrens mit CO<sub>2</sub> und Ozon gegenübergestellt. Die Prozessbedingungen wurden dabei aus den vorangegangenen Arbeiten in Abschnitt 6.1 übernommen (80 bar, 100 g/m<sup>3</sup> Ozon, 35°C, 220 min Behandlungszeit 1 % m/m Wasser). In einigen Untersuchungen erschien es sinnvoll, zusätzlich den Einfluss einer Behandlung ausschließlich mit Ozon zum Vergleich heranzuziehen. Die Prozessbedingungen waren dabei wie in den Versuchen zum kombinierten Verfahren gewählt, allerdings wurde bei Umgebungsdruck gearbeitet.

Zunächst werden in den Kapiteln 6.2.1 - 6.2.2 die topografischen, dann in den Kapiteln 6.2.3 - 6.2.4 die thermo-mechanischen und schließlich in den Kapiteln 6.2.5 bis 6.2.9 die chemischen Eigenschaften von Oberfläche und Bulk untersucht. Die biologischen Analysetechniken werden im gesonderten Abschnitt 6.3 behandelt.

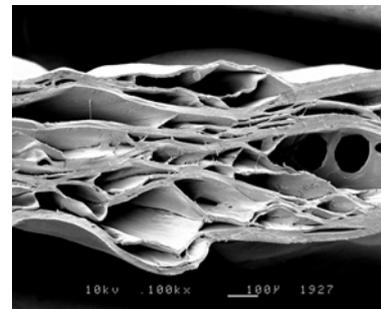
### **6.2.1 Elektronenmikroskopisch detektierbare Veränderungen**

Neben AFM-Untersuchungen, die im nächsten Kapitel diskutiert werden, kann man mit REM-Aufnahmen Polymeroberflächen im mikroskopischen Bereich topografisch charakterisieren. Zur Aufklärung der Veränderungen durch die Behandlungen wurden REM-Aufnahmen sowohl der Oberfläche (vgl. Anhang **Tabelle A3**) als auch der Schnittkanten (vgl. **Abbildung 19**) der Polymerfolien erstellt. Die Aufnahme der Folienoberfläche des PP zeigt in der 500-fachen Vergrößerung leichte, regelmäßige Unebenheiten in Form von bis zu 30 µm langen Querrillen. Die Aufsichtsaufnahme der Folienoberfläche des PVDF erscheint völlig glatt. Die Aufnahmen der Oberfläche der PLA-co-TMC-Folie zeigen leichte, unregelmäßige Unebenheiten, sowohl bei der behandelten als auch bei der unbehandelten Probe.

Während für die Proben von PVDF und PP weder in der Aufsicht noch für die Aufnahme des Querschnittes (vgl. **Abbildung 19 a** und **b**) ein Unterschied zwischen der Kontroll- und der mit CO<sub>2</sub>/Ozon sterilisierten Probe zu erkennen ist, sind die Veränderungen im Querschnitt der Folie aus PLA-co-TMC (vgl. **Abbildung 19 c**) besonders augenscheinlich. Der Querschnitt zeigt deutliche Aufwerfungen in der Folie, die teilweise die ursprüngliche Foliendicke um mehr als das Dreifache überschreiten. Um zu verdeutlichen, dass dieser Effekt durch die Nutzung von CO<sub>2</sub> ausgelöst wird, wurde eine zusätzliche Aufnahme der Schnittkante des PLA-co-TMC erstellt, die dieselben Veränderungen zeigt, wie die mit CO<sub>2</sub> und Ozon sterilisierte Probe.



**Abbildung 19:** REM-Aufnahmen bei 300-facher (100-fach bei PLA-co-TMC) Vergrößerung der Polymer-Querschnitte im Vergleich. Die sterilisierte Probe (untere Reihe) wurde bei 35 °C und 80 bar mit 100 g/m<sup>3</sup> Ozon für 220 min. behandelt. Das rechts abgebildete PLA-co-TMC wurde ohne Ozon bei o.g. Bedingungen behandelt.



Nalawade et al. [208] diskutieren in ihrem Übersichtsartikel, dass Kohlendioxid in Abhängigkeit vom Druck und der Temperatur in Polymere diffundiert und dort als Weichmacher wirkt. Während sich in CO<sub>2</sub> nur wenige, zumeist niedermolekulare hydrophobe Substanzen lösen [209], sind Polymere zumeist unlöslich. Die Löslichkeit des Fluids in Polymeren kann jedoch erheblich sein. Oberhalb des Glaspunktes von PP kann die Aufnahmekapazität des Polymer für CO<sub>2</sub> bei etwa 100 bar ca. 5 % m/m betragen [210]. Bei einer Temperatur über dem Schmelzpunkt um 160 °C wird bei gleichem Druck etwa ein Drittel mehr Kohlendioxid aufgenommen. Wird der Druck auf 200 bar erhöht, verfünffacht sich die CO<sub>2</sub>-Aufnahme. In einer Übersichtsarbeit von Tomasko et al. [211] werden für PP selbst oberhalb 160 °C nur etwa 1 % m/m bis 2 % m/m CO<sub>2</sub> in Polymer gefunden.

Dieser Vorgang wurde in anderem Zusammenhang von Berens et al. [151] diskutiert, der für glasartige Polymere die Absorption von CO<sub>2</sub> im Polymer beschreibt, was zu einem Plastizierungseffekt führt, allerdings ist dieser Prozess reversibel. Für Polymilchsäure wurde gezeigt, dass das hochkristalline Homopolymer quasi nicht von CO<sub>2</sub> gequollen werden kann, während das amorphe Copolymer mit Glykolid eine starke Quellung zulässt [212]. Alle Arbeiten unterstreichen, dass CO<sub>2</sub> in nennenswerter Menge nur in die amorphen Bereiche eines Polymers eindiffundieren kann. Das in dieser Arbeit untersuchte Copolymer zeigt

ebenfalls eine starke Deformation, die wahrscheinlich auf vorangegangene Quellung zurückzuführen ist.

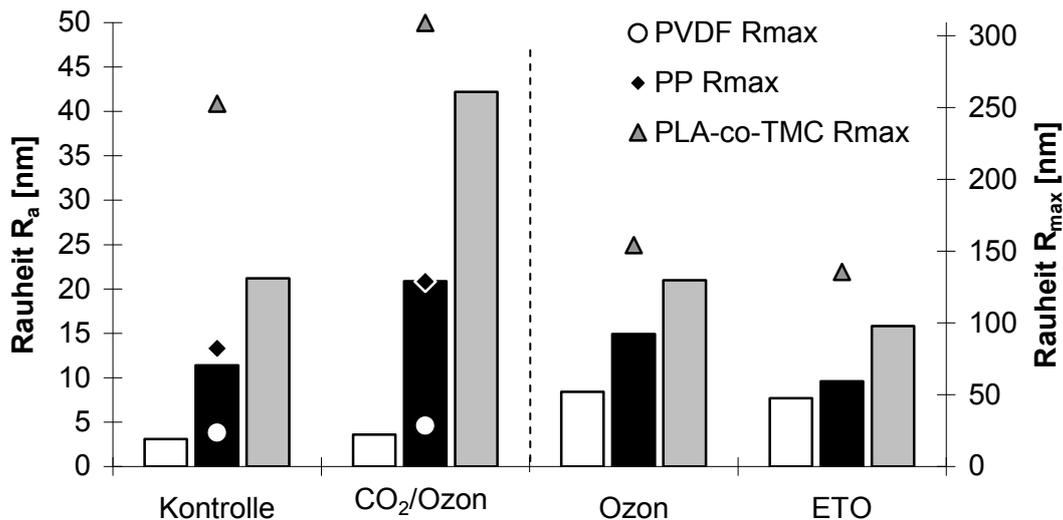
Die Aufwerfungen beim PLA-co-TMC sind also vermutlich darauf zurückzuführen, dass CO<sub>2</sub> bei der Hochdrucksterilisation in die fehlgeordneten Bereiche des Polymers diffundiert ist. Bei der anschließenden Entspannung ist das Ausdiffundieren des CO<sub>2</sub> aus dem Polymer gehemmt, wobei die mit der Druckabsenkung einhergehende Dichteänderung des Fluids vom überkritischen in den gasförmigen Zustand zu einer Aufblähung des Polymers führt. Die Quellung von PLLA wird in anderen Untersuchungen genutzt, um poröses Material [162] als Ersatz von Schädelknochenanteilen herzustellen [45]. Auch in diesen Arbeiten wird postuliert, dass bei dem Verfahren nur der fehlgeordnete Anteil des Polymers gequollen wird.

Die Beobachtung der Aufwerfungen muss vor allem für die Interpretation der weiteren Oberflächenanalytik beachtet werden. Insbesondere für den Kontaktwinkel ist mit erheblichen Abweichungen vom Kontrollwert zu rechnen, die schon alleine aufgrund der geänderten Oberflächentopographie der PLA-co-TMC-Folie zustande kommen. Die Polymere PVDF und PP zeigen eine solch offensichtliche Veränderung nicht - auch liegen keine Publikationen vor, die von einer Quellung von PP oder PVDF unterhalb des Schmelzpunktes berichten.

### 6.2.2 Oberflächentopographie mittels Rasterkraftmikroskopie

AFM-Scans wurden erstellt, um Aussagen über den Einfluss der Sterilisation auf die Topographie der Polymerfolien treffen zu können. Der arithmetische Mittenrauwert ( $R_a$ ), entspricht der mittleren Abweichung vom Mittelwert. Die maximalen Rauheiten ( $R_{max}$ ) ergeben sich hingegen aus den größten Abweichungen in z-Richtung. Darüber hinaus ist das Flächenverhältnis ( $r > 1$ ) zwischen einer rauen Oberfläche und einer ideal glatten Oberfläche wichtig.

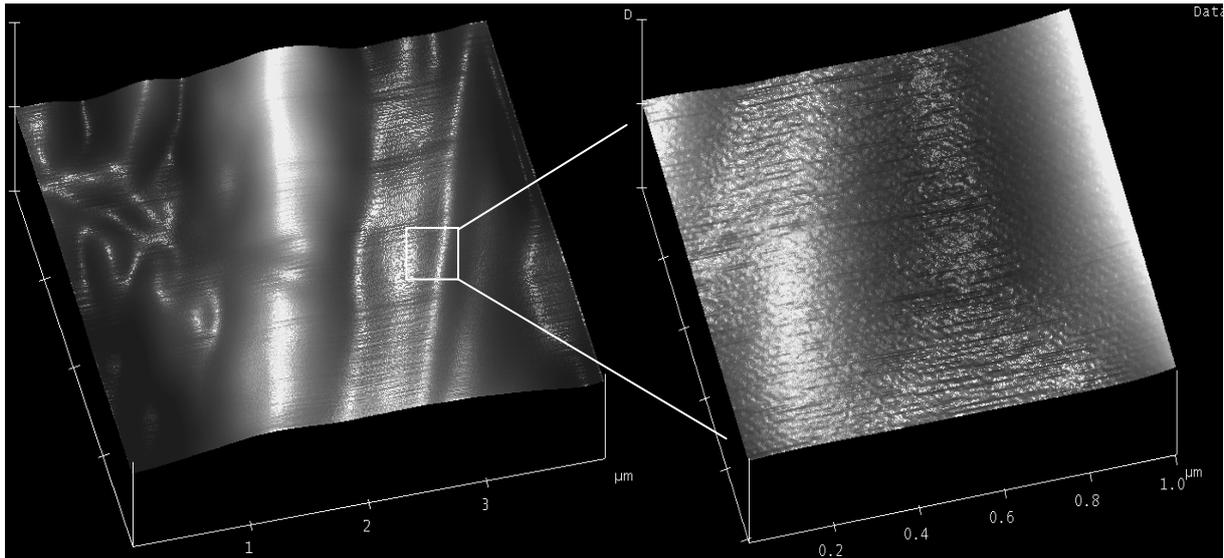
Bei allen sterilisierten Proben ist eine Änderung der Rauheiten zu erkennen - die Ergebnisse sind in **Abbildung 20** zusammengefasst. Nach CO<sub>2</sub>/Ozon-Sterilisation zeigt sich eine Zunahme sowohl in den durchschnittlichen als auch in den maximalen Rauheiten. Die (hier nicht dargestellten) Flächenverhältnisse bleiben bei allen Proben unterhalb 1,018. Bei den gezeigten Ergebnissen ist zu beachten, dass die Messungen der nur mit Ozon bzw. ETO behandelten PP- und PVDF-Proben zeitlich versetzt durchgeführt wurden, so dass nur die Werte der Kontrollprobe mit den Werten der CO<sub>2</sub>/Ozon Probe sowie die Werte der Ozonprobe mit denen der ETO Probe quantitativ vergleichbar sind.



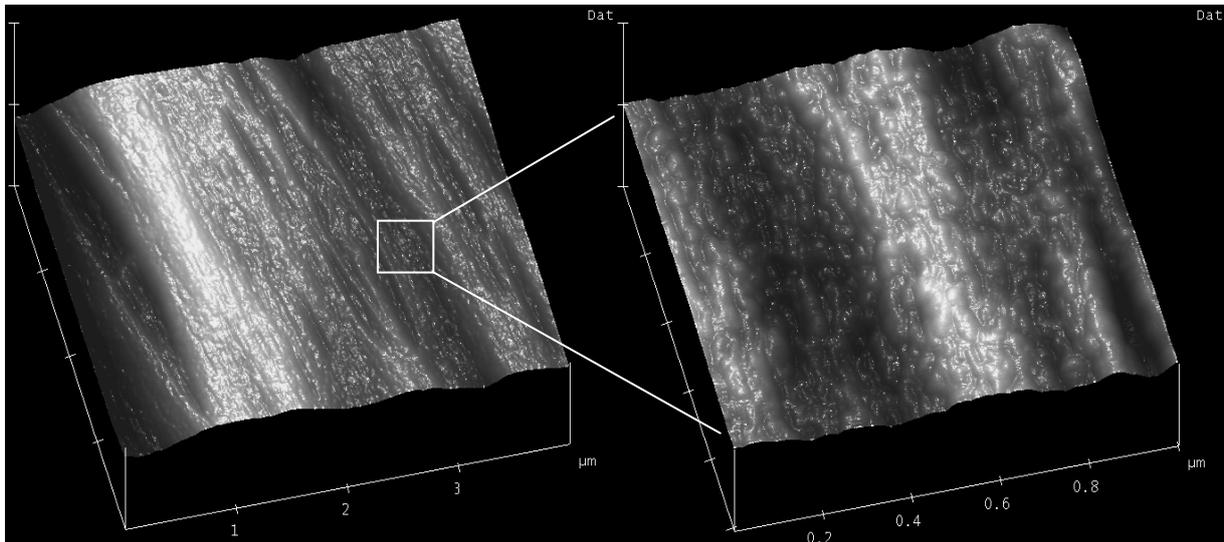
**Abbildung 20:** Vergleich der Rauheiten ( $R_a$  als Balken auf der linken Ordinate,  $R_{max}$  als Symbole auf der rechten Ordinate dargestellt) der Polymeroberflächen in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode - Übersichtsaufnahme (Messfleck 16  $\mu\text{m}$ ) mit  $n = 1$ .

Die augenscheinlichste Veränderung bei der PLA-co-TMC-Probe ist die klare Erhöhung der durchschnittlichen Rauheit durch die kombinierte Behandlung mit CO<sub>2</sub>/Ozon. Dies ist sowohl dem Diagramm zum Übersichtsscan als auch der Detailaufnahme zu entnehmen. Hingegen wurden die Rauheiten  $R_a$  des PLA-co-TMC weder durch die Ozon- noch durch die ETO-Sterilisation um mehr als 20 % verändert. Die Oberfläche der PVDF-Folie wurde laut **Abbildung 20** durch die CO<sub>2</sub>/Ozon Behandlung nur geringfügig verändert: In der Detailaufnahme erkennt man, dass kleinere Änderungen auch auf der PVDF-Folie induziert werden.

Außer PP zeigen alle Oberflächen nicht-periodische Strukturen. Beispielhaft sind hier die durch die Behandlungen bedingten Änderungen auf PP-Folien über AFM-Aufnahmen dargestellt (vgl. **Abbildung 21** und **Abbildung 22**). Der Messfleck betrug jeweils 1  $\mu\text{m}^2$  bzw. 16  $\mu\text{m}^2$ . Wie bei allen Folien ist auch hier die Tendenz einer Zunahme der Rauheit durch die kombinierte Behandlung von Ozon und CO<sub>2</sub> zu erkennen. Die monoaxiale Ausrichtung der Oberflächenstruktur der PP-Folie ist auf deren Längsverstreckung bei der Herstellung zurückzuführen und bleibt auch nach Behandlung deutlich sichtbar.



**Abbildung 21:** 3-D AFM-Scans der PP-Kontrollprobe - links Übersichtsaufnahme (Messfleck 16  $\mu\text{m}^2$ ), rechts Detailaufnahme (Messfleck 1  $\mu\text{m}^2$ ).



**Abbildung 22:** 3-D AFM-Scans der  $\text{CO}_2$ /Ozon behandelten PP-Probe - links Übersichtsaufnahme (Messfleck 16  $\mu\text{m}^2$ ), rechts Detailaufnahme (Messfleck 1  $\mu\text{m}^2$ ).

In einigen Forschungsarbeiten wurde beobachtet, dass durch eine UV/Ozon-Behandlung von PET [146] und PP [213] eine Aufrauung der Oberfläche stattfindet. Die Autoren führen dies auf die Bildung von niedermolekularen, an die Oberfläche gebundenen polymeren Abbauprodukten zurück. Diese können jedoch mit Wasser von der Oberfläche gewaschen werden, wodurch eine glattere Oberfläche als die des Ausgangsmaterials erhalten wird. Eine vergleichbare leichte Aufrauung wurde auch in vorliegender Arbeit gefunden. Die erhebliche Änderung des PLA-co-TMC ist ggfs. auf Deformation durch „Quellung“ oder andersartige Aufwerfung des Materials durch  $\text{CO}_2$  zurückzuführen, was erklären würde, warum die Proben, bei denen nur Ozon eingesetzt wurde, keine signifikante Veränderung der Oberflächentopografie aufweisen. Anhand von REM-Aufnahmen, die im Rahmen dieser Arbeit

angefertigt wurden, wurde diese Hypothese im letzten Kapitel diskutiert. Die quellende Wirkung von komprimiertem CO<sub>2</sub> auf PLA wurde in anderen Arbeiten bereits nachgewiesen [162, 214].

Die gezeigten, sehr unterschiedlichen Oberflächenrauheiten der Polymere können zu Fehlmessungen bei den Kontaktwinkeln führen und damit sind auch bei der Interpretation der Oberflächenenergien zu beachten [215]. Es muss gleichzeitig darauf hingewiesen werden, dass funktionelle Gruppen an der Oberfläche ebenfalls die Oberflächenenergie eines Polymers beeinflussen und die Differenzierung des Einflusses von chemischer und topographischer Komponente sich oft als schwierig erweist [216, 217]. Gerade bei implantierbaren Polymeren sind jedoch neben der Bestimmung der Oberflächenchemie und -topographie auch Tests zum biomedizinischen Verhalten der Polymere (Protein- und Zelladhäsion) wichtig. Da Zellen und andere biologische Systeme sowohl auf chemische als auch morphologische Stimuli reagieren, können sich Änderungen der Oberflächenrauheit auf die Qualität und Quantität der Zelladhäsion auswirken [147]. Von Andrews [27] wurde die Zunahme der Rauheit der Oberfläche mit verstärktem Anwachsen von L929 Fibroblasten korreliert. Man würde daher aufgrund vorliegender Ergebnisse ein verstärktes Anwachsen auf der Oberfläche der Polymere vermuten, die mit CO<sub>2</sub>/Ozon sterilisiert wurden. Daher wurde in vorliegender Arbeit in Tests zur Biokompatibilität untersucht, ob die gezeigten Veränderungen in der Polymertopographie eine Auswirkung auf das Anwachsverhalten von Fibroblastenzellen haben.

Die Analyse der strukturellen Eigenschaften hat einige der Änderungen bei den verschiedenen Polymeren sichtbar gemacht. Einzelne Mechanismen der Veränderung im Material sind bereits diskutiert worden. Weitere Untersuchungen zielen insbesondere auf die thermomechanischen Charakteristika der Polymere, die in den folgenden beiden Kapiteln mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie und Zugfestigkeitsmessungen ermittelt werden.

### **6.2.3 Thermische Analyse der Polymereigenschaften mittels DSC**

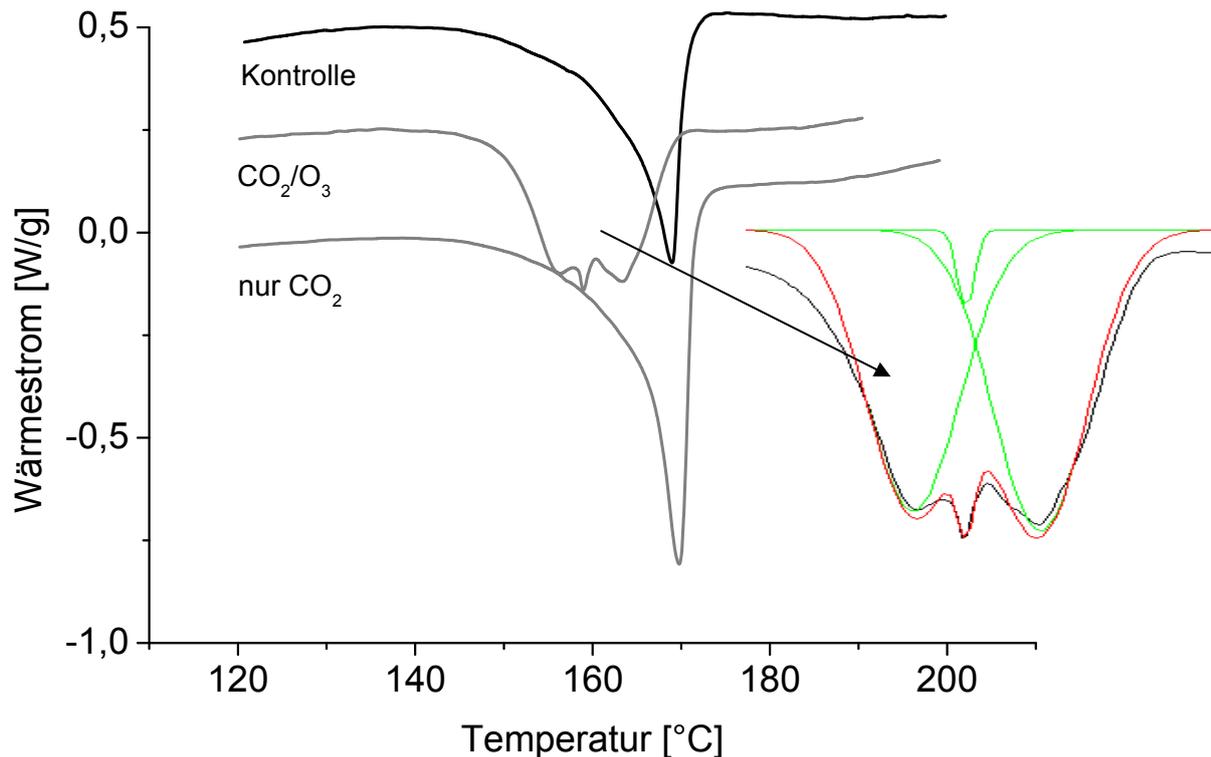
Temperaturabhängige Eigenschaften von Polymeren können im Wesentlichen durch den Schmelzpunkt ( $T_m$ ) und den Glasübergangspunkt ( $T_g$ ) beschrieben werden. In vorliegender Arbeit wurden hinsichtlich dieser Charakterisierungsmerkmale verschiedenartige Polymere untersucht. Während amorphe Polymere nur eine Glasübergangstemperatur besitzen, weisen kristalline Polymere zumeist auch eine ausgeprägte Schmelztemperatur auf. Beim Glasübergang teilkristalliner Polymere wird in den fehlgeordneten Bereichen die Kettensegmentbeweglichkeit „frei“ und die Wärmekapazität  $c_p$  ändert sich. Beim Schmelzen muss

Energie in das System eingebracht werden (die als Übergangsenthalpie  $\Delta H$  gemessen wird), um die kristallinen Bereiche des Polymers vom festen in den flüssigen Zustand zu überführen. Die Messungengenauigkeit des Verfahrens wurde durch Dreifachbestimmung für jedes Polymer bestimmt und betrug am Schmelzpunkt der Kontrollproben maximal  $\pm 1,4$  K. Die Abweichung vom mittleren  $\Delta H$  der Kontrollproben betrug maximal  $\pm 5,2$  %.

Die unbehandelte Kontrollprobe der PP-Folie zeigte einen wenig ausgeprägten Glasübergangsbereich-ähnliche, stufenartige Erhöhung bei  $44$  °C, die aber angesichts der Literaturwerte [218] von  $-20$  °C bis  $0$  °C zu hoch liegt ( $T_g$  kann sich jedoch durch Einlagerung niedermolekularer Substanzen – z.B. Weichmacher – erhöhen).  $T_m$  bei  $161,8$  °C stimmt hingegen gut mit dem Literaturwert ( $160$  °C bis  $165$  °C) überein. Laut o.g. Literatur beträgt  $\Delta H_{m0}$  von perfekt kristallinem PP(HD)  $205$  J/g. Daraus errechnet sich nach Gl. 12 [219] die Kristallinität  $K$  %:

$$K\% = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_{m0}} \cdot 100\% \quad \text{Gl. 12}$$

Für vorliegendes, unbehandeltes PP kann damit ein kristalliner Anteil von etwa  $35$  % errechnet werden. Kryshuk et al. [220] berichten, dass die Oxidationsrate von PP durch Ozon mit steigender Kristallinität verringert werden kann. Während bei fast allen PP-Proben bei einer Heizrate von  $10$  K/min nur ein Peak mit Schulter zu sehen ist (vgl. **Abbildung 23**), sind bei der mit  $\text{CO}_2$  und Ozon sterilisierten Probe eindeutig drei getrennte Maxima bei  $155$  °C,  $159$  °C und  $164$  °C zu erkennen. Die integrierten Peakflächen der Schmelzpeaks ergeben mit aufsteigender Temperatur Schmelzenthalpien von  $31,0$  J/g,  $1,5$  J/g und  $33,3$  J/g (summiert  $65,8$  J/g), während  $\Delta H_m$  der Einzelpeaks der anderen Folien um mehr als  $6$  J/g bis  $11$  J/g (also  $10$  % bis  $20$  %) höher liegen.

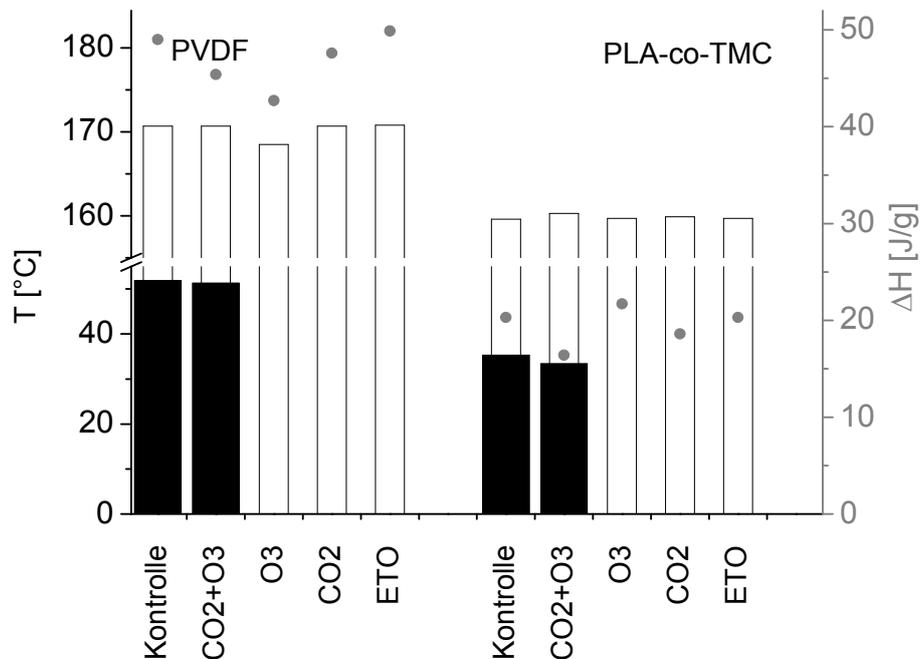


**Abbildung 23:** Vergleich der Schmelztemperaturen bei einer Aufheizrate von 10 K/min im Thermogramm (exotherm auf der Ordinate aufwärts) - in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode. Rechts stehend sind die Peakflächen der Einzelpeaks der Schmelzkurve von CO<sub>2</sub>/Ozon mittels *peak-fitting* mit der Gauss'schen Profilfunktion angenähert.

$T_m$  resultiert aufgrund der inhomogenen Kristallitgröße und -modifikationen bei vielen kristallinen und teilkristallinen Polymeren nicht notwendigerweise in einem scharfen Peak, sondern in einem Schmelzbereich. So schmelzen große Kristalle erst bei höheren Temperaturen als kleine. Drei Schmelzpeaks weisen beim PP daher entweder auf verschiedene Kristallmodifikationen und/oder Kristallitgrößen hin. Popov et al. [221] berichten von einer Schmelzpunkterniedrigung eines mit Ozon behandelten PP. Für eine chemische Alterung bei der PP-Folie spricht, dass auch nach der 1. Aufheizung noch Unterschiede in den Schmelzpeaks ( $T_m$  und  $\Delta H$ ) zu erkennen sind. Die Reduktion der beiden Werte kann aber auch für eine Vernetzung des Polymers sprechen, während die kristallinen Anteile die Festigkeit beeinflussen. Damit ist bei der sterilisierten PP-Folie im Streifenzugversuch von einer signifikanten Reduktion der Dehnung auszugehen.

Aus der 1. Aufheizung kann man Informationen über die thermische und mechanische Vorgeschichte sowie materialspezifische Eigenschaften gewinnen - beim nachfolgenden Aufheizen sieht man nur noch materialspezifische Eigenschaften [219]. Um Schmelzpunkte gut zu erkennen, wurde zunächst mit langsamer Heizrate (1 K/min) gearbeitet. Anschließend wurde mit 10 K/min aufgeheizt, um ein starkes  $\Delta H_m$ -Signal zu erhalten. Insbesondere wurde in vorliegenden Untersuchungen Augenmerk auf physikalische und chemische Alterung der

sterilisierten Polymere gelegt. Die physikalische Alterung betrifft beispielsweise die Kristallstruktur und Kristallinität des Polymers [222], während bei der chemischen Alterung die chemische Struktur der Polymere verändert wird (Kettenspaltung, Vernetzung, Oxidation). Die Ergebnisse der thermischen Analyse der Polymere PVDF und PLA-co-TMC sind in **Abbildung 24** zusammengefasst.



**Abbildung 24:** Einflüsse der Behandlungsmethoden auf die Polymerfolien PVDF und PLA-co-TMC im Vergleich. Schmelzpunkte ( $T_m$  □) und Glaspunkte ( $T_g$  ■) sind auf der linken Ordinate dargestellt und Schmelzenthalpien ( $\Delta H$  ●) auf der rechten (gemessen bei 1 K/min).

Die für PVDF ermittelte Glasübergangstemperatur betrug  $51,9\text{ }^\circ\text{C}$  und die Schmelztemperatur  $167\text{ }^\circ\text{C}$ , wobei die Änderung der Schmelzenthalpie ( $\Delta H_m$ )  $48\text{ J/g}$  betrug.  $T_g$  lag damit leicht über und  $T_m$  leicht unter den von Ehrenstein [218] angegebenen Durchschnittswerten ( $T_g = 40\text{ }^\circ\text{C}$ ;  $T_m = 170\text{ bis }175\text{ }^\circ\text{C}$ ) für PVDF. Die Kristallisationsenthalpie von PVDF mit 100 % Kristallinität ( $\Delta H_{m0}$ ) beträgt laut Literatur [223]  $104,7\text{ J/g}$ . Damit errechnet sich ein kristalliner Anteil (K%) bei der Kontrollprobe des vorliegenden PVDF von etwa 40 %. Bei keiner der untersuchten Behandlungen wurde eine oberhalb der Messungenauigkeit liegende Änderung von Schmelz- oder Glasübergangstemperatur ermittelt (der Glasübergangspunkt wurde nur für die Kontrollprobe und die kombinierte Behandlung mit  $\text{CO}_2$  und Ozon bestimmt). Die Übergangsenthalpie war nach der kombinierten Behandlung um etwa  $3\text{ J/g}$  niedriger und nahm nach der reinen Ozonbehandlung um insgesamt  $6\text{ J/g}$ , und damit signifikant gegenüber der Kontrollprobe, ab.

Es wurde gezeigt, dass der Einsatz von CO<sub>2</sub> hier keinen verstärkenden Effekt auf die polymerschädigende Wirkung des Ozons hat. Dies war auch nicht anzunehmen, da für PVDF ein Schmelzen bei den in dieser Arbeit untersuchten Temperaturen (35 °C) und CO<sub>2</sub>-Druck (80 bar) ausgeschlossen wird ( $T_m > 160$  °C). Es ist lediglich bekannt, dass bei 485 bar die Schmelztemperatur von PVDF um etwa 23 °C reduziert werden kann - bei 83 bar und 140 °C wird immer noch ein messbares Schmelzen an der Polymeroberfläche detektiert, was in einem reduzierten Schmelzpunkt und kleinerem  $\Delta H$  und damit verminderter Kristallinität resultiert [223].

Behandeltes PLA-co-TMC weist keinen signifikant von der Kontrollprobe abweichenden Schmelzpunkt auf. Der Glaspunkt bei der mit CO<sub>2</sub> und Ozon behandelten Folie liegt geringfügig (2 K) niedriger und die Schmelzenthalpie um etwa 20 %. Alle Proben weisen im Gegensatz zu dem sterilisierten PP nur einen Schmelzpunkt auf. Wie für PLLA gezeigt wurde [224], kann die Änderung der Kristallisationsenthalpie genutzt werden, um Änderungen in der Kristallinität des Polymers anzuzeigen. Aus eben genannter Literatur wurde ein  $\Delta H_m$ -Wert für PLLA von 93,6 J/g herangezogen. Es errechnet sich aus Gl.12 eine Kristallinität der Kontrollprobe von ca. 21 %. Bei der mit CO<sub>2</sub> und Ozon behandelten Probe nimmt die Kristallinität um etwa 20 % (auf  $K = 17$  %) gegenüber der Kontrollprobe ab. Generell ist jedoch zu beachten, dass die Änderung von  $\Delta H_m$  nur als Orientierungshilfe für die Änderung der Kristallinität zu sehen ist. Eine ausführliche Analyse der Kristallinität könnte durch eine Röntgen-Weitwinkelstreuungsmessung (WAXS) erfolgen.

Während bei  $T < T_g$  Polymermoleküle nur eine geringe Kettensegmentbeweglichkeit aufweisen, haben bei  $T > T_g$  insgesamt die Polymerketten amorpher Bereiche und der fehlgeordnete Anteil von teilkristallinen Polymeren eine höhere Beweglichkeit (Translations-, Rotations- und Diffusionsvorgänge). Sie werden also beim Überschreiten von  $T_g$  von glasig erstarrt in eine Polymerschmelze überführt – dabei ist im Thermogramm ein Änderung von  $c_p$  abzulesen. Die Stufenhöhe bei  $T_g$  ist proportional der  $c_p$ -Änderung, wobei eine hohe  $c_p$ -Änderung auf einen hohen fehlgeordnete Anteil hinweist (hohe Zähigkeit). Bei der behandelten Probe wurde ein etwa 20 %-iger Anstieg des fehlgeordneten Anteils ermittelt. Exotherme Peaks in der Aufheizkurve des PLA-co-TMC unterhalb der Schmelztemperatur können auf temperaturbedingte, kleine Kristallite hinweisen.

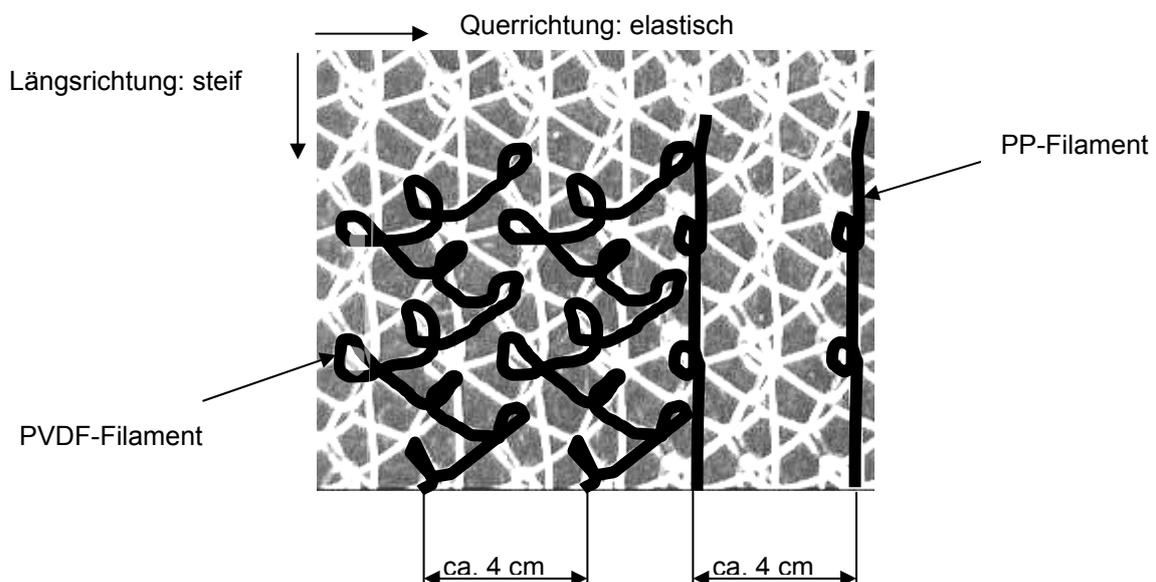
Bach et al. [153] diskutieren, dass bei nicht thermofixierten PET-Fasern das Eindiffundieren von CO<sub>2</sub> als Quasi-Verunreinigung wirkt und damit eine Schmelzpunktniedrigung einhergeht. Sie postulieren, dass eine Änderung der Kristallitstruktur stattfindet und dass auch

nach Druckabsenkung insbesondere die Modifikation des fehlgeordneten Anteils des Polymers erhalten bleibt [158].

#### 6.2.4 Mechanische Eigenschaften: Zugfestigkeit und Dehnung

Die thermische Analyse führt zu der Vermutung, dass es - insbesondere durch die CO<sub>2</sub>/Ozon-Sterilisation - zu einer chemischen Alterung des PP kommt, welche durchaus die Festigkeit des Materials beeinflussen kann. Die Streifenzugversuche wurden statt an Folien an Implantatnetzen "Dynamesh®-IPOM" durchgeführt, um den Praxisbezug herzustellen. Die Netze sind so konstruiert, dass entsprechend der physiologischen Dehnungseigenschaften der Bauchwand [176, 225] unterschiedliche Hauptachsen in Längs- und Querrichtung resultieren. Sie sind aus überwiegend (88 %) PVDF- und aus einem geringen Anteil (12 %) PP-Filamenten aufgebaut. Die sich in Querrichtung ergebende hohe Elastizität wird durch den Strukturaufbau des Netzes über die PVDF-Fäden realisiert, in Längsrichtung wird die Elastizität dagegen durch die fast gestreckt liegenden PP-Fäden eingeschränkt (vgl.

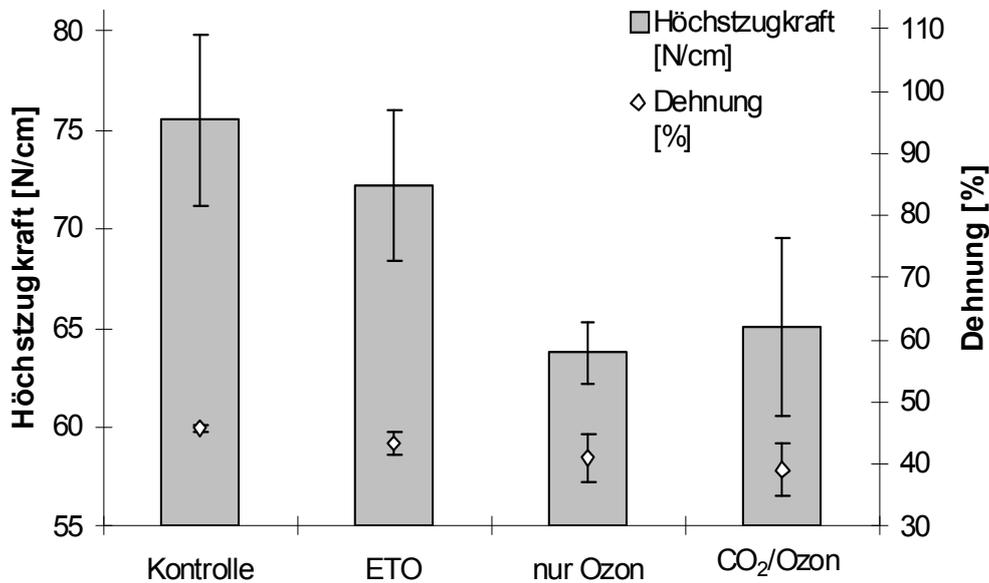
**Abbildung 25).**



**Abbildung 25:** Aufbau von Dynamesh®-IPOM-Geflechtes. Die steife Längsrichtung ist bestimmt durch PP-Filamente, die elastische Querrichtung durch locker geflochtene PVDF-Filamente.

Um die Materialien besser benennen zu können, wird die Untersuchungsrichtung im Streifenzugversuch jeweils mit dem Namen des Polymers bezeichnet, das die Eigenschaft bestimmt. Somit wird die Längsrichtung kurz als PP und die Querrichtung als PVDF bezeichnet. Es wurde die Höchstzugkraft in N/cm sowie die Dehnung bei Bruch in % jeweils als Mittelwert dreier Wiederholungsmessungen bestimmt. Die Ergebnisse für PP (längs) sind in **Abbildung**

26; die Ergebnisse für PVDF (quer) in **Abbildung 27** dargestellt. Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalierungen, welche die Unterschiede in der Festigkeit und Dehnung verdeutlichen. So wurden jeweils unbehandelte Kontrollproben mit den in CO<sub>2</sub> und Ozon sterilisierten Netzen sowie mit den nur mit Ozon behandelten Proben verglichen. Als Referenz wird eine Gruppe von mit ETO sterilisierten Polymeren herangezogen.

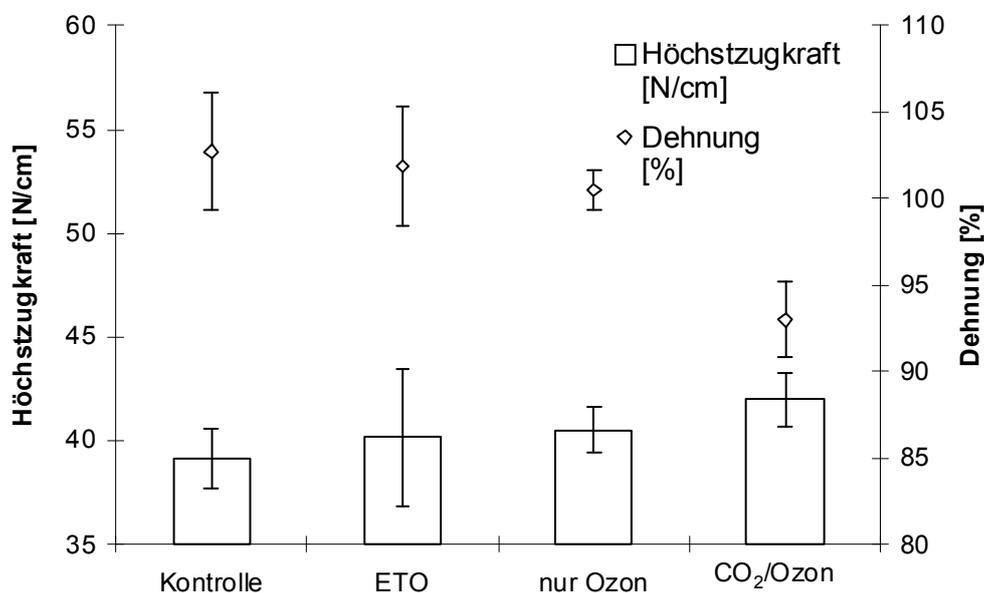


**Abbildung 26:** Höchstzugkraft (linke Ordinate) und Dehnung (rechte Ordinate) von Dynamesh-IPOM®-Geflechtes. In steifer Ausrichtung mit erhöhtem PP-Anteil in der Gegenüberstellung der Sterilisationsmethoden (n = 3).

Die unbehandelten Testgeflechte in Längsrichtung (PP) zeigen eine Höchstzugkraft von ca. 76 N/cm und eine Dehnung von 46 % (vgl. **Abbildung 26**). Die Referenzbehandlung mit ETO führt sowohl bei der Höchstzugkraft als auch bei der Dehnung im Vergleich zur Kontrollgruppe nur zu einer insignifikanten Abnahme. Wird nur mit Ozon behandelt, nimmt die Zugkraft signifikant auf 64 N/cm ab. Die Dehnung sinkt - nur insignifikant - auf 41 %. Die kombinierte CO<sub>2</sub>/Ozon-Behandlung induziert eine verringerte Höchstzugkraft von nur noch 65 N/cm. Die Dehnung sinkt - jedoch nicht signifikant. Die Werte für die Dehnung der beiden letztgenannten Behandlungen sowie die Festigkeit nach der CO<sub>2</sub>/Ozon-Behandlung zeigen eine große Schwankungsbreite und sind daher statistisch insignifikant - eine abnehmende Tendenz ist jedoch klar erkennbar. Es findet somit - außer bei ETO - eindeutig eine negative Beeinflussung der untersuchten Festigkeitsparameter statt.

Für so genannte IPOM-Netze liegt der Mindestanspruch bezüglich Festigkeit bei > 31 N/cm [225]. Die nach den Behandlungen festgestellte Höchstzugkraft lag folglich, trotz deutlicher Verringerung gegenüber der Kontrollprobe, noch klar über dem geforderten Wert. Damit ist bei keinem der Verfahren der Minimalwert unterschritten worden.

Wie bereits in Kapitel 6.2.3 bei der thermischen Analyse vermutet wurde, ist es jedoch durch die Behandlung mit Ozon und CO<sub>2</sub>/Ozon zu einer deutlichen chemischen Alterung des PP gekommen. Nun wurde gezeigt, dass diese Alterungserscheinungen auch die Festigkeit des Produkts beeinflussen [218]. Der Effekt wurde bereits von Wang [226] gezeigt, der mittels Ozon PP-Membranen hydrophilierte, die schon nach weniger als 5 min Behandlung um bis zu 40 % ihrer Festigkeit einbüßten. Unterdessen wurden offenbar durch die ETO-Sterilisation die Zugfestigkeitseigenschaften nicht beeinflusst, was mit den Ergebnissen der thermischen Analyse korreliert und mit den Literaturdaten übereinstimmt [227]. Polypropylen gilt unter den medizinischen Polymeren als wenig stabil auch gegenüber anderen Methoden wie  $\gamma$ -Sterilisation. Diese führt wegen der durch Strahlung induzierten Reduktion der Dehnung zu drastischen Defekten bei sterilisierten PP-Implantaten [228].



**Abbildung 27:** Höchstzugkraft und Dehnung von Dynamesh-IPOM<sup>®</sup>-Geflechtes. In elastischer Ausrichtung mit erhöhtem PVDF-Anteil in der Gegenüberstellung der Sterilisationsmethoden (n = 3).

Die unbehandelten Geflechte in Querrichtung (PVDF) weisen eine Höchstzugkraft von ca. 39 N/cm und eine Dehnung von etwa 103 % auf (vgl. **Abbildung 27**). Bei der kombinierten CO<sub>2</sub>/Ozon-Behandlung wird die Höchstzugkraft - insignifikant - auf 42 N/cm erhöht. Die Dehnung allerdings sinkt um ca. 10 %. Die ETO-Sterilisation bzw. die Ozon-Behandlung induzieren keine veränderte Dehnung oder Höchstzugkraft.

Dass die deutliche Änderung der Dehnung durch das CO<sub>2</sub> alleine verursacht wurde, kann aufgrund umfangreicher Untersuchungen von Jimenez et al. [229] nahezu ausgeschlossen werden. Eine Interaktion mit dem Ozon ist aber wahrscheinlich, was auch die eigenen Ergebnisse aus den Kapiteln 6.1.1 - 6.1.2 zur Inaktivierung stützen. In einer umfangreichen Übersichtsarbeit [230] werden der ETO-Sterilisation nur Effekte auf extrem temperaturlabile und

einige hydrophile Beschichtungen zugeschrieben. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung stützen diese Aussage und zeigen kaum Änderungen der PP- und PVDF-Netze durch das alkylierende Gas. Allgemein gilt PVDF als eines der am besten zu sterilisierenden Polymere [231].

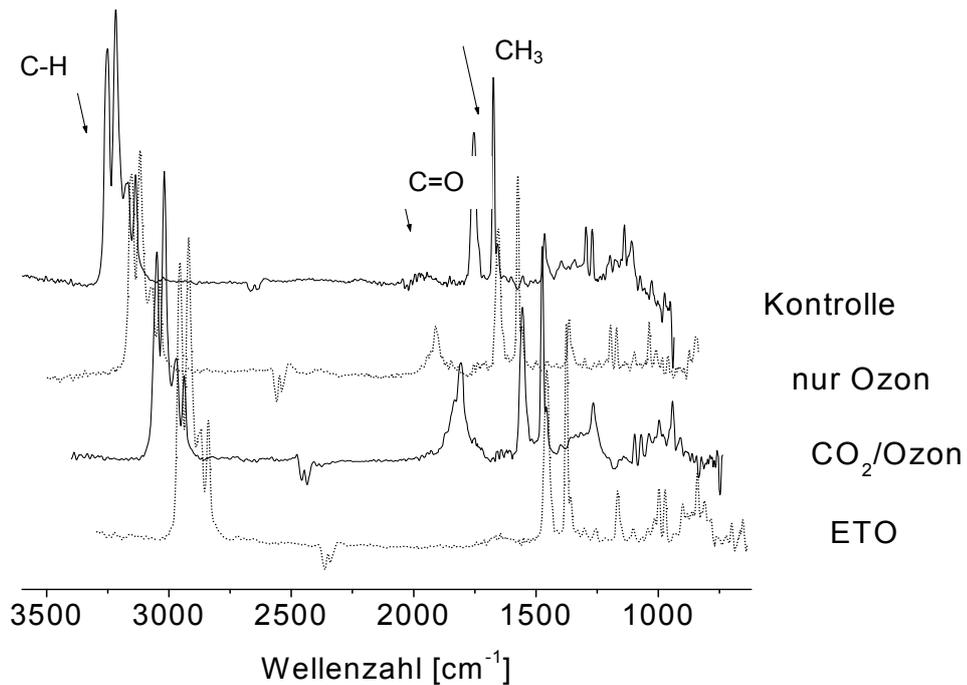
Während die bisherige Oberflächenanalytik insbesondere die topografischen Charakteristika der Materialien und deren Veränderungen aufgezeigt hat, sind in den letzten beiden Kapiteln zahlreiche Aspekte hinsichtlich der Festigkeit sowie der thermischen Eigenschaften der Polymere geklärt worden. Dabei wurden einige Fragen bezüglich der Ursachen für die gezeigten Veränderungen aufgeworfen. Diese Ursachen können nur mittels chemischer Analytik der Polymere, die in den nächsten Kapiteln beschrieben wird, besser verstanden werden.

### 6.2.5 FTIR-Spektroskopie chemischer Oberflächengruppen

Mittels ATR-FTIR wurden mögliche Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung der Polymere untersucht, die auf die Sterilisationsbehandlung zurückzuführen sind. Die Methode eignet sich besonders um nachzuweisen, ob durch die Behandlung neue chemische Gruppen oder Elemente in das Material eingebracht werden. Die Informationstiefe beträgt dabei wenige  $\mu\text{m}$ .

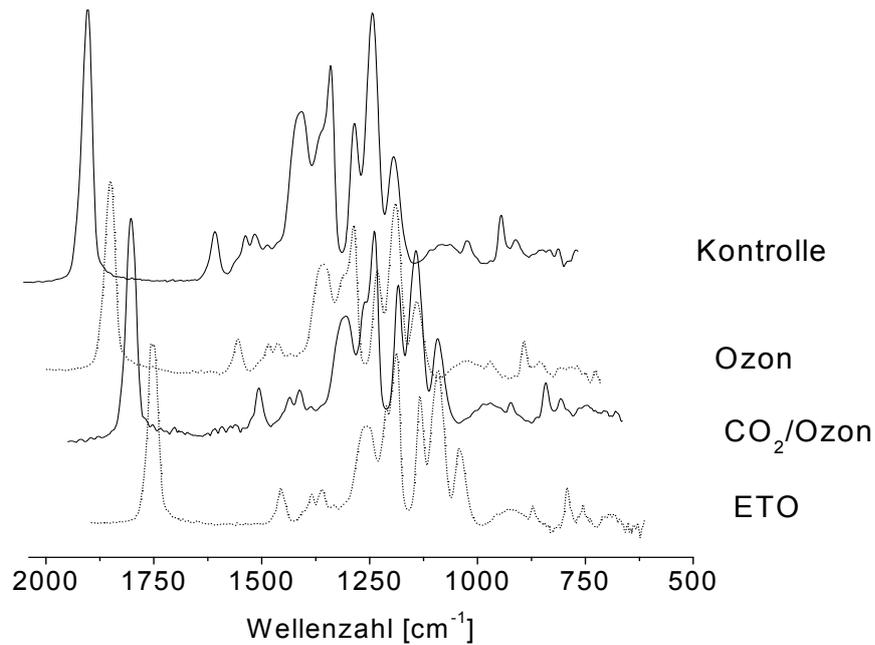
Durch Nutzung von Ozon als Sterilisationsmittel ist zu erwarten, dass zunächst die oberflächennahen Bereiche des Polymers oxidiert werden. Als Beispiel für einen stark oxidativen Angriff wurde eine Polypropylenfolie mittels  $\text{CO}_2$  und Ozon sterilisiert. Das Absorptionsspektrum ist - über die Wellenzahl aufgetragen - in

**Abbildung 28** dargestellt. Es zeigt bei einer Wellenzahl um  $1710\text{ cm}^{-1}$  eindeutig Abweichungen zur Kontroll- und ETO-sterilisierten Probe, die auf Bildung von Carbonylgruppen ( $\text{C}=\text{O}$ ) bei PP schließen lassen.

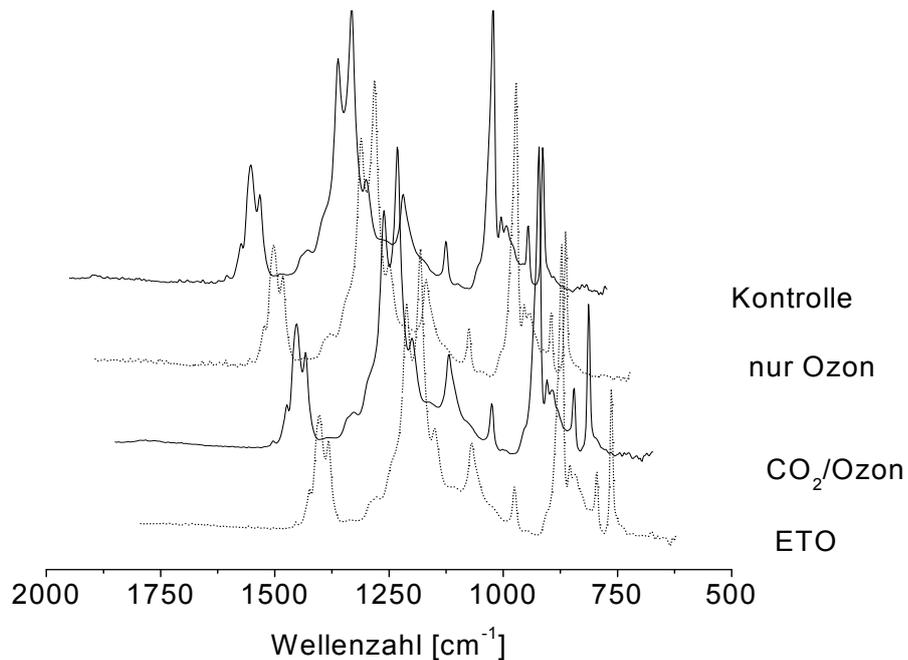


**Abbildung 28:** IR-Absorptionsspektren von PP. Kontrolle und nach unterschiedlichen Sterilisationsbehandlungen.

Bei grundsätzlich allen Proben sind erwartungsgemäß bei den behandelten und unbehandelten Polymermaterialien die CH<sub>2</sub>- (und CH<sub>3</sub>) -Banden im Bereich 1500  $\text{cm}^{-1}$  bis 1250  $\text{cm}^{-1}$  erkennbar sowie aliphatisches CH beim PP knapp unterhalb der Wellenzahl 3000  $\text{cm}^{-1}$ . Diese bleiben auch nach allen Behandlungen unverändert. Weder beim PLA-co-TMC (vgl. **Abbildung 29**) noch beim PVDF (vgl. **Abbildung 30**) kann eine signifikante Änderung gemessen werden. Bei einer Wellenzahl von ca. 1710  $\text{cm}^{-1}$  wird beim PLA-co-TMC die C=O Bande detektiert. Bei diesem Polymer werden keine Unterschiede in den Banden und nur marginale Unterschiede zwischen Kontrollproben und behandelten Proben in den Peakhöhen (-Intensitäten) ermittelt.



**Abbildung 29:** IR-Absorptionsspektren von PLA-co-TMC. Kontrolle und nach unterschiedlichen Sterilisationsbehandlungen.



**Abbildung 30:** IR-Absorptionsspektren von PVDF. Kontrolle und nach unterschiedlichen Sterilisationsbehandlungen.

Von den in dieser Arbeit untersuchten Polymeren wurde nur auf den PP-Folien eine wesentliche Änderung der über IR-Spektroskopie messbaren funktionellen Gruppen im Oberflächenbereich von wenigen  $\mu\text{m}$  ermittelt. Insbesondere wenn keine neuen Elemente eingebracht werden, können Veränderungen, die sich nur im nm-Bereich der Oberfläche und damit oft in geringen Konzentrationen vollziehen, besser mittels Röntgen-Photoelektronenspektroskopie (XPS) wegen der niedrigen Nachweisgrenze der Methode erfasst werden. Daher

ist mittels XPS (Informationstiefe bis ca. 10 nm) bzw. Kontaktwinkelmessungen in den folgenden Kapiteln zu überprüfen, welche Modifikationen der unmittelbar oberflächennahen Schicht stattfinden.

Die Ozonisierung von PP wurde u.a. von Ouslati [232] mittels FTIR untersucht und die Mechanismen der Entstehung funktioneller Gruppen diskutiert. Die beim Ozonzerfall entstehenden Radikale können in Polymeren zur Bildung weiterer Polymerradikale unter Spaltung chemischer Bindungen führen. Sind diese Radikale nicht durch Vernetzungsreaktion der Polymerketten untereinander abzusättigen (wird zumeist nur in Plasmen unter Sauerstoff-Abschluss erreicht), entstehen mit dem vorhandenen Ozon, Luftsauerstoff oder weiteren Sauerstoff-Radikalen, Peroxid-Gruppen [233]. Diese Peroxid-Gruppen können ihrerseits zu Hydroxyl-, Carbonyl- oder Carboxyl-Gruppen weiterreagieren [234]. Die mögliche Bildung dieser Gruppen wird im Kapitel 6.2.9 eingehend diskutiert; der Nachweis für die Entstehung muss jedoch zunächst analytisch erbracht werden. Eine quantifizierende Abschätzung kann aber schon anhand der Benetzungsfähigkeit der Polymere getroffen werden.

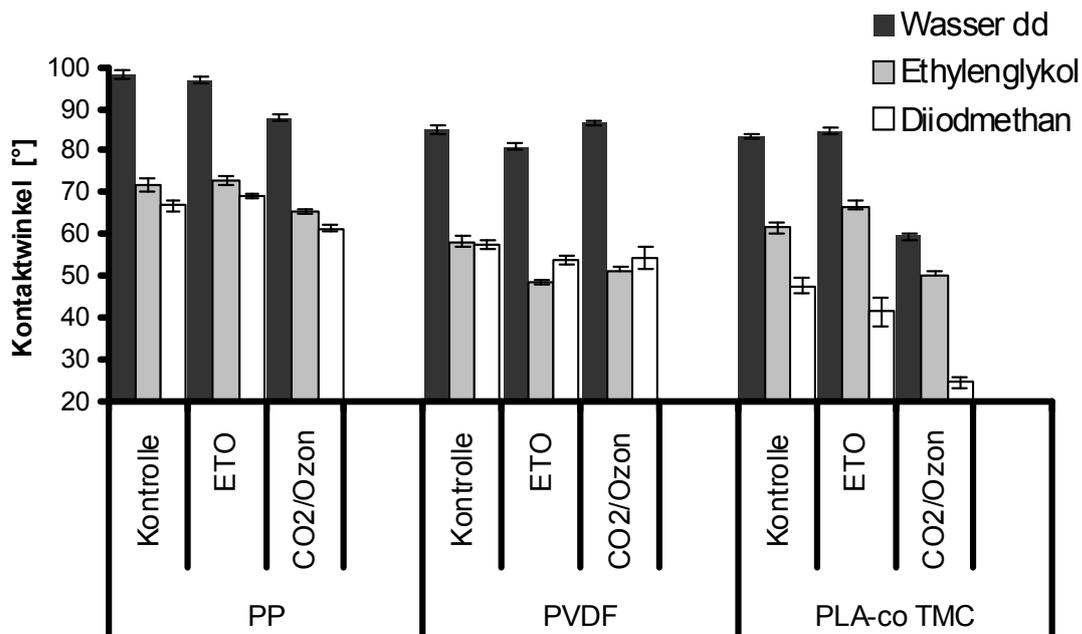
### 6.2.6 Kontaktwinkelmessung zur Bestimmung der Benetzbarkeit

Wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt wurde, können hydrophile Gruppen in hydrophobe Polymere wie PP eingebracht werden. Dies wird oft gezielt genutzt, um die polaren Wechselwirkungen polymerer Oberflächen zu erhöhen, die ein Material - zumeist mit wässrigen Lösungen - eingehen kann [235]. Des Weiteren muss in Betracht gezogen werden, dass auch durch Änderung der Rauheiten, wie in Kapitel 6.2.2 gezeigt, die Ausprägung der Wechselwirkungen beeinflusst werden können [236].

Zunächst werden hier die Kontaktwinkel betrachtet, die das jeweilige Polymer an der Grenzfläche mit den Benetzungsmitteln bildet. Wasser hat dabei eine hohe Oberflächenspannung (72,8 mN/m) und einen relativ hohen polaren Anteil. Ethylenglykol weist eine Oberflächenspannung von 47,7 mN/m auf und etwa gleiche polare und disperse Anteile; schließlich Diiodmethan, das eine Oberflächenspannung - ähnlich dem Ethylenglykol - von 50,8 mN/m hat, was aber ausschließlich dem dispersen Anteil zuzurechnen ist (vgl. Kap. 5.2.3, **Tabelle 4**).

Der Kontakt- (oder Rand-) winkel  $\Theta$  von Wasser auf unbehandeltem PP (vgl. **Abbildung 31**) betrug 98,2°. Nach der ETO-Behandlung ergab sich nur eine insignifikante Abnahme. Bei kombinierter CO<sub>2</sub>/Ozon-Sterilisation hingegen wurde die Oberfläche erheblich hydrophilisiert und der Kontaktwinkel um ca. 10° verringert. Die Bestimmung des Kontaktwinkels von Ethyl-

lenglykol auf unbehandeltem PP ergab 71,7°. Aus der kombinierten CO<sub>2</sub>/Ozon-Sterilisation resultiert ein um ca. 6,4° verringerter Randwinkel. Der Kontaktwinkel von Diiodmethan auf unbehandeltem PP wurde mit 66,8° ermittelt. Die ETO-Behandlung führte zu einer Erhöhung auf 69,2°. Durch die CO<sub>2</sub>/Ozon-Sterilisation wird der Kontaktwinkel auf 61,2° vermindert. Die gezeigten Ergebnisse weisen auf eine deutliche Veränderung der PP-Oberflächen hin. Aus **Abbildung 31** ist hervorzuheben, dass die Kontaktwinkel mit Diiodmethan auf allen Polymeren starken Schwankungen unterliegen.



**Abbildung 31:** Vergleich der Benetzungseigenschaften der Polymeroberflächen in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode: Mittelwerte (n = 3) der (fortschreitenden) Kontaktwinkel mit drei Benetzungsflüssigkeiten unterschiedlicher polarer und disperser Anteile: Wasser (schwarz), Diiodmethan (weiß) und Ethylenglykol (grau).

Die Benetzungseigenschaften von Implantaten oder Material für *tissue engineering* werden häufig durch die Einbringung von funktionellen Gruppen absichtlich modifiziert. So werden z.B. Hydroxy-, Amino-, oder Amidgruppen mittels Ozonisierung oder Plasmabehandlung zur Hydrophilierung auf Polymeroberflächen aufgebracht, um durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken die Adsorption von polaren Biomolekülen zu verbessern [237, 238]. Bei dieser Behandlung wird zielgerichtet - insbesondere der polare Anteil der Oberflächenenergie - heraufgesetzt [239], um die Benetzbarkeit und Haftfähigkeit zu erhöhen. Idealerweise werden bei der Sterilisation diese gezielt herbeigeführten Modifikationen nicht weiter verändert. Daher sind die gemessenen Veränderungen durch das CO<sub>2</sub>/Ozon-Verfahren kritisch zu betrachten, vor allem, da sie im Vergleich zur ETO-Sterilisation erheblich größer ausfallen.

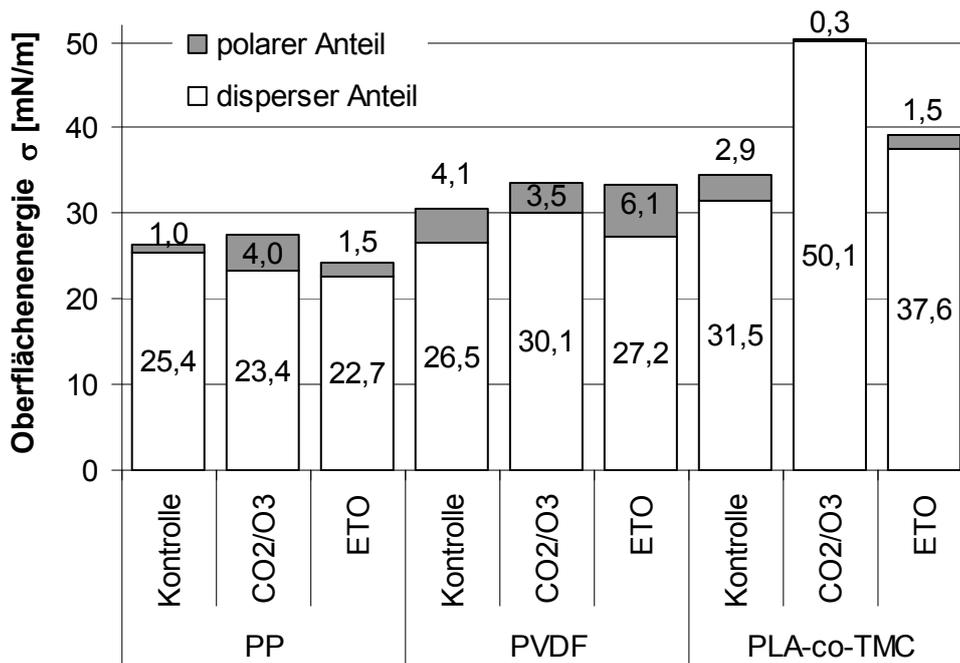
Der Kontaktwinkel von Wasser auf unbehandeltem PVDF (vgl. **Abbildung 31**) wurde mit 85,1° ermittelt und stimmt gut mit dem von Owens [189] gemessenen Wert von 82°, überein. Erwähnenswert ist lediglich die Herabsetzung des Randwinkels von Wasser auf 81,0° und

die Reduzierung des Kontaktwinkels von Ethylenglykol nach der ETO-Behandlung, während bei kombinierter CO<sub>2</sub>/Ozon-Sterilisation die Änderung der Benetzbarkeit - bis auf die durch Ethylenglykol - sehr gering ausfällt.

Der Kontaktwinkel von Wasser wurde von 83,3° bei unbehandelten PLA-co-TMC um fast 24° auf 59,4° durch die kombinierte CO<sub>2</sub>/Ozon-Sterilisation verringert. Auch der Randwinkel von Diiodmethan wurde um fast 24°, der von Ethylenglykol um 12° gesenkt. Nach der ETO-Behandlung ergab sich eine deutliche Verringerung des Kontaktwinkels von Diiodmethan um 8,5°. Der Randwinkel von Wasser wurde dabei nicht verändert.

Beim PVDF kann allenfalls von einem leichten Effekt der ETO-Behandlung gesprochen werden. Hier deutet sich eine minimale Hydrophilierung an. Der auffallend starke Effekt bei PLA-co-TMC mit allen Benetzungsmitteln durch die kombinierte Behandlung kann auf eine Änderung der Folienstruktur (Aufwerfungen - und damit deutliche Vergrößerung der benetzten Länge) zurückzuführen sein, wie in den Abschnitten zu den REM-Aufnahmen und der Oberflächentopographie (6.2.1 und 6.2.2) gezeigt wurde. In den FTIR-Spektren konnte kein Anhaltspunkt für eine chemische Modifikation gefunden werden - weitere Informationen werden hier die XPS-Ergebnisse im folgenden Kapitel oder der nasschemische Nachweis (Kapitel 6.2.8) bringen.

Aus den Kontaktwinkeln, welche die drei Flüssigkeiten auf der Polymeroberfläche bilden, wurden nach Owens-Wendt [189] die (kritischen) Oberflächenenergien ( $\sigma$ ) berechnet. Das Auswerteverfahren nach Owens-Wendt berücksichtigt, dass Grenzflächenenergien auf zwei verschiedenen Wechselwirkungen von Molekülen beruhen, nämlich auf den von permanenten Dipolen (polarer Anteil) und auf den von van-der-Waals- und London-Kräften (disperser Anteil). Der polare und disperse Anteil der Wechselwirkungen ist vergleichend in **Abbildung 32** in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode dargestellt. Um die Verlässlichkeit der durch Experimentaldaten ( $n = 3$ ) errechneten Geradengleichung (Gl. 8) zu überprüfen, wurde das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  hinzugezogen. In dieser Untersuchung können nur zwei Werte  $R^2 > 0,95$  nicht erfüllen. Bei PVDF (CO<sub>2</sub>/Ozon) mit  $R^2 = 0,85$  erscheint der disperse Anteil - auch in Anbetracht der Schwankungen der für Diiodmethan ermittelten Kontaktwinkel - mittels der angewandten Methode zu hoch. Dies gilt auch für PP (Kontrolle) mit  $R^2 = 0,93$ .



**Abbildung 32:** Disperser (weiß) und polarer (grau) Anteil der Oberflächenenergien von Polymerfolien in Abhängigkeit von der Sterilisationsmethode. Die Gesamtoberflächenenergie ergibt sich additiv aus beiden Anteilen.

Die Ergebnisse der Berechnung polarer und disperser Anteile der Polymeroberflächen in **Abbildung 32** zeigen, dass bei der durch CO<sub>2</sub>/Ozon sterilisierten PP-Probe die polare Komponente der Oberflächenenergie gegenüber der Kontrolle und der ETO-sterilisierten Probe deutlich zunimmt. Dies korreliert mit den über FTIR-Spektroskopie ermittelten sauerstoffhaltigen (hydrophilen) Oberflächengruppen.

Die Erhöhung des polaren Anteils des ETO-behandelten PVDF kann erst nach der XPS-Analyse im nächsten Kapitel diskutiert werden. Die Unterscheidung in polare und disperse Anteile hilft auch bei der Beantwortung der Frage, ob die ausgeprägte Veränderung des Kontaktwinkels beim PLA-co-TMC ausschließlich auf chemische oder physikalische Modifikation der Oberfläche zurückzuführen ist [71, 240]. Demgemäß muss die Erhöhung des dispersen Anteils unter Berücksichtigung der in der AFM-Analyse gezeigten Rauheiten diskutiert werden, da die Methode nach Owens-Wendt unter Verwendung der Young-Gleichung - streng genommen - nur für glatte Oberflächen anwendbar ist und nach Wenzel [241] für raue Oberflächen ein empirischer Koeffizient ( $r$  = Flächenverhältnis rauer zu ideal glatter Oberfläche) eingeführt werden muss:

$$\cos \Theta_r = r \cos \Theta \quad \text{Gl. 13}$$

Der entsprechende Kontaktwinkel  $\Theta$  für glatte Oberflächen kann auf diesem Weg nur berechnet werden, wenn die Tropfenauflagefläche komplett in Kontakt mit der Materialoberfläche

( $f_s$ ) steht, ansonsten muss nach dem Ansatz von Cassie und Baxter [242] gearbeitet werden, die die Fläche der Fehlstellen ( $f_a$ ), an der der Tropfen sich nur in Kontakt mit Luft befindet mit einbeziehen:

$$\cos \Theta_r = f_s \cos \Theta - f_a \quad \text{Gl. 14}$$

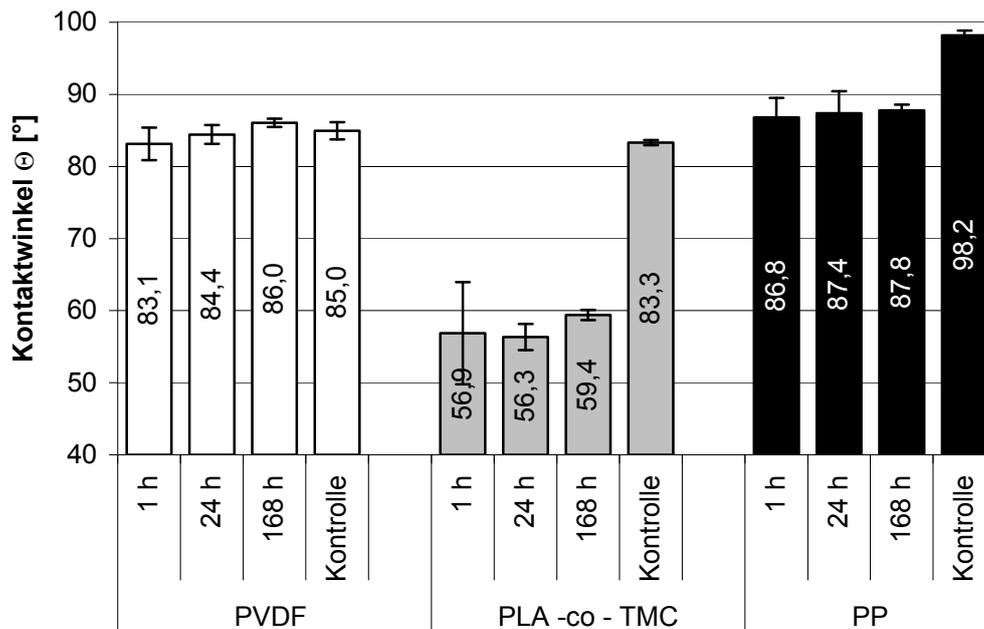
Oliver et al. [190] resümieren aus Ergebnissen anderer Autoren, dass die Rauheit erst oberhalb  $0,1 \mu\text{m}$  die Ausbildung des Kontaktwinkels signifikant beeinflusst. Sie finden in ihren eigenen Untersuchungen jedoch einen niedrigeren Grenzwert von  $0,05 \mu\text{m}$ . Arbeiten von Strobel et al. [243], Walzak et al. [1] sowie Morra et al. [244] gehen jedoch ebenfalls von einem Grenzwert von  $0,1 \mu\text{m}$  aus. Die in vorliegender Arbeit gefundenen AFM-Ergebnisse (Kapitel 6.2.1) zeigen für PP und PVDF mittlere Rauheiten (Rautiefen) von weniger als  $0,04 \mu\text{m}$  sowie maximale Rauheiten unterhalb  $0,1 \mu\text{m}$ . Die Rauheiten reichen damit nicht an die genannten Grenzwerte heran, womit die Ansätze von Wenzel sowie Cassie und Baxter nicht angewandt werden können - allerdings mit einer Ausnahme. Aus den REM-Aufnahmen der Folienquerschnitte geht hervor, dass die Oberfläche der mit  $\text{CO}_2$ /Ozon behandelten PLA-co-TMC-Folie erhebliche Aufwerfungen, teilweise im Bereich von einigen  $\mu\text{m}$  aufweist. Diese Rauheiten könnten (durch falsch zu niedrig bestimmte Kontaktwinkel) die drastische Erhöhung der Oberflächenenergie der behandelten Probe erklären. Für hydrophile Oberflächen kommt nur der Ansatz nach Wenzel in Frage, der jedoch unter Beachtung des Flächenverhältnisses  $r$  für das behandelte PLA-co-TMC nur marginale Änderungen in der Berechnung der Oberflächenenergien ergibt. Die zu hohe Bewertung des dispersen Anteils kann demnach auf die in 6.2.2 gezeigten Aufwerfungen, den damit entstandenen Hohlräumen und deren starke Benetzung durch das Diiodmethan (mit relativ niedriger Oberflächenspannung) zurückzuführen sein.

Die Hydrophilierung von Polymeroberflächen ist vielfach untersucht worden und ist für verschiedene technische Anwendungen bereits etabliert. Insbesondere für Verfahren, die nicht unter Sauerstoff-Ausschluss oder unter Vakuum arbeiten (dies sind zumeist industrielle Verfahren) wird beobachtet, dass die Hydrophilie abhängig von der Lagerzeit wieder absinkt. Nach Plasma-Behandlung konnte man dies an PET [245] und PP [246] zeigen. Es wird beobachtet, dass die behandelte Oberfläche wieder hydrophober wird - ein sogenannter Alterungseffekt oder *hydrophobic recovery* - den man auf zwei Phänomene zurückführt:

- a) Reorientierung der polaren Gruppen von der Oberfläche in die Bulkphase, bzw. unpolare Gruppen an die Oberfläche,
- b) Diffusion von niedermolekularen Polymerketten an die Oberfläche [247].

Für Plasma-behandelte HDPE-Folien gibt es weitere Interpretationen [248]. So wird die Adsorption von Kontaminationen aus der Umgebung an der Oberfläche oder Diffusion von

niedermolekularem, oxidiertem Oberflächenmaterial in die Bulkphase diskutiert [249]. Die Autoren postulieren, dass die thermodynamisch angetriebene Orientierung der hydrophilen Gruppen in die Bulkphase für PP und PET spätestens nach vier Tagen abgeschlossen ist. Im Folgenden wird untersucht, ob dieser Alterungseffekt auch für die CO<sub>2</sub>/Ozon-Sterilisation gefunden wird. Dazu wurden die Kontaktwinkel von Wasser auf den Folien sowohl 1 h als auch 24 h und 168 h nach der Behandlung ermittelt und mit den Kontaktwinkeln der Kontrollproben verglichen (vgl. **Abbildung 33**).



**Abbildung 33:** Abhängigkeit des Wasser-Kontaktwinkels von der Lagerzeit der mit CO<sub>2</sub>/Ozon sterilisierten Polymere im Vergleich zur unbehandelten Kontrollprobe (n = 3).

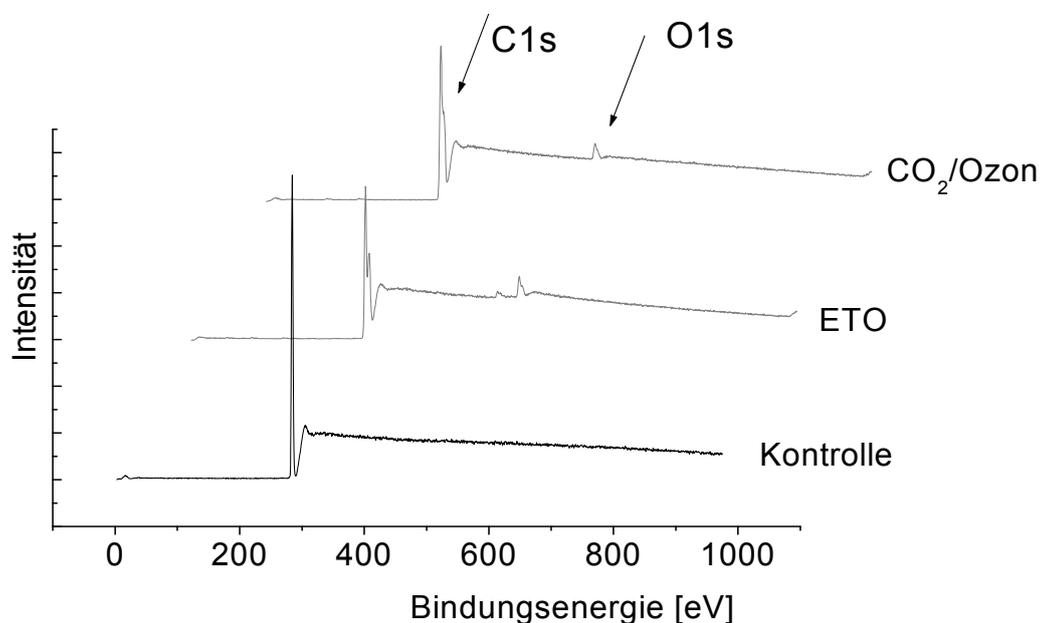
Es ist allenfalls eine Tendenz bei der Abhängigkeit der Hydrophilie der behandelten Polymeroberflächen von der Lagerzeit zu erkennen, die jedoch im Rahmen der Schwankungsbreite der Messwerte bleibt (vgl. **Abbildung 33**). Damit wurde gezeigt, dass bei dem untersuchten Verfahren - im Gegensatz zu Plasma-basierten Methoden - nur ein zu vernachlässigender Alterungseffekt im gewählten Zeitraum stattfindet. Dies ist auch für die weitere Analytik von Bedeutung, da die XPS-Messungen (vgl. 6.2.7) etwa eine Woche nach der Behandlung durchgeführt wurden.

### 6.2.7 Röntgen-Photoelektronenspektroskopische Oberflächenanalyse (XPS)

Während aus der FTIR-Analytik - eindeutig - lediglich hervorging, dass die PP-Folie nach der Sterilisation Carbonylgruppen aufweist, lassen die Ergebnisse aus den Kontaktwinkeluntersuchungen vermuten, dass auch bei den anderen Polymeren - zumindest an der Oberfläche - eine Veränderung durch die Sterilisationsmethoden stattgefunden hat. Die XPS-Analytik

erlaubt es, Aussagen über die chemische Zusammensetzung der Folien bis zu einer Informationstiefe von maximal 10 nm zu treffen und wird inzwischen standardmäßig zur Bewertung von sterilisations-induzierten Veränderungen von Polymeroberflächen eingesetzt [250]. Speziell, wenn bisher nicht im Polymer vorhandene Elemente auf die Oberfläche aufgebracht werden, wie im Fall der auf Ozon basierenden Sterilisation von PVDF ( $-\text{CH}_2\text{-CF}_2-$ ) und PP ( $-\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)-$ ), ist deren Quantifizierung mittels XPS gut erfassbar.

Die Übersichtsdarstellung wird bei eindeutigen Änderungen wie in **Abbildung 34** am Beispiel der XPS-Untersuchung an PP genutzt, um qualitativ darzustellen, dass durch die Sterilisations-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle die chemische Zusammensetzung der Oberfläche verändert wurde. Die Einflüsse der verschiedenen Behandlungen auf die Elementzusammensetzung der PP-Folie sind gegenübergestellt. Die beiden Hauptlinien, Sauerstoff (O1s) und Kohlenstoff (C1s) sind hervorgehoben. Schon in diesem Übersichtsspektrum ist eine Zunahme des Sauerstoffgehaltes und damit einhergehend eine Abnahme des Kohlenstoffs durch alle Behandlungen im Vergleich zur Kontrollprobe zu erkennen. Die C1s-Signale der behandelten Proben deuten im Gegensatz zur Kontrollprobe schon im Übersichtsspektrum eine Aufspaltung oder zumindest eine Schulter im Peak und damit eine Bindung des Kohlenstoffs an weitere Elemente an. Die Veränderung der Elementkonzentrationen und deren Bindungszustände werden nachfolgend anhand der Detailspektren näher betrachtet und quantifiziert.



**Abbildung 34:** Vergleich der XPS-Übersichtsspektren von PP-Folie in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode. Herausgestellt werden hier die Sauerstoff-1s- und die Kohlenstoff-1s-Linie.

Die Peakflächen repräsentieren die Elementkonzentration - dabei ist zu beachten, dass der Wirkungsquerschnitt der Photoionisation bei Sauerstoff ca. 2,85 Mal größer als bei Kohlenstoff ist [251].

Das C1s-Detailspektrum kann nach Beamson und Moulder [252, 253] in vier Regionen aufgeteilt werden. Als Referenzpeak wurde aliphatischer Kohlenstoff (C-C/C-H) gewählt und auf 285,0 eV ± 0,2 eV normiert. Die drei Hauptlinien der weiteren Kohlenstoff-Bindungszustände verschieben sich von diesem Referenzpeak bei

- Alkohol-/bzw Ether- oder peroxidischem Kohlenstoff (C-OR) auf 286,4 eV ± 0,2 eV,
- Carbonyl-Kohlenstoff (C=O) auf 289,2 ± 0,2 eV sowie
- Carboxyl-Kohlenstoff (O-C=O) auf 290,1 ± 0,2 eV.
- Beim PLA-co-TMC kommt des Weiteren ein Carbonat-Peak bei 290,1 ± 0,2 eV hinzu.

Das O1s Spektrum besteht aus zwei Hauptpeaks [249, 254]:

- Carbonylisch gebundener Sauerstoff (-C=O) bei 532,0 eV ± 0,2 eV und
- Ether- oder Hydroxyl Sauerstoff (-O-R) bei 533,4 eV ± 0,2 eV.

Weitere Elemente sind, wenn nicht gesondert erwähnt, entweder nicht vorhanden, oder lagen unterhalb der Nachweisgrenze der Methode von 0,1 Atom-%. Außerdem muss hier darauf hingewiesen werden, dass Wasserstoff durch die Methode nicht detektiert wird.

Die Elementzusammensetzung sowie die Anteile der O- und C-Bindungszustände wurden aus den PP-Detailspektren ermittelt und sind in **Tabelle 12** zusammengefasst. Die theoretische Elementzusammensetzung der Polymere errechnet sich aus der Strukturformel. Für unbehandeltes PP als Referenz wurde erwartungsgemäß 100 % Kohlenstoff gefunden. Im hoch aufgelösten C1s-Spektrum konnte nur aliphatisch gebundener Kohlenstoff detektiert werden. Durch die Behandlung der Polymerfolien verändert sich jeweils die Elementzusammensetzung. Generell sieht man, dass nach den Behandlungen die aliphatisch gebundene Kohlenstoff-Spezies in der Reihenfolge Kontrolle > Ozon/CO<sub>2</sub> > ETO für PP abnimmt. Demgegenüber erhöhte sich der O1s-Anteil in gleicher Reihenfolge.

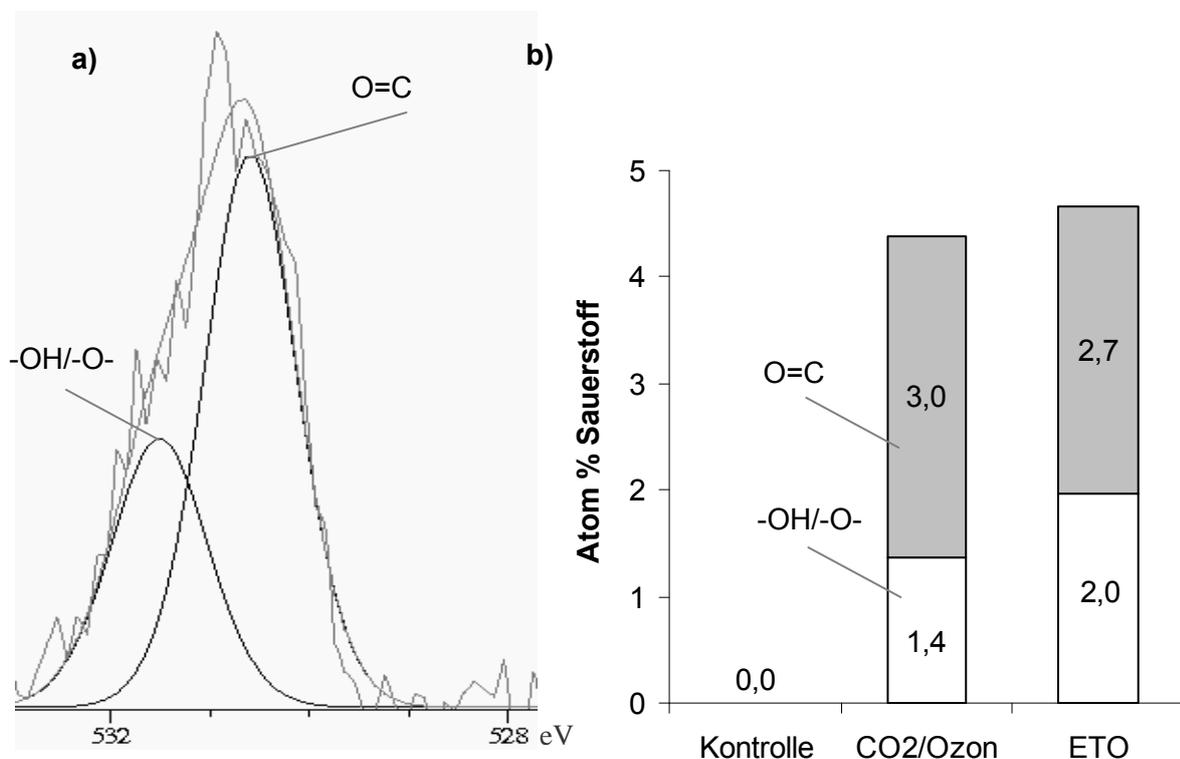
**Tabelle 12:** Oberflächenzusammensetzung (in Atom-%) der PP-Polymerfolie und Anteile der O- und C-Bindungszustände, nach unterschiedlichen Behandlungsmethoden.

	O1s				C1s		
	O=C	-O-/OH	Σ O	C-C/C-H	C-OR	Σ C	
Energie [eV]	532,4	531,2		285,0	286,4		
ETO	2,0	2,7	<b>4,7</b>	84,8	10,5	<b>95,3</b>	
CO <sub>2</sub> /Ozon	3,0	1,4	<b>4,4</b>	94,4	1,2	<b>95,6</b>	
<i>Kontrolle</i>	0,0	0,0	<b>0,0</b>	100,0	0,0	<b>100,0</b>	
<i>berechnet</i>	0,0	0,0	<b>0,0</b>	100,0	0,0	<b>100,0</b>	

Der Vergleich der XPS-Spektren zeigt, dass der C-Anteil des unbehandelten Polyolefins durch die CO<sub>2</sub>/Ozon-Behandlung von 100 % auf 95,6 % gesenkt wird, während der Anteil des Gesamtsauerstoffs sich auf bis zu 4,4 % erhöht. Aber nicht nur die Zusammensetzung, sondern auch die benötigte Ionisationenergie und damit die Bindungsarten der Elemente

wurden verändert. Wie **Abbildung 35 a** verdeutlicht, können im O1s-Spektrum zwei Bindungsarten des Sauerstoffs aufgelöst werden, während dies im C1s-Spektrum nicht möglich war. Die Anteile an carbonylisch gebundenem Sauerstoff sind, wie **Abbildung 35 b** dargestellt, höher als der Anteil der -O-/OH Bindungen.

Aus den Ergebnissen geht außerdem hervor, dass durch die ETO-Sterilisation mehr sauerstoffhaltige Gruppen auf die Polymer-Oberfläche eingebracht werden als bei der CO<sub>2</sub>/Ozon-Behandlung. Die Sauerstoff-Spektren zeigen dass die eingebrachten Gruppen jeweils von der Ionisierungsenergie etwas niedriger liegen, als die durch CO<sub>2</sub>/Ozon induzierten Hydroxyl-, Ether- oder Peroxid- sowie Carbonylgruppen. Bei allen genannten Gruppen handelt es sich um funktionelle Einheiten, die in der Lage sind, ein hydrophobes Polymer zur hydrophilieren. Wie an späterer Stelle ausführlich gezeigt wird, kann es durch Oxidation von Polyolefinoberflächen durchaus zur Bildung von COOH-Gruppen kommen [1, 213, 216]. Sofern Carboxylgruppen in das PP eingebracht worden sind, liegt deren Konzentration jedoch unterhalb der Nachweisgrenze des XPS oder die Gruppen sind vornehmlich in die Bulkphase diffundiert oder erst dort entstanden. Dass die Oxidation des Polymers auch Auswirkungen auf dessen Festigkeit hat, konnte in Untersuchungen mittels Zugtest festgestellt werden. Es ist deshalb davon auszugehen, dass sich der oxidative Effekt nicht nur auf die Oberfläche beschränkt.



**Abbildung 35: a)** O1s Spektrum von CO<sub>2</sub>/Ozon-sterilisierter PP-Folie. Die Peakfits (nach Gauss-Methode) sind jeweils markiert und zeigen die Bindungszustände des Sauerstoffs. **b)** Entwicklung der O1s Sauerstoff-Spezies auf der PP-Oberfläche in der Gegenüberstellung der Sterilisationsmethoden.

Für die um 531,2 eV gefundenen Sauerstoffgruppen werden in der Literatur OH-Gruppen [255] bzw. einfach an Kohlenstoff gebundener Sauerstoff [256] diskutiert, was auf Adsorption von ETO zurückzuführen sein könnten. Von OH-Gruppen ausgehend, sollte die Möglichkeit in Erwägung gezogen werden, dass durch die ETO-Sterilisation (bei der immer eine gewisse Feuchtigkeit eingestellt wird) durchaus Ethylenglykol auf der Polymeroberfläche gebildet werden kann [12, 257]. Dies wird gestützt durch Briggs [258] und weitere Autoren [259], die bei 532,3 eV gefundenen Sauerstoffgruppen auf Glycolverbindungen auf Polymeroberflächen zurückführen. Bei den um 531,2 eV gefundenen Sauerstoffgruppen könnte es sich laut Literatur auch um Carbonylgruppen handeln [254]. Allerdings wird dies durch FTIR-Messungen dieser Arbeit nicht bestätigt, hier wurden bei ETO-sterilisiertem PP keine derartigen Gruppen gefunden.

Beim PVDF wird, durch die im Vergleich zum Kohlenstoff höhere Elektronegativität des Fluors, die aliphatische Bindungslinie im Polymerverbund mit F von 285 eV nach 286,4 eV verschoben; der Kohlenstoff in der  $CF_2$ -Gruppe findet sich bei 290,7 eV [260]. Des Weiteren wird für das PVDF der Fluor-Peak bei 689,0 eV ermittelt. Die hier nachgewiesene Erhöhung sowohl des C/F- als auch des O/F-Verhältnisses bei den behandelten PVDF-Proben wird in einigen Arbeiten als Nachweis für eine „Beschichtung“ und damit einer Abdeckung des Fluorpolymers interpretiert [261, 262]. Dies könnte auf eine Adsorption von niedermolekularen, kohlenstoffhaltigen Kontaminationen (z.B. aus Abbauprodukten) auf die Polymeroberfläche zurückzuführen sein, wie dies schon für ozonbehandelte Polyolefine [1, 213] und Polystyrol [147, 148] ermittelt wurde. Im vorliegenden Fall könnte sich also die Fluorabnahme durch die "Bildung" und Ablagerung aliphatischen und oxidierten Kohlenstoffs erklärt werden. Die nach der ETO-Behandlung detektierte Erhöhung des C/F- und des O/F-Verhältnisses kann auch darauf zurückzuführen sein, dass Ethylenoxidderivate an der Polymeroberfläche angelagern, wie schon ausführlich von Moreira et al. [53] und in weiteren Arbeiten [263, 264] gezeigt wurde und am Beispiel der ETO-behandelten PP-Folie in dieser Arbeit. Die in vorliegender Arbeit detektierten Sauerstoffverbindungen der O1s-Linie korrespondieren zudem nicht mit sauerstoffgebundenen Kohlenstoffen der C1s-Linie. Gegen die Oxidation der Oberfläche spricht auch, dass die Kontaktwinkelmessungen für die ETO-behandelten Proben allenfalls eine leichte Hydrophilierung der Oberfläche andeuten. Auch die FTIR-Messungen zeigen keine oxidierten Gruppen durch die Behandlungen, was ebenfalls eher auf eine Schichtbildung, wahrscheinlich durch Adsorption, hindeutet, obwohl eine Erhöhung des O/C-Verhältnisses bei PVDF gezeigt werden konnte.

Auch das Spektrum und die Zusammensetzung der Folienoberfläche des PLA-co-TMC (vgl. **Tabelle 13**) lässt zunächst vermuten, dass bei der Behandlung mehr sauerstoffhaltige

Gruppen entfernt wurden als bei der Rekombination mit Ozon neu erzeugt worden sind. Da durch Ozonsterilisation jedoch eher eine Oxidation der Oberfläche anzunehmen ist, könnten die Ergebnisse auf die bereits diskutierten Effekt der Adsorption von niedermolekularem Material zurückzuführen sein.

**Tabelle 13:** Oberflächenzusammensetzung (in Atom-%) und Anteile der O- und C-Bindungszustände der Polymerfolie PLA-co-TMC: errechnete Gehalte unter Annahme eines Masseverhältnisses von 70:30 m/m%, Lactid:TMC. (\*auf den Folien fanden sich außerdem Kontaminationen durch Fluor, die vermutlich aus dem Herstellungsprozess der Folien stammen).

	<b>O1s</b>			<b>C1s</b>				
	<b>O-C</b>	<b>-O-/-OH</b>	<b>Σ O*</b>	<b>C-C/C-H</b>	<b>C-O</b>	<b>O-C=O</b>	<b>Carbonat</b>	<b>Σ C*</b>
Energie [eV]	532,0	533,4		285,0	286,4	289,2	290,7	
ETO	14,1	15,7	<b>29,8</b>	31,6	19,9	14,6	2,1	<b>68,2</b>
CO <sub>2</sub> /Ozon	15,8	16,1	<b>32,0</b>	27,9	20,4	13,6	2,7	<b>64,6</b>
<i>Kontrolle</i>	<i>13,6</i>	<i>19,3</i>	<b>33,0</b>	23,6	22,3	16,9	2,1	<b>64,9</b>

Durch die Berechnung der O/C-Verhältnisse der Polymerfolien wird nochmals verdeutlicht, dass insbesondere die kombinierte CO<sub>2</sub>/Ozon-Sterilisation und die ETO-Behandlung den Sauerstoffanteil von PP und PVDF heraufsetzen. Dagegen wurde das O/C-Verhältnis der PLA-co-TMC-Folie verringert. Dabei liegen die Veränderungen durch den CO<sub>2</sub>/Ozon basierten Prozess nicht höher als die durch ETO-Begasung induzierten Modifikationen. Es muss hier klar herausgestellt werden, dass eine abschließende Klärung bezüglich der Tiefe der Materialveränderung nur in Verbindung mit weiteren Analysen getroffen werden kann. Da durch die FTIR-Analytik nur für die PP-Folie eine eindeutige Veränderung des Materials nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass die mittels XPS gefundenen Abweichungen von der Kontrollprobe der PVDF- und PLA-co-TMC-Proben hauptsächlich an der Oberfläche (bis 10 nm) erfolgten und unter der Nachweisgrenze IR-spektroskopischer Methode liegen. Ob auch in die Bulkphase der PP-Folie Oxidation und dadurch ggfs. auch Kettenbruch stattgefunden hat, kann nur eine Analyse der Molmassenverteilung ergeben. Eine Überprüfung der in diesem Kapitel gefunden Oberflächengruppen erfolgt nasschemisch im folgenden Kapitel.

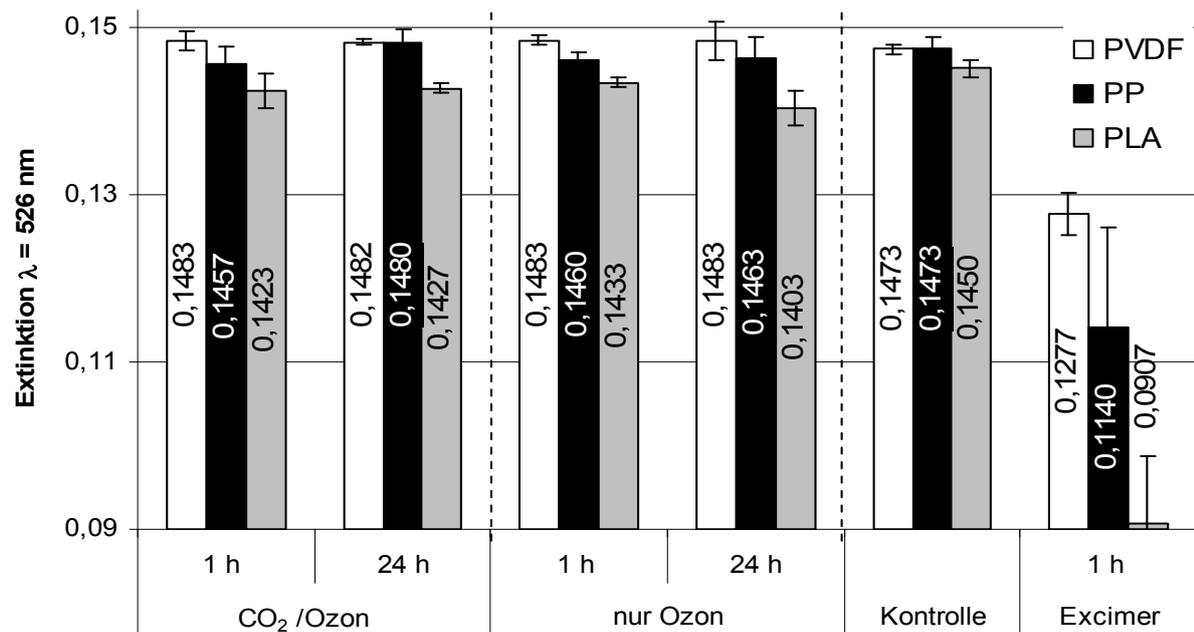
### 6.2.8 Quantitativer, nasschemischer Nachweis von Oberflächengruppen

Wie im Kapitel 6.2.5 bereits angesprochen, können bei Kontakt von Ozon mit einem Polymer verschiedene Radikale entstehen. Zum quantitativen Nachweis von langlebigen Radikalen auf den Polymeroberflächen wurde hier die DPPH-Methode angewendet. Dass das nass-

chemische Verfahren auch für hydrophobe Oberflächen nutzbar ist, wurde schon gezeigt [145].

### Radikalbestimmung

Zur Bewertung der Ergebnisse wurde in dieser Arbeit ein Referenzverfahren hinzugezogen, um die Radikalbildung auf Polymeroberflächen durch die hier untersuchten Sterilisationsmethoden quantitativ untereinander und mit dem Referenzverfahren vergleichen zu können. Es ist hinreichend bekannt, dass Radikale auf Polymeroberflächen mittels Excimer-Bestrahlung induziert werden können [167, 265]. In vorliegender Arbeit wurden die Polymere 30 min im Abstand von 30 mm unter Luftstrom mit einer KrCl\*-Excimer-Lampe (Heraeus, Deutschland) bei 222 nm bestrahlt. Es wurde untersucht, ob 1 h nach der Behandlung sowie nach 24 h noch Radikale auf der Oberfläche nachgewiesen werden können. Die Ergebnisse der Entfärbung einer DPPH-Lösung nach einstündigem Kontakt mit den Folien sind in **Abbildung 36** dargestellt:



**Abbildung 36:** Ergebnisse der Radikalbestimmung auf den Polymeroberflächen, jeweils 1 h und 24 h nach Behandlung. Gemessen wurde die Entfärbung einer DPPH-Lösung. Im Vergleich die Werte unbehandelter Kontrollproben und mit einer Excimer-Lampe (222 nm) bestrahlter Polymere (n = 3).

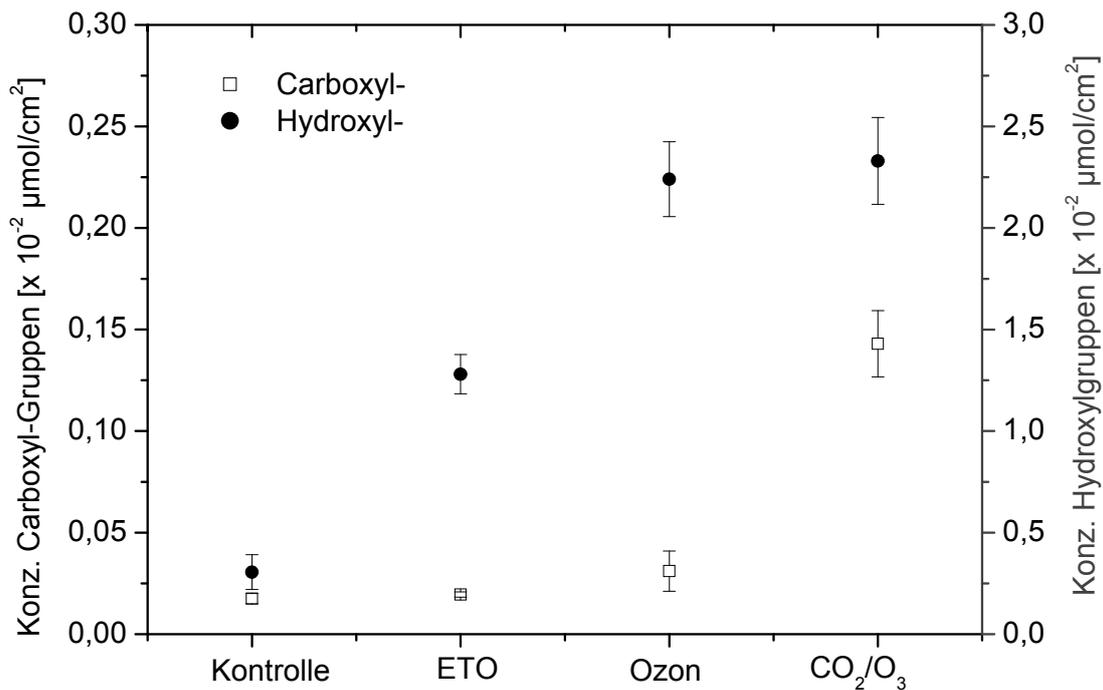
Während für die mit der Excimer-Lampe bestrahlte Probe nach 1 h eine hohe Radikalkonzentration nachgewiesen werden konnte, wurde für keines der anderen Polymere eine deutliche Konzentrationsänderung gemessen. Weder die kombinierte Behandlung mit CO<sub>2</sub> und Ozon noch die alleinige Nutzung von Ozon konnten auf den Polymeren eine messbare Konzentration von ausreichend stabilen Radikalen induzieren. Die Ergebnisse der Konzentrationen nach 24 h werden nur der Vollständigkeit halber hier erwähnt, da auch sie keine

Abweichung von der Kontrollprobe zeigten. Diese Ergebnisse offenbaren, dass bei der untersuchten Sterilisationsmethode keine langlebigen Radikale in messbarer Konzentration erzeugt werden, wie dies beispielsweise bei der  $\gamma$ -Sterilisation der Fall ist [64].

Für die Radikalquantifizierung stand im Rahmen dieser Arbeit nur die DPPH-Methode zur Verfügung. Diese zeichnet sich im negativen Sinne durch eine relativ hohe Nachweisgrenze von ca.  $10^{13}$  Radikale/cm<sup>2</sup> aus. Es können zudem nur hinreichend reaktive und - nach Sauerstoffkontakt – nur noch Peroxidradikale bestimmt werden. Für vorliegende Aufgabe wären instrumentelle Verfahren wie ESR (Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie) vorzuziehen, da mit ihnen Radikale auch unterschieden werden können und die Nachweisgrenze deutlich niedriger liegt. Weiterhin wäre die Thermo- oder Chemolumineszenz geeignet, mit der bis zu  $10^7$  Radikale/cm<sup>2</sup> nachgewiesen werden können [233].

### ***Weitere funktionelle Gruppen***

Weitere - neu etablierte - Oberflächengruppen beeinflussen die Materialeigenschaften hydrophober Polymere erheblich. Mittels FTIR wurden insbesondere bei PP bereits Carbonylgruppen detektiert. Allerdings war es nicht möglich, weiter zwischen den sauerstoffhaltigen Gruppen zu unterscheiden, bzw. sie zu quantifizieren. Diese Gruppen wurden daher nass-chemisch mittels Colorimetrie und UV-VIS-spektroskopischer Messung bestimmt. Für die Quantifizierung der polymergebundenen Carboxylgruppen wurde hierbei ein auf Methylblau-Färbung basierender Farbttest verwendet; für die Ermittlung der Hydroxylkonzentration wurde ein Diazonium-Salz eingesetzt [145]. Die Oberflächenkonzentrationen von Carboxyl- und Hydroxylgruppen auf PP sind in **Abbildung 37** dargestellt.



**Abbildung 37:** Konzentration von Carboxyl- und Hydroxylgruppen auf den PP-Oberflächen 1 h nach Behandlung. Im Vergleich die Werte unbehandelter Kontrollproben (n = 3).

Erwartungsgemäß wurde auf den Kontrollproben des PP nur jeweils eine niedrige Oberflächenkonzentration an Carboxyl- und Hydroxyl-Gruppen gefunden. Bei der Sterilisation mit CO<sub>2</sub> und Ozon erfolgt offenbar - im Vergleich zu der reinen Ozonbehandlung - verstärkt die Bildung von Carboxylgruppen. Die hier detektierten Carboxylgruppen können bei Kontakt mit wässriger Lösung im neutralen Bereich durch Dissoziation in H<sup>+</sup> und auf der Folie verbleibenden COO<sup>-</sup> zur negativen Nettoladung des Materials beitragen. Dies ist bei der Charakterisierung der biomedizinischen Eigenschaften des Polymers zu beachten [168]. Bei der Behandlung nur mit Ozon wurden zwar genauso viele Hydroxyl-Gruppen auf der Oberfläche gebildet, wie bei der in CO<sub>2</sub> durchgeführten Behandlung, allerdings wurde durch die Ozonbehandlung keine signifikante Anzahl an Carboxyl-Gruppen auf dem Polymer gebildet. Die ETO-Sterilisation führt erwartungsgemäß nicht zu einer Bildung von Carboxylgruppen. Die nachgewiesenen Hydroxylgruppen könnten einerseits im Polymer verankert sein, oder aber auf adhäriertes Ethylenoxid oder dessen Derivate wie Ethylenglykol auf dem Polymer zurückzuführen sein (wie im Abschnitt 6.2.7 diskutiert).

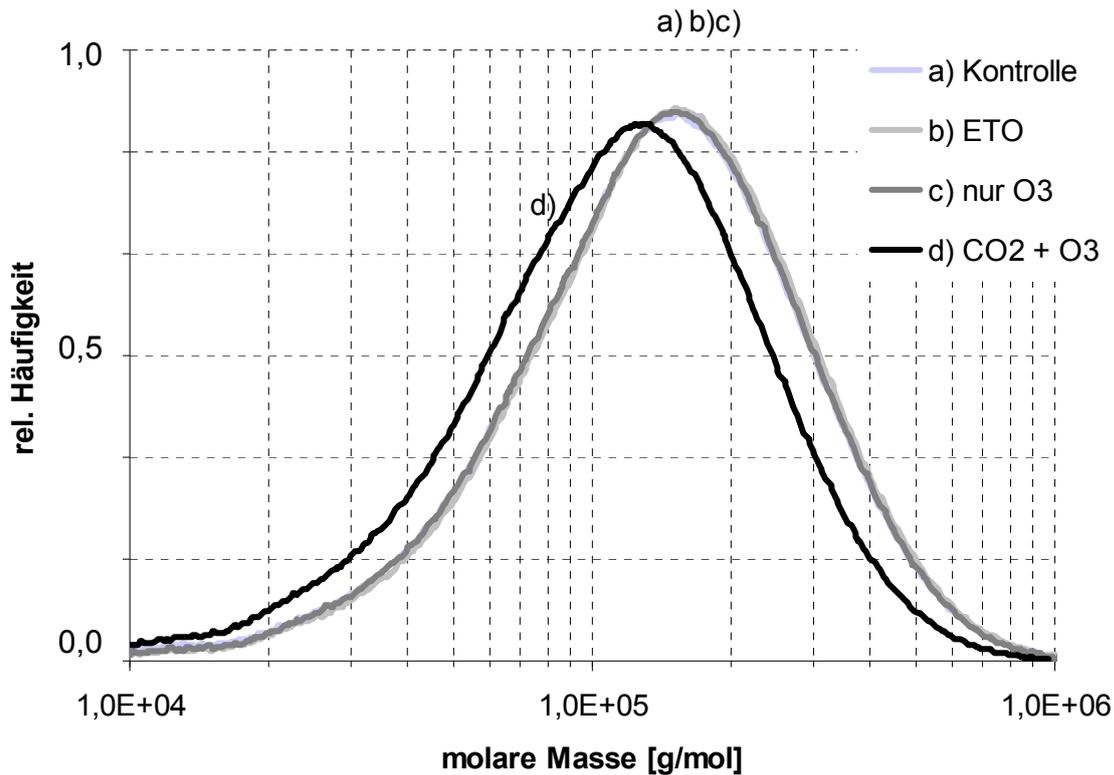
Des Weiteren wurde mittels iodometrischer Analyse auf der Oberfläche unbehandelter Polymere keine nachweisbare Konzentration gebundener Peroxid-Gruppen detektiert. Auf den mit Ozon begasten Polymerfolien wurde eine Oberflächenkonzentration von  $3,9 \times 10^{-2} \mu\text{mol}/\text{cm}^2$  ermittelt, auf den mit CO<sub>2</sub> und Ozon sterilisierten PP-Folien  $8,3 \times 10^{-2} \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ . Die Bildung der Gruppen scheint also bevorzugt in der Präferenz Peroxid- > Hydroxy- > Carboxyl- stattzufinden. Die Ergebnisse der Kontrollprobe werden auch von Knittel et al. für

unbehandeltes PP ermittelt [145]. Die Autoren fanden auf für 30 min. mit Ozon-behandelter PP-Folie jedoch ein geringeres Verhältnis der Gruppen Peroxid-/Hydroxyl- im Vergleich zu dieser Arbeit. Die Anzahl der zahlenmäßig dominierenden Peroxidgruppen liegt hier im Bereich  $10^{16}$  Gruppen/cm<sup>2</sup>. Dies liegt oberhalb der Nachweisgrenze des DPPH-Tests und lässt vermuten, dass die Radikale schon nach 1 h bis unterhalb der Nachweisgrenze abregiert sind. Die Bildungsreaktionen der hier gefundenen funktionellen Oberflächengruppen werden im anschließenden Kapitel diskutiert.

### 6.2.9 Molmassenverteilung mittels GPC

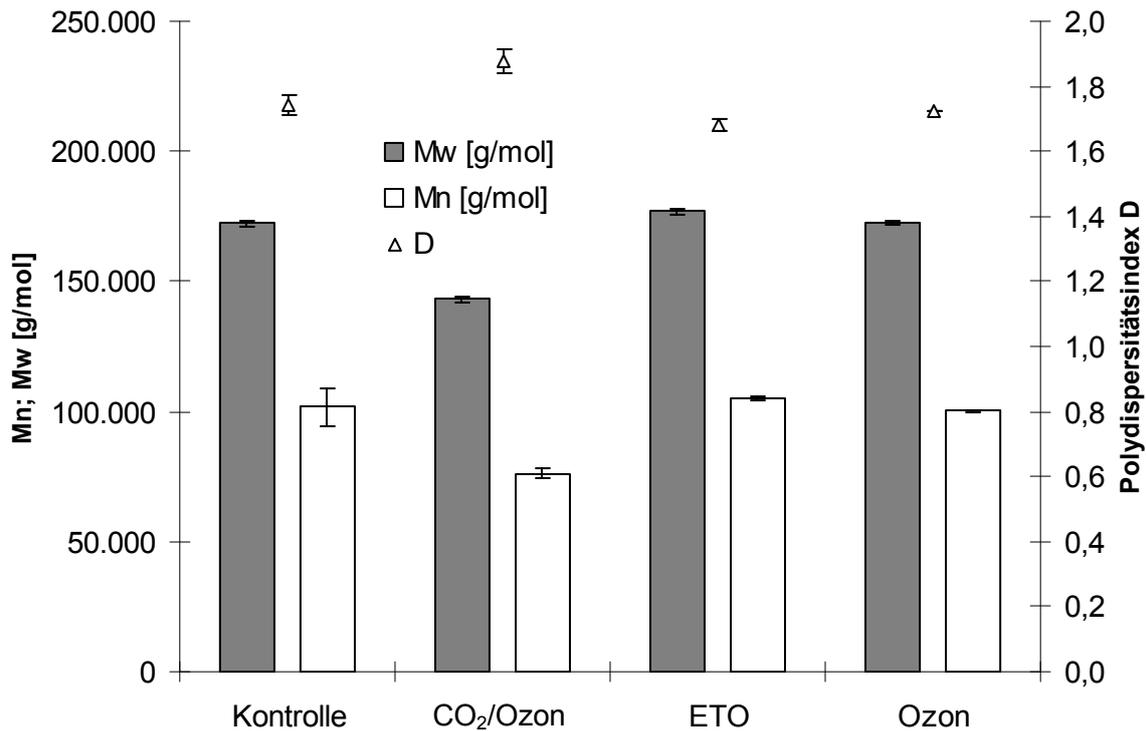
Während in den letzten Kapiteln der Fokus auf einzelnen Gruppen - der Polymeroberfläche lag, wird nun die makromolekulare Struktur - vor allem der Bulkphase - der Polymere analysiert. Polymere, die von biologischen Systemen via Matrixpolymerisation produziert werden, wie z.B. Nukleinsäuren oder Enzyme, sind monodispers - jedes Makromolekül hat also die gleiche Molmasse. Die industrielle Polymerherstellung hingegen ist von statistischen Ansätzen der Polymerisationsmethoden abhängig, und damit haben diese Polymere eine - engere oder weitere - Molmassenverteilung.

Die in Abschnitt 6.2.4 gezeigte verringerte Zugfestigkeit weist auf einen Polymerkettenabbau hin. Die Molmassenverteilung der Polymere PLA-co-TMC und PP wurde daher mittels Gel-permeationschromatographie analysiert. Der Abbau von Polymeren kann durch die folgenden Kennzahlen charakterisiert werden [266]. Das Ergebnis der GPC-Analyse kann als zahlenmäßiges Mittel  $M_n$  oder gewichtsmittleres Mittel  $M_w$  der Molmassenverteilung angegeben werden. Aus dem Verhältnis der beiden Kennzahlen ergibt sich der Polydispersitätsindex  $D = M_w/M_n \geq 1$  [267]. Dabei gilt  $D = 1$  nur für monodisperse Proben. Mit wachsendem  $D$  geht eine größere Verteilungsbreite einher. Im Folgenden werden die Molmassen der behandelten Polymere PLA-co-TMC denen der Kontrollproben gegenübergestellt. In **Abbildung 38** sind die Verteilungskurven der Molmasse von PLA-co-TMC aufgetragen (detaillierte Ergebnisse sind im Anhang als **Tabelle A3** und **A4** aufgeführt).



**Abbildung 38:** Vergleichende Darstellung der gewichtsmittleren Molmassenverteilung von behandeltem und unbehandeltem PLA-co-TMC (n = 3).

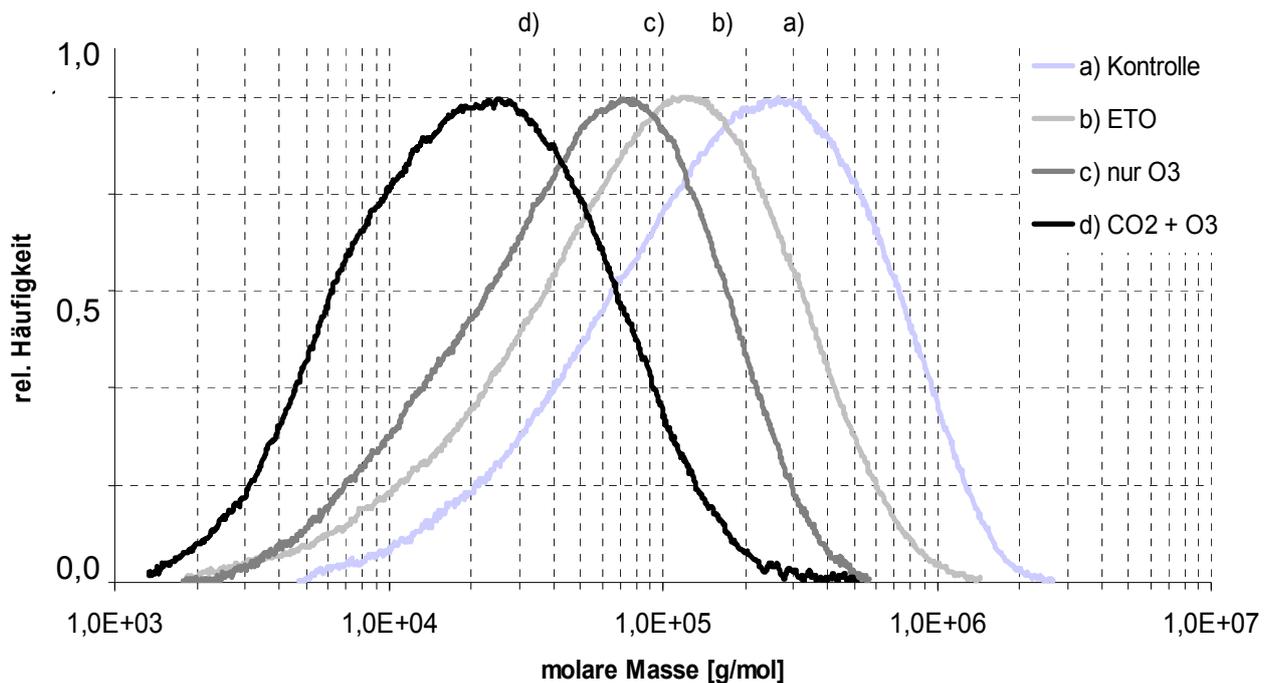
In **Abbildung 38** ist zu erkennen, dass für PLA-co-TMC die ausnahmslos monomodalen Verteilungskurven in der logarithmischen Darstellung die Form einer log-Normalverteilung zeigen. Während die Verteilungskurven der Kontrollprobe sowie der mit ETO und der nur mit Ozon behandelten Probe quasi deckungsgleich sind, ist die mit CO<sub>2</sub> und Ozon sterilisierte Probe zu kleineren Molmassen verschoben. Damit wird für die CO<sub>2</sub>/Ozon-Behandlung ein leichter Molmassenabbau offenbart. In **Abbildung 39** sind vergleichend die zahlen- und gewichtsmittleren Molmassen, sowie die Dispersitätsindizes von PLA-co-TMC in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode dargestellt.



**Abbildung 39:** Vergleichende Darstellung der Molmassen ( $M_n$  = Zahlenmittel;  $M_w$  = Gewichtsmittel,  $D$  = Polydispersitätsindex) von behandeltem und unbehandeltem PLA-co-TMC ( $n = 3$ ).

In **Abbildung 39** ist zu erkennen, dass die Kontrollprobe von PLA-co-TMC eine zahlenmittlere Molmasse von 102.000 g/mol und eine gewichtsmittlere Molmasse von 172.000 g/mol aufweist. Sowohl die Werte von  $M_w$  als auch die von  $M_n$  der mit Ozon und der mit ETO behandelten Proben weichen kaum von den Molmassen der Kontrollprobe ab. Damit ergibt sich auch bei der Polydispersität ( $D = 1,72 \pm 0,03$ ) kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollprobe und den Proben nach den eben erwähnten Behandlungen. Sowohl  $M_n$  als  $M_w$  werden hingegen durch die CO<sub>2</sub>/Ozon-Behandlung signifikant reduziert.  $M_n$  wird um etwa 25 % auf 76.000 g/mol und  $M_w$  um 20 % auf 143.000 g/mol verringert. Weiterhin sieht man auch hier, dass der Polydispersitätsindex zwar geringfügig, aber signifikant auf 1,88 erhöht wird und damit eine etwas breitere Verteilung der Molmassen anzeigt. Während ein 70-%iger Abbau der Molmasse von PLLA durch  $\gamma$ -Sterilisation bekannt ist, wird dieser Effekt bei ETO-Sterilisation nicht gefunden [268].

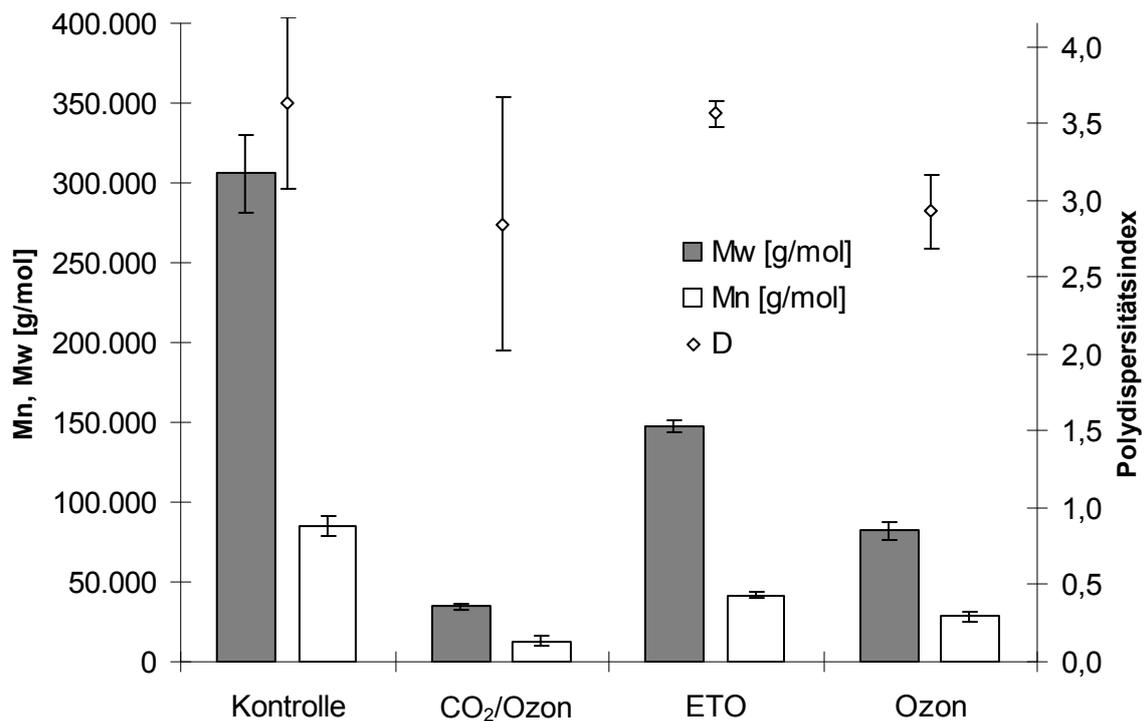
In **Abbildung 40** sind die Verteilungskurven der gewichtsmittleren Molmasse des PP aufgetragen. Obwohl durch alle Behandlungen eine deutliche Reduktion der Molmasse stattfindet, erkennt man ebenfalls eine monomodale Normalverteilung. Die Behandlungen resultieren in absteigender Reihenfolge Kontrolle > ETO > Ozon > CO<sub>2</sub>/Ozon in niedrigeren Molmassen.



**Abbildung 40:** Vergleichende Darstellung der gewichtsmittleren Molmassenverteilung von behandeltem und unbehandeltem PP (n = 3).

Für die Kontrollprobe des PP (vgl. **Abbildung 41**) wurde eine zahlenmittlere Molmasse von 85.000 g/mol und eine gewichtsmittlere Molmasse von 305.000 g/mol gemessen. Die Polydispersität ( $D = 3,63 \pm 0,56$ ) zeigt eine breitere Verteilung der Molmassen als beim PLA-co-TMC. Durch die Behandlung mit  $\text{CO}_2$  und Ozon wird eine erhebliche Reduzierung der Molmassen herbeigeführt. Sowohl  $M_w$  (35.000 g/mol) als auch die  $M_n$  (13.000 g/mol) werden um fast 90 % verkleinert und die Verteilungsbreite auf  $2,84 \pm 0,82$  reduziert.

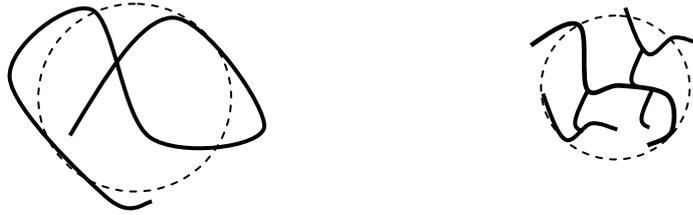
Für die mit ETO sterilisierte Probe ergeben sich im Vergleich die geringsten Veränderungen - immerhin werden jedoch sowohl  $M_w$  als auch  $M_n$  um mehr als 50 % reduziert. Auch  $D$  nimmt leicht ab. Durch die Ozonbehandlung wird ein Abbau der zahlenmittleren Molmasse um etwa 66 % induziert. Im geringeren Maße (26 %) wird die massenmittlere Molmasse reduziert - damit wird eine signifikante Reduzierung der Verteilungsbreite auf  $2,93 \pm 0,24$  erreicht. Derartig deutliche Reduzierungen der Molmassen von PP sind von  $\gamma$ -basierten Sterilisationsverfahren bekannt [269, 270] – über die Auswirkung der ETO-Sterilisation auf die Molmassen von PP hingegen liegen keine Informationen vor. Wie jedoch in Abschnitt 6.2.4 gezeigt wurde, ist die Höchstzugkraft des PP nach der ETO-Sterilisation geringfügig verringert, die auf den hier gezeigten Molmassenabbau zurückzuführen sein könnten.



**Abbildung 41:** Vergleichende Darstellung der Molmassen ( $M_n$  = Zahlenmittel;  $M_w$  = Gewichtsmittel,  $D$  = Polydispersitätsindex) von behandeltem und unbehandeltem PP ( $n = 3$ ).

Während Hill et al. [246] auf Untersuchungen verweisen, in denen gezeigt wird, dass Plasma- und Flammenbehandlung an PP-Folien eine Oxidschicht von wenigen Monolayern induzieren, vermuten sie in eigenen Arbeiten mit UV/Ozon sowie nur Ozon, dass die Behandlungstiefe in der Größenordnung von  $1 \mu\text{m}$  liegt, weisen dies jedoch nicht experimentell nach. Aus den hier gezeigten Ergebnissen zur  $\text{CO}_2/\text{Ozon}$ -Behandlung muss geschlossen werden, dass die Eindringtiefe der Behandlung sich nicht auf wenige  $\mu\text{m}$  oder gar nm beschränkt. Es ist rechnerisch nicht möglich, dass bei einer Foliendicke von  $75 \mu\text{m}$  und einer Eindringtiefe von  $1 \mu\text{m}$ , ein Molmassenabbau von 90 % zu verzeichnen ist.

Für die PP-Proben wurde der Staudinger Index ermittelt, um einen Anhaltspunkt für mögliche Vernetzungsreaktionen zu erhalten [232]. Die hydrodynamische Dichte und damit die intrinsische Viskosität  $\eta$  von verschiedenartig geformten Polymeren folgen der empirischen (Kuhn-)Mark-Houwink(-Sakurada)-Gleichung (vgl. Gl.15). Wird der Logarithmus der intrinsischen Viskositäten gegen den Logarithmus der Molmassen wie in **Abbildung 43** aufgetragen, ergibt sich innerhalb bestimmter Schranken ein linearer Zusammenhang, aus dem die konstanten Faktoren  $K$  und  $\alpha$  ermittelt werden können [267]. Dabei liegt  $\alpha$  innerhalb der Grenzen  $0 < \alpha < 2$ . Lineare Polymere, ohne Verzweigungen resultieren in einer Geraden der Steigung von etwa 0,6 bis 0,8. Für verzweigte Polymere resultiert ein geringerer  $\alpha$ -Wert [271, 272] (vgl. **Abbildung 42**).

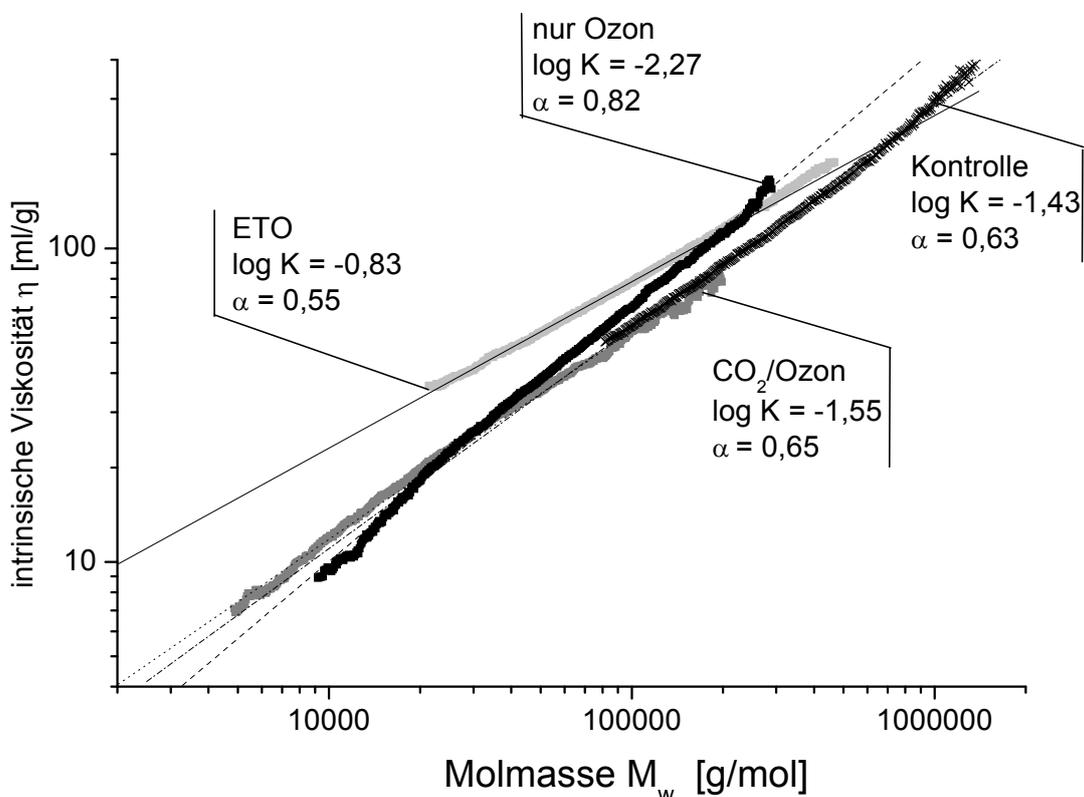


**Abbildung 42:** Verzweigungen (rechts) führen bei gleicher Molmasse zu einem kleinerem hydrodynamischen Volumen und damit zu einer höheren Dichte.

$$|\eta| = K M^\alpha$$

**Gl. 15**

In der Literatur wurde für lineares PP in Trichlorbenzol bei 135 °C ein  $\alpha$  von 0,725 ermittelt [273], was in relativ guter Übereinstimmung mit dem in dieser Arbeit gefundenen  $\alpha$  von 0,63 für unbehandeltes PP liegt (vgl. **Abbildung 43**). Für CO<sub>2</sub>/Ozon liegt  $\alpha$  etwa 5 % höher, für die ETO-Behandlung ergibt sich ein um 9 % reduziertes  $\alpha$ . Dagegen liegt  $\alpha$  für die nur mit Ozon behandelte Probe um etwa 30 % über der Kontrollprobe. Durch die gezeigten Änderungen an den Staudinger Indizes ergibt sich nach o.g. Definition noch keine eindeutigen Hinweise auf eine Vernetzung - allenfalls verschiebt die ETO-Behandlung das PP in Richtung kompaktere Form, was in Anbetracht des kleinen  $\Delta\alpha$  jedoch noch keine Vernetzung belegt. Der erhöhte Index nach der Ozonbehandlung kann allenfalls ein Hinweis auf eine Linearisierung oder Versteifung der Ketten sein.

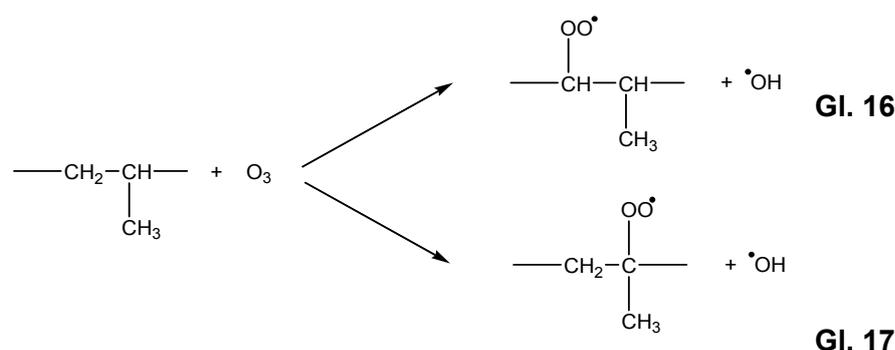


**Abbildung 43:** Vergleichende Darstellung der Mark-Houwink-Plots von behandelter und unbehandelter PP-Folie (die intrinsischen Viskositäten sind gegen die gewichtsmittleren Molmassen aufgetragen).

Die für den Ozon-basierten Prozess wesentlichen Abbaumechanismen werden nachfolgend diskutiert. Bei der Depolymerisation, wird der Polymerisationsgrad (Anzahl der polymerisierten Monomereinheiten = P) unter Beibehaltung der chemischen Struktur des Monomers verringert. Dabei ist zwischen statistischem Bindungsbruch und endständigem Abbau unter Bildung von Monomereinheiten zu unterscheiden. Als weitere Folge eines oxidativen Angriffes kann das Polymer durch Einbringung oder Entfernung von Elementen oder chemischen Gruppen verändert werden – unter Erhalt des Polymerisationsgrades. Schließlich gibt es noch eine Kombination der vorgenannten Zersetzungsreaktionen [267]. Bei den mit Ozon und CO<sub>2</sub> behandelten PP-Folien kann eine ausschließliche Veränderung der Monomereinheiten ausgeschlossen werden, da der Polymerisationsgrad signifikant verringert wird.

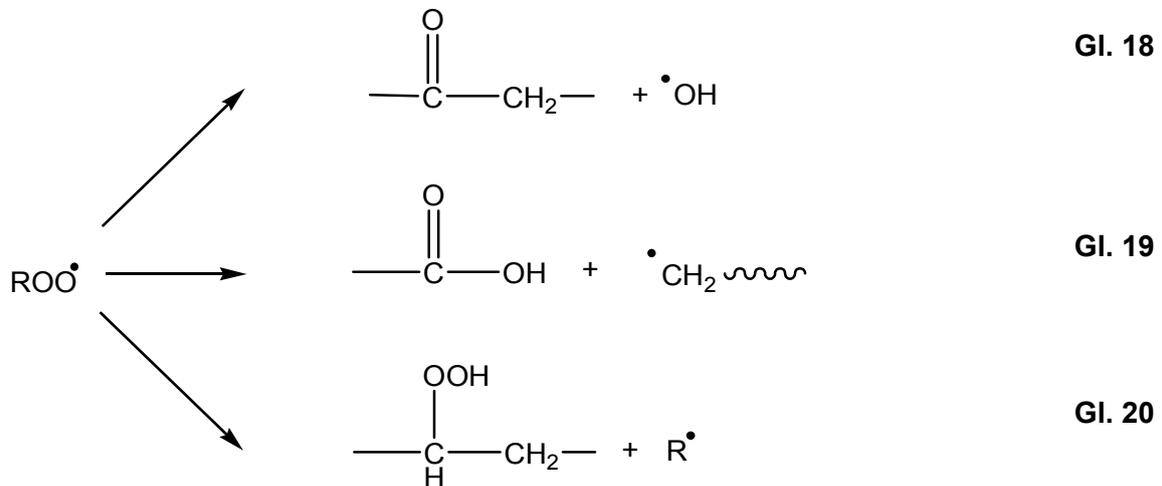
Bei beispielsweise thermisch belasteten Polyolefinen ist von statistischem Kettenbruch auszugehen, bei dem die homolytische Spaltung der Kette an jedem Punkt mit gleicher Wahrscheinlichkeit stattfindet [274]. Für den statistischen Angriff spricht in vorliegenden Untersuchungen die Normalverteilung der Molmassen von PP und von PLA-co-TMC sowohl vor als auch nach der Sterilisation. Die geringfügige Verringerung des Dispersitätsindex und die leicht veränderten Peaksymmetrie der Verteilungskurve d) in **Abbildung 40** deutet allenfalls darauf hin, dass Polymere kleiner Molmassen etwas leichter abgebaut werden. Die Erhöhung des Dispersitätsindex durch gleichzeitigen Kettenbruch und Vernetzung wird beispielsweise bei der  $\gamma$ -Sterilisation von Polycaprolacton beobachtet [275]. Durch  $\gamma$ -Sterilisation wird Vernetzung auch in PP [29] und PE [276] induziert, führt jedoch auch zu verminderter Abnutzungsresistenz, die vermieden werden kann, wenn das Material nach der Behandlung in sauerstofffreier Atmosphäre gelagert wird [277].

Die Kettenabbaureaktion von Polyolefinen durch Ozon wird von Blinov et al. [278, 279] beschrieben - verantwortlich werden hauptsächlich Alkoxy-Radikale (RO $\cdot$ ) gemacht, die neben Alkyl- (R $\cdot$ ) und Peroxyl-Radikalen (RO<sub>2</sub> $\cdot$ ) entstehen können. Von Walzak et al. [1] werden die wichtigsten Reaktionen, die beim Kontakt von gasförmigem Ozon mit Polypropylen stattfinden wie nachfolgend (vgl. **Abbildung 44**) beschrieben,



**Abbildung 44:** Bildung von Peroxyl- und Hydroxylradikalen unter Ozoneinwirkung bei Polyolefinen, nach Walzak et al. [1].

wobei die schnelle Initialreaktion von Ozon mit PP in Peroxiradikalen (ROO $\cdot$ ) resultiert. Bei der nachfolgenden Reaktion werden Carbonyl-, Carboxyl- und Hydroperoxidgruppen gebildet:



**Abbildung 45:** Bildung von Carbonyl-, Carboxyl- und Hydroperoxidgruppen als Folgereaktion der Ozoneinwirkung bei Polyolefinen, nach Walzak et al. [1].

Nach Robin [280] ist neben den in

**Abbildung 45** genannten Gruppen die Entstehung von Hydroxylgruppen möglich, wenn ein Hydroxylradikal auf ein Polymerradikal trifft ( $\text{R}\cdot + \text{HO}\cdot \rightleftharpoons \text{ROH}$ ).

Nur die Reaktion, bei der Carboxyl-Gruppen gebildet werden (Gl. 19), führt zu einer Kettenspaltung. Die anderen Reaktionen sind Additionen an die Polymerkette. Der Abbau der Molmasse beim PP durch  $\text{CO}_2$ /Ozon korreliert mit dem vergleichsweise starken Zuwachs an Carboxyl-Gruppen gegenüber dem unbehandelten Polymer. Diese Reaktionen führen zu einem Molekulargewichtsabbau, wenn die Polymerprobe nicht unter mechanischer Spannung steht, was laut der Autoren Vernetzungsreaktionen Vorschub leisten könnte. Es ist zu beachten, dass das Molekulargewicht und die Vernetzung einen Einfluss auf die Festigkeit der Polymere haben [281]. In den vorangegangenen Kapiteln zur Dehnung und Zugfestigkeit wurde eine solche Änderung bereits bewiesen.

Der Einsatz von Ozon führt zur Bildung funktioneller Gruppen auf der Polymeroberfläche. Es konnte gezeigt werden, dass die Bildung der in der Literatur angegebenen Gruppen (Carbonyl-, Carboxyl-, Hydroxyl- [1, 216, 246, 280] und Hydroperoxyl- [280]) nicht bei jeder der untersuchten Behandlungen in gleichem Maße induziert werden. Diese Oberflächengruppen können mit geladenen, hydrophilen oder hydrophoben Gruppen von im Blut vor-

handenen Biomolekülen interagieren. Während aber beispielsweise oberflächengebundene OH-Gruppen zur Hydrophilierung einer Oberfläche beitragen, dissoziieren sie im wässrigen Medium bei neutralem pH-Wert nicht und tragen damit nicht zu Ladungseffekten bei - anders als beispielsweise COOH-Gruppen. Die genannten Effekte sind insbesondere für die biomedizinischen Untersuchungen im nächsten Kapitel wichtig, da hier Proteine als amphiphile Biopolymere, eine wichtige Rolle spielen [282].

### **6.3 Biomedizinische Eigenschaften der Polymere**

Im Abschnitt 6.2 wurde der Einfluss des Hochdruck-Verfahrens auf die Polymereigenschaften untersucht und mit Referenzverfahren verglichen. Dabei wurde deutlich, dass sowohl topografische und thermo-mechanische Charakteristika als auch chemische Oberflächen- und Bulkeigenschaften der Polymere in unterschiedlicher Ausprägung verändert wurden. Ob diese Änderungen die biomedizinischen Eigenschaften der Polymere beeinflussen können, wird im Folgenden dargestellt. Bei der Anbindung von Biomolekülen und Zellen an Polymer-substrate sollte dabei zwischen Anwendungen aus zwei biomedizinischen Disziplinen unterschieden werden [168]:

1. Die Biokompatibilität von Implantaten ist definiert über die Minimierung der unspezifischen Protein- und Zelladhäsion.
2. Dagegen wird beim *tissue engineering* gezielt die polymere Oberfläche (mit Proteinen) modifiziert, die dann die Adhäsion von Vorläuferzellen begünstigen und zur Proliferation, Differenzierung und Matrix-Bildung anregen.

Neben der Adhäsion von Proteinen und geeigneten Zellen wurde des Weiteren untersucht, ob durch die Sterilisation der Polymere toxische Eigenschaften induziert werden, durch die innerhalb eines mehrtägigen Zeitraumes die adhärenen Zellen abgetötet werden. Schließlich wurde ein weiterer wichtiger Aspekt betrachtet, der die Pyrogenität der Polymeroberflächen betrifft.

#### **6.3.1 Protein- und Fibroblastenadhäsion auf Polymeroberflächen**

Die Interaktion von biologischen Systemen mit Polymeren kann mittels Proteinadhäsionsuntersuchungen und Zellkulturtechnik studiert werden. Obwohl *in-vitro* Experimente nicht das gesamte Spektrum der Zellantworten erfassen, die bei einer Implantation erfolgen würden, bietet die Zellkulturtechnik die Möglichkeit, definierte Bedingungen zu schaffen, um die Zellantwort besser zu charakterisieren und zu quantifizieren als *in-vivo* Analysen [283]. Die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden mit der permanenten Mausfibroblasten-Zelllinie L929 durchgeführt. Bevor jedoch eine Zelle an einer Oberfläche anhaftet, sind vorgeschaltete Prozesse wie Proteinadhäsion notwendig.

Bei Blut-Biomaterial-Wechselwirkung ist die Gerinnungskaskade von großer Bedeutung. Schon wenige Sekunden nach dem Einsetzen des Implantats in den Körper werden Proteine

aus Körperflüssigkeiten (z.B. Blut oder Tränenflüssigkeit) an der Oberfläche des Materials adsorbiert. Die anschließende Adhäsion von Thrombozyten - und im späteren Verlauf Fibroblasten und anderen Körperzellen - wird maßgeblich von dieser initialen Proteinadsorption bestimmt. Die Proteinadsorption wiederum wird von Faktoren wie der Kristallstruktur der Implantatoberfläche, der Oberflächenenergie, der Rauheit und der chemischen Oberflächenzusammensetzung beeinflusst [7]. Wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt werden konnte, wurden einige der erwähnten Einflussfaktoren durch die Sterilisation verändert. Daher ist anzunehmen, dass diese Änderungen einen Effekt auf die Zelladhäsion und die vorangehende Proteinadsorption haben. Im Kapitel „Experimentelles“ (5.2.4) wurde dargelegt, dass für die biomedizinischen Tests die Medien RPMI sowie FBS verwendet wurden. Diese enthalten jeweils über 1000 Stoffe, darunter Wachstumshormone, Proteine und Aminosäuren, die zur Zelladhäsion und –proliferation notwendig sind [284, 285]. Erst wenn die Polymeroberfläche die Adsorption der Proteine zulässt, kann in einem zweiten Schritt die Adhäsion der Zellen an der Oberfläche und in einem dritten Schritt die Proliferation stattfinden (vgl. **Abbildung 6**). Die Proteinadhäsion wurde in dieser Arbeit durch BSA (Bovines Serumalbumin) simuliert und über ein colorimetrisches Verfahren quantifiziert.

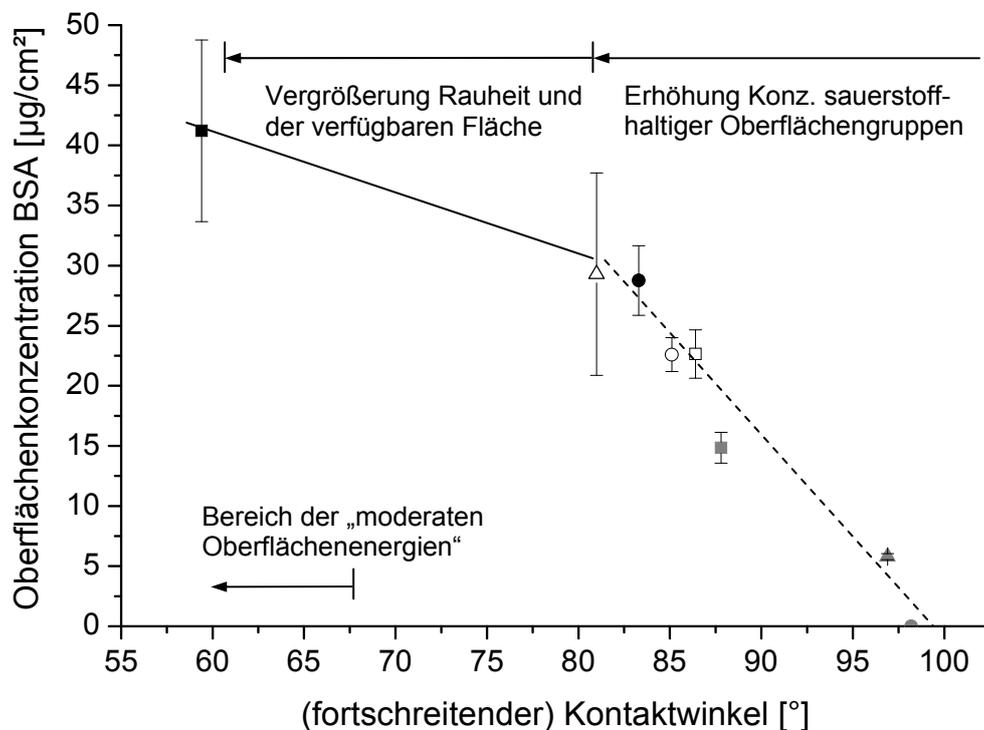
Der dafür verwendete Bicinchoninsäure- (BCA-) Assay nach Smith [286] ist besonders für die Bestimmung der Proteinadhäsion an festen Oberflächen geeignet [168]. Der Test ist selbst im Bereich niedriger Konzentrationen von 5 µg bis 250 µg Protein/ml Puffer (PBS) bei pH 7,4 noch zuverlässig reproduzierbar. In **Abbildung 46** wird der Zusammenhang zwischen der adhärenierten Proteinmasse pro cm<sup>2</sup> Folienoberfläche und den Polymereigenschaften dargestellt. Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Adhäsionsversuchen aufgetragen.

Auf der unbehandelten PP-Folie konnte kein adhäreniertes BSA nachgewiesen werden. Die Konzentration des oberflächengebundenen BSA erhöhte sich auf 5 µg/cm<sup>2</sup>, wenn die Folie mit ETO sterilisiert wurde. Nach der Sterilisation mit CO<sub>2</sub> und Ozon verdreifachte sich nochmals die Adhäsion. Die Sterilisation induziert offenbar verstärkte Wechselwirkungen der Proteine mit der Polymeroberfläche. Diese Resultate zeigen einen Zusammenhang mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen zum Kontaktwinkel mit Wasser. Die adhärenierte Proteinmenge korreliert – zumindest für die gestrichelte Linie in **Abbildung 46** - mit der Verringerung der Kontaktwinkel. In diesem Zusammenhang gilt es zu bedenken, dass die Änderung des Kontaktwinkels bei der Behandlung durch eine Einbringung verschiedenartiger chemischer Oberflächengruppen in unterschiedlicher Quantität induziert wird.

Aus Kapitel 6.2.8 geht hervor, dass nach der CO<sub>2</sub>/Ozon-Sterilisation unter anderem Carboxylgruppen auf der Oberfläche von PP detektiert wurden. Diese dissoziieren in

wässrigem Medium schon bei neutralem pH-Wert zu freien  $H^+$ -Ionen und  $COO^-$ , was eine Verschiebung in Richtung negativer Nettoladung der Polymeroberfläche induziert (Hydroxylgruppen dissoziieren bei im Blut vorliegenden pH-Werten von etwa 7,4 nicht). Somit können auch Ladungseffekte die Proteinadhäsion beeinflussen [168, 287]. Der isoelektrische Punkt von Albumin liegt bei 4,6 [288] - damit weist das Protein im Blut eine leicht negative Nettoladung auf, was erklären kann, warum auf der mit  $CO_2/O_3$ -behandelten Oberfläche etwas weniger Albumin adsorbiert als der Kontaktwinkel vermuten ließe.

Von Lydon et al. wurde schon früh herausgestellt, dass nicht der Kontaktwinkel oder die Oberflächenenergie per se die Zelladhäsion beeinflusst. Vielmehr wird ein Modell der „moderaten Oberflächenenergien“ diskutiert [165], während Elwing postuliert, dass mit steigender Hydrophobizität die Proteinadsorption erhöht wird [289], was durch die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse nicht gestützt wird. In späteren Arbeiten wurde von Xu et al. [290] eine stufenartige Erhöhung der Proteinadhäsion bei  $60^\circ$  bis  $65^\circ$  ermittelt. Bei deutlich niedrigeren Kontaktwinkeln nimmt die Adhäsion dann wieder klar ab [170]. Andere Autoren berichten durchaus auch von verstärkter Adhäsion von humanem Serumalbumin auf hydrophilierten PET-, PHMS- [166, 291] und Silizium-Oberflächen [292].

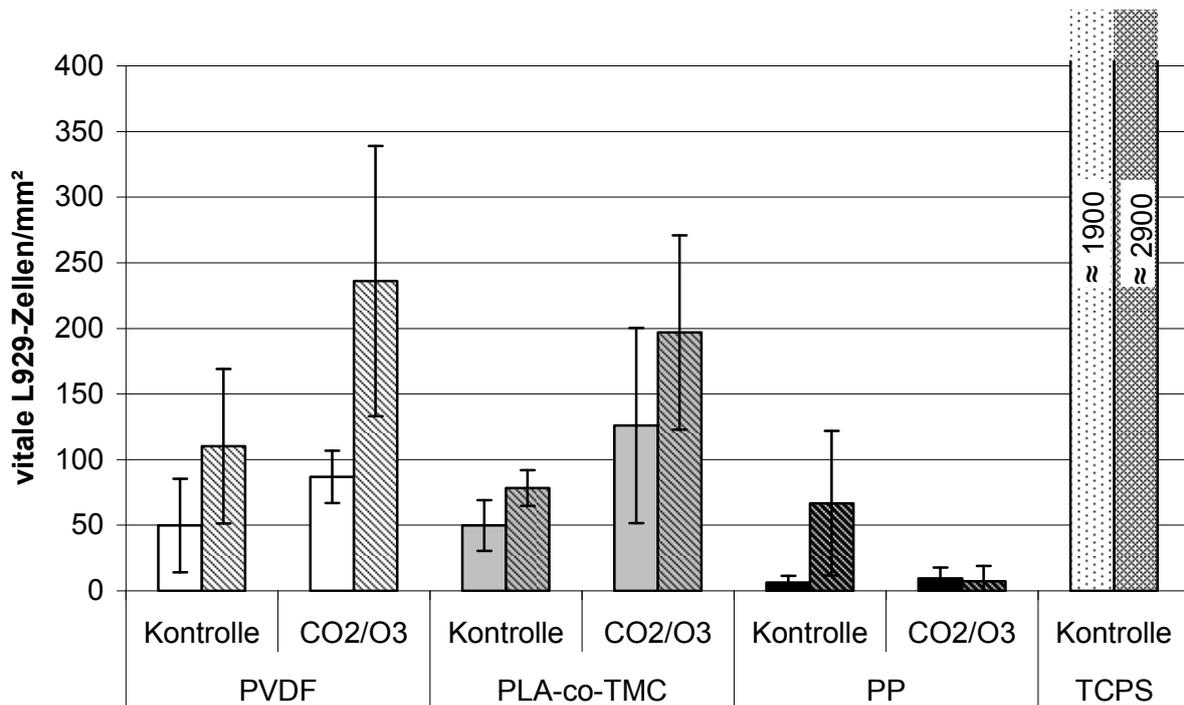


**Abbildung 46:** Proteinadhäsion an Folien-Oberflächen in Abhängigkeit vom fortschreitenden Kontaktwinkel mit Wasser: PP (Kontrolle ●, ETO ▲,  $CO_2/O_3$  ■), PVDF (Kontrolle ○, ETO △,  $CO_2/O_3$  □), PLA-co-TMC (Kontrolle ●,  $CO_2/O_3$  ■); Ausgangskonzentration 4,6 mg BSA/ml PBS (n=3).

Für die mit ETO bzw. CO<sub>2</sub> und Ozon behandelten Oberflächen von PVDF wurde lediglich eine leichte Erhöhung der Konzentration adhärierter Proteine gegenüber den Kontrollproben ermittelt. Auch für PLA-co-TMC konnte nur eine Steigerung von ca. 10 % durch die Behandlung gezeigt werden. Die erhöhte BSA-Oberflächenkonzentration auf dem behandelten PLA-co-TMC könnte neben der besseren Benetzbarkeit auch mit den in den Kapiteln 6.2.1 und 6.2.2 genannten Effekten der Aufwerfung der Folien zusammenhängen. Damit steht effektiv eine größere (auch innere) Oberfläche zur Verfügung, die das Ergebnis beeinflussen kann.

Die durch die Sterilisation induzierte, erhöhte Proteinadhäsion ist aus zwei Blickwinkeln zu betrachten. Für Anwendungen im Bereich *tissue engineering* ist sie vorteilhaft, da in Zellkulturmedien keine Blutplättchen vorhanden sind, die Thromben bilden können, andere Zellen aber an den Proteinen anbinden können. Für Implantatmaterialien müsste in weitergehenden Untersuchungen überprüft werden, ob auch die Fibrinogenadhäsion verstärkt wird, bzw., wie die Konkurrenzadsorption zwischen Albumin und Fibrinogen erfolgt. Dies ist beispielsweise mit Radio-Immunoessays möglich [293]. Übermäßige Fibrinogenadhäsion erhöht die Thrombozyten-Anheftung, leistet so der Ausbildung eines Thrombus - eigentlich ein temporärer Wundverschluss [288] - Vorschub und verzögert damit das Einwachsen des Implantats. Oberflächengebundenes Albumin hingegen verringert die Adhäsion von Blutplättchen [294]. Weiterer Untersuchungen bedarf die Konformation bzw. die Orientierung der anheftenden Proteine, da diese durch die spezifischen Eigenschaften der Oberfläche geändert werden kann und damit die Zelladhäsion beeinflusst wird [295].

Proteine wirken sich durch biospezifische Interaktion mit den Rezeptoren der Zellmembran auf die Adhäsion an Polymeren aus [296, 297]. Die oben gezeigte unterschiedliche Proteinanheftung lässt auch unterschiedlich starke Besiedlung der Polymere durch Zellen erwarten. Die Ergebnisse der Zellkulturversuche sind in **Abbildung 47** dargestellt. Das Diagramm zeigt die Oberflächenkonzentration vitaler Fibroblasten. Es wurden jeweils zwei Kontrollproben aller Polymere sowie zwei mittels CO<sub>2</sub>/Ozon sterilisierte Proben untersucht und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen an drei repräsentativen Stellen pro Probe aufgenommen. Die Oberflächenkonzentration in Zellen/mm<sup>2</sup> wurde nach jeweils 24 h ermittelt. Nach 72 h wurde erneut die Zellzahl bestimmt, um den Einfluss des Substrates auf die Viabilität und ggfs. Proliferation der Zellen zu ermitteln. Tissue-Culture-Polystyrol (TCPS) wurde als Referenzmaterial verwendet, da es mit Kontaktwinkeln im mittleren Bereich von 60° bis 70° [296, 298] eine für Adhäsion und Proliferation der Zellen optimierte Oberfläche bietet. (Eine Zusammenstellung aller Aufnahmen befindet sich im Anhang, **Tabelle A6**)



**Abbildung 47:** Vitale Fibroblastenzellen/mm<sup>2</sup> Folienoberfläche von PVDF (□), PLA-co-TMC (■) und PP (■). Als Referenzmaterial dient hier TCPS (gepunktet). Die Zelldichte wurde nach 24 h (gefüllte Balken) und nach 72 h (gestreifte Balken, rechts) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils sechs Fluoreszenzaufnahmen je Material sowie die Standardabweichungen (n = 6).

Auf den unsterilisierten Kontrollproben der PVDF-Folie wurden nach 24 h ca. 50 adhärenente L929-Mausfibroblasten/mm<sup>2</sup> detektiert. Nach 72 h Inkubationszeit verdoppelte sich diese Zahl. Auf der Oberfläche der mittels CO<sub>2</sub>/Ozon sterilisierten Folien ergab sich eine um fast 100 % höhere Zellzahl als bei den nicht sterilisierten Oberflächen. Obwohl der Unterschied aufgrund der hohen Standardabweichung bei der Kontrollprobe nicht statistisch signifikant ist, so ist die Tendenz doch erkennbar. Nach 72 h wurde eine Zunahme der Zellzahl um etwa 200 % ermittelt.

Die unsterilisierten Folienoberflächen der PLA-co-TMC-Probe erlauben mit 50 Zellen pro mm<sup>2</sup> die Ausbildung etwa derselben Zelldichte wie die Kontrollproben des PVDF. Nach 72 h wird eine Zunahme der Zelldichte auf etwa 80 Zellen/mm<sup>2</sup> ermittelt. Die mittels CO<sub>2</sub>/Ozon sterilisierten Proben wiesen eine um ca. 120 % höhere initiale Zelladhäsion auf. Nach 72 h ergab sich eine Zelldichte von 200 Zellen/mm<sup>2</sup>. Dies ist eine signifikant höhere Zelldichte als die ermittelten Werte bei den Kontrollproben.

Die Kontrollen sowie die mittels CO<sub>2</sub>/Ozon sterilisierten PP-Proben weisen nach 24 h eine deutlich niedrigere Zelldichte pro mm<sup>2</sup> auf als die Oberflächen der anderen Polymere. Auf den PP-Oberflächen wurden jeweils nur 6 bzw. 10 Zellen/mm<sup>2</sup> gefunden. Nach 72 h waren auf den Kontrollproben ca. 70 Zellen/mm<sup>2</sup> zu finden, was etwa einer Verzehnfachung der

Zelldichte entspricht, während die sterilisierten Proben eine signifikant niedrigere Zelldichte aufweisen - hier wurden durchschnittlich nur 7 Zellen/mm<sup>2</sup> gefunden.

Auf dem für Zellkulturtechnik optimierten Polystyrol adhärten die Fibroblastenzellen erwartungsgemäß besonders gut. Nach 24 h wurde eine Zelldichte von über 1900 Zellen pro mm<sup>2</sup> gefunden. Nach 72 h wurde eine um 50 % erhöhte Zelldichte ermittelt. Die Zellen sind hier teilweise schon konfluent (d.h. die Oberfläche des Polymers ist komplett bewachsen), so dass es zur Kontaktinhibierung kommt, und die Zellen nicht mehr weiter wachsen. Dies ist eine (erwartungsgemäß) signifikant höhere Zelladhäsion gegenüber allen in dieser Arbeit untersuchten Polymeroberflächen.

Die Sterilisation von Polymeren kann aufgrund von chemischen oder radikalischen Reststoffen aus dem Prozess zu verminderter Zelladhäsion führen [299]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Sterilisation die Oberfläche von PVDF und PLA-co-TMC dahingehend geändert wurde, dass die Adhäsion von Fibroblasten im Vergleich zu den unsterilisierten Kontrollproben tendenziell erhöht wurde. Hierbei muss auf die hohe Standardabweichung hingewiesen werden, wegen der diese Erhöhung als nicht statistisch signifikant, aber zumindest als Tendenz eingestuft werden kann. Weiterhin wurde gezeigt, dass nach 72 h die Zelldichte auf der sterilisierten PVDF-Oberfläche zunahm. Auch auf der Oberfläche der PLA-co-TMC-Proben ist eine erhöhte Zelldichte zu beobachten. Damit kann zusammenfassend nicht belegt werden, dass das Sterilisationsverfahren die Zelladhäsion oder die Langzeitviabilität oder die Adhäsionsfähigkeit der Fibroblasten negativ beeinflusst. Für die Oberfläche der PP-Proben wird durch die Sterilisation die ohnehin schlechte Adhäsion (nach 24 h) nicht verändert. Die Zelldichte ist nach 72 h im Vergleich zur Kontrollprobe allerdings erheblich geringer. Die untersuchten Polymeroberflächen sind grundsätzlich nicht als besonders attraktiv für eine Zelladhäsion einzustufen. Im Gegensatz dazu sind die kommerziell erhältlichen TCPS-Oberflächen, für die Zelladhäsion optimiert.

Die Oberflächenkonzentration der adhärten Fibroblastenzellen korrespondiert bei den unsterilisierten Kontrollproben mit den ermittelten Kontaktwinkeln (vgl. Kap. 6.2.6) bzw. mit der Proteinadhäsion (vg. Kap. 6.3.1). Je hydrophiler eine Materialoberfläche (im gezeigten Kontaktwinkelbereich) ist, desto besser wird sie vom Medium benetzt und fördert somit auch die BSA- und Zelladhäsion, was in anderen Arbeiten gezeigt wurde [300, 301]. Während die Zelldichten auf den PVDF-Oberflächen (Kontaktwinkel 85°) und den PLA-co-TMC-Oberflächen (KW 83°) nahezu gleich groß sind, wird bei den Kontrollproben von PP (KW 97°) eine signifikant niedrigere Zelldichte ermittelt. Somit ergibt sich eine Präferenz der Zelladhäsion in absteigender Reihenfolge PLA-co-TMC > PVDF > PP, die auch mit der Prä-

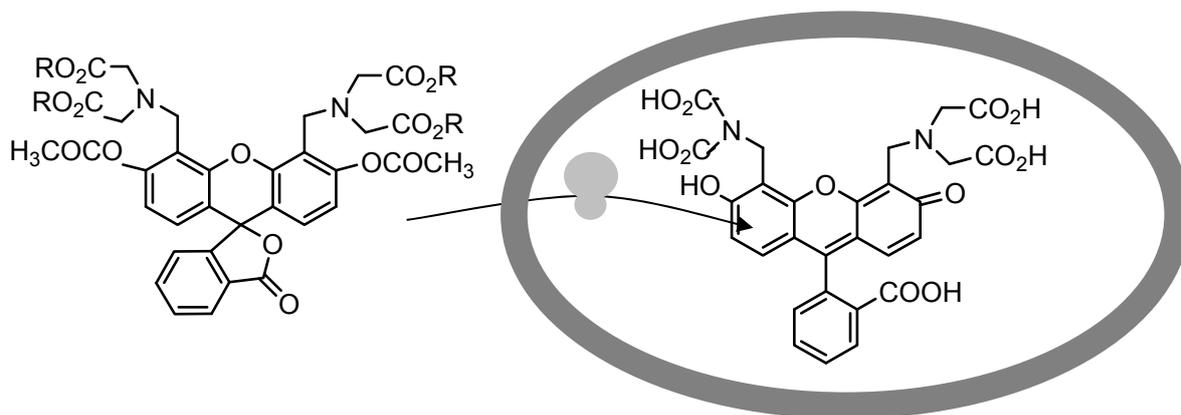
ferenz der Proteinadhäsion übereinstimmt. Durch die Sterilisation wurde bei PVDF und PLA-co-TMC die Oberfläche leicht hydrophiliert, und die Zelldichte erhöhte sich. Saltzman postuliert in seiner Monografie zum *tissue engineering* [298], dass die Zelladhäsion ein Maximum bei "mittleren" Kontaktwinkeln von 40° bis 70° erfährt, was von Arbeiten von Tamada et al. [296] gestützt wird.

Auffällig ist, dass die signifikant niedrigere Zelldichte auf den sterilisierten PP-Oberflächen nicht gut mit dem ermittelten Kontaktwinkel (86°) korreliert, der eine ähnlich hohe Adhäsion von Fibroblastenzellen erlauben sollte wie die Kontrollproben des PVDF. Unterschiede können jedoch auch auf chemische Effekte (Reststoffe oder Abbauprodukte) zurückzuführen sein [49]. Eine hohe Radikalkonzentration auf der Polymeroberfläche als Ursache für die schlechte Zelladhäsion kann jedoch ausgeschlossen werden, da sie im DPPH-Test (Kap. 6.2.8) nicht nachgewiesen wurde. Die Auswirkung von Radikalen und sonstigen zytotoxischen Stoffen werden im folgenden Kapitel diskutiert.

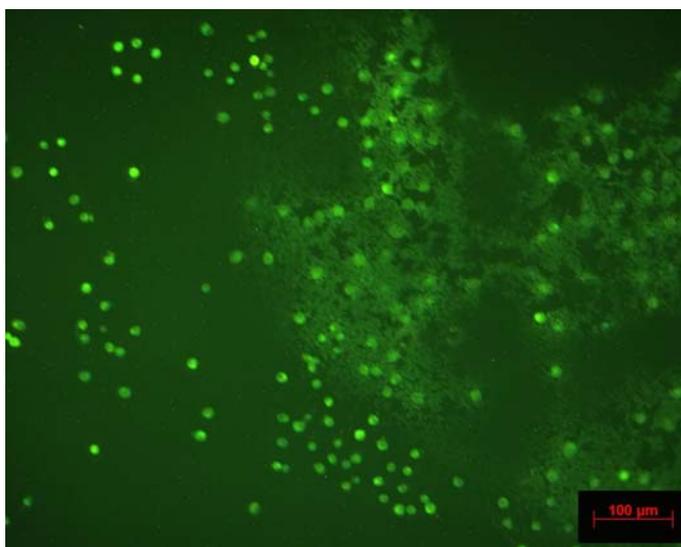
### 6.3.2 Zytotoxizität der Polymeroberflächen - Fluoreszenz-Anfärbung

Es ist bekannt, dass Radikale, die bei strahlenbasierten Sterilisationsprozessen entstehen, durchaus noch bis zu zwei Jahre nach dem Prozess im Material nachgewiesen werden können [64]. Auch für die ETO-Sterilisation ist gezeigt worden, dass auf dem Material adsorbierte Restmengen von ETO oder dessen Reaktionsprodukte zytotoxisch auf L929-Zellen wirken können [257, 302]. Ob das in dieser Arbeit untersuchte CO<sub>2</sub>/Ozon-Verfahren in den Polymeren PP, PVDF oder PLA-co-TMC ebenfalls zytotoxische Eigenschaften induzieren kann, wurde bislang nicht untersucht.

Die Färbung mittels Live/Dead<sup>®</sup>-Farbstoff erlaubt es, zwischen lebenden (grün) und toten (rot) Zellen zu unterscheiden. Calcein AM kann in die intakte Zellmembran eindringen (**Abbildung 48**), wo es von zellulärer Esterase viabler Zellen hydrolysiert und zu Calcein umgesetzt wird, das für die Membran inpermeabel ist. Bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 545 nm emittiert das Calcein grünes Licht mit einem Emissionsmaximum bei 515 nm. Damit kann ermittelt werden, welche Fibroblastenzellen nach der Adhäsion noch vital sind.

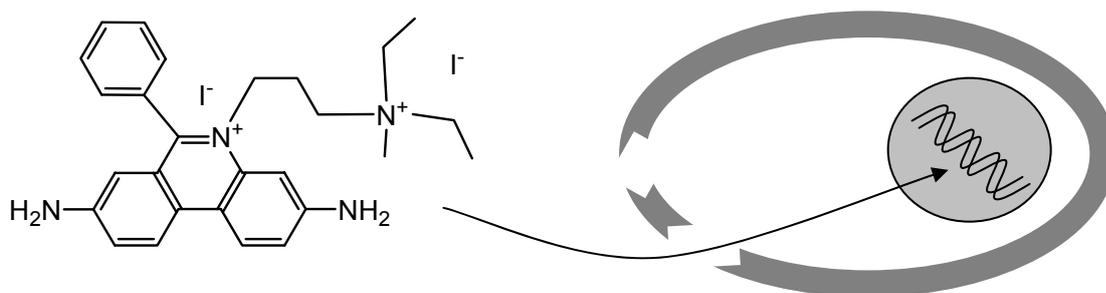


**Abbildung 48:** Calcein AM (R = acetoxymethyl) passiert die intakte Membran und wird in der Zelle von Esterase zu Calcein umgesetzt.



**Abbildung 49:** Fluoreszenzaufnahme einer mit Fibroblasten besiedelten, CO<sub>2</sub>/Ozon-sterilisierten PVDF-Oberfläche nach 72 h Inkubationszeit.

Propidiumiodid, der zweite Farbstoff des Live/Dead®-Kits, emittiert rotes Licht bei 617 nm und kann nur durch die beschädigte Zellmembran in die Zelle eindringen und an die DNS des Zellkerns binden. Ist der Anteil der grün gefärbten, vitalen Zellen sehr niedrig und werden nach 24 h bzw. 72 h Zellen abgetötet und rot gefärbt, weist dies auf eine zytotoxische Oberfläche hin.

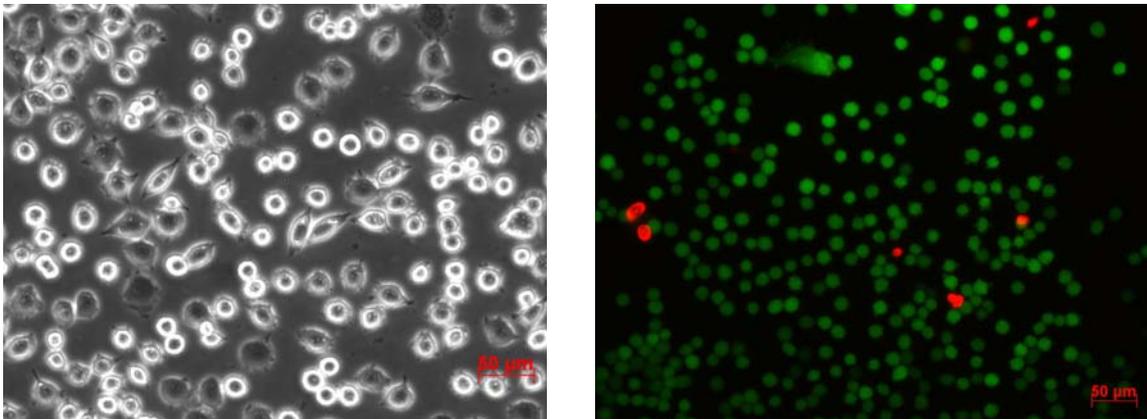


**Abbildung 50:** Propidiumiodid dringt durch die geschädigte Membran ein und bindet an die DNS der Zelle.

Bei keiner der Aufnahmen ist eine signifikante Anzahl an rot gefärbten Zellen zu erkennen (Anhang **Tabelle A6** und **Abbildung 49**), so dass davon ausgegangen werden kann, dass keine der Oberflächen von PVDF, PP oder PLA-co-TMC toxisch auf L929-Fibroblasten wirkt. Allenfalls bei den Proben des TCPS (

**Abbildung 51 b**) sind wenige ( $< 1\%$ ) rot gefärbte Zellen zu erkennen. Damit wurde hier beispielhaft gezeigt, dass mit dem eingesetzten Assay durchaus nekrotische Fibroblasten detektiert werden können. Des Weiteren wird in

**Abbildung 51 a** in einer lichtmikroskopischen Aufnahme nachgewiesen, dass die Fibroblastenzellen anheften, da sie nicht mehr die Kugelform aufweisen, die für in Suspension befindliche Zellen typisch ist, sondern eindeutig adhärente Zellen ausbilden - wenn auch hier die Spreitung der Zellin nicht als optimal bezeichnet werden kann.



**Abbildung 51:** Fibroblastenzellen auf TCPS - **a**) links lichtmikroskopische Aufnahme nach 72 h, **b**) rechts Fluoreszenzaufnahme nach 24 h.

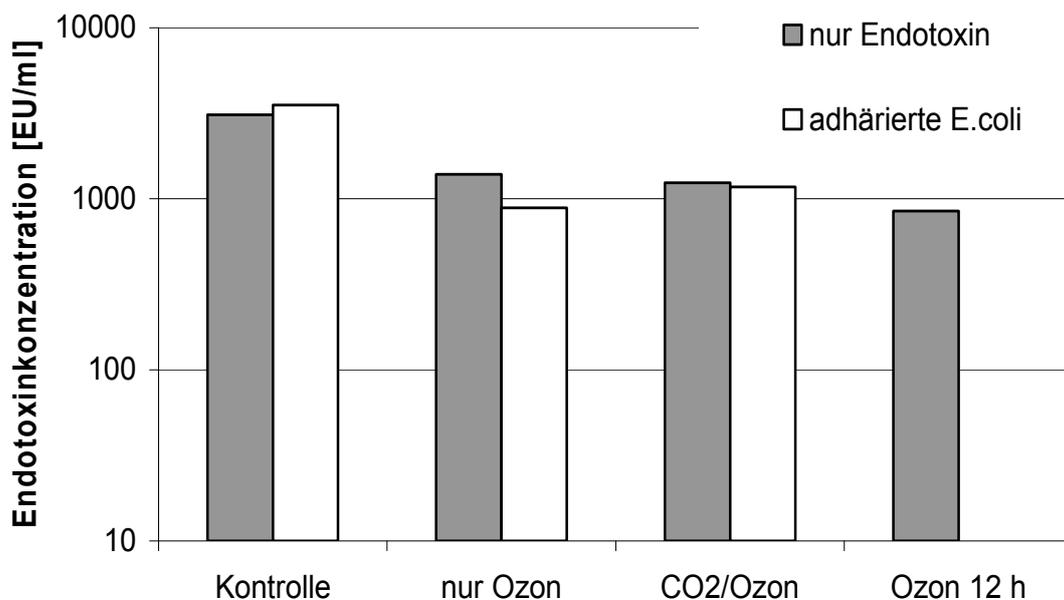
Es ist bekannt, dass viele Sterilisationstechniken die Biokompatibilität von Polymeren negativ beeinflussen. So können einerseits durch polymere Abbauprodukte Entzündungen oder sogar Gewebelyse hervorgerufen werden. Andererseits kann durch die Änderung der Oberflächenchemie der Polymere die initiale Zelladhäsion positiv beeinflusst werden und schließlich auch das Einwachsen des Implantats [49]. Die Nutzung von Säugetierzellen für die *in-vitro* Diagnostik zur Zytotoxizität spielt daher vor Einsatz des sterilisierten Materials *in-vivo* eine wichtige Rolle. Im vorliegenden Kapitel konnte nicht nachgewiesen werden, dass von dem untersuchten Verfahren die Gefahr einer induzierten Zytotoxizität ausgeht.

### 6.3.3 Pyrogenität der Polymere - Endotoxin-Test

Steril bedeutet zwar frei von lebensfähigen Keimen, allerdings kann noch eine weitere Gefahr von abgetöteten Mikroorganismen ausgehen [303]. Endotoxine, Lipopolysaccharide

aus der Zellwand gram-negativer Bakterien, können Fieber und sogar einen septischen Schock auslösen und werden nur durch wenige Sterilisationsverfahren erfolgreich inaktiviert [250, 304]. Der Grenzwert für intravenöse Anwendungen ist auf fünf Endotoxineinheiten (EU) pro kg Körpergewicht nach der European Pharmacopeia festgelegt [305].

Das Lysat aus dem Blut des Pfeilschwanzkrebse koaguliert bei Kontakt mit Endotoxin und wird zur Quantifizierung im sog. LAL-Test eingesetzt. In **Abbildung 52** sind die Ergebnisse der Versuche zur Verringerung der Endotoxinkonzentration auf Implantatoberflächen abgebildet. Dabei wurde sowohl das Bakterium *E. coli*, dessen Zellwand u.a. aus Lipopolysacchariden besteht, als ganzer Mikroorganismus sowie das Endotoxin in isolierter Form auf die Dynamesh<sup>®</sup>-Implantatnetze aus PVDF und PP aufgebracht. Die kontaminierten Netze wurden dem in dieser Arbeit untersuchten Standardzyklus zur Sterilisation unter Druck als auch ohne Druck ausgesetzt. Zusätzlich wurde auch die Auswirkung einer zwölfstündigen Ozonbehandlung auf die Endotoxinkonzentration untersucht.



**Abbildung 52:** Versuch zur Verringerung der Endotoxin-Konzentration auf PP/PVDF-Dynamesh<sup>®</sup>-Implantatnetzen in der Gegenüberstellung der Behandlungsmethoden (n = 1).

Die Ergebnisse zeigen, dass zwar eine Reduktion der Endotoxin-Konzentration sowohl bei isoliertem Endotoxin als auch bei intakten, gram-negativen Zellen möglich ist. Allerdings sind die Reduktionsraten sehr gering und damit für die Aufbereitung von Implantaten ungeeignet. Die Resultate von Rybka et al. [174], die eine erfolgreiche Extraktion mittels scCO<sub>2</sub> zeigen, konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Vielmehr ist zu vermuten, dass die Abnahme der Endotoxinkonzentration auf die oxidative Wirkung des Ozons alleine zurückzuführen ist, da in den Vergleichsexperimenten nur mit Ozon etwa dieselbe Verringerung erreicht wurde wie in der kombinierten Behandlung. Die zwölfstündige Ozonbehandlung bringt keine weitere wesentliche Verringerung der Endotoxinkonzentration, sodass ausgehend von der hier

untersuchten, hohen Endotoxin-Ausgangskonzentration bei den untersuchten Bedingungen keine Reduktion bis unter den Grenzwert - innerhalb einer praktikablen Behandlungszeit - zu erwarten ist.

Zur Zusammenfassung der Einflüsse des Verfahrens auf die wichtigsten biomedizinischen Parameter eines polymeren Implantats oder *scaffolds* eignet sich die Liste der Mindestanforderungen nach Zhang [7] sowie **Abbildung 6**: Die Inaktivierung wurde in Kapitel 6.1 erfolgreich nachgewiesen. Die Untersuchungen zur Pyrogenität zeigen jedoch, dass Reststoffe, wie Endotoxine, nicht in ausreichendem Maße durch das Verfahren entfernt werden können. Durch die Behandlung werden einige Eigenschaften der Polymere verändert, wie in Kapitel 6.2 belegt wurde. Die Proteinadhäsion wurde durch diese Änderungen verstärkt. Wie außerdem in Kapitel 6.3 klar wurde, induzieren die physiko-chemischen Modifikationen der Polymere eine veränderte Zelladhäsion. Diese Zusammenhänge, Kausalitäten und Schlussfolgerungen werden auf den folgenden Seiten zusammenfassend diskutiert.

## 7 Diskussion

**Im Verlaufe des zweijährigen Projektes konnte eine erfolgreiche Strategie zum kombinierten Einsatz von hoch komprimiertem CO<sub>2</sub> und Ozon zur Sterilisation von implantierbaren textilen Werkstoffen entwickelt werden.**

Das umwelt- und materialschonende Verfahren zur Niedrig-Temperatur-Sterilisation wurde am Beispiel von teils thermolabilen Implantatmaterialien auf Basis der Polymere PP, PVDF und PLA-co-TMC untersucht. Die komprimierten Fluide wurden zur Inaktivierung von krankenhausesrelevanten Keimen eingesetzt. Der Einfluss der Prozessparameter auf die Abtötung humanpathogener Bakterien, Pilze sowie Sporen wurden erfolgreich bestimmt.

Um die Sterilisationswirkung des Verfahrens zu ermitteln, wurden auf Cellulose-Keimträgern fixierte vegetative Mikroorganismen mit komprimiertem gasförmigem, flüssigem und überkritischem Kohlendioxid sowie darin gelöstem Wasser behandelt. Es wurde gezeigt, dass vegetative Keime und Sporen erfolgreich bei Temperaturen unter 55 °C inaktivierbar sind. Zur Validierung der Sterilität mittels des Hochdruck-Verfahrens wurden kontaminierte Cellulose-teststreifen mit humanpathogenem *Staphylococcus aureus* bzw. *Candida albicans* eingesetzt. Dabei wurden die wichtigsten Einflussparameter für die Sterilisation in dem Prozess ermittelt. Bei vegetativen Mikroorganismen wurde eine Keimzahlreduktion von mehr als 10<sup>5</sup> mittels komprimiertem CO<sub>2</sub> unter Wasserzugabe schon bei 35 °C erreicht. Sporen der Spezies *Bacillus atrophaeus* (früher: *subtilis*) und *Geobacillus stearothermophilus* wurden ebenso erfolgreich inaktiviert, wobei *B. atrophaeus* als der für das Verfahren weitaus resistere Keim identifiziert wurde. Die Inaktivierung von Sporen ohne Zugabe von Ozon war im Rahmen der untersuchten Parametereinstellungen nicht möglich, wurde aber durch Zugabe des oxidativen Additivs in geringen Mengen erreicht.

Eigenschaften der Oberflächen und der Bulkphasen der Polymere wurden nach der Behandlung eingehend charakterisiert und mit den Eigenschaften von Polymeren verglichen, die mittels konventioneller Ethylenoxidsterilisation behandelt wurden, um den Einfluss der Sterilisationsmethode auf die Polymere zu bestimmen. Mittels DSC, GPC und Zugfestigkeitstests wurde untersucht, ob durch die Sterilisation der Polymermaterialien die Charakteristika der Bulkphase signifikant geändert wurden. Bei der Parametereinstellung zur effektiven Sterilisation wurde eine Materialveränderung beobachtet, die grundsätzlich mit der von konventionellen Niedrig-Temperatur-Methoden vergleichbar ist; nur wenige Polymereigenschaften

wurden signifikant geändert. Bei sterilisiertem PP zeigte sich jedoch Molmassenabbau und damit einhergehend eine Verringerung der Zugfestigkeit. Weiterhin wurde mittels XPS, AFM, ATR-FTIR und Kontaktwinkelmessungen überprüft, ob Benetzungseigenschaften, chemische Zusammensetzung und Morphologie der Polymeroberfläche bzw. der oberflächennahen Bulkphase verändert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Sterilisation aufgrund der Bildung polarer Gruppen auf der Oberfläche des Polypropylens die Benetzbarkeit erhöht wurde.

In Versuchen zu biomedizinischen Eigenschaften der polymeren Implantate wurde die Adhäsion von Proteinen quantifiziert und das Anwachsverhalten von Mausfibroblasten (L929) auf sterilisierten und unbehandelten Folien der Polymere PP, PVDF und PLA-co-TMC verglichen. Untersucht wurde die Anhaftung der Zellen sowie die Schädigung (z.B. durch Reaktionsprodukte oder langlebige Radikale) und schließlich, ob das sterilisierte Material noch Proliferation (Wachstum durch Zellteilung) zulässt. Auf den Polymeroberflächen konnten keine durch die Sterilisation induzierten zytotoxischen Eigenschaften nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigte sich eine verstärkte Anhaftung und Proliferation von Fibroblasten auf PVDF und PLA-co-TMC stattfand. Für Implantate ist das Ergebnis kritisch zu sehen, während es für das *tissue engineering* vorteilhaft ist. Des Weiteren wurde im Rahmen der Biokompatibilitätstests mittels Limulus-Amebozyten-Lysat-Test experimentell gezeigt, dass durch die Behandlung nur unbedeutende Mengen Endotoxine inaktiviert oder abgetragen werden können.

Diese Arbeit belegt, dass der umweltfreundliche Prozess auf Basis von CO<sub>2</sub> für einige Materialien eine Alternative zu den konventionellen Sterilisationsprozessen ist. Darüber hinaus ergeben sich weitere Möglichkeiten für einen Einsatz der Technologie in Bereichen der Medizin, Pharmazeutik-Sterilisation und Biotechnologie.

Die vorliegenden Untersuchungen versuchen die wichtigsten Aspekte der Sterilisation unter Nutzung von komprimiertem CO<sub>2</sub> abzudecken - sie erfüllen dies naturgemäß nur exemplarisch und in einem scharf abgegrenzten Bereich. Die Fülle der angewendeten Produkte, Materialien und Materialkombinationen im medizinischen Bereich ist ebenso variantenreich wie die möglichen biogenen Kontaminationen. Darüber hinaus ist der Einsatz des Verfahrens auch für weitere, nicht in dieser Arbeit untersuchte nicht medizinische Anwendungen denkbar, bei denen nicht vollständige Sterilität nötig ist, sondern die Abtötung vegetativer Keime ausreicht. Der Prozess könnte z.B. für die Inaktivierung von biologischen Kontaminanten – insbesondere Schimmel - auf textilen Kulturgütern, wie Grabtüchern dienen [306-

308]. Vorrangig werden hier aber die wichtigsten Fragestellungen, die sich zwangsläufig aus der Arbeit zur vollständigen Sterilisation ergeben, dargestellt.

Die in vorliegender Arbeit untersuchten Keime sind hinsichtlich ihrer Inaktivierungsresistenz durchaus als anspruchsvoll einzustufen. Bisher wurde jedoch noch nicht untersucht, wie die CO<sub>2</sub>/Ozon-Inaktivierung bei Mehrfachlagen von Bakterien wirkt. So ist ggfs. ein Inaktivierungsgradient von äußeren zu inneren Schichten denkbar. In den vergangenen Jahren nehmen die Forschungsarbeiten zur Biofilmbildung zu, wie man an der über die letzten zehn Jahre steigenden Anzahl an Publikationen sieht. Krankenhausrelevante Keime wie *E. faecalis*, *P. aeruginosa* und *S. atropheus* sind Biofilmbildner und zeigen gegenüber der körpereigenen Immunabwehr und bioziden Substanzen ein erhöhtes Resistenzvermögen [309]. Die extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) bilden ein komplexes, heterogenes System, das die Bakterien im Biofilm vor Bioziden besser schützt als planktonische Zellen und stellen außerdem einen idealen Ort für lateralen Gentransfer dar [310]. Daher sollten künftige Untersuchungen auch die Inaktivierung von Mikroorganismen in Bakterienkolonien und die Durchdringung der EPS-Matrix durch CO<sub>2</sub> betrachten.

Selbst Grundlagen der Inaktivierung von Mikroorganismen mittels CO<sub>2</sub> und Ozon sind noch weitgehend ungeklärt. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben bisher nur Hinweise, welche möglichen Mechanismen die Inaktivierung der Keime bestimmen. Dieser Punkt muss dringend weiter vertieft werden. Außerdem wurde die Inaktivierung anderer infektiöser biologischer Systeme, wie Mycoplasten (zellwandfreie Organismen), Viren, Viroide und Prionen in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Für die Übertragung des Verfahrens auf andere Produkte, wie beispielsweise Plasmen und Seren, für den Einsatz im menschlichen Körper sollten in weiteren Arbeiten die genannten biologischen Systeme in Betracht gezogen werden. Bisher sind nur Arbeiten zur Phageninaktivierung in hochkomprimiertem Phosphatpuffer (PBS) bekannt [311].

Da der in dieser Arbeit behandelte Prozess nur im Hinblick auf Keiminaktivierung optimiert wurde, sollten Variationen der Parameter untersucht werden, die die Materialschonung in den Fokus rücken. Dabei gilt zu bedenken, dass zwar bei dem untersuchten Sterilisationsprozess grundlegend gezeigt wurde, dass eine Inaktivierung relevanter Keime um bis zu 6 log-Stufen möglich ist - bei konventionellen Prozessen muss jedoch ein sogenannter sterility assurance level (SAL) eingehalten werden, der gewöhnlich eine Verdopplung der Behandlungszeit vorsieht [138, 312, 313]. In Anbetracht der an Polypropylen gezeigten Schädigungen durch oxidativen Angriff sollte eine dem Prozess nachgeschaltete Inertisierung des Produkts – beispielsweise mittels Stickstoffspülung und Verpackung unter Stickstoffatmosphäre zur Unterbindung der weiteren Bildung von Peroxiradikalen nach der Sterilisation – in

Betracht gezogen werden. Des Weiteren ist die Analyse von - für die gamma-Sterilisation entwickeltem - stabilisiertem PP, dem Antioxidanzien und Radikalfänger beigemischt werden [314, 315], sicherlich vielversprechend und könnte auch auf andere Biomaterialien anwendbar sein.

Der Erkenntniszuwachs und die Entwicklungen im Fachgebiet des *tissue engineering* für die Gestaltung von neuem, funktionalisiertem Gewebe [16] waren in den letzten zehn Jahren enorm. Zwei- sowie dreidimensionale Kunststoffimplantate bilden spezielle Gerüststrukturen, die immer häufiger zur Gewebezüchtung eingesetzt werden, um menschliches Gewebe zu bewahren, wiederherzustellen oder um die Funktion von geschädigtem Gewebe oder Organen zu verbessern. Das Fachgebiet der „novel organs“ ist durch die jüngsten Fortschritte in der Stammzellforschung verstärkt ins Interesse der Wissenschaft gerückt [175]. Insbesondere die Entwicklung der letzten Jahre im Bereich des Rapid-Prototyping lassen eine individuelle Herstellung von polymerbasierten Implantaten on-demand zu [316-318]. Mittels nachgeschalteter Sterilisation ohne mehrtägige Quarantänezeiten [12, 302] wäre dementsprechend die Herstellung von maßgeschneiderten Prothesen und nahezu sofortigen Einsatz in den Körper in greifbare Nähe gerückt. In diesem Bereich, wie auch für Arbeiten in der Biotechnologie *in-vitro* als auch im Pilot- oder Produktionsmaßstab sind sterile Materialien begehrt, sofern es gelingt, entsprechende Werkstoffe sicher und substratschonend zu sterilisieren [319].

Für die Chirurgie im Bereich der Weichteilgewebe wie Brustimplantate und artifizieller Haut sind Materialien, wie Silikone, Hydrogele oder Collagen von Interesse [320, 321]. Daneben spielen natürlich auch nicht-polymere Materialien in der Medizin insbesondere für Implantate eine Rolle. So werden in Bestandteile des kardiovaskulären Systems, wie Herzschrittmachern und -klappen, Stents (röhrenförmige Stützgerüste) aber auch in Orthopädie- und Dentalimplantaten Metalle, wie Aluminium, Edelstahl, Cobalt-Chrom-Legierungen und Titan eingesetzt [33, 49]. Weiterhin werden von der Biotechnologie für den Diagnosebereich Sensoren, Elektroden und Batterien entwickelt. Ansätze, wie lab-on-a-chip werden verfolgt, bei denen Materialien wie Glas, Halbleiter, Platin, Gold, Titan oder Tantal in extrem filigranen Schichten zum Einsatz kommen [7], deren Resistenz nicht einmal gegenüber konventionellen Sterilisationsmethoden bekannt ist. Eine Ausweitung der zu untersuchenden Materialien sollte außerdem Membranen mit einbeziehen, die bei der Hämodialyse, Plasmapherese, Oxygenierung und Ultrafiltration, also im medizinischen und Nahrungsmittelbereich eingesetzt werden [22, 322, 323]. Es ist zu klären, ob Objekte mit funktionalisierten Oberflächen [168], z.B. mit proteinabweisendem Polyethylenglykol [324], Polyethylenoxid [297] oder mit

Beschichtungen mit Heparin [325] und Albumin [326] mit dem hier gezeigten Verfahren sterilisiert werden können.

Wie in der Einleitung dargelegt wurde, ist die Anheftung von Fibroblastenzellen - und damit das Anwachsverhalten des textilen Implantats - wesentlich von der vorgeschalteten Adsorption von Proteinen abhängig. Um diesem Fakt Rechnung zu tragen, sollten sich vertiefende Arbeiten mit dem Mechanismus der Anheftung und der Charakterisierung relevanter Parameter, wie z.B. der Oberflächenladung, beschäftigen. Die Protein-Adsorption kann beispielsweise mit der ELISA-Techniken [36], Fluoreszenzspektroskopie oder Reflektometrie [282] näher untersucht werden. Vor dem Einsatz *in-vivo* müssen weitere *in-vitro* Studien zur Biotoxizität und -kompatibilität der Materialien durchgeführt werden. Insbesondere Langzeit-Zellversuche mit Fibroblasten, Endothelzellen, Osteoblasten und Hela-Zellen, Hämotoxizität mit roten Blutzellen und Endothelzellen und die Mutagenität mit dem Ames'-Test [7] stellen wichtige Bausteine für den Erkenntnisgewinn dar, der vor Einsatz des Medizinprodukts im Menschen zwingend erforderlich ist.

## 8 Öffentlichkeitsarbeit

Gemäß den Richtlinien der DBU wurde im April 2008 in Osnabrück ein Statusseminar abgehalten. Am 24.03.2009 fand in Krefeld ein Abschlusssseminar zur Präsentation der erzielten Resultate statt. Die Ergebnisse sollen zu einem späteren Zeitpunkt in der einschlägigen Fachliteratur veröffentlicht werden\*. Darüber hinaus wird der Abschlussbericht in einer verkürzten Form als DTNW-Mitteilung publiziert. Des Weiteren wurden die Arbeiten auf internationalen Fachtagungen in Form von Vorträgen und Postern präsentiert:

“Sterilisation medizinischer Hochleistungs-Textilien mittels komprimiertem CO<sub>2</sub> und O<sub>3</sub> Techtexil, 14. Internationales Techtexil-Symposium für Technische Textilien, Vliesstoffe, und textilmarmierte Werkstoffe, Frankfurt, 2007

“Sterilise implantable high-tech (bio-) materials the eco-friendly way” 11th European meeting on Supercritical Fluids, Barcelona, 2008

“Low-temperature sterilisation of polymers for biomedical applications using sub- and supercritical fluids” Poster Präsentation und Vortrag anlässlich des Malcom-Lilly-awards, 7th European Symposium on Biochemical Engineering Science, Faro, 2008

"Eco-friendly sterilisation of implantable textiles - Process compatibility for high-tech (bio-) polymers" ESB European Symposium on Biomaterials, Brighton, UK, 2007

\*Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse sind größtenteils aus der Dissertationsschrift „Sterilisation implantierbarer (Bio-) Polymere mit Ozon in hoch komprimierten Fluiden - umweltverträgliche Inaktivierung von Biokontaminanten“ von Claudio Cinquemani, Einreichung im März 2009 an der Universität Duisburg-Essen entnommen.

## 9 Fazit

In dem zweijährigen von der DBU geförderten Forschungsvorhaben haben die Projektpartner DTNW und FEG gemäß der anfänglichen Zielsetzung eine Verfahrenstechnik zur Sterilisation von Medizinaltextilien und Implantaten mittels hochkomprimiertem Kohlendioxid und Ozon.

Dabei wurde die Partnerstruktur im Vorfeld so gewählt, dass neben der Forschungseinrichtung des DTNW ein Anwender vorhanden war, mit dem die Umsetzung der Fragestellungen vom Labormaßstab in die industrielle Praxis diskutiert wurde. Gemäß dem Projektantrag wurden die Labor- und Technikumsversuche sowie die textilspezifischen Untersuchungen überwiegend am DTNW durchgeführt. Die FEG stellte die implantierbaren Polymernetze zur Verfügung und führte Zugfestigkeitsanalysen sowie Teile der biomedizinischen Analysen statt.

**Die Zusammenarbeit der Partner erwies sich dabei als fruchtbar und die durchgeführte Vorgehensweise hat sich bewährt, so dass im Verlaufe des Projektes die gesteckten Ziele erfüllt und über die Projektziele hinaus wertvolle Informationen zu dem Verfahren gewonnen werden konnten.**

Normalerweise fallen im Bereich Textilsterilisation große Mengen (chemikalienhaltigen) Abwassers oder gasförmige Emissionen wodurch Umweltressourcen (Luft, Wasser und Boden) belastet werden [24, 327]. Da bei dem Verfahren hochkomprimierte Fluide eingesetzt werden, die bei Normbedingungen gasförmig vorliegen, wird der Anfall von Abwasser vollständig vermieden. Das Sterilisationsmittel Ozon ist zwar toxisch, wird jedoch nach Einsatz *on-site* durch einen Katalysator rückstandsfrei zu Sauerstoff zersetzt, womit der Prozess eigensicher ist. Weil neben dem Kohlendioxid und Sauerstoff (zur Erzeugung des Ozons) keine zusätzlichen Einsatzstoffe gebraucht werden, reduzieren sich signifikant die Kosten für Chemikalien und Sicherheitsmaßnahmen [202]., die bisher gegen toxische und entflammbare Stoffe getroffen werden mussten. Die Entsorgung von umweltschädlichen Desinfektionsmitteln erfordert zumeist den Transport auf der Straße oder Schiene. Sowohl seitens der Emissionen als auch der Verfahrenssicherheit werden Vorteile durch das neue Verfahren gegenüber konventionellen Prozessen erzielt. In- oder externe Krankenhaussterilisatoren und Sterilisations-Dienstleister sind prädestiniert dafür, das neue Verfahren zu nutzen.

Bisher werden bei den konventionellen Desinfektions- und Sterilisationsverfahren textile Materialien angegriffen bzw. deren Lebenszeit erheblich herabgesetzt. Die Umstellung auf das hier untersuchte Verfahren würde die Implementierung neuer Apparate erfordern. Hochdruckverfahren auf Basis von CO<sub>2</sub> werden bisher nur zur Reinigung von Textilien eingesetzt – die Umstellung auf eine Zudosierung von Ozon würde lediglich die Materialwahl bei nicht metallischen Bauteilen beeinflussen. Aufgrund der Investitionskosten ist daher der neue Prozess speziell für hochpreisige und sensible Medizinaltextilien, wie beispielsweise Kleidung von Operationspersonal oder Abdecktücher von Vorteil. Bisher fielen zudem im Krankenhausbereich durch den Einsatz von Einwegtextilien große Mengen Abfall an - durch eine CO<sub>2</sub>/O<sub>3</sub>-Behandlung von temperaturempfindlichen OP-Textilien wäre die Umstellung auf ein Mehrwegsystem möglich und würde eine Abfallreduzierung bewirken. Insbesondere aber Implantate, wie die in dieser Arbeit untersuchten implantierbaren IPOM Herniennetze, die mit Preisen von über 1000 €/Netzimplantat anzusetzen sind [225], sind aus ökonomischer Sicht von Interesse.

Ein Sterilisationsprozess für Medizinaltextilien, bei dem weder mit giftigen Substanzen umgegangen noch mit hohen Temperaturen gearbeitet werden muss, ist noch eine völlige Neuheit. Es gibt weltweit noch keine entsprechende Technologie. Temperaturempfindliche textile Materialien werden in der Medizintechnik derzeit kaum eingesetzt und würden eine wesentliche Innovation in dieser Branche darstellen. Weiterhin würde bei Vorhandensein eines nicht temperatur- oder chemikalienbasierten HP-CO<sub>2</sub>-Sterilisationsverfahrens die Entwicklung temperatursensitiver Biomaterialien schneller vorangetrieben werden können.

Aus dem erfolgreichen Projekt ergeben sich neue Aufgabenstellungen für die Zukunft, wie etwa die Einbeziehung biogener Materialien und die Entwicklung einer on-demand Technologie.

## 10 Literatur

- [1] Walzak, M.J., Flynn, S. Foerch, R. Hill, J.M., Karbaszewski, E., Lin, A., Strobel, M. (1995): UV and ozone treatment of polypropylene and poly(ethylene terephthalate). In *Polymer Surface Modification: Relevance to adhesion*. Ed. Mittal, K.L., VSP, Utrecht, pp. 253-272.
- [2] Daschner, F.: *Praktische Krankenhaushygiene und Umweltschutz*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1997.
- [3] Block, S.S.: *Disinfection, Sterilisation and Preservation*. Lea & Febiger, Philadelphia, London 1991.
- [4] Sheng, W.H., Wang, J.T., Lu, D.C.T., Chie, W.C., Chen, Y.C., Chang, S.C. (2005) Comparative impact of hospital-acquired infections on medical costs, length of hospital stay and outcome between community hospitals and medical centres. *Journal of Hospital Infection* 59: 205-214.
- [5] Amato-Gauci, A., Ammon, A.: Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe. European Centre for Disease prevention and Control, Stockholm 2007.
- [6] P. Vandendaele, A.L.a.W.C.W., J. Krueger (2005): Reducing microbial contamination in hospital blankets: a contribution to combat nosocomial infections (hospital infections). In *Medical textiles and biomaterials for healthcare*. Ed. S. C. Anand, M.M., S. Rajendran, University of Bolton and J. F. Kennedy, Chembiotech Ltd, UK, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.
- [7] Zhang, M. (2004): Biocompatibility of Materials. In *Biomaterials and Tissue Engineering*. Ed. Shi, D., Springer, Berlin, pp. 83-137.
- [8] Loy, W.: *Textile Produkte für Medizin, Hygiene und Wellness*. Deutscher Fachverlag GmbH, Frankfurt-Main 2006.
- [9] Barrie, D. (1994) How hospital linen and laundry services are provided. *Journal of Hospital Infection* 27: 219-235.
- [10] Ferreira, L.M., Casimiro, M.H., Oliveira, C., Cabeco Silva, M.E., Marques Abreu, M.J., Coelho, A. (2002) Thermal analysis evaluation of mechanical properties changes promoted by gamma radiation on surgical polymeric textiles. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 191: 675-679.
- [11] Best, M., Neuhauser, D. (2004) Ignaz Semmelweis and the birth of infection control. *Qual Saf Health Care* 13: 233-234.
- [12] Wallhäuser, K.H.: *Praxis der Sterilisation, Desinfektion - Konservierung*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1995.
- [13] Rutala, W.A., Weber, D.J. (1999) Infection control: the role of disinfection and sterilization. *Journal of Hospital Infection* 43: S43-S55.
- [14] Benediktsdottir, E., Kolstad, K. (1984) Non-sporeforming anaerobic bacteria in clean surgical wounds - air and skin contamination. *Journal of Hospital Infection* 5: 38-49.
- [15] Jalovaara, P., Puranen, J. (1989) Air bacterial and particle counts in total hip replacement operations using non-woven and cotton gowns and drapes. *Journal of Hospital Infection* 14: 333-338.
- [16] Edwards, S.L. (2004) Design of nonwoven scaffold structures for tissue engineering of the anterior cruciate ligament. *AUTEX Research Journal*.
- [17] Hanker, J.S., Giammara, B.L. (1988) Biomaterials and biomedical devices. *Science* 242: 885-892.
- [18] Rigby, A.J., Anand, S.C., Horrocks, A.R. (1997) Textile Materials for Medical Healthcare Applications. *J.Text.Inst.* 88: 83- 93.
- [19] Jansson, V., Thal, C., Arnholz, S., Milz, K. U., Koch und Refior, H. J. (2000) Ein neues resorbierbares Knochen-Knorpel-Ersatztransplantat. *Der Orthopäde* 29: 151-157.
- [20] Fu, T., Zhao, J.-L., Xu, K.-W. (2007) The designable elastic modulus of 3-D fabric reinforced biocomposites. *Materials Letters* 61: 330-333.
- [21] Hongu, T., Phillips, G. O. : *New fibers*. Crc Pr Inc, Chichester 1997.
- [22] Ulbricht, M. (2006) Advanced functional polymer membranes. *Polymer* 47: 2217-2262.
- [23] Lankester, B.J.A. (2002) Direct measurement of bacterial penetration through surgical gowns: a new method. *Journal of Hospital Infection*.
- [24] Lohman, J.H. (2002) A History of Dry Cleaners and Sources of Solvent Releases from Dry Cleaning Equipment. *Environmental Forensics* 3: 35-58.
- [25] Spilimbergo, S., Elvassore, N., Bertuccio, A. (2002) Microbial inactivation by high-pressure. *The Journal of Supercritical Fluids* 22: 55-63.
- [26] Beckman, E.J. (2004) Supercritical and near-critical CO<sub>2</sub> in green chemical synthesis and processing. *The Journal of Supercritical Fluids* 28: 121-191.

- [27] Andrews, K.D., Hunt, J.A., Black, R.A. (2007) Effects of sterilisation method on surface topography and in-vitro cell behaviour of electrostatically spun scaffolds. *Biomaterials* 28: 1014-1026.
- [28] Nuutinen, J.-P., Clerc, C., Virta, T., Törmälä, P. (2002) Effect of gamma, ethylene oxide, electron beam, and plasma sterilization on the behaviour of SR-PLLA fibres in vitro. *Journal of biomaterials science. Polymer edition* 13: 1325-1336.
- [29] Hopper, R.H., Engh, C.A., Fowlkes, L.B., Engh, C.A. (2004) The pros and cons of polyethylene sterilization with gamma irradiation. *Clinical orthopaedics and related research*: 54-62.
- [30] Liu (2004): Biocompatibility of Materials. In *Biomaterials and Tissue Engineering*. Ed. Shi., D., Springer Berlin, pp. 83-137.
- [31] Mei Fang Zhu, Y., H.: Handbook of Fibre Chemistry. CRC Press 2006.
- [32] Bethge, T.: Universität zu Lübeck, 2004.
- [33] Riepe, G., Heintz, C., Kaiser, E., Chakfé, N., Morlock, M., Delling, M., Imig, H. (2002) What can we learn from Explanted Endovascular Devices? *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 24: 117-122.
- [34] Klinge, U., Klosterhalfen, B., Öttinger, A.P., Junge, K., Schumpelick, V. (2002) PVDF as a new polymer for the construction of surgical meshes. *Biomaterials* 23: 3487-3493.
- [35] Marmey, P., Porté, M.C., Baquey, C. (2003) PVDF multifilament yarns grafted with polystyrene induced by [gamma]-irradiation: Influence of the grafting parameters on the mechanical properties. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 208: 429-433.
- [36] Klee, D., Ademovic, Z., Bosserhoff, A., Hoecker, H., Maziolis, G., Erli, H.-J. (2003) Surface modification of poly(vinylidene fluoride) to improve the osteoblast adhesion. *Biomaterials* 24: 3663-3670.
- [37] Valentini, R.F., Vargo, T.G., Gardella Jr, J.A., Aebischer, P. (1992) Electrically charged polymeric substrates enhance nerve fibre outgrowth In vitro. *Biomaterials* 13: 183-190.
- [38] Berger, D., Bientzle, M. (2007) Laparoscopic Repair of Parastomal Hernias: A Single Surgeon's Experience in 66 Patients. *Diseases of the Colon and Rectum* 50.
- [39] Anonymus (2008): DuPont POLICY Regarding Medical Applications of DuPont Materials. Ed. Company, E.I.d.P.d.N.a., retrieved from personal contact email: Ivo Erren DuPont Fluoroproducts Sales Representative.
- [40] D'Eon, J.C., Mabury, S.A. (2007) Production of Perfluorinated Carboxylic Acids (PFCAs) from the Biotransformation of Polyfluoroalkyl Phosphate Surfactants (PAPS): Exploring Routes of Human Contamination. *Environ.Sci.Technol.* 41: 4799-4805.
- [41] Sinclair, E., Kim, S.K., Akinleye, H.B., Kannan, K. (2007) Quantitation of Gas-Phase Perfluoroalkyl Surfactants and Fluorotelomer Alcohols Released from Nonstick Cookware and Microwave Popcorn Bags. *Environ.Sci.Technol.* 41: 1180-1185.
- [42] Tittlemier, S.A., Pepper, K., Seymour, C., Moisey, J., Bronson, R., Cao, X.L., Dabeka, R.W. (2007) Dietary Exposure of Canadians to Perfluorinated Carboxylates and Perfluorooctane Sulfonate via Consumption of Meat, Fish, Fast Foods, and Food Items Prepared in Their Packaging. *Environ.Sci.Technol.* 55: 3203-3210.
- [43] Gupta, B., Revagade, N., Hilborn, J. (2007) Poly(lactic acid) fiber: An overview. *Progress in Polymer Science* 32: 455-482.
- [44] Athanasiou, K.A., Niederauer, G.G., Agrawal, C.M. (1996) Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 17: 93-102.
- [45] Schiller, C., Rasche, C., Wehmöller, M., Beckmann, F., Eufinger, H., Epple, M., Weihe, S. (2004) Geometrically structured implants for cranial reconstruction made of biodegradable polyesters and calcium phosphate/calcium carbonate. *Biomaterials* 25: 1239-1247.
- [46] Kasperczyk, J., Jelonek, K., Dobrzyński, P., Jarz, B. (2006) The influence of copolymer chain microstructure on cyclosporine a (CyA) and Sirolimus prolonged and sustained release from PLA/TMC and PLA/PCL matrices. *Journal of Controlled Release* 116: e5-e6.
- [47] Fabre, T., Schappacher, M., Bareille, R., Dupuy, B., Soum, A., Bertrand-Barat, J., Baquey, C. (2001) Study of a (trimethylenecarbonate-co-[var epsilon]-caprolactone) polymer - Part 2: In-vitro cytocompatibility analysis and in vivo ED1 cell response of a new nerve guide. *Biomaterials* 22: 2951-2958.
- [48] Klee, D., Höcker, H. (1999) Polymers for biomedical applications: improvement of the interface compatibility. *Advances in Polymer Science* 149: 1-57.
- [49] An, Y.H., Alvi, F.I., Kang, Q., Laberge, M., Drews, M.J., Zhang, J., Matthews, M.A., Arciola, C.R. (2005) Effects of sterilization on implant mechanical property and biocompatibility. *The International journal of artificial organs* 28: 1126-1137.
- [50] Rutala, W.A., Weber, D. J. (1999) Infection control: the role of disinfection and sterilization. *Journal of Hospital Infection* 43: S43-S55.

- [51] Peniston, S.J., Choi, S.J. (2007) Effect of sterilization on the physicochemical properties of molded poly(L-lactic acid). *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 80: 67-77.
- [52] Croonenborghs, B., Smith, M.A., Strain, P. (2007) X-ray versus gamma irradiation effects on polymers. *Radiation Physics and Chemistry* 76: 1676-1678.
- [53] Moreira, A.J., Mansano, R.D., Andreoli Pinto, T.d.J., Ruas, R., Zambon, L.d.S., da Silva, M.V., Verdonck, P.B. (2004) Sterilization by oxygen plasma. *Applied Surface Science* 235: 151-155.
- [54] Kayser, H.K., Bienz, K.A., Eckert, J., Zinkernagel, R.M.: *Medizinische Mikrobiologie*. Thieme Verlag, Stuttgart 1998.
- [55] Brock, T.: *Mikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin 2001.
- [56] Neely, A.N. (2000) Survival of Enterococci and Staphylococci on Hospital Fabrics and Plastic. *Journal of clinical microbiology* 38.
- [57] Russel, A.D., Chopra, I.: *Understanding antibacterial action and resistance*. Ellis Horwood, New York 1996.
- [58] Schlegel, H.-G., Zaborosch, C.: *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme Verlag, Stuttgart 2007.
- [59] Schaal, K.P. (1991) Medical and microbiological problems arising from airborne infection in hospitals. *Journal of Hospital Infection* 18: 451-459.
- [60] Roncoroni (1983) Disinfection in washing machines. *Journal of Hospital Infection* 4: 101-102.
- [61] Dharan, S., Pittet, D. (2002) Environmental controls in operating theatres. *Journal of Hospital Infection* 51: 79-84.
- [62] Weyenberg, W., Vermeire, A., D'Haese, E., Vanhaelewyn, G., Kestelyn, P., Callens, F., Nelis, H.J., Remon, J.P., Ludwig, A. (2004) Effect of different sterilisation methods on the properties of bioadhesive powders and ocular minitablets, and clinical evaluation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 23: 77-87.
- [63] Plester, D.: *The effect of radiation sterilisation on plastics*. Duke University press, Durham 1973.
- [64] Jahan, M.S., King, M. C., Haggard, W. O., Sevo, K. L., Parr, J. E. (2001) A study of long-lived free radicals in gamma-irradiated medical grade polyethylene. *Radiation Physics and Chemistry* 62: 141-144.
- [65] Russell, A.D., Hugo, W.B., Ayliffe, G.A.J.: *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilisation*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne 1982.
- [66] Rosaspina, S., Salvatorelli, G., Anzanel, D. (1994) The bactericidal effect of microwaves on *Mycobacterium bovis* dried on scalpel blades. *Journal of Hospital Infection* 26: 45-50.
- [67] Young, S.K., Graves, D.C., Rohrer, M.D., Bulard, R.A. (1985) Microwave sterilization of nitrous oxide nasal hoods contaminated with virus. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 60: 581-585.
- [68] Najdovski, L., Dragas, A.Z., Kotnik, V. (1991) The killing activity of microwaves on some non-sporogenic and sporogenic medically important bacterial strains. *Journal of Hospital Infection* 19: 239-247.
- [69] Ernst, R.R. (1962) Ethylene oxide gaseous sterilisation. *Appl. microbiol.* 10: 337-341.
- [70] Dillow (1999) Bacterial inactivation by using near- and supercritical carbon dioxide. *Proc.Natl.Sci. USA* 96: 10344-10348.
- [71] Shi, L. (1999) Investigation of polymer surface dynamics modified by plasma by using dynamics contact angle method. *Yingyong Kexue Xuebao* 17: 405-410.
- [72] Vandencastele, N., Merche, D., Reniers, F. (2006) XPS and contact angle study of N<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> plasma-modified PTFE, PVDF and PVF surfaces. *Surface and Interface Analysis* 38: 526-530.
- [73] Lerouge, S. (2001) Plasma Sterilisation: A review of Parameters, Mechanisms, and Limitations. *Plasmas and Polymers* 6: 175-188.
- [74] Moisan, M. (2002) Plasma sterilisation: Methods and mechanisms. *Pure Appl. Chem.* 74: 349-358.
- [75] Hettlich, H.J., Otterbach, F., Mittermayer, C., Kaufmann, R., Klee, D. (1991) Plasma-induced surface modifications on silicone intraocular lenses: chemical analysis and in vitro characterization. *Biomaterials* 12: 521-524.
- [76] Jarzebski, A.B., Malinowski, J.J. (1995) Potentials and Prospects for Application of Supercritical Fluid Technology in Bioprocessing. *Process Biochemistry* 30: 343-352(310).
- [77] König, A. (2005): Andere Kristallisationsverfahren. In *Kristallisation in der industriellen Praxis*. Ed. Hofmann, G., Wiley VCH, pp. 237-262.
- [78] Jessop, P.G., Leitner, W.: *Chemical Synthesis Using Supercritical Fluids*. Wiley VCH, Weinheim 1999.
- [79] Author: USA Patent (1977).
- [80] Schollmeyer, E., Knittel, D., Buschmann, H.-J., Kosfeld, R. (1990): Verfahren zum Reinigen bzw. Waschen von Bekleidungsstücken oder dergleichen. In *Patentschrift*. Ed. DTNW, Germany.

- [81] General-Electric (2002) General Electric patents dry cleaning process. *Focus on Surfactants* 2002: 5.
- [82] HPC, U. (2002) Dry cleaning system patented by Unilever HPC. *Focus on Surfactants* 2002: 5.
- [83] Weast, C.R., Astle, M.J. (Eds.): *Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, Boca Raton 1981.
- [84] Sun, Y., Shekunov, B.Y. (2003) Surface tension of ethanol in supercritical CO<sub>2</sub>. *The Journal of Supercritical Fluids* 27: 73-83.
- [85] King, J.W., Williams, L.L. (2003) Utilization of critical fluids in processing semiconductors and their related materials. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 7: 413-424.
- [86] Sutjiadi-Sia, Y., Jaeger, P., Eggers, R. (2008) Interfacial phenomena of aqueous systems in dense carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids* 46: 272-279.
- [87] van Roosmalen, M.J.E., Woerlee, G.F., Witkamp, G.J. (2004) Surfactants for particulate soil removal in dry-cleaning with high-pressure carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids* 30: 97-109.
- [88] van Roosmalen, M.J.E., van Diggelen, M., Woerlee, G.F., Witkamp, G.J. (2003) Dry-cleaning with high-pressure carbon dioxide--the influence of mechanical action on washing-results. *The Journal of Supercritical Fluids* 27: 97-108.
- [89] Galy, J., Sawada, K., Fournel, B., Lacroix-Desmazes, P., Lagerge, S., Persin, M. (2007) Decontamination of solid substrates using supercritical carbon dioxide--Application with trade hydrocarbonated surfactants. *The Journal of Supercritical Fluids* 42: 69-79.
- [90] Lemmon, E.W., McLinden, M.O., Friend, D.G. (2005): Thermophysical Properties of Fluid Systems. In *NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69*, <http://webbook.nist.gov>. Ed. Mallard, E.P.J.L.a.W.G., National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899.
- [91] Henkel, K.: *Waschmittelchemie*. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg 1976.
- [92] Moerman, F., Mertens, B., Demey, L., Huyghebaert, A. (2001) Reduction of *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* and *Streptococcus faecalis* in meat batters by temperature-high hydrostatic pressure pasteurization. *Meat Science* 59: 115-125.
- [93] Ananta, E., Heinz, V., Knorr, D. (2004) Assessment of high pressure induced damage on *Lactobacillus rhamnosus* GG by flow cytometry. *Food Microbiology* 21: 567-577.
- [94] Yuste, J., Capellas, M., Fung, D.Y.C., Mor-Mur, M. (2004) Inactivation and sublethal injury of foodborne pathogens by high pressure processing: Evaluation with conventional media and thin agar layer method. *Food Research International* 37: 861-866.
- [95] Wei, C.I., Balaban, M.O., Fernando, S., Peplow, A.J. (1990) Bacterial Effect of high pressure CO<sub>2</sub> treatment on foods spiked with listeria or salmonella. *Journal of food Protection* 54: 189-193.
- [96] Erkmén, O., Karaman, H. (2001) High carbon dioxide pressure inactivation kinetics of *Escherichia coli* in broth. *Food Microbiology* 18: 11-16.
- [97] Butz, P., Funtenberger, S., Haberditzl, T., Tauscher, B. (1996) High Pressure Inactivation of *Byssoschlamys nivea* Ascospores and Other Heat Resistant Moulds. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 29: 404-410.
- [98] Voldrich, M., Dobias, J., Ticha, L., Cerovsky, M., Kratka, J. (2004) Resistance of vegetative cells and ascospores of heat resistant mould *Talaromyces avellaneus* to the high pressure treatment in apple juice. *Journal of Food Engineering* 61: 541-543.
- [99] Wilkinson, N., Kurdziel, A.S., Langton, S., Needs, E., Cook, N. (2001) Resistance of poliovirus to inactivation by high hydrostatic pressures. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2: 95-98.
- [100] Solomon, L., Zeegen, P., Eiserling, F.A. (1966) The effects of high hydrostatic pressure on coliphage T-4. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biophysics including Photosynthesis* 112: 102-109.
- [101] Nakagami, T., Shigehis, T., Ohmori, T., Taji, S., Hase, A., Kimura, T., Yamanishi, K. (1992) Inactivation of herpes viruses by high hydrostatic pressure. *Journal of Virological Methods* 38: 255-261.
- [102] Russell, A.D., Harrison, I.H. (1993) Chemical disinfectants for hospital and veterinary use. *The Lancet* 341: 1284.
- [103] Bertucco, A., Spilimbergo, S., Vetter, G. (2001): Treating micro-organisms with high pressure. In *Industrial Chemistry Library*, Elsevier, pp. 626-640.
- [104] Lin, H.-M. (1991) Disintegration of Yeast Cells by Pressurized Carbon Dioxide. *Biotechnol. Prog.* 1991: 201-204.
- [105] Lin, H.-M., Zhiying, Y., Li, F.C. (1993) Inactivation of *Leuconostoc dextranicum* with carbon dioxide under pressure. *The Chemical Engineering Journal* 52: B29-B34.

- [106] Parton, T., Bertucco, A., Elvassore, N., Grimolizzi, L. (2007) A continuous plant for food preservation by high pressure CO<sub>2</sub>. *Journal of Food Engineering* 79: 1410-1417.
- [107] Author: (1990).
- [108] Schmidt, A., Beermann, K., Bach, E., Schollmeyer, E. (2007) Disinfection of textile materials contaminated with E. coli in liquid carbon dioxide. *Journal of Cleaner Production* 42.
- [109] Debs-Louka, L., Abraham, G., Chabot, V., Ilaf, K.A. (1999) Effect of Compressed Carbon Dioxide on Microbial Cell Viability. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 65: 626-631.
- [110] Isenschmid, A. (1995) The influence of pressure and temperature of compressed CO<sub>2</sub> on the survival of yeast cells. *Journal of Biotechnology*.
- [111] Jones, R.P., Greenfield, P.F. (1982) Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 4: 210-223.
- [112] Ballestra, P., Cuq, J.-L. (1998) Influence of Pressurized Carbon Dioxide on the Thermal Inactivation of Bacterial and Fungal Spores. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 31: 84-88.
- [113] Enomoto, A. (1997) Inactivation of food microorganisms by high-pressure CO<sub>2</sub>. *Biosci Biotechnol Biochem.* 61: 1133-1337.
- [114] Hong, S.-I., Pyun, Y.-R. (2001) Membrane damage and enzyme inactivation of *Lactobacillus plantarum* by high pressure CO<sub>2</sub> treatment. *International Journal of Food Microbiology* 63: 19-28.
- [115] Spilimbergo, S. (2005) Determination of Extracellular and Intracellular pH of *Bacillus subtilis* Suspension Under CO<sub>2</sub> Treatment. *Biotechnology and Bioengineering* 92.
- [116] Garcia-Gonzalez, L., Geeraerd, A.H., Spilimbergo, S., Elst, K., Van Ginneken, L., Debevere, J., Van Impe, J.F., Devlieghere, F. (2007) High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future. *International Journal of Food Microbiology* 117: 1-28.
- [117] King, M.B. (1992) The Mutual Solubilities of Water with Supercritical and Liquid Carbon Dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*.
- [118] Toews, K.L. (1995) pH-Defining Equilibrium between Water and Supercritical CO<sub>2</sub>. influence on SFE of Organics and Metal Chelates. *Anal. Chem.*
- [119] Parton, T., Rocchi, E., Spilimbergo, S., Elvassore, N., Bertucco, A. (2003) Sterilization of fruit juice by high pressure CO<sub>2</sub>. *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II, Proceedings of the International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, 2nd, Dortmund, Germany, Sept. 16-19, 2002: 419-424.*
- [120] Hayakawa, I., Linko, Y.-Y., Linko, P. (1996) Novel Mechanical Treatments of Biomaterials. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* 29: 395-403.
- [121] Krebbers, B. (2003) Combined high-pressure and thermal treatments for processing of tomato puree: evaluation of microbial inactivation and quality parameters. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*.
- [122] Watanabe, T. (2003) Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* Spores by High-Pressure Carbon Dioxide Treatment. *Applied and Environmental Microbiology*.
- [123] Spilimbergo, S., Bertucco, A., Lauro, F.M., Bertoloni, G. (2003) Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by supercritical CO<sub>2</sub> treatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 4: 161-165.
- [124] Kamihira, M.T., M., Kobayashi T. (1987) Sterilization of Microorganisms with Supercritical Carbon Dioxide. *Agricultural and Biological Chemistry* 51: 407-412.
- [125] Jian Zhang, S.B., Courtney Gleason, Michael A. Matthews, Michael J. Drews, Martine LaBerge, Yuehwei H. An (2006) Sterilizing *Bacillus pumilus* spores using supercritical carbon dioxide. *Journal of Microbiological Methods* 66: 479-485.
- [126] Marmier, L., Abraham, H. (1899) Sterilisation of potable waters by ozone. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences* 128: 1034-1035.
- [127] da Silva, L.M., Santana M. H. P., C., B.J.F. (2003) Electrochemistry and green chemical processes: Electrochemical ozone production. *Quim. Nova* Vol. 26: 880-888.
- [128] Wiederhold, H.: Technische Universität Darmstadt, 2007.
- [129] Reynolds, T.D., Richards, P.A.: Unit operations and processes in environmental engineering. PWS Publishing Co., Boston 1996.
- [130] Chang, S.L. (1971) Modern concept of Disinfection. *Journal of the sanitary engineering division* 97: 689-707.
- [131] Christensen, E., Giese, A.C. (1954) Changes in absorption spectra of nucleic acids and their derivatives following exposure to ozone and ultraviolet radiations. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 51: 208-216.
- [132] Doroszkiewicz, W., Sikorska, I., Jankowski, S. (1994) Studies on the influence of ozone on complement-mediated killing of bacteria. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 9: 281-285.
- [133] Ishizaki, K., Sawadaishi, K., Miura, K., Shinriki, N. (1987) Effect of ozone on plasmid DNA of *Escherichia coli* in situ. *Water Research* 21: 823-827.

- [134] Shinriki, N., Ishizaki, K., Yoshizaki, T., Miura, K., Ueda, T. (1988) Mechanism of inactivation of tobacco mosaic virus with ozone. *Water Research* 22: 933-938.
- [135] Foegeding, P.M. (1985) Ozone inactivation of Bacillus and Clostridium spore populations and the importance of the spore coat to resistance. *Food Microbiology* 2: 123-134.
- [136] Khadre, M.A. (2001) Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. *International Journal of Food Microbiology*.
- [137] Ohkawa, H. (2004) High-Density Ozone Disinfection of Medical-Care Materials for Dental Surgery. *Plasma Processes Polymers*.
- [138] Dufresne, S., Hewitt, A., Robitaille, S. (2004) Ozone Sterilization: Another Option for Healthcare in the 21st Century. *American Journal of Infection Control* 32: E26-E27.
- [139] Zhang, J., Davis, T.A., Matthews, M.A., Drews, M.J., LaBerge, M., An, Y.H. (2006) Sterilization using high-pressure carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids* 38: 354-372.
- [140] Karaman, H., Erkmen, O. (2001) High carbon dioxide pressure inactivation kinetics of Escherichia coli in broth. *Food Microbiology*.
- [141] Peleg, M., Penchina, C.M. (2000) Modeling Microbial Survival during Exposure to a Lethal Agent with Varying Intensity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40: 159-172.
- [142] E. Debs-Louka, N.L., G. Abraham, V. Chabot, K. Allaf, (1999) Effect of compressed carbon dioxide on microbial cell viability *Appl. Environ. Microbiol* 65.
- [143] Razumovskii, S.D., Kefeli, A. A., Zaikov, G. E. (1971) Degradation of polymers in reactive gases. *European Polymer Journal* 7: 275-285.
- [144] Forrester, A.R., Hay, J.M., Thomson, R.H. (1968): Organic Chemistry of Stable Free Radicals. Academic Press, London, p. 137.
- [145] Knittel, D., Schollmeyer, E. (2008) Functional group analysis on oxidized surfaces of synthetic textile polymers. *Talanta* 76: 1136-1140.
- [146] Ton-That, C., Teare, D.O.H., Campbell, P.A., Bradley, R.H. (1999) Surface characterisation of ultraviolet-ozone treated PET using atomic force microscopy and X-ray photoelectron spectroscopy. *Surface Science* 433-435: 278-282.
- [147] Mitchell, S.A., Poulsson, A.H.C., Davidson, M.R., Bradley, R.H. (2005) Orientation and confinement of cells on chemically patterned polystyrene surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 46: 108-116.
- [148] Davidson, M.R., Mitchell, S.A., Bradley, R.H. (2005) Surface studies of low molecular weight photolysis products from UV-ozone oxidised polystyrene. *Surface Science* 581: 169-177.
- [149] Wissinger, R.G., Paulaitis, M.E. (1987) Swelling and sorption in polymer CO<sub>2</sub> mixtures at elevated pressures. *J. of Polym sci. Part B* 25: 2497.
- [150] Liao, I.S., McHugh, M.A. (1985) High Pressure Solid Polymer-Supercritical Fluid Phase Behaviour, Hrsg. J.M.L. Penninger et al., Elsevier, Amsterdam (1985) *Process Technology Proceedings 3 (Supercritical Fluid Technology)*: 415-434.
- [151] Berens, A. (1992) Application of Compressed Carbon Dioxide in the Incorporation of Additives into Polymers. *Journal of Applied Polymer Science* 46: 231-241.
- [152] Pantoula, M. (2006) Sorption and swelling in glassy polymer/carbon dioxide systems Part I. Sorption. *Journal of Supercritical Fluids*.
- [153] Bach, E., Cleve, E., Schollmeyer, E. (1996): Dyeing of poly(ethylene terephthalate) fibers in supercritical carbon dioxide. In *Process Technology Proceedings*, Elsevier, pp. 581-586.
- [154] Saus, W., Knittel, D. Schollmeyer, E., Buschmann, H-J. (1995): Verfahren zum Färben von hydrophobem Textilmaterial mit Dispersionsfarbstoffen aus überkritischem CO<sub>2</sub>. In *Patent*. Ed. DTNW, Germany.
- [155] Poulakis, K., Spee, M., Schneider, G.M., Knittel, D., Schollmeyer, E. (1991) Färbung von Polyester in überkritischem CO<sub>2</sub>. *Chemiefaser/Textilindustrie* 41.
- [156] Bach, E. (2002) Past, present and future of supercritical fluid dyeing technology – an overview. *Rev. Prog. Color* 32: 88-102
- [157] Schmidt, A., Bach, E. Schollmeyer, E. (2002) Damage to synthetic fibers treated in supercritical carbon dioxide at 300 bar and temperatures up to 160 °C. *Textile Res. J.* 72: 1023-1032.
- [158] Cleve, E., Bach, E., Schollmeyer, E. (1997) Untersuchungen zum Schmelz- und Strukturverhalten von Polyethylenterephthalatfasern in Luft bei 1 bar und in überkritischem CO<sub>2</sub> bis 280 bar. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie* 256: 39-48.
- [159] Bach, E., Cleve, E., Schollmeyer, E. (1997) The dyeing of polyolefin fibers in supercritical carbon dioxide. Part I: Thermo-mechanical properties of polyolefin fibers after treatment in CO<sub>2</sub> under dyeing conditions. *J. Text. Inst.* 89 Part I: 647-656.
- [160] Sproule, T.L. (2003) Bioactive polymer surfaces via supercritical fluids. *Journal of Supercritical Fluids*.
- [161] Bach, E., Knittel, D., Schollmeyer, E. (2006) Dyeing PLA in CO<sub>2</sub>. *Color Technology* 122: 252-258.

- [162] Wang, X., Li, W., Kumar, V. (2006) A method for solvent-free fabrication of porous polymer using solid-state foaming and ultrasound for tissue engineering applications. *Biomaterials* 27: 1924-1929.
- [163] Powell, H.M., Ayodeji, O., Summerfield, T.L., Powell, D.M., Kniss, D.A., Tomasko, D.L., Lannutti, J.J. (2007) Chemotherapeutic implants via subcritical CO<sub>2</sub> modification. *Biomaterials* 28: 5562-5569.
- [164] Goldwyn, A.: RWTH Aachen, 2006.
- [165] Lydon, M.J., Minett, T.W., Tighe, B.J. (1985) Cellular interactions with synthetic polymer surfaces in culture. *Biomaterials* 6: 396-402.
- [166] Satriano, C., Carnazza, S., Guglielmino, S., Marletta, G. (2003) Surface free energy and cell attachment onto ion-beam irradiated polymer surfaces. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 208: 287-293.
- [167] Bahners, T., Textor, T., Schollmeyer, E. (2004): In *Polymers Surface Modification: Relevance to Adhesion*. Ed. Mittal, K.L., VSP, Utrecht, pp. 97-124.
- [168] Goddard, J.M., Hotchkiss, J.H. (2007) Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in Polymer Science* 32: 698-725.
- [169] Liu, Z.-M., Xu, Z.-K., Wan, L.-S., Wu, J., Ulbricht, M. (2005) Surface modification of polypropylene microfiltration membranes by the immobilization of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone): a facile plasma approach. *Journal of Membrane Science* 249: 21-31.
- [170] Higuchi, A., Sugiyama, K., Yoon, B.O., Sakurai, M., Hara, M., Sumita, M., Sugawara, S.-i., Shirai, T. (2003) Serum protein adsorption and platelet adhesion on pluronic(TM)-adsorbed polysulfone membranes. *Biomaterials* 24: 3235-3245.
- [171] Petsch, D., Deckwer, W.D., Anspach, F.B. (1998) Proteinase K digestion of proteins improves detection of bacterial endotoxins by the Limulus amoebocyte lysate assay: application for endotoxin removal from cationic proteins. *Analytical biochemistry* 259: 42-47.
- [172] Peiró, S.A., Kulander, L., Eriksson, Ö. (1990) Quantitative determination of endotoxins on surgical gloves. *Journal of Hospital Infection* 16: 167-172.
- [173] Rioufol, C., Devys, C., Meunier, G., Perraud, M., Goulet, D. (1999) Quantitative determination of endotoxins released by bacterial biofilms. *Journal of Hospital Infection* 43: 203-209.
- [174] Rybka, J., Grycko, P., Francisco, J.d.C., Gamian, A., Dey, E.S. (2008) Application of supercritical carbon dioxide (scCO<sub>2</sub>) for the extraction of lipopolysaccharides (LPS) from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* PCM 2266. *The Journal of Supercritical Fluids* 45: 51-56.
- [175] Neuss, S., Apel, C., Buttler, P., Denecke, B., Dhanasingh, A., Ding, X., Grafahrend, D., Groger, A., Hemmrich, K., Herr, A., Jahnen-Dechent, W., Mastitskaya, S., Perez-Bouza, A., Rosewick, S., Salber, J., Wöltje, M., Zenke, M. (2008) Assessment of stem cell/biomaterial combinations for stem cell-based tissue engineering. *Biomaterials* 29: 302-313.
- [176] Berger, D., Bientzle, M. (2006) Principles of laparoscopic repair of ventral hernias. *European Surgery* 38: 393-398.
- [177] Junge, K., Binnebösel, M., Rosch, R., Jansen, M., Kämmer, D., Otto, J., Schumpelick, V., Klinge, U. (2008) Adhesion formation of a polyvinylidene fluoride/polypropylene mesh for intra-abdominal placement in a rodent animal model. *Surgical Endoscopy* in press.
- [178] Bach, E., Cleve, E., Schmidt, A. (2003): Färben von Baumwolle und proteinischen Fasern in überkritischem CO<sub>2</sub> mit reaktiven Dispersionsfarbstoffen (Abschlussbericht BA 2091/1-1). Ed. DTNW, Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Krefeld.
- [179] Listky, B.Y. (1977) Microbiology of Sterilization. *AORN* 26: 334, 337, 339-340, 342, 344, 346, 348, 350.
- [180] Colella, G., Tartaro, G., Cannavale, R., Lanza, A., Marulo, F. (2008) Effects of repeated cycles of sterilisation on the mechanical characteristics of titanium miniplates for osteosynthesis. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*.
- [181] Mroz, T.E., Lin, E.L., Summit, M.C., Bianchi, J.R., Keesling, J.J.E., Roberts, M., Vangsness, J.C.T., Wang, J.C. (2006) Biomechanical analysis of allograft bone treated with a novel tissue sterilization process. *The Spine Journal* 6: 34-39.
- [182] Özer, F., Karakaya, S., Ünlü, N., Erganis, O., Kav, K., Imazato, S. (2003) Comparison of antibacterial activity of two dentin bonding systems using agar well technique and tooth cavity model. *Journal of Dentistry* 31: 111-116.
- [183] Kuscu, E., Duran, H.E., Zeyneloglu, H.B., Demirhan, B., Bagis, T., Saygili, E. (2002) The effect of surgical sterilization on ovarian function: a rat model. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 100: 204-207.
- [184] Capello, E. (2005) Residual stresses in turning  
Part I: Influence of process parameters. *Journal of Materials Processing Technology*.
- [185] Yuranova, T. (2003) Antibacterial textiles prepared by RF-plasma and vacuum-UV mediated deposition of silver. *Journal of Photochemistry and Photobiology*.

- [186] Scheffler, E.: Statistische Versuchsplanung und -auswertung. Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Stuttgart 1997.
- [187] Box, G.E.P., Hunter, W.G., Hunter, J.S.: Statistics for Experimenters. John Wiley and Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane 1978.
- [188] Tretinnikov, O.N., Ikada, Y. (1994) Dynamic Wetting and Contact Angle Hysteresis of Polymer Surfaces Studied with the Modified Wilhelmy Balance Method. *Langmuir* 10: 1606-1614.
- [189] Owens, D.K., Wendt, R. C. J. (1969) Estimation of the surface free energy of polymers. *Appl. Polym. Sci.* 1969: 1741-1747.
- [190] Oliver, J.P., Huh, C., Mason, S.G. (1980) An experimental study of some effects of solid surface roughness on wetting. *Colloids and Surfaces* 1: 79-104.
- [191] ISO-13934 (1999): Textiles - Tensile properties of fabrics - Part I: Determination of maximum force and elongation at maximum force using the strip method. Ed. Standardization, I.O.f.
- [192] ISO-527-3 (2003): Plastics - Determination of tensile properties - Part 3: Test conditions for films and sheets Ed. Standardization, I.O.f.
- [193] Hayes, A.W.E.: Principles and Methods of Toxicology. Raven Press, New York 1994.
- [194] Spilimbergo, S., Bertucco, A. (2003) Non-thermal bacteria inactivation with dense CO<sub>2</sub>. *Biotechnology and Bioengineering* 84: 627-638.
- [195] Spilimbergo, S., Dehghani, F., Bertucco, A., Foster, N.R. (2003) Inactivation of bacteria and spores by pulse electric field and high pressure CO<sub>2</sub> at low temperature. *Biotechnology and Bioengineering* 82: 118-125.
- [196] Cinquemani, C., Boyle, C., Bach, E., Schollmeyer, E. (2007) Inactivation of microbes using compressed carbon dioxide - An environmentally sound disinfection process of medical fabrics. *Journal of Supercritical fluids* 42: 1-6.
- [197] Cinquemani, C., Bach, E., Schollmeyer, E. (2006): Carbon dioxide as a green solvent for textile industry - dyeing, surface modification & disinfection. In *Achema, 28. Internationaler Ausstellungskongress für Chemische Technik, Umweltschutz und Biotechnologie* DECHEMA e.V. Frankfurt am Main, Frankfurt/M, Deutschland.
- [198] Cinquemani, C., Knittel, D., Müllen, A., Schollmeyer, E. (2008): Sterilise implantable high-tech (bio-)materials the eco friendly way. In *11th European Meeting on Supercritical Fluids*. Ed. Veciana, V., Ventosa, Barcelona, Spain, p. 122.
- [199] Doona, C.J., Feeherry, F.E., Ross, E.W. (2005) A quasi-chemical model for the growth and death of microorganisms in foods by non-thermal and high-pressure processing. *International Journal of Food Microbiology* 100: 21-32.
- [200] Moerman, F. (2005) High hydrostatic pressure inactivation of vegetative microorganisms, aerobic and anaerobic spores in pork Marengo, a low acidic particulate food product. *Meat Science* 69: 225-232.
- [201] Nuutinen, J.P., Clerc, C., Virta, T., To?rma?la, P. (2002) Effect of gamma, ethylene oxide, electron beam, and plasma sterilization on the behaviour of SR-PLLA fibres in vitro. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 13: 1325-1336.
- [202] Mendes, G.C.C., Brandão, T.R.S., Silva, C.L.M. (2007) Ethylene oxide sterilization of medical devices: A review. *American Journal of Infection Control* 35: 574-581.
- [203] Scott, D.B.M., Leshner, E.C. (1963) Effect of Ozone on Survival and Permeability of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 85: 567-576.
- [204] Goldstein, B.D., McDonagh, E.M. (1975) Effect of ozone on cell membrane protein fluorescence : I. In vitro studies utilizing the red cell membrane. *Environmental Research* 9: 179-186.
- [205] Farooq, S., Engelbrecht, R.S., Chian, E.S.K. (1977) Influence of temperature and u.v. light on disinfection with ozone. *Water Research* 11: 737-741.
- [206] Anonymus (1999): Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual, EPA 815-R-99-014. Ed. water, O.o., US Environmental Protection Agency.
- [207] Allen, N.S., Edge, M.: Fundamentals of Polymer degradation and Stabilisation. Elsevier Applied Sciences, Amsterdam 1992.
- [208] Nalawade, S.P., Picchioni, F., Janssen, L.P.B.M. (2006) Supercritical carbon dioxide as a green solvent for processing polymer melts: Processing aspects and applications. *Progress in Polymer Science* 31: 19-43.
- [209] Williams, L.L., Rubin, J.B. (2000) Removal of polymer coatings with supercritical fluids. *Abstracts of Papers, 220th ACS National Meeting, Washington, DC, United States, August 20-24, 2000 FIELD Full Journal Title: Abstracts of Papers, 220th ACS National Meeting, Washington, DC, United States, August 20-24, 2000: IEC-133.*
- [210] Lei, Z., Ohyabu, H., Sato, Y., Inomata, H., Smith, J.R.L. (2007) Solubility, swelling degree and crystallinity of carbon dioxide-polypropylene system. *The Journal of Supercritical Fluids* 40: 452-461.
- [211] Tomasko (2003) A Review of CO<sub>2</sub> Applications in the Processing of Polymers. *Ind. Eng. Chem. Res.* 42: 6431-6456.

- [212] Sheridan, M.H., Shea, L.D., Peters, M.C., Mooney, D.J. (2000) Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery. *Journal of Controlled Release* 64: 91-102.
- [213] MacManus, L.F., Walzak, M.J., McIntyre, N.S. (1999): Study of ultraviolet light and ozone surface modification of polypropylene. pp. 2489-2501.
- [214] Tsivintzelis, I., Angelopoulou, A.G., Panayiotou, C. (2007) Foaming of polymers with supercritical CO<sub>2</sub>: An experimental and theoretical study. *Polymer* 48: 5928-5939.
- [215] Marmur, A. (1996) Equilibrium contact angles: theory and measurement. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 116: 55-61.
- [216] Nie, H.Y., Walzak, M.J., Berno, B., McIntyre, N.S. (1999) Atomic force microscopy study of polypropylene surfaces treated by UV and ozone exposure: modification of morphology and adhesion force. *Applied Surface Science* 144-145: 627-632.
- [217] Pietak, A., Korte, S., Tan, E., Downard, A., Staiger, M.P. (2007) Atomic force microscopy characterization of the surface wettability of natural fibres. *Applied Surface Science* 253: 3627-3635.
- [218] Ehrenstein, G.W., Riedel, G., Trawiel, P.: Praxis der Thermischen Analyse von Kunststoffen. Carl Hanser Verlag, München 2003.
- [219] Frick, A., Stern, C.: DSC-Prüfung in der Anwendung. Hanser Verlag, München Wien 2006.
- [220] Krisyuk, B.E., Popov, A.A., Zaikov, G.Y. (1980) The surface tension of polymer films and its effect on the chemical reaction kinetics. The effect of ozone on polypropylene. *Polymer Science U.S.S.R.* 22: 365-372.
- [221] Popov, A.A., Russak, A.V., Popova, Y.S., Komova, N.N., Zaikov, G.Y. (1988) Modification of mechanical properties of oriented polypropylene by ozone oxidation. *Polymer Science U.S.S.R.* 30: 177-182.
- [222] Ehrenstein, G.W., Pongratz, S.: Beständigkeit von Kunststoffen. Hanser Verlag, München 2007.
- [223] Shieh, Y.-T., Hsiao, T.-T., Chang, S.-K. (2006) CO<sub>2</sub> pressure effects on melting, crystallization, and morphology of poly(vinylidene fluoride). *Polymer* 47: 5929-5937.
- [224] Hakkarainen, M., Karlsson, S., Albertsson, A.-C. (2000) Rapid (bio)degradation of polylactide by mixed culture of compost microorganisms - low molecular weight products and matrix changes. *Polymer* 41: 2331-2338.
- [225] Junge, K., Obolenski, B. (2005) Neue innovative Netzimplantate für die laparoskopische Hernienchirurgie. *Technische Textilien* 3.
- [226] Wang, Y., Kim, J.-H., Choo, K.-H., Lee, Y.-S., Lee, C.-H. (2000) Hydrophilic modification of polypropylene microfiltration membranes by ozone-induced graft polymerization. *Journal of Membrane Science* 169: 269-276.
- [227] Serbetci, K., Kulacoglu, H., Devay, A.O., Hasirci, N. (2007) Effects of reesterilization on mechanical properties of polypropylene meshes. *The American Journal of Surgery* 194: 375-379.
- [228] Massey, L.K. (2005): Introduction to Sterilization Methods. In *The Effect of Sterilization Methods on Plastics and Elastomers (2)*, William Andrew Publishing, Norwich, NY, pp. 1-15.
- [229] Jiménez, A., Thompson, G.L., Matthews, M.A., Davis, T.A., Crocker, K., Lyons, J.S., Trapotsis, A. (2007) Compatibility of medical-grade polymers with dense CO<sub>2</sub>. *The Journal of Supercritical Fluids* 42: 366-372.
- [230] v. Recum, A., Jacobi, J.E.: Handbook of biomaterials evaluation. CRC Press, New York 1999.
- [231] Massey, L.K. (2005): Polyvinylidene Fluoride (PVDF). In *The Effect of Sterilization Methods on Plastics and Elastomers (2)*, William Andrew Publishing, Norwich, NY, pp. 65-66.
- [232] Oueslati, R., Catoire, B. (1991) Ozonisation et modifications morphologiques et physicochimiques de fibres de polypropylene. *European Polymer Journal* 27: 331-340.
- [233] Meyer-Plath, A. (2004) Radikalidentifizierung auf Polymeren nach Plasmabehandlung. *VIP* 16: 118-125.
- [234] Popov, A.A., Russak, A.V., Ledneva, O.A., Zaikov, G.Y. (1986) Oxidative stability on exposure to ozone-oxygen in relation to the structure of polypropylene and high density polyethylene composites. Isotropic and oriented states. *Polymer Science U.S.S.R.* 28: 2041-2047.
- [235] Yanjarappa, M.J., Sivaram, S. (2002) Recent developments in the synthesis of functional poly(olefin)s. *Progress in Polymer Science* 27: 1347-1398.
- [236] Butt, H.-J., Cappella, B., Kappl, M. (2005) Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surface Science Reports* 59: 1-152.
- [237] Low, S.P., Williams, K.A., Canham, L.T., Voelcker, N.H. (2006) Evaluation of mammalian cell adhesion on surface-modified porous silicon. *Biomaterials* 27: 4538-4546.
- [238] Mitchell, S.A., Poulsson, A.H.C., Davidson, M.R., Emmison, N., Shard, A.G., Bradley, R.H. (2004) Cellular attachment and spatial control of cells using micro-patterned ultra-violet/ozone treatment in serum enriched media. *Biomaterials* 25: 4079-4086.

- [239] Ráhel, J., Simor, M., Cernák, M., Stefecka, M., Imahori, Y., Kando, M. (2003) Hydrophilization of polypropylene nonwoven fabric using surface barrier discharge. *Surface and Coatings Technology* 169-170: 604-608.
- [240] Extrand, C.W., Kumagai, Y. (1996) Wetting and contact angle hysteresis on soft polymer surfaces. *Book of Abstracts, 212th ACS National Meeting, Orlando, FL, August 25-29*: COLL-122.
- [241] Wenzel, R.N. (1936) Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Ind. Eng. Chem.* 28: 988-994.
- [242] Cassie, A.B.D., Baxter, S. (1944) Wettability of porous surfaces. *Trans. Faraday Soc.* 40.
- [243] Strobel, M., Walzak, M.J., Hill, J., Karbasheski, E., Lyons, J.S. (1995): A comparison of gas-phase methods of modifying polymer surfaces. In *Polymer Surface Modification: Relevance to Adhesion*. Ed. Mittal, K.L., pp. 233-251.
- [244] Morra, M., Occhiello, E., Garbassi, F. (1990) Knowledge about polymer surfaces from contact angle measurements. *Advances in Colloid and Interface Science* 32: 79-116.
- [245] Cui, N.-Y., Upadhyay, D.J., Anderson, C.A., Meenan, B.J., Brown, N.M.D. (2007) Surface oxidation of a Melinex 800 PET polymer material modified by an atmospheric dielectric barrier discharge studied using X-ray photoelectron spectroscopy and contact angle measurement. *Applied Surface Science* 253: 3865-3871.
- [246] Hill, J., Karbasheski, E., Lin, A., Strobel, M., Walzak, M.J. (1995): Effects of aging and washing on UV and ozone-treated poly(ethylene terephthalate) and polypropylene. In *Polymer Surface Modification: Relevance to adhesion*. Ed. Mittal, K.L., VSP, Utrecht, pp. 273-289.
- [247] Graubner, V.M.: Ph.D. Thesis, Technische Universität München, 2003.
- [248] Øiseth, S.K., Krozer, A., Kasemo, B., Lausmaa, J. (2002) Surface modification of spin-coated high-density polyethylene films by argon and oxygen glow discharge plasma treatments. *Applied Surface Science* 202: 92-103.
- [249] Özden, N., Akaltan, F., Suzer, S., Akovali, G. (1999) Time-related wettability characteristic of acrylic resin surfaces treated by glow discharge. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 82: 680-684.
- [250] Brétagnol, F., Rauscher, H., Hasiwa, M., Kylián, O., Ceccone, G., Hazell, L., Paul, A.J., Lefranc, O., Rossi, F. (2008) The effect of sterilization processes on the bioadhesive properties and surface chemistry of a plasma-polymerized polyethylene glycol film: XPS characterization and L929 cell proliferation tests. *Acta Biomaterialia* 4: 1745-1751.
- [251] Chtourou, H., Riedl, B., Kokta, B.V., Adnot, A., Kaliaguine, S. (1993) Synthetic pulp fiber ozonation: An ESCA and FTIR study. *J. Appl. Polymer Science* 49: 361-373.
- [252] Moulder, J.F., Bomben, K.D., Sobol, P.E., Stickle, W.F.: Handbook of X Ray Photoelectron Spectroscopy. Perkin-Elmer, Physical Electronics Division Minnesota 1993.
- [253] Beamson, G., Briggs, D.: High Resolution XPS of Organic Polymers. Chichester, New York, Brisbane 1992.
- [254] Singamsetty, C.S.K., Pittman, C.U., Booth, G.L., Jr., G.-R.H.-., Gardner, S.D. (1995) Surface characterization of carbon fibers using angle-resolved XPS and ISS. *Ref: Carbon* 33: 587-595.
- [255] Mancia, F., Fierro, G., Ingo, G.M. (1989) XPS Investigation on the Corrosion Behavior of 13Cr-Martensitic Stainless Steel in CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>S-Cl<sup>-</sup> Environments. *Corrosion* 45: 814-823.
- [256] Droulas, J.L., Duc, T.M., Jugnet, Y. (1991) Etude des propriétés interfaciales des dépôts par évaporation et pulvérisation d'aluminium sur polyéthylène téréphtalate. *Le Vide, les Couches Minces Supplément au N° 258*: 39-41.
- [257] W.J. Boonk, W.G.K. (1981): A possible case of delayed hypersensitivity to ethylene oxide. pp. 385-390.
- [258] Briggs, D., Seah, M.P.: Practical surface analysis. John Wiley & Sons 1993.
- [259] de Angelis, B.A., Rizzo, C., Contarini, S., Howlett, S.P. (1991) XPS study on the dispersion of carbone additives in silicon carbide powders. *Journal of Applied Surface Science* 51: 177-183.
- [260] Duca, M.D., Plosceanu, C.L., Pop, T. (1998) Surface modifications of polyvinylidene fluoride (PVDF) under rf Ar plasma. *Polymer Degradation and Stability* 61: 65-72.
- [261] Hinder, S.J., Lowe, C., Watts, J.F. (2007) An XPS and ToF-SIMS investigation of the outermost nanometres of a poly(vinylidene difluoride) coating. *Progress in Organic Coatings* 60: 255-261.
- [262] Liu, Y., Lee, J.Y., Kang, E.T., Wang, P., Tan, K.L. (2001) Synthesis, characterization and electrochemical transport properties of the poly(ethyleneglycol)-grafted poly(vinylidene fluoride) nanoporous membranes. *Reactive and Functional Polymers* 47: 201-213.
- [263] Charlesworth, F.A. (1976) Ethylene oxide residues in sterilized medical devices. *Food and Cosmetics Toxicology* 14: 61-61.
- [264] Hari, P.R., Naseerali, C.P., Sreenivasan, K. (2009) A sensitive estimation of residual ethylene glycol in ethylene oxide sterilized medical devices by HPLC with electrospray ionization mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography B* 877: 328-332.

- [265] Kesting, W., Knittel, D., Bahnert, T., Schollmeyer, E. (1992) Pulse- and time-dependent observation of UV-laser-induced structures on polymer surfaces. *Applied Surface Science* 54: 330-335.
- [266] Großpietsch, U.: Gerhard-Mercator-Universität GH Duisburg, 2002.
- [267] Elias, H.-G.: An Introduction to Plastics. VCH, Weinheim, New York, Basel 1993.
- [268] K. A. Hooper, Cox, J.D., Kohn, J. (1997) Comparison of the effect of ethylene oxide and gamma-irradiation on selected tyrosine-derived polycarbonates and poly(L-lactic acid). *Journal of Applied Polymer Science* 63: 1499-1510.
- [269] Gorelik, B.A., Grigoriev, A.G., Semenenko, E.I., Sokolava, L.A. (1990) The destruction of polyolefins under low doses of ionizing irradiation. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry* 35: 213-217.
- [270] Sandford, C., Woo, L. (1988) Shelf life prediction of radiation sterilized polymeric materials. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry* 31: 671-678.
- [271] Signer, R. (1962): Das Molekulargewicht und seine Bestimmung. In *Chemie und Technologie der Kunststoffe*. Ed. Houwink, R., Staverman, A.Jl, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig.
- [272] Laschet, M.: Universität Hamburg, 2002.
- [273] Th. G. Scholte, N.L.J.M.H.M.S.A.M.G.B. (1984): Mark-Houwink equation and GPC calibration for linear short-chain branched polyolefines, including polypropylene and ethylene-propylene copolymers. pp. 3763-3782.
- [274] Wylamrzy, J.: Duisburg-Essen, 2004.
- [275] Cottam, E., Hukins, D.W.L., Lee, K., Hewitt, C., Jenkins, M.J. Effect of sterilisation by gamma irradiation on the ability of polycaprolactone (PCL) to act as a scaffold material. *Medical Engineering & Physics* In Press, Corrected Proof.
- [276] McKellop, H., Shen, F.W., Lu, B., Campbell, P., Salovey, R. (2000) Effect of sterilization method and other modifications on the wear resistance of acetabular cups made of ultra-high molecular weight polyethylene. A hip-simulator study. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A* 82: 1708-1725.
- [277] McNulty, D.E., Liao, Y.S., Haas, B.D. (2002) The influence of sterilization method on wear performance of the low contact stress total knee system. *Orthopedics* 25.
- [278] Blinov, N.N., Popov, A.A., Komova, N.N., Zaikov, G.Y. (1985) Change in molecular mass distribution of high density polyethylene on ozone-oxygen oxidation in the field of mechanical forces. *Polymer Science U.S.S.R.* 27: 1311-1320.
- [279] Toháček, J., Jancár, J., Kalfus, J., Zborilová, P., Burán, Z. (2008) Degradation of polypropylene impact-copolymer during processing. *Polymer Degradation and Stability* 93: 770-775.
- [280] Robin, J.J. (2004) The Use of Ozone in the Synthesis of New Polymers and the Modification of Polymers. *Advances in Polymer Science* 187: 35-79.
- [281] Uehara, H., Yamazaki, Y., Kanamoto, T. (1996) Tensile properties of highly syndiotactic polypropylene. *Polymer* 37: 57-64.
- [282] Czeslik, C. (2004) Factors ruling protein adsorption. *Z. Phys. Chem.* 218: 771-801.
- [283] Saltzman, W.M. (2000): Cell Interactions with Polymers. In *Principles of Tissue Engineering*. Eds. Lanza, R.P., Langer, R., Vacanti, J., Academic Press., San Diego.
- [284] Hubbell, J.A. (2000): Matrix Effects. In *Principles of Tissue Engineering*. Eds. Lanza, R.P., Langer, R., Vacanti, J., Academic Press, San Diego.
- [285] Freshney, R.I.: Culture of animal cells. Wiley and sons, New Jersey 2005.
- [286] Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150: 76-85.
- [287] Cole, M.A., Voelcker, N.H., Thissen, H., Griesser, H.J. (2009) Stimuli-responsive interfaces and systems for the control of protein-surface and cell-surface interactions. *Biomaterials* 30: 1827-1850.
- [288] Weisel, J.W., David A. D. Parry, a.J.M.S. (2005): Fibrinogen and Fibrin. In *Advances in Protein Chemistry*, Academic Press, pp. 247-299.
- [289] Elwing, H., Welin, S., Askendal, A., Nilsson, U., Lundström, I. (1987) A wettability gradient method for studies of macromolecular interactions at the liquid/solid interface. *Journal of Colloid and Interface Science* 119: 203-210.
- [290] Xu, L.-C., Siedlecki, C.A. (2007) Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials* 28: 3273-3283.
- [291] Satriano, C., Scifo, C., Marletta, G. (2000) Study of albumin adsorption on ion beam irradiated polymer surfaces. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 166-167: 782-787.

- [292] Roy, R.K., Choi, H.W., Yi, J.W., Moon, M.W., Lee, K.R., Han, D.K., Shin, J.H., Kamijo, A., Hasebe, T. (2009) Hemocompatibility of surface-modified, silicon-incorporated, diamond-like carbon films. *Acta Biomaterialia* 5: 249-256.
- [293] Martins, M.C.L., Wang, D., Ji, J., Feng, L., Barbosa, M.A. (2003) Albumin and fibrinogen adsorption on PU-PHEMA surfaces. *Biomaterials* 24: 2067-2076.
- [294] Bamford, C.H., Al-Lamee, K.G. (1992) Chemical methods for improving the haemocompatibility of synthetic polymers. *Clinical Materials* 10: 243-261.
- [295] Roach, P., Farrar, D., Perry, C.C. (2004) Interpretation of protein adsorption: Surface-induced conformational changes. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 8168-8173.
- [296] Tamada, Y., Ikada, Y. (1994) Fibroblast growth on polymer surfaces and biosynthesis of collagen. *Journal of Biomedical Research* 28: 783-789.
- [297] Chen, H., Yuan, L., Song, W., Wu, Z., Li, D. (2008) Biocompatible polymer materials: Role of protein-surface interactions. *Progress in Polymer Science* 33: 1059-1087.
- [298] Saltzman, W.M.: Tissue Engineering. Oxford University Press, Oxford, New York 2004.
- [299] von Woedtke, T., Schlosser, M., Urban, G., Hartmann, V., Jülich, W.D., Abel, P.U., Wilhelm, L. (2003) The influence of antimicrobial treatments on the cytocompatibility of polyurethane biosensor membranes. *Biosensors and Bioelectronics* 19: 269-276.
- [300] Satriano, C., Marletta, G., Conte, E. (1999) Cell adhesion on low-energy ion beam-irradiated polysiloxane surfaces. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 148: 1079-1084.
- [301] Teare, D.O.H., Emmison, N., Ton-That, C., Bradley, R.H. (2001) Effects of Serum on the Kinetics of CHO Attachment to Ultraviolet-Ozone Modified Polystyrene Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 234: 84-89.
- [302] Hastings Jr, C.E., Martin, S.A., Heath Iii, J.R., Mark, D.E., Mansfield, J.L., Hollinger, J.O. (1990) The effects of ethylene oxide sterilization on the in vitro cytotoxicity of a bone replacement material. *Toxicology in Vitro* 4: 757-762.
- [303] Anderson, J.M., Charles, W.P., Jr, Antonios, G.M., Larry, V.M., Langer, R.S. (1998): Biocompatibility of Tissue Engineered Implants. In *Frontiers in Tissue Engineering*, Pergamon, Oxford, pp. 152-165.
- [304] Goad, M.E.P., Goad, D.L., Wanda, M.H., Colin, G.R., Matthew, A.W. (2002): Biomedical Devices and Biomaterials. In *Handbook of Toxicologic Pathology (Second Edition)*, Academic Press, San Diego, pp. 459-477.
- [305] Petsch, D., Anspach, F.B. (2000) Endotoxin removal from protein solutions. *Journal of Biotechnology* 76: 97-119.
- [306] Geijer, A., Franzen, A.M. (1975): Textile conservation in Sweden. Problems and practices. In *Conservation in archaeology and the applied arts*, Stockholm, pp. pp 7-13.
- [307] Rowe, S. (2004) The Effect of Insect Fumigation by Anoxia on Textiles Dyed with Prussian Blue. *Studies in Conservation* 49 259-270.
- [308] Neuheuser, H.P. (1993) Gesundheitsvorsorge in Archiven. Zum Problem der Schimmelpilz-Kontamination. *Der Archivar* 46: 364-366.
- [309] Campoccia, D., Montanaro, L., Arciola, C.R. (2006) The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials* 27: 2331-2339.
- [310] Flemming, H.-C., Neu, T. R., Wozniak, D. J. (2007) Guest commentary, The EPS Matrix: The "House of Biofilm Cells". *Journal of Bacteriology* Vol. 189: 7945-7947.
- [311] Moroni, O., Jean, J., Autret, J., Fliss, I. (2002) Inactivation of lactococcal bacteriophages in liquid media using dynamic high pressure. *International Dairy Journal* 12: 907-913.
- [312] Matthews, I.P., Gibson, C., Samuel, A.H. (1994) Sterilisation of implantable devices. *Clinical Materials* 15: 191-215.
- [313] Jülich, W.D., von Woedtke, T. (2001) Reprocessing of thermosensitive materials -- efficacy against bacterial spores and viruses. *Journal of Hospital Infection* 48: S69-S79.
- [314] Massey, L.K. (2005): Polypropylene (PP). In *The Effect of Sterilization Methods on Plastics and Elastomers (2)*, William Andrew Publishing, Norwich, NY, pp. 65-66.
- [315] Carlsson, D.J., Chmela, S. (1990): Polymers and high-energy radiation. In *Mechanisms of polymer degradation and stabilisation*. Ed. Scott, G., Elsevier Applied Sciences, Amsterdam, pp. 111-133.
- [316] Chaterji, S., Kwon, I.K., Park, K. (2007) Smart polymeric gels: Redefining the limits of biomedical devices. *Progress in Polymer Science* 32: 1083-1122.
- [317] Murray, P.E., Garcia-Godoy, F., Hargreaves, K.M. (2007) Regenerative Endodontics: A Review of Current Status and a Call for Action. *Journal of Endodontics* 33: 377-390.
- [318] Boland, T., Tao, X., Damon, B.J., Manley, B., Kesari, P., Jalota, S., Bhaduri, S. (2007) Drop-on-demand printing of cells and materials for designer tissue constructs. *Materials Science and Engineering: C* 27: 372-376.

- [319] Chang, T.M.S. (2000) Artificial cell Biotechnology for medical applications. *Blood Purif.*
- [320] Pompe, W., Worch, H., Epple, M., Friess, W., Gelinsky, M., Greil, P., Hempel, U., Scharnweber, D., Schulte, K. (2003) Functionally graded materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering A* 362: 40-60.
- [321] Thorrez, L., Shansky, J., Wang, L., Fast, L., VandenDriessche, T., Chuah, M., Mooney, D., Vandenburgh, H. (2008) Growth, differentiation, transplantation and survival of human skeletal myofibers on biodegradable scaffolds. *Biomaterials* 29: 75-84.
- [322] Krasteva, N., Harms, U., Albrecht, W., Seifert, B., Hopp, M., Altankov, G., Groth, T. (2002) Membranes for biohybrid liver support systems--investigations on hepatocyte attachment, morphology and growth. *Biomaterials* 23: 2467-2478.
- [323] Hicke, H.-G., Lehmann, I., Malsch, G., Ulbricht, M., Becker, M. (2002) Preparation and characterization of a novel solvent-resistant and autoclavable polymer membrane. *Journal of Membrane Science* 198: 187-196.
- [324] Cole, M.A., Voelcker, N.H., Thissen, H., Griesser, H.J. (in press) Stimuli-responsive interfaces and systems for the control of protein-surface and cell-surface interactions. *Biomaterials* In Press, Corrected Proof.
- [325] Wendel, H.P., Ziemer, G. (1999) Coating-techniques to improve the hemocompatibility of artificial devices used for extracorporeal circulation. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 16: 342-350.
- [326] Ríhová, B. (1996) Biocompatibility of biomaterials: hemocompatibility, immunocompatibility and biocompatibility of solid polymeric materials and soluble targetable polymeric carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 21: 157-176.
- [327] Zimmer, C., McKinley, D. (2008) New approaches to pollution prevention in the healthcare industry. *Journal of Cleaner Production* 16: 734-742.

# 11 Anhang

**Tabelle A 1:** Textile Produkte für Medizin und Hygiene nach Loy [7].

	CO	Viskose	Seide	PA	PP	PVDF, PTFE	P(L)LA	PGA	PET	SAP	Hydrogel/ alginat	Latex	PU	PE	PVC	Silikon	PCL
<b>1. Verbands- und Kompressionsmaterial</b>																	
1.1 mit direktem Wundkontakt	g, v, w				g, v, w	g, v, w	s	s	x								
1.2 ohne Wundberührung	g, w	g, w		g, w					g								
<b>2. Hospitaltextilien</b>																	
2.1 medizinische Betteinlagen																	
2.1.1 Inkontinenzeinlagen	g	g		v	s				g, v	v			x	s	s		
2.1.2 Antidekubitus-Bett und Schuheinlagen				g, w					g, w								
2.2 Hospitaltextilien																	
2.2.1 OP-Abecktücher	g	v			v	s, m			g, s, m				s, m	s		s	
2.2.2 OP-Bekleidung		g		s	v	s			g					v			
2.2.3 OP-Tischauflagen									w								
2.2.4 OP-Nahtmaterial (mono- und multifil)			f	f		f	f*	f*						f		s	f*
<b>3. Textile Implantatstrukturen für Körpersubstanzersatz (Regenerative Medizin)</b>																	
3.1 Faserpolymere für die Regenerative Medizin					f (g, w)	f (g, w)	f*(g, w)	f*(g, w)	f (g, w)				f (g, w)				f*(g, w)
3.2 Textile Gefäßprothesen					f (g, w)	f (g, w)	f*(g, w)	f*(g, w)	f (g, w)				f, v, (g, w)				f*(g, w)
3.3 Textilimplantate der Hernien- Herz-, und Augen Chirurgie																	
3.3.1 Bauchwandverstärkungen					f (g, w)	f (g, w)											
3.3.2 Herzklappenersatz, Herzbeutelumhüllung					w	w			w							s	
3.3.3 Keraprotthese (Hornhautersatz)																	
3.4 Gewebezüchtung mit textilen Zellträgern (Tissue Engineering)				v	v	w, v	w, v	w, v	w, v								

f = Filament; g = Gewebe; l = Laminat; m = Membran; s = Schicht; v = Vlies; w = Gewirk; \* = resorbierbar

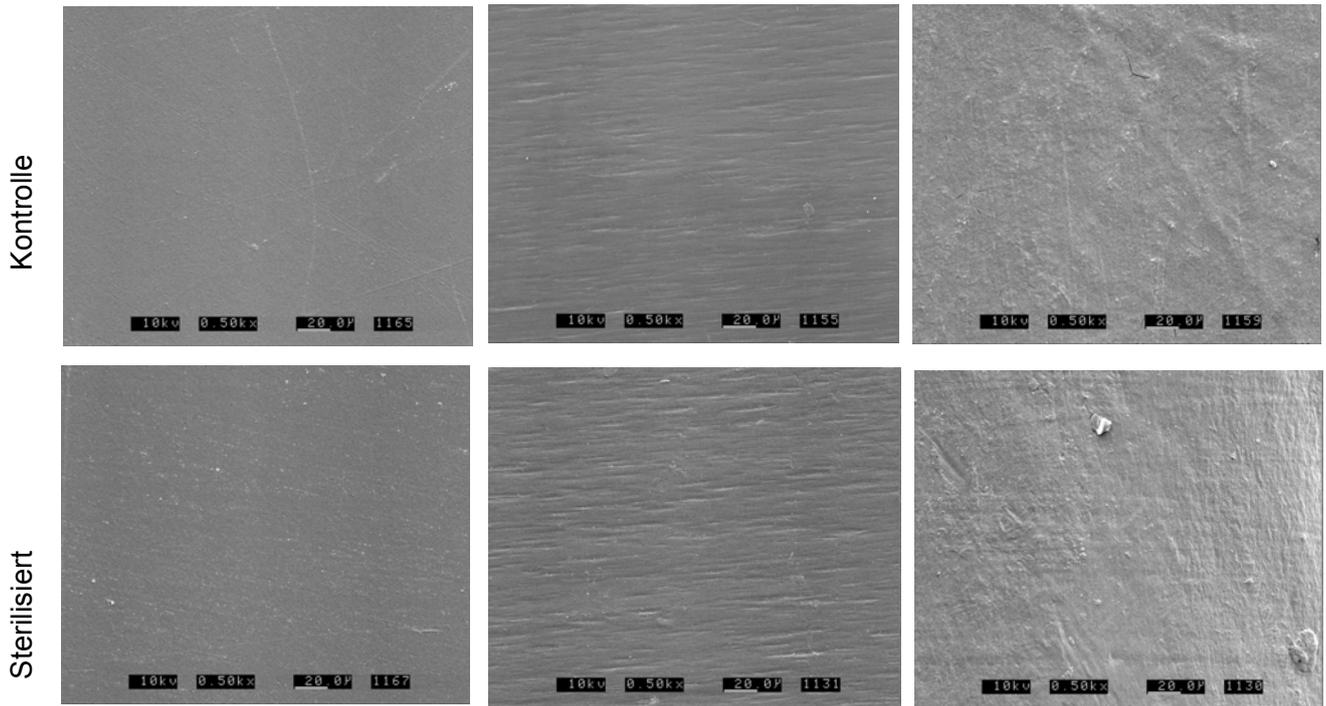
**Tabelle A 2:** Teilfaktorieller Versuchsplan. Die Durchlaufreihenfolge deutet die Randomisierung der Durchführung an. Nach Versuchsnr. 27 Zusatzversuche außerhalb des regulären Versuchsplans.

Versuchsnr.	Durchlaufreihenfolge	Druck [bar]	Ozonkonz. [mg/m <sup>3</sup> ]	Zeit [min]	Temperatur [°C]
1	8	0	0	20	20
2	12	80	0	20	50
3	17	0	70	20	50
4	11	80	70	20	20
5	13	0	0	220	50
6	24	80	0	220	20
7	16	0	70	220	20
8	5	80	70	220	50
9	15	0	0	20	20
10	4	80	0	20	50
11	26	0	70	20	50
12	23	80	70	20	20
13	6	0	0	220	50
14	7	80	0	220	20
15	20	0	70	220	20
16	10	80	70	220	50
17	9	0	0	20	20
18	22	80	0	20	50
19	2	0	70	20	50
20	27	80	70	20	20
21	3	0	0	220	50
22	21	80	0	220	20
23	19	0	70	220	20
24	18	80	70	220	50
25	14	40	35	120	35
26	25	40	35	120	35
27	1	40	35	120	35
28	29	80	0	220	50
29	28	0	70	220	50
30	32	0	70	220	50
31	35	0	70	220	50
32	31	80	110	400	50
33	34	80	110	400	50
34	30	80	110	400	50
35	33	0	110	400	50

a) PVDF

b) PP

c) PLA-co-TMC



**Tabelle A 3:** REM-Aufnahmen bei 500-facher Vergrößerung der Polymer-Querschnitte im Vergleich. Die sterilisierte Probe (untere Reihe) wurde bei 35 °C und 75 bar mit 75 g/m<sup>3</sup> Ozon für 4 h behandelt.

Tabelle A 4 Detailergebnisse der GPC-Messungen von PP.

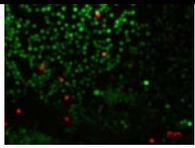
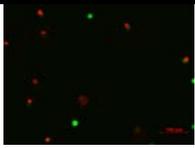
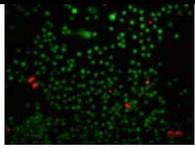
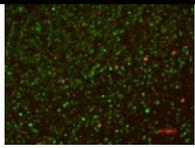
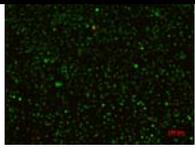
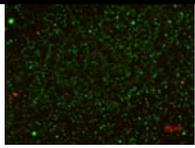
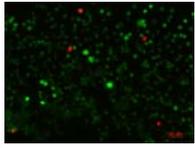
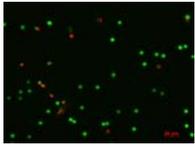
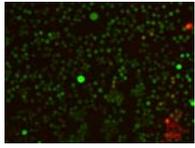
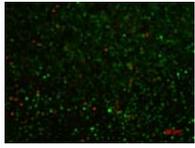
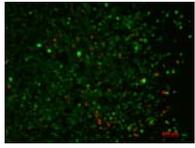
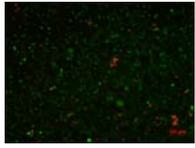
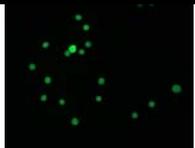
Messung	Probe	M <sub>n</sub> (D) [mol/g]	M <sub>w</sub> (D) [mol/g]	D	
Kontrolle	1	PP1/2_1	78100,00	333000,00	4,26
	2	PP1/2_2	83200,00	263000,00	3,16
	3	PP1/2_3	84300,00	251000,00	3,93
<b>Mittelwert</b>		<b>81866,67</b>	<b>282333,33</b>	<b>3,78</b>	
<b>Std</b>		<b>3308,07</b>	<b>44286,94</b>	<b>0,57</b>	
Ozon CO2	4	PP2/2_1	12800,00	30000,00	2,35
	5	PP2/2_2	9930,00	29100,00	2,93
	6	PP2/3_3	7080,00	31400,00	4,43
<b>Mittelwert</b>		<b>9936,67</b>	<b>30166,67</b>	<b>3,24</b>	
<b>Std.</b>		<b>2860,01</b>	<b>1159,02</b>	<b>1,07</b>	
ETO	7	PP3/2_1	42300,00	136000,00	3,22
	8	PP3/2_2	39300,00	131000,00	3,33
	9	PP3/2_3	38700,00	130000,00	3,36
<b>Mittelwert</b>		<b>40100,00</b>	<b>132333,33</b>	<b>3,30</b>	
<b>Std.</b>		<b>1928,73</b>	<b>3214,55</b>	<b>0,07</b>	
Ozon	10	PP4/2_1	30600,00	80900,00	2,64
	11	PP4/2_2	28700,00	73200,00	2,55
	12	PP4/2_4	24100,00	71600,00	2,97
<b>Mittelwert</b>		<b>27800,00</b>	<b>75233,33</b>	<b>2,72</b>	
<b>Std</b>		<b>3342,15</b>	<b>4972,26</b>	<b>0,22</b>	

Tabelle A 5 Detailergebnisse der GPC-Messungen von PLA-co-TMC.

Messung	M <sub>n</sub> (D)	M <sub>w</sub> (D)	D	
Kontrolle	1	98536,00	171130,00	1,74
	2	96964,00	172210,00	1,78
	3	110152,00	173700,00	1,71
<b>Mittelwert</b>	<b>101884,00</b>	<b>172346,67</b>		
<b>Std</b>	<b>7203,31</b>	<b>1290,44</b>		
Ozon CO2	4	78367,00	144160,00	1,84
	5	74220,00	141800,00	1,91
	6	76133,00	143520,00	1,89
<b>Mittelwert</b>	<b>76240,00</b>	<b>143160,00</b>		
<b>Std.</b>	<b>2075,57</b>	<b>1220,49</b>		
ETO	7	105610,00	175770,00	1,66
	8	104360,00	177260,00	1,70
	9	105590,00	177780,00	1,68
<b>Mittelwert</b>	<b>105186,67</b>	<b>176936,67</b>		
<b>Std.</b>	<b>715,98</b>	<b>1043,28</b>		
Ozon	10	99840,00	172320,00	1,73
	11	100510,00	173300,00	1,72
	12			
<b>Mittelwert</b>	<b>100175,00</b>	<b>172810,00</b>		
<b>Std</b>	<b>473,76</b>	<b>692,96</b>		

**Tabelle A 6** Fluoreszenzaufnahmen der mit Live/Dead angefärbten Fibroblastenzellen auf Polymer.

	24 h			72 h		
	Bild 1	Bild 2	Bild 3	Bild 1	Bild 2	Bild 3
<b>PVDF</b> Kontrolle Probe 1						
<b>PVDF</b> Ozon/CO2 Probe 1						
<b>PLA-co-TMC</b> Kontrolle Probe 1						
<b>PLA-co-TMC</b> CO2/Ozon Probe 1						

	24 h			72 h		
	Bild 1	Bild 2	Bild 3	Bild 1	Bild 2	Bild 3
<b>TCPS</b> Probe 1						
Probe 2						
<b>PP</b> Kontrolle Probe 1						
Probe 2						
<b>PP</b> CO2/Ozon Probe 1						
Probe 2						