

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie  
der Ludwig - Maximilians - Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

und dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

**Über die selektive Abtötung von Bakterien durch Femtosekunden  
- Laserimpulse.**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Ursula Haertel  
aus  
Bad Tölz  
2010

Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. F.-X. Reichl

Mitberichterstatter:

Priv. Doz. Dr. Susanne Bailer

Priv. Doz. Dr. Ekaterini Paschos

Mitbetreuung durch:

Prof. Dr. Wolfgang Zinth

Frau Karin Haiser

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser,

FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung:

23.03.2010

**In Dankbarkeit meinen  
Eltern gewidmet**



## Abkürzungen

---

HGF:	humane Gingiva - Fibroblasten
S. mutans:	Streptokokkus mutans
E. coli:	Escherichia coli
ISRS:	Impulsive stimulated Raman scattering
Hepes - BSS	Hepes - buffered - saline - solution
HBSS	Hank`s - buffered - saline - solution

# INHALTSVERZEICHNIS

## **Thema: Über die selektive Abtötung von Bakterien durch Femtosekunden - Laserimpulse.**

### **Verzeichnis der Abkürzungen**

<b>1. Einleitung</b> .....	S. 10
1.1. Historie und Therapieansätze von Parodontalerkrankungen.....	S. 10
1.2. Historie der Desinfektion.....	S. 12
1.3. Desinfektion, Sterilisation und Reinigung.....	S. 13
1.4. Desinfektionsmaterialien der Mundhöhle.....	S. 14
1.4.1. Halogene: Chlor und Jod.....	S. 14
1.4.2. Alkohole.....	S. 16
1.4.3. Aktivsauerstoff freisetzende Substanzen.....	S. 16
1.4.3.1. Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	S. 16
1.4.3.2. Ozon (O <sub>3</sub> ).....	S. 17
1.4.4. Vergiftungen mit Desinfektionsmaterialien.....	S. 17
1.5. Zahntaschenentstehung und ihre Keime.....	S. 18
1.6. Photodynamische Therapie.....	S. 20
1.7. Laser.....	S. 21
1.7.1. Ursprung.....	S. 21
1.7.2. Femtosekundenlaser.....	S. 22
1.8. Impulsiv stimulierte Raman Streuung (ISRS).....	S. 23
1.9. Kariesentstehung und ihre Keime.....	S. 23
<b>2. Fragestellung</b> .....	S. 25
<b>3. Material und Methode</b> .....	S. 26
3.1. Materialien.....	S. 26

3.1.1. Übersicht über verwendete Materialien.....	S. 26
3.1.1.1. Auswahl geeigneter Objektträger für adhärenente HGF: Hellma Quarzglas Objektträger.....	S. 27
3.1.1.2. LabTek™ – Chamber – Slides von Nunc™ .....	S. 28
3.1.2. Von Tsen et al. [81] [82] verwendete Bakterien und Viren.....	S. 28
3.1.3. Kultivierung von Keimen.....	S. 28
3.1.3.1. Kultivierung von S. mutans.....	S. 28
3.1.3.2. Kultivierung von E. coli.....	S. 29
3.1.4. Kultivierung von HGF.....	S. 30
3.1.4.1. Kultivierung von HGF in Suspension.....	S. 30
3.1.4.2. Kultivierung von adhärenenten HGF.....	S. 31
3.1.5. Färbe – Kits.....	S. 31
3.1.5.1. Auswahl der Färbe – Kits.....	S. 32
3.1.5.2. Vorbereitung der bakteriellen Suspension für die Färbung.....	S. 32
3.1.5.3. Verwendetes #L7012 - Färbe - Kit von Invitrogen® für Bakterien.....	S. 33
3.1.5.4. Vorbereitung der HGF für die Färbung.....	S. 34
3.1.5.5. Verwendetes #L7013 - Färbe - Kit von Invitrogen® für HGF.....	S. 35
3.2. Methoden: Mikrobiologischer Versuchsaufbau.....	S. 36
3.2.1. Färbung von S. mutans und E. coli mit Invitrogen® - Färbekits...	S. 36
3.2.2. Direkte und indirekte Auszählung der Bakterien auf dem C – Chip von PeQLab.....	S. 37
3.2.3. Färbung von HGF.....	S. 38
3.2.3.1. Anfärben der HGF in Suspension.....	S. 38
3.2.3.2. Färbung der adhärenenten HGF auf Objektträgern.....	S. 38
3.2.4. Direkte und indirekte Auszählung der HGF in der Neubauer -	S. 39

Zählkammer.....	
3.3. Vergleichender Versuchsaufbau des Femtosekundenlasers zur Bestrahlung von HGF und Bakterien bei den Versuchen von Tsen et al.....	S. 40
3.4. Versuchseinstellungen zur Bestrahlung von HGF und Bakterienkulturen...	S. 41
3.4.1. Vorversuche mit HGF.....	S. 41
3.4.2. kHz Versuche/ $\lambda = 800\text{nm}$ mit adhärenen HGF.....	S. 42
3.4.3. 1kHz Versuche/ $\lambda = 800\text{nm}$ mit S. mutans und E. coli.....	S. 43
3.4.4. 80MHz Versuche/ $\lambda = 800\text{nm}$ mit S. mutans und E. coli.....	S. 43
3.4.5. 1kHz Versuche/ $\lambda = 400\text{nm}$ mit adhärenen HGF.....	S. 44
3.4.5.1. 1kHz Versuche/ $\lambda = 400\text{nm}$ / $1,6\text{GW}/\text{cm}^2$ mit adhärenen HGF.....	S. 44
3.4.5.2. 1kHz Versuche/ $\lambda = 400\text{nm}$ / $18\text{GW}/\text{cm}^2$ mit adhärenen HGF.....	S. 44
3.4.6. 1kHz Versuche/ $\lambda = 400\text{nm}$ mit S. mutans und E. coli.....	S. 44
3.4.6.1. 1kHz Versuche/ $\lambda = 400\text{nm}$ / $1,6\text{GW}/\text{cm}^2$ S. mutans und E. coli.....	S. 45
3.4.6.2. 1kHz Versuche/ $\lambda = 400\text{nm}$ / $18\text{GW}/\text{cm}^2$ S. mutans und E. coli.....	S. 45
3.5. Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	S. 45
3.6. Erläuterung der statistischen Testverfahren.....	S. 45
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>S. 46</b>
4.1. Ergebnisse der Versuchsreihen.....	S. 46
4.1.1. Ergebnisse für HGF.....	S. 46
4.1.2. Ergebnisse für E. coli.....	S. 46
4.1.3. Ergebnisse für S. mutans.....	S. 47
4.2. Auswertung der Versuchsergebnisse.....	S. 47
4.2.1. Ergebnisse der Vorversuche mit HGF.....	S. 47
4.2.2. Ergebnisse der 1kHz Versuche/ $\lambda = 800\text{nm}$ mit adhärenen HGF..	S. 48
4.2.3. Ergebnisse der 1kHz Versuche/ $\lambda = 800\text{nm}$ mit S. mutans und	S. 48

E. coli.....	
4.2.4. Ergebnisse der 80MHz Versuche/ $\lambda= 800\text{nm}$ mit S. mutans und E. coli.....	S. 49
4.2.5. Ergebnisse der 1kHz Versuche/ $\lambda= 400\text{nm}$ mit adhärenen HGF..	S. 49
4.2.5.1. Ergebnisse der 1kHz Versuche/ $\lambda= 400\text{nm}/$ $1,6\text{GW}/\text{cm}^2$ mit adhärenen HGF.....	S. 49
4.2.5.2. Ergebnisse der 1kHz Versuche/ $\lambda= 400\text{nm}/ 18\text{GW}/\text{cm}^2$ mit adhärenen HGF.....	S. 49
4.2.6. Ergebnisse der 1kHz Versuche/ $\lambda= 400\text{nm}$ mit S. mutans und E. coli.....	S. 50
4.2.6.1. Ergebnisse der 1kHz Versuche/ $\lambda= 400\text{nm}/$ $1,6\text{GW}/\text{cm}^2$ S. mutans und E. coli.....	S. 50
4.2.6.2. Ergebnisse der 1kHz Versuche/ $\lambda= 400\text{nm}/ 18\text{GW}/\text{cm}^2$ S. mutans und E. coli.....	S. 50
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>S. 51</b>
5.1. Diskussion verschiedener Therapieansätze.....	S. 51
5.2 Diskussion von Material und Methode.....	S. 51
5.3. Diskussion der Ergebnisse.....	S. 54
5.4. Schlussbetrachtung.....	S. 55
5.5. Schlussfolgerung.....	S. 56
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>S. 57</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>S. 60</b>
<b>8. Anhang: Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>S. 70</b>
8.1. Tabellen.....	S. 70
8.2. Abbildungen.....	S. 79
<b>9. Danksagung.....</b>	<b>S. 115</b>
<b>10. Lebenslauf.....</b>	<b>S. 116</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Historie und Therapieansätze von Parodontalerkrankungen

Die Geschichte der Kenntnis von Parodontalerkrankungen nimmt ihren Ursprung bereits sehr früh im ersten Jahrhundert nach Christus mit Aulus Cornelius Celsus, der Hinweise auf diese Erkrankung vermerkt [33]. Jedoch erst im Jahre 1728 beschreibt der Pariser Zahnarzt Pierre Fauchard [77] zum ersten Mal klinische Symptome einer Parodontitis marginalis in seinem Werk *Le Chirurgien Dentiste*, welche er als Zahnfleischkorbut bezeichnet [26]. Fast 200 Jahre später, im Jahre 1938, wurde die Parodontitis als Krankheit im Sinne der Reichversicherungsordnung (RVO) anerkannt [35]. Noch bis Anfang 1960 glaubte man, dass sowohl Gingivitis als auch Parodontitis entweder anlagebedingt sind oder durch Dysfunktionen oder Traumata verursacht werden, und hielt die parodontalen Erkrankungen für die Folge einer unspezifischen Plaqueakkumulation [39].

Erst Ende der 50er Jahre erkannte man, dass eine bessere Mundhygiene den parodontalen Zustand verbessert [3], und man fand heraus, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der bakteriellen Besiedelung der Zahnoberflächen und einer Gingivitis beziehungsweise Parodontitis besteht [39] [76]. Noch im Jahre 1978 wurde die Gingivitis als Initialerkrankung und die Parodontitis als gingivitische Folgeerkrankung angesehen (WHO 1978). Erst zehn Jahre später wurden die unabhängige Ätiologie und Pathogenese der Erkrankungen aufgedeckt [26].

Heute wird die Parodontitis als opportunistische Erkrankung angesehen, bei der es neben den pathogenen Keimen auch auf ein für diese Keime günstiges Milieu, wie eine anaerobe Nische, eine verminderte Immunantwort oder genetisch prädisponierende Faktoren des Wirts ankommt [12]. Sobald sich die parodontopathogenen Keime in einer Zahntasche etabliert haben, können diese weder mechanisch durch Scaling, Laser oder Ultraschall-Therapie noch durch chemische Desinfektionsmittel oder antibiotische Therapie [38] [67] vollkommen entfernt werden [34]. Da diese Keime so schwer zu eliminieren sind, wollen wir nun - durch einen neuen Versuchsaufbau mit einem Femtosekundenlaser [25] - selektiv Bakterien in der Tiefe der zerstörten parodontalen Tasche abtöten.

Autoren postulieren [81] [82], eine revolutionäre Methode gefunden zu haben, mit der Mikroorganismen selektiv durch einen Nahinfrarot-Femtosekundenlaser inaktiviert werden können [16] [17] [80], während humane Zellen überleben. Dabei soll es Schwellenwerte bei unterschiedlichen Leistungsdichten geben, bei denen Bakterien, Viren oder Säugetierzellen inaktiviert werden. Autoren behaupten [81] [82], dass der sogenannte Raman - Effekt [65] [66], wenn Wellenlänge und Impulslänge eines Femtosekundenlasers adäquat gewählt sind, selektiv Viren und Bakterien inaktiviert, ohne auf Säugetierzellen zytotoxisch zu wirken. Tsen et al. [81] [82] möchten diesen Effekt für Bluterkrankungen, wie AIDS und Hepatitis, und zur Desinfektion von Biomaterialien in Krankenhäusern nutzen. Durch diese Methode soll eine effiziente Abtötung von Mikroorganismen ohne Nebenwirkungen erfolgen [82].

Noch ist unklar, warum es unterschiedliche Schwellenwerte bei der Inaktivierungs-Leistungsdichte zwischen Bakterien, Viren und Säugetierzellen gibt, wobei Tsen et al. [81] [82] davon ausgehen, dass durch die über ultrakurze Impulse angeregte Raman - Streuung (ISRS, impulsive stimulated Raman scattering) [75] strukturelle Zusammensetzungen von Proteinhüllen oder Membranen verändert werden [79], da Bakterien und Zellen aus Bilayer-Strukturen bestehen, während Viren, wie die M13-Bakteriophagen, aus Kapsiden aufgebaut sind. Bei den M13 - Bakteriophagen liegt die Inaktivierungsschwelle bei einer Leistungsdichte von  $60 \text{ MW/cm}^2$ , bei *Escherichia coli* bei  $900 \text{ MW/cm}^2$  hingegen bei Jurkat-Zellen bei  $22000 \text{ MW/cm}^2$ . Eine andere Ursache für die selektive Inaktivierung könnte der Dämpfungseffekt der umgebenden Wassermoleküle sein, der mit der Größe der Mikroorganismen zunimmt [82].

In der vorliegenden Arbeit wollen wir diesen von Tsen et al. [81] [82] beschriebenen Versuch modifizieren und den vom Femtosekundenlaser erzeugten Raman - Effekt [65] [66] zur Desinfektion tiefer Zahntaschen nutzen. In unseren Versuchen wollen wir diese Hypothese in Bezug auf Bakterien prüfen. Dazu werden Experimente mit fluoreszenzfarbstoff-markierten Bakterien, zum einen mit dem Karies erzeugenden Mundhöhlenkeim *Streptokokkus mutans* (*S. mutans*) [44] [54] und dem auch in der Mundhöhle vorkommenden *Escherichia coli* (*E. coli*) [53] [71], zum anderen mit menschlichen Schleimhautzellen der Mundhöhle, den sogenannten humanen Gingiva - Fibroblasten (HGF) [31] [83], durchgeführt, um die selektive Inaktivierung von Keimen durch den Raman - Effekt [65] [66] zu testen.

## 1.2. Historie der Desinfektion

In Europa wurden Maßnahmen zur Dekontamination von Gegenständen und Instrumenten erst Mitte des 19. Jahrhunderts als wichtig für die Genesung und Prognose von Patienten erachtet. Den Wandel brachten dann einerseits Fortschritte in der Mikrobiologie, die Aufschlüsse über Infektionswege gaben, und andererseits praktische Erfahrungen in der Medizin.

Obwohl bereits Mitte des 18. Jahrhunderts britische Geburtshelfer beobachteten, dass durch Hygiene die Sterblichkeit der Wöchnerinnen sank, verbreitete sich diese Erkenntnis dennoch nicht auf dem europäischen Kontinent [1].

Allerdings führte hier der Assistenzarzt in der Klinik für Geburtshilfe, Ignaz Philipp Semmelweis (1818-1865), 1847 die Desinfektion der Hände mit Chlorkalklösung ein, als er erkannte, dass das Kindbettfieber so eingedämmt werden konnte [22]. Auch Instrumente wurden daraufhin in Chlorkalklösung vorbehandelt, was die Mortalitätsrate der Mütter im Wochenbett erheblich, auf unter 2%, senkte [1]. Auch die britische Krankenschwester Florence Nightingale (1820-1910), die als Pionierin moderner Krankenpflege gilt, maß bereits in ihrem 1859 erschienen Buch ‚Notes on nursing‘ der Sauberkeit in der Umgebung eines genesenden Patienten Bedeutung bei [56].

Der englische Chirurg Joseph Lister (1827-1912) entdeckte 1867 die Karbolsäure für die Medizin und somit ein Verfahren zur Verhütung postoperativer, nosokomialer Wundinfektionen [22]. Zunächst wurden sogenannte Karbolsprays eingesetzt, die sowohl die Operationsräume und deren Einrichtung als auch Personen mit Phenoltröpfchen benetzten. Da dadurch Wundheilungen komplikationslos verliefen, mussten nun Ärzte und Pflegepersonal bei Patientenkontakt die Hände in verdünnter Karbolsäure waschen [1]. Listers Forschungsergebnisse zur Verminderung infektiöser Keime und somit der Verhinderung einer Infektion nannte er selbst das ‚antiseptische Prinzip‘ [1].

Heinrich Hermann Robert Koch (1843-1910) entwickelte zwischen 1878 - 1880 neue Untersuchungsmethoden sowohl in Färbung und Fixierung als auch in der Mikroskopie und Kultivierung von Bakterien durch Einführung fester Nährböden zur Trennung von Bakteriengemischen [22] [28]. Durch die Gewinnung und Züchtung verschiedener Bakterienspezies in Einzelkolonien und Reinkulturen konnten unterschiedliche Bakterienarten anhand ihres Aussehens unterschieden werden. Koch gelang es durch seine standardisierte

Methode zahlreiche Erreger zu kultivieren und nachzuweisen [28]. Für dieses Verfahren stellte er die sogenannten Koch-Postulate auf, die auch heutzutage noch gültig sind. Die Postulate besagen, dass bei Vorliegen einer bestimmten Infektion ein definierter Mikroorganismus vorhanden sein muss, der isolierbar, anzüchtbar ist, bei Übertragung auf andere Organismen dieselbe Erkrankung auslöst und von dem beimpften Tier zu gewinnen sein sollte [1].

Durch diese Postulate entstand in der Zahnmedizin die Theorie der spezifischen Plaquehypothese, welche die Qualität der Plaque, also spezifische Bakterien, für die Infektion verantwortlich macht, und verdrängte die unspezifische Plaquehypothese, die nur von der Quantität der Plaque ausging [34].

Man sieht, dass die vor über 100 Jahren gewonnenen Erkenntnisse über Keime und Desinfektionsverfahren selbst heutzutage noch teilweise gültig und anwendbar sind. Die auf diese Weise damals eingebürgerte Hygiene und Desinfektion in Krankenhäusern und Kliniken wurden bis heute immer weiter perfektioniert.

Und dank Robert Koch und seinen mikrobiologischen Fortschritten färben wir heutzutage isoliert angezüchtete Bakterien an, um sie unter hoch entwickelten Fluoreszenzmikroskopen anzuschauen und auszuwerten.

### **1.3. Desinfektion, Sterilisation und Reinigung**

Um die sensationelle Wirkung der selektiven Abtötung von Bakterien durch einen Femtosekundenlaser zu verstehen, sollte man zunächst bisher eingesetzte Desinfektionsmittel und ihre Wirkung betrachten sowie die Keime, die Karies und Parodontitis verursachen, da wir mit dem Hauptkeim der Karies, dem *S. mutans*, Teile des Experiments durchführen werden und das Ganze bei Erfolg in der Parodontologie einsetzen wollen.

Es gibt drei verschiedene Methoden der Keimreduktion: die Sterilisation, Desinfektion und Reinigung.

Der Begriff Sterilisation wird vom Deutschen Arzneibuch (DAB) folgendermaßen definiert: Sterilisation bedeutet das „Abtöten oder Entfernen aller lebensfähigen Vegetativ- und Dauerformen von pathogenen und apathogenen Mikroorganismen in Stoffen, Zubereitungen oder an Gegenständen“ [20].

Dabei kommt es zu einer Keimzahlreduktion um den Faktor  $> 1.000.000$  [69].

Der Begriff Desinfektion bedeutet eine Reduzierung der Anzahl pathogener Keime, so dass von dem desinfizierten Gegenstand keine Infektion mehr ausgehen kann. Dabei wird die Keimzahl um den Faktor 1.000-100.000 reduziert [69].

Die Desinfektion der tiefen Zahntaschen erweist sich mit Desinfektionsmitteln der Mundhöhle als sehr schwierig und eine vollständige Elimination der Keime aus den tiefen Taschen durch Desinfektionsmittel ist nahezu unmöglich.

Die Reinigung ist ein Keimminderungsverfahren durch mechanische Beseitigung von Mikroorganismen, die dadurch nicht zwingend abgetötet werden. Dabei kommt es lediglich zu einer Keimreduktion um den Faktor 10-100 [69].

## **1.4. Desinfektionsmaterialien der Mundhöhle**

Einige der oralen Wirkagenzien, wie Halogene, Alkohole oder Aktivsauerstoff-freisetzende Substanzen, spielen hierbei heutzutage eine große Rolle in der adjuvanten Parodontaltherapie, das heißt parallel zur mechanischen Lokalbehandlung [34].

### **1.4.1. Halogene: Chlor und Jod**

Eine der am häufigsten verwendeten Spüllösungen bei der adjuvanten Parodontaltherapie ist das Chlorhexidindigluconat.

Einerseits wird Chlor in Form seiner Oxide eingesetzt, zum Beispiel zur Spülung von Wurzelkanälen als Natriumhypochlorit in 2,5 - 5,25%iger Konzentration [73].

Andererseits kommt kovalent gebundenes Chlor vor allem in Mundspüllösungen zum Einsatz [32]. Dieses Chlorhexidin (CHX), ein Biguanid, wird vor allem als CHX- Digluconat - Salz in Mundspüllösungen (0,06 - 0,2%) verwendet und wirkt antibakteriell, bakteriostatisch und bakterizid auf grampositive Bakterien. In hohen Konzentrationen (0,2%) bewirkt es eine Plaquehemmung und wirkt zusätzlich bakterizid auf gramnegative Bakterien [70].

Außerdem besitzt es eine hohe Substantivität, welche eine lange Verweildauer am Wirkort bedeutet [47]. Da die kationischen Gruppen des CHX elektrostatisch an die negativ geladenen

Oberflächen der Mundhöhle, wie Zähne, Zahnfleisch sowie Plaque, binden, kann CHX in der Mundhöhle verweilen und bildet somit ein Reservoir, das für einen 'slow release' zur Verfügung steht. Eine weitere Anti - Plaque - Wirkung erreicht das CHX durch seine starke Affinität zu Anionen, wodurch Bindungsstellen der Mikroorganismen an Zahnoberflächen blockiert werden. Des Weiteren zerstört es die Permeabilität der bakteriellen Zellwände, sodass es selbst in die Zelle gelangen kann, wo dann das Zytoplasma durch das gestörte osmotische Gleichgewicht präzipitiert.

Ferner kann CHX membrangebundene ATPasen inhibieren und somit den Glukosestoffwechsel von Zellen beeinflussen. Bei zu langer Anwendung von CHX - Spüllösungen können jedoch unerwünschte Nebenwirkungen wie Geschmacksirritation, verstärkte Zahnsteinbildung oder reversible Braunverfärbung von Zahnfleisch und Zähnen resultieren [34] [69].

Elementares Jod kann nur mit Lösungsmitteln in wässriger Form zum Beispiel als Polyvinylpyrrolidon zum Einsatz kommen. Da es zur Reihe der Halogene gehört, hat es eine hohe Reaktionsbereitschaft. Jod hat eine oxidierende Eigenschaft, wobei, durch die Anlagerung von Jod, Proteine in ihrer Feinstruktur so verändert werden, dass sie ihre Funktion verlieren. Somit wirkt es bakterizid, fungizid, viruzid, sporizid und tuberkulozid [58]. Das bekannteste Jod - Mund - Antiseptikum ist wohl Betaisodona<sup>®</sup> mit 7,5%igem Povidon - Jod [36], das sogar gegen Bakteriensporen wirksam ist [64] [69]. Dieses Mund - Antiseptikum zeigt jedoch ,in - vitro' eine stärkere Keimreduktion als in - vivo bei Speichel- oder Serumkontakt. Bei diesen Zubereitungen ist Vorsicht geboten, wenn Patienten an Schilddrüsenerkrankungen oder an Jodüberempfindlichkeit leiden, da Jod aus diesen resorbiert wird [72].

## **1.4.2. Alkohole**

Zur Desinfektion in der Zahnmedizin kommt Ethanol in 70-80%iger, n - Propanol in 60-70%iger oder Isopropanol in 70-80%iger Konzentration zum Einsatz. Während Ethanol in der 70-80%igen Konzentration lediglich bakteriostatisch wirkt, wirkt Propanol in 60-70%iger Konzentration bereits bakterizid. Die Wirkung der Alkohole basiert auf der Dehydratation von Membranen, zytoplasmatischen Proteinen und Nukleinsäuren, wodurch es zu einem raschen Wirkungseintritt kommt [69]. Alkohole können also in Bakterien eindringen, selbst dort, wo eine Fettschicht das Eindringen von anderen Mitteln verhindert. Allerdings haben Alkohole keine sporizide Wirkung [78].

## **1.4.3. Aktivsauerstoff freisetzende Substanzen**

Von vorrangiger Bedeutung sind in der Zahnmedizin anorganische Peroxidverbindungen, wie  $H_2O_2$ , Carbamidperoxid oder Natriumperborat und Ozon ( $O_3$ ).

Außer Ozon besitzen diese Substanzen klassische  $O_2^{2-}$ -Gruppen. Jede dieser Substanzen ist in der Lage unspezifische Proteine und Membranbausteine zu oxidieren. Ihre Wirkung ist hierbei stark abhängig vom Redoxpotential des umgebenden Milieus [69].

### **1.4.3.1. Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ )**

Wasserstoffperoxid hat ein hohes Oxidationspotential und besitzt wegen der Sauerstoffabspaltung und Schaumbildung sowohl eine desinfizierende als auch reinigende mechanische Wirkung.

Durch die Freisetzung des Sauerstoffs ist es in der Lage, anaerobe Keime zu hemmen. In der Form von Carbamidperoxid ( $CH_6N_2O_3$ ) oder Natriumcarbonat-Peroxyhydrat ( $2 Na_2CO_3 \times 3 H_2O_2$ ) ist  $H_2O_2$  lagerbar. In der Zahnmedizin wird  $H_2O_2$  lokal in 3-10%iger Lösung eingesetzt, in Mundspüllösungen, die der Patient zu Hause anwendet, lediglich in einer Konzentration von 0,3 - 0,5%iger Dosierung.

Ein weiteres Anwendungsgebiet für  $\text{H}_2\text{O}_2$  in der Mundhöhle ist das Bleichen (Bleachen) der Zähne mit Carbamidperoxid oder Natriumperborat [26] [34] [69].

#### 1.4.3.2. Ozon ( $\text{O}_3$ )

Bereits seit 1950 wird Ozon in der medizinischen Therapie angewandt. Bei der Ozonbehandlung in der Zahnmedizin kommt meist ein Ozon - Sauerstoff - Gemisch, zum Beispiel HealOzone [63] oder CurOzone [48] von KaVo, zur Anwendung.

Ozon wirkt dabei bakterizid, fungizid, viruzid und wirkt auch gegen Protozoen [5]. Es ist sehr reaktionsfreudig und kann, da es ein starkes Oxidationsmittel ist, viele Mikroorganismen in ihrem Stoffwechselverhalten schädigen [5]. Es entsteht, wenn ein Sauerstoffradikal mit einem Sauerstoffmolekül reagiert, und zerfällt unter Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , wobei gefährliche Hydroxyradikale und Superoxidanionen frei werden [60].

Unter all den genannten Desinfektionsmitteln hat Ozon das höchste toxische Potential [61]. Pro Tag darf ein Erwachsener (70kg KG) nur  $1\mu\text{l}$  Ozon aufnehmen [69].

#### 1.4.4. Vergiftungen mit Desinfektionsmaterialien

Auch heutzutage gibt es immer wieder Vergiftungsfälle mit Desinfektionsmitteln in Deutschland. Zwischen den Jahren 1990 bis 2000 waren Vergiftungen mit Desinfektionsmitteln bei Erwachsenen die dritthäufigste Vergiftungsursache mit 250 Patienten, und sogar elf Kinder erlitten in diesem Zeitraum Vergiftungen durch Desinfektionsmittel [69].

Durch Verwendung eines Femtosekundenlasers zur Entfernung von Bakterien könnten Vergiftungsfälle mit Desinfektionsmitteln ausgeschlossen werden und es gäbe auch keine Resistenzbildungen von Mikroorganismen gegen Medikamente mehr.

## 1.5. Zahntaschenentstehung und ihre Keime

Die Anwendung eines Femtosekundenlasers stellt eine neuartige Methode zur Bekämpfung der Keime in den tiefen Zahntaschen dar. Um diese revolutionäre Methode herauszustellen, soll erst die Pathogenese der Parodontalerkrankungen mit der Adhäsion der Bakterien an Wurzeloberflächen erklärt werden.

Die Ätiologie entzündlicher Parodontopathien wird in einen primären und einen sekundären Ursachenkomplex eingeteilt.

Unter dem primären Ursachenkomplex werden die pathogenen Mikroorganismen im Zahnbelag - der Plaque - und die durch diesen Biofilm erzeugten entzündlichen Reaktionen des Parodonts zusammengefasst.

Unter dem sekundären Ursachenkomplex versteht man lokale und systemische Faktoren, wie Zahnstein, Speichel oder Zahnstellung, die den primären Ursachenkomplex beeinflussen können [34].

Primär sind die Entstehung und der Verlauf entzündlicher Parodontopathien durch Mikroorganismen in der Zahnplaque bedingt. Diese Plaque ist ein weicher strukturierter Biofilm, in dem Mikroorganismen kommunizieren, sich organisieren, vermehren und vor äußeren Umwelteinflüssen schützen, wodurch sie ihr Überleben und ihr Wachstum sichern. 1mg Nassgewicht von dieser Plaque enthält etwa  $10^8$  Bakterien [34]. Die supragingivale Plaque befindet sich koronal des Gingivalsaumes. Bei gesunder Gingiva bildet sie einen dünnen Zahnbelag, der sich zu 75% aus grampositiven, fakultativ anaeroben Kokken und Stäbchen zusammensetzt [34].

Die subgingivale Plaque hingegen liegt unterhalb des Gingivalsaumes, wo das Milieu sauerstoffarm ist und somit das Wachstum anaerober Keime begünstigt wird. Bei entzündetem Parodont befinden sich viele fusiforme und filamentöse Mikroorganismen und Spirochäten in der subgingivalen Plaque [42] [43], wobei der Anteil von beweglichen zu unbeweglichen Mikroorganismen von 40:1 auf 1:1 bis 1:3 sinkt. Wenn diese subgingivale Plaque verkalkt, entsteht der subgingivale Zahnstein, der als Konkrement bezeichnet wird. Diese Konkreme sind, aufgrund entzündlicher subgingivaler Blutungen, durch Bluteinschlüsse dunkelbraun verfärbt. Diese sind sehr schwer von der Wurzeloberfläche zu entfernen und dienen den Mikroorganismen als Retentionsstelle für ihre Kolonisation [34].

Die Pathogenese [42] entzündlicher, plaquebedingter Parodontopathien erfolgt, laut Page und Schroeder, in vier Schritten:

Das erste Stadium ist die initiale Läsion. Hierbei entsteht durch marginale ödematöse Schwellung ein subgingivaler Raum. Darauf folgt aus einer unbeeinflussten initialen Läsion dann innerhalb von 14 Tagen die frühe Läsion, bei der bereits die Zerstörung des kollagenen Faserapparates der Gingiva beginnt und ein Einriss des Saumepithels am Sulkusboden stattfindet.

Diese beiden ersten Stadien beschreiben den Zustand einer klinisch manifesten Gingivitis.

Innerhalb weniger Wochen kann sich dann die etablierte Läsion bilden, die - bei perfekter Mundhygiene - ebenso wie die initiale und frühe Läsion noch komplett reversibel wäre. Bei dieser Läsion kommt es bereits zur Ausbildung einer gingivalen Tasche, wobei das Vorhandensein einer subgingivalen Plaque obligat ist. Dieses dritte Stadium beschreibt schon den Zustand einer chronischen Gingivitis.

Im vierten Stadium findet ein destruktiver Prozess des Parodonts statt, der durch alleinige Mundhygienemaßnahmen nicht mehr reversibel ist. Bei dieser fortgeschrittenen Läsion finden sich akute Phasen der Exazerbation und auch chronische Perioden der Stagnation. Hierbei entsteht eine parodontale Tasche mit beginnender Knochendestruktion. Dieses letzte Stadium beschreibt also bereits den Übergang einer chronischen Gingivitis in eine Parodontitis [34].

Keime, die zur Entstehung einer parodontalen Läsion beitragen, sind in Tabelle 1 aufgeführt. Man unterscheidet hierbei Keime mit sehr hoher und hoher Assoziation zur Parodontitis [2] [26]; [29], [37], [84].

Tab.1: [26]

<b>Sehr hohe Assoziation</b>	<b>Hohe Assoziation</b>
Porphyromonas gingivalis	Eikenella corrodens
Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Actinobacillus actinomycetemcomitans)	Campylobacter recta
Tanarella forsythia (Bacteroides forsythus)	Fusobacterium nucleatum

Nicht klassifizierte Spirochäten	<i>Prevotella intermedia</i>  <i>Treponema denticola</i>  <i>Eubacterium nodatum</i>
----------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------

Tab. 1: Im Bereich der Parodontologie unterscheidet man Keime, die sehr häufig mit einer Parodontitis einhergehen, somit also sehr hoch mit ihr assoziiert sind, und solche Keime, die häufig im Zusammenhang mit einer Parodontitis gefunden werden und somit eine hohe Assoziation zu ihr aufweisen.

Um als pathogen eingestuft zu werden, muss ein Bakterium folgende Virulenzfaktoren aufweisen: Es muss sich an Geweben des Wirtorganismus anhaften, sich innerhalb einer ökologischen Nische vermehren und wachsen, die wirtseigenen Abwehrmechanismen umgehen und das besiedelte Gewebe aktiv destruieren können. Einer der wichtigsten Keime ist der *Aggregatibacter actinomycetem comitans* [37], der sich durch Kapselantigene, Pilli und Vesikel an den Wirt anheften kann, die Wirtsantwort durch zum Beispiel Leukotoxin [8] umgehen kann und durch Kollagenasen oder Endotoxine aktiv Gewebe destruieren kann [52]. Auf diese pathogenen Keime reagiert der infizierte Wirtorganismus mit einer entzündlichen Abwehrreaktion, sodass die Wirtsabwehr dem bakteriellen Angriff entgegensteht. Allerdings können die bei der Wirtsabwehr laufenden Prozesse auch selbst zur Destruktion des Parodonts beitragen [34].

## 1.6. Photodynamische Therapie

Eine neue Entwicklung ist die photodynamische Therapie (PDT), die eine Alternative zu konventionellen Methoden darstellen könnte. Bei der PDT bindet ein sogenannter Photosensitizer an die Zielzelle und wird dann durch Licht einer bestimmten Wellenlänge aktiviert. Während dieses Prozesses werden freie Radikale (über Singulett Sauerstoff) gebildet, die dann einen Effekt hervorrufen, der auf die Zelle toxisch wirkt [62]. Manche Autoren behaupten, dass gramnegative Bakterien wegen ihres Zellwandaufbaus resistent

gegen die PDT sind [62]. Klinische Studien über nicht - invasive chirurgische Therapie bei aggressiver Parodontitis, photodynamische Therapie, Scaling und Wurzelglättung zeigen ähnliche Ergebnisse [21] [57].

Des Weiteren scheinen die toten Zellen im Biofilm kein Hindernis für die Diffusion des Photosensitizers und die Penetration von Licht zu sein.

Zusätzlich deutet die reduzierte Zelldichte nach der photodynamischen Therapie auf einen Verlust an Zellen im Biofilm hin. Obwohl der Grund für diese Veränderungen nicht offensichtlich ist, scheint die PDT den Zell - zu - Zell - Kontakt zu reduzieren und verursacht somit einen Verlust an Zellen im Biofilm [74].

Da die Bakterien bei der PDT [74] lediglich reduziert werden, wird klar, dass durch bisherige instrumentelle [6] [7] und medikamentöse [59] [62] Therapie weder eine komplette Elimination noch eine selektive Inaktivierung von Mikroorganismen erreicht werden kann.

## **1.7. Laser**

### **1.7.1. Ursprung**

Die ersten Versuche eines LASERs gingen von Collins et al. [19] im Jahre 1960 aus. Ebenfalls im Jahr 1960 schlug Maimann dann den ersten Prototypen des LASERs [45], basierend auf der Theorie von stimulierter Strahlenemission [18], vor. Das Wort LASER ist ein Akronym für Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation [41], also Lichtverstärkung durch Strahlungsemission. Ein LASER erzeugt ein monochromatisches, räumlich-zeitlich kohärentes Licht mit viel Leistung. Das aktive Medium ist z.B. ein Ti:Saphir - Kern, der die Pumpenergie einer Blitzlichtlampe absorbiert. Die absorbierte Energie hebt einige Elektronen in höhere, angeregte Quantenzustände, die dann sowohl spontan, als auch stimuliert Photonen emittieren können. Wenn sich mehr Elektronen in einem angeregten Energieniveau befinden als Elektronen in niedrigeren Energieniveaus, ist eine so genannte Besetzungsinversion erreicht. Die Photonen, die dabei emittiert werden, werden zwischen zwei Spiegeln reflektiert und schlagen neue Photonen aus dem aktiven Medium heraus, wobei eine Lawine von Photonen induziert wird. Einer der Spiegel reflektiert

100% der Photonen, der andere hingegen weniger als 100%. Dieser geringe transmittierte Anteil ist dann als Laserstrahl nutzbar.

### 1.7.2. Femtosekundenlaser

Charakteristisch für einen Femtosekundenlaser sind ultrakurze Impulse von einer Femtosekunde (fs), welche  $10^{-15}$  Sekunden entspricht. Mit diesen Femtosekunden - Pulsen soll ein bestimmter Effekt hervorgerufen werden, der impulsiv stimulierte Raman - Effekt, auch impulsiv stimulierte Raman - Streuung (ISRS) genannt [65] [66].

In früheren Studien stellten Autoren die Hypothese auf, dass ISRS [75] eines Femtosekundenlasers zur selektiven Inaktivierung von Bakteriophagen (Viren) und Bakterien führt [17] [16] [80], während Säugetierzellen unversehrt bleiben [81] [82].

Daher wurde in dieser Studie der Effekt von ISRS durch einen nahinfraroten Femtosekundenlaser mit den Bakterien *S. mutans* und *E. coli* vorgenommen und mit den Ergebnissen von HGF verglichen.

Die ultrakurzen Impulse von  $10^{-15}$  Sekunden werden durch Modenkopplung erzeugt. Moden sind Eigenzustände des Femtosekundenlasers, die im Laser mit ihren eigenen Wellenlängen schwingen. Daher ist die Modenkopplung eine Technik, mit der eine feste Phasenbeziehung zwischen den Moden des Laserhohlraumes erzeugt werden kann. Je mehr Moden gekoppelt werden, um so kürzer werden die daraus resultierenden Pulsmaxima.

In unseren Experimenten wählten wir zwei verschiedene Lasereinstellungen.

Die Anregungsquelle des einen Experimentes ist ein gepulster Femtosekunden – Ti:Saphir – Laser, der Spitfire XP, von Newport Spectra Physics. Dieser arbeitet bei einer fixen Zentralwellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$  und eine zweite Harmonische ist bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 400\text{nm}$  und bei einer Repetitionsrate von 1kHz einstellbar.

In einem weiteren Experiment wurde ein Tsunami Femtosekundenlaser von Newport Spectra Physics als Anregungsquelle benützt. Dieser arbeitet bei einer Zentralwellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , allerdings bei einer Repetitionsrate von 80MHz.

## **1.8. Impulsiv stimulierte Raman Streuung (ISRS)**

Durch einen nahinfraroten Femtosekundenlaser soll es möglich sein, über die Femtosekunden - Pulse die ISRS hervorzurufen.

Diese ISRS wurde von Sir Raman im Jahre 1928 entdeckt, die er als inelastische Streuung von Licht eines Photons an einem Atom oder Molekül beschreibt [65] [66]. Bei diesem Prozess wird ein Teil der Energie des Photons, das auf das Molekül trifft, auf das Molekül übertragen. Dabei wird die kinetische Energie teilweise in innere Energie umgewandelt, und daher wird das Molekül auf ein höheres Energieniveau angehoben, weil die Energie in dem Molekül deponiert wird.

In vorherigen Studien behaupten Autoren, dass diese übertragene Energie so groß ist, dass die molekularen Verbindungen aufbrechen sollen [81] [82]. Daher soll der Raman - Effekt zu einer selektiven Inaktivierung von Bakteriophagen (Viren) und Bakterien führen, während Säugetierzellen unversehrt bleiben sollen [81] [82].

## **1.9. Kariesentstehung und ihre Keime**

Das Experiment mit dem Femtosekundenlaser wird mit Karies erzeugenden Bakterien durchgeführt. Hierbei verwenden wir den *S. mutans* [30], der bei der Kariesentstehung eine große Rolle spielt [9] [44].

Karies ist die häufigste lokalisierte Erkrankung der Zahnhartsubstanzen. Durch das Zusammenspiel potentiell pathogener ökologischer Faktoren und potentiell pathogener Mikroorganismen entsteht die Karies [34]. Bakteriell bedingte Demineralisationsprozesse verändern die Oberfläche der Zahnhartsubstanz. Dabei reichen die resultierenden Veränderungen von submikroskopisch nachweisbaren Kristallgitterveränderungen in der Frühphase der Schmelzkaries bis hin zu makroskopisch diagnostizierbaren Defekten in Form von offenen Kavitäten bei fortgeschrittener Schmelz- und Dentinkaries [34].

Die Ätiologie der Karies beschreibt viele unterschiedliche Theorien zur Kariesentstehung. Die von Willoughby Dayton Miller 1889 [26] [34] entwickelte und später von anderen Wissenschaftlern verifizierte und erweiterte chemisch - parasitäre Theorie ist heute das allgemein akzeptierte Modell zur Ätiopathogenese der Karies. Miller entdeckte die

Milchsäuregärung der Kohlenhydrate aus der Nahrung durch Bakterien des Speichels und nahm allerdings fälschlicherweise an, dass die Vergärung in der Mundhöhle stattfindet und nicht an der Zahnoberfläche kariesauslösend sei [34], [26].

Entscheidend für die Kariesentstehung sind vier Komponenten, nämlich die Zähne als Wirt, die Mikroorganismen - also die Plaque und das Substrat, die Kohlenhydrate und der Zeitfaktor [34] [26]. Dieser sei für das biologische Gleichgewicht von Remineralisation und Demineralisation und somit für die Kariesentstehung entscheidend [26].

Nach diesen beiden Theorien geht man davon aus, dass kariogene Mikroorganismen der Mundhöhle in Form von Plaque bei einem Überangebot an kariogenem Substrat, wie zum Beispiel niedermolekularen Kohlenhydraten, organische Säuren produzieren, die die Zahnhartsubstanz bei ausreichend langer Wirkung entmineralisieren [34]. Eine Demineralisation findet beim Erreichen des für den Zahnschmelz kritischen pH - Intervalls von 5,2 - 5,7 statt und bei ausreichender Verweildauer des pH - Werts im kritischen Bereich [34]. Somit führt das Zusammenwirken der vier Faktoren Substrat, Plaque, Wirt und Zeit zur Kariesentstehung. Bei Anheben des pH - Werts der Plaque auf ein über dem kritischen pH - Wert liegendes Niveau remineralisiert der Zahnschmelz in Anwesenheit von Speichel, der eine kalzium- und phosphatübersättigte Lösung ist [34]. Durch die ständig veränderten pH - Werte an der Zahnoberfläche müssen De- und Remineralisation der Zahnoberfläche als ein dynamischer Prozess betrachtet werden.

Bei der Entstehung der Plaque adsorbiert ein Konglomerat aus Kohlenhydraten und Proteinen, das so genannte acquired pellicle (0,1 - 1µm), auf der Zahnoberfläche [40]. Dieses besteht primär aus Speichelproteinen, die aufgrund ihrer Eigenladung an die Kalzium- und Phosphatgruppen des Apatits der Zahnhartsubstanz physikochemisch oder über Bindungsmoleküle (Adhäsine) an Rezeptoren binden können. Innerhalb weniger Stunden heften sich an diese semipermeable Membran erste Bakterien, vor allem grampositive Streptokokken (*S. sanguis* und *S. mitis*) und Aktinomyzeten, später Veillonellen [34]. Auch Lactobazillen sind an der Auslösung der Karies mitbeteiligt, sind aber nur im sauren Milieu aktiv und tragen dadurch vor allem zur Demineralisation der Zahnhartsubstanz bei [26]. Nach sieben bis 14 Tagen überwiegen Stäbchen und Filamente. Mit zunehmendem Alter gewinnt die Plaque anaeroben Charakter, wobei diese mittlerweile aus dicht gepackten Bakterien besteht (60-70 Vol.%). Ihre Metaboliten sind für die Demineralisation der Zahnoberfläche

verantwortlich. Besonders *S. mutans* besitzt eine besondere Stoffwechselleistung: über anaerobe Glykolyse erzeugt er organische Säuren, wie Pyruvat und Laktat, die den Zahn demineralisieren, er ist also sowohl azidogen als auch säuretolerant, da er sich im sauren Milieu gegen die Umgebung abschotten kann, indem er aktiv Säuren aus dem Zellinneren nach außen schleust, und er kann bei geringer Substratzufuhr seinen Stoffwechsel durch die Bildung von intrazellulären Speicherkohlehydraten aufrecht erhalten [34].

Als Wirtsfaktor hat insbesondere der Speichel in seiner Zusammensetzung, Menge und Konsistenz einen starken Einfluss auf die Vermehrung von Mikroorganismen und besitzt eine antibakterielle Wirkung [34].

## **2. Fragestellung**

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es zu überprüfen, ob durch einen Nahinfrarot - Femtosekundenlaser der Raman - Effekt erzeugt wird und selektiv Bakterien, *S. mutans* und *E. coli*, inaktiviert werden, während HGF überleben. Bei Erfolg soll das Ziel sein, den Laser zur Desinfektion tiefer Zahntaschen einzusetzen.

Bei den experimentellen ‚in – vitro‘ - Versuchen wurden *S. mutans*, *E. coli* und HGF mit dem Femtosekundenlaser bestrahlt, um anschließend mit Hilfe spezieller fluoreszierender Färbe - Kits von Invitrogen® gefärbt und als lebend oder tot ausgewertet zu werden.

Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- 1.) Gelingt es, Bakterien (*S. mutans* oder *E. coli*) selektiv abzutöten, während HGF überleben?
- 2.) Ist der Raman - Effekt für die Inaktivierung von Bakterien und humanen Zellen verantwortlich?
- 3.) Ist die Abtötung von *E. coli* und den HGF abhängig von der mittleren Laserleistung, den Leistungsdichten, der Belichtungszeit oder der Repetitionsrate?

### 3. Material und Methode

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1. Übersicht über verwendete Materialien

Tab. 2: Material und Geräte

Material/ Geräte	Firma
<i>BacLight</i> mounting oil (Component C), 10 mL. Der Brechungsindex ist bei 25°C: 1.517 ± 0.003.	Molecular Probes Invitrogen® <u>L 7012</u>
Begasungs - Brutschrank, 37°C und 5% gesättigtem CO <sub>2</sub> - Dampf	Thermo Electron Corporation: Heraeus® HERAcCell®
Bio Photometer	Eppendorf®
Brain - Heart - Infusion 5ml(BHI)	Becton&Dickinson
C – Chips – Zählkammer	PeQLab®
Columbia Agar	Becton&Dickinson/ Carl Roth GmbH
Deckgläser	Carl Roth GmbH+Co. KG
DEAD Red (Ethidiumhomodimer-2) Nukleinsäurefärbung (Komponente B), 50 µl Lösung in 20% DMSO	Molecular Probes Invitrogen® <u>L 7013</u>
Einmal – Impfösen	Carl Roth GmbH+Co. KG
Fluoreszenzküvette	Hellma QS 10mm, 114F
Fluoreszenzmikroskop	Bundeswehr- Neuherberg, Sonderanfertigung, tragbar
Fluoreszenzmikroskop	Nikon (DS 5M E50i) ausgestattet mit Nikon - Software (D1Fi)
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA – Laboratories GmbH
Glutaraldehyde 8%, Lösung in Wasser, 6x10ml	SERVA®
HBSS mit Streptomycin/Penicillin	PAA – Laboratories GmbH
HEPES* <sup>1</sup> - buffered saline solution: pH 7.2-7,5, 1M, liquid	Invitrogen®
Isopropylalkohol 70%	Merck KGaA, Darmstadt
KollagenS Typ1 (calf skin)	Boehringer Mannheim
Kryo SSM – Medium	Promocell

Lab - Tek™ - Chamber Slide™, Permanox®, 177445	Nunc™
Magnetischer Rühr Tisch	VARIOMAG®
Medium Quantum 333 Complete Fibroblast Medium, mit L - Glutamine	PAA – Laboratories GmbH
Minisart® - Filter 0,2µm	Sartorius
Neubauer Zählkammer	Marienfeld superior
Optische Einmal - Absorptionsküvetten	ratiolab® 100 ½ Mikroküvetten Nr. 1201
Optische Filter Langpass - oder Bandpass – Filter	Omega® Filter, Chroma® Filter
Optische Glasobjektträger	Hellma OG 730.000
Pipetten und Spitzen: 1000/100/10µl	Eppendorf® reference
Propidiumjodid, 20 mM (Component B), 300µl Lösung in DMSO	Molecular Probes Invitrogen® <u>L 7012</u>
Reagenzgefäßständer	Carl Roth GmbH+Co. KG
Stirring bar Ø x L= 2 x 5mm	H+P Labortechnik AG
SYTO 9 dye, 3.34 mM (Component A), 300µl Lösung in DMSO (Dimethylsulfoxid)	Molecular Probes Invitrogen® <u>L 7012</u>
Syto10grün fluoreszierende Nukleinsäurefärbung (Komponente A), 50µl Lösung in DMSO	Molecular Probes Invitrogen® <u>L 7013</u>
Zentrifuge	Hettich – Zentrifugen / Mikro 12-24
Zentrifugengefäße 1,5ml	Eppendorf

HEPES\*<sup>1</sup> = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- Ethansulfonsäure

### 3.1.1.1. Auswahl geeigneter Objektträger für adhärenente HGF: Hellma Quarzglas Objektträger

Für den Vorversuch wurden spezielle Objektträger der Firma Hellma verwendet. Diese bestehen aus einem speziellen optischen Quarzglas (Firma Hellma # 730.000) mit einem definierten Füllvolumen von 40µl und einer Schichtdicke von 0,5mm.

Hierauf wurden nach Beschichtung mit 30µl KollagenS TypI (Boehringer Mannheim, calf skin) in einer Übernachtskultur im Brutschrank bei 37°C und 5% gesättigtem CO<sub>2</sub> - Dampf adhärenente HGF angezüchtet, wobei in den 40µl auf dem Quarzglasboden über Nacht etwa 2x10<sup>4</sup> Zellen anwuchsen.

Da der Femtosekundenlaser jedoch auch mit anderen Objektträgern kompatibel ist und nicht, wie anfangs vermutet, nur mit speziellem Quarzglas gearbeitet werden muss, entschied man sich für andere für Zellkulturen geeignete Objektträger, mit denen die Versuchsreihen einfacher durchgeführt werden können.

#### 3.1.1.2. LabTek<sup>TM</sup> - Chamber - Slides von Nunc<sup>TM</sup>

Nach dem ersten Vorversuch mit dem Femtosekundenlaser wählten wir 8 Well LabTek - Permanox Chamber slides von Nunc<sup>TM</sup>, die speziell für Zellkulturen geeignet sind und mit denen eine größere Anzahl von HGF über Nacht kultiviert werden können. Es wurden pro Well 200µl Quantum333 und 200µl einer Zellsuspension, die aus  $3,5 \times 10^6$  Zellen/ml bestand, in das jeweilige Well gegeben. Nach einer Übernachtkultur im Brutschrank waren dann etwa  $5,4 \times 10^5$  Zellen pro Well angewachsen. Mit diesen Objektträgern wurden die weiteren Versuche vorgenommen.

### 3.1.2. Von Tsen et al. [81] [82] verwendete Bakterien und Viren

Tsen et al. [81] [82] verwendeten in ihrem Experiment Viren (M13 - Bakteriophagen und den Tobacco Mosaic Virus (TMV)) und das Bakterium E. coli.

### 3.1.3. Kultivierung von Keimen

#### 3.1.3.1. Kultivierung von S. mutans

S. mutans ist ein grampositiver karieserzeugender Keim. Er wurde auf Columbia - Agar gegeben und nach einer Übernachtkultur im Inkubator waren die Streptokokken auf diesem Agar bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank angewachsen. Dieser Agar besteht aus 12g/l Casein (Pankreatisches Pepton), 5g/l Peptischem Pepton (abgebautes Tiergewebe), 3g/l

Hefeextrakt, 3g/l Rindfleischextrakt, 1g/l Maisstärke, 5g/l Natriumchlorid, 13,5g/l Agar und 5% defibriniertem Schafsblut.

Nachdem auf den Agarplatten genügend Bakterien gewachsen waren, wurden die Bakterien nach vorsichtigem Entfernen von den Agarplatten mittels Überimpfösen in eine Herz – Hirn – Infusion (Brain Heart Infusion (BHI)) - Bouillon überführt. Diese Bouillon besteht aus: 6,0g/l Herz-Hirn-Infusion von Frischgeweben, 6,0g/l peptisch abgebautem Tiergewebe, 5,0g/l Natriumchlorid, 3,0g/l Dextrose, 14,5g/l pankreatisch abgebauter Gelatine und 2,5g/l Dinatriumphosphat. In dieser Bouillon wurden die Bakterien über Nacht auf dem Rüttler bei 37°C vermehrt.

Für die Experimente wurden die Streptokokken in eine HEPES - buffered - saline - solution gegeben, wobei eine optische Dichte von  $OD_{600} = 0.1$  eingestellt wurde, was einer absoluten Zellzahl von  $6,7 \times 10^6$  entspricht.

Daraufhin wurde der Keim bis zu den Versuchen im Kühlschrank bei +4°C oder im Gefrierschrank bei -28°C gelagert.

### 3.1.3.2. Kultivierung von E. coli

E. coli ist ein gramnegativer Keim, der vor allem in Verbindung mit Entzündungen in der Mundhöhle gefunden werden kann [71]. Er wurde ebenfalls in einer Übernachtskultur auf Columbia-Agar bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert, wie in 3.1.3.1. beschrieben, und wurde, nachdem der Keim genügend gewachsen war, mittels sterilen Einmal - Impfösen vorsichtig von den Agarplatten entfernt und ebenfalls, wie in 3.1.3.1. beschrieben, in ein BHI - Medium gegeben.

Für Experimente wurde der E. coli in HEPES - buffered - saline - solution gegeben, wobei eine optische Dichte von  $OD_{600} = 0.08$  eingestellt wurde, was einer absoluten Zellzahl von  $5,2 \times 10^6$  entspricht.

Über Nacht wurde der Keim auf dem Rüttler bei 37°C vermehrt. Daraufhin wurde auch dieser Keim bis zum Versuch im Kühlschrank bei +4°C oder im Gefrierschrank bei -28°C gelagert.

### **3.1.4. Kultivierung von HGF**

In unseren Experimenten kultivierten wir HGF, welche von der Firma PromoCell® GmbH (Heidelberg, Deutschland) stammten (Zelllinien - Nummer: 1210412; Katalognummer Lot - No. 304X160301).

#### **3.1.4.1. Kultivierung von HGF in Suspension**

Die Kultivierung der Zellen im Brutschrank erfolgte in 5%iger CO<sub>2</sub> - Atmosphäre bei 95% relativer Luftfeuchtigkeit und bei 37 °C in gebrauchsfertigem Kulturmedium Quantum 333 (PAA). Quantum 333 enthält 12 % fötales Kälberserum und ist zusätzlich mit Insulin und einem effizienten Eisen bindenden Molekül versetzt.

Die Aussaat erfolgte innerhalb von 4 Tagen nach der letzten Passage (P3+4) der konfluent gewachsenen Fibroblastenkulturen.

Die primären Fibroblasten befanden sich in der 3. - 4. Passage.

Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden zweimal mit HBSS, der mit 10%igem Streptomycin und Penicillin versetzt ist, gespült und dann für 10 Minuten mit 0,125%iger Trypsin - Lösung behandelt. Nach etwa 10 Minuten im Brutschrank lösten sich die Zellen von der Oberfläche der Kulturflasche ab und nahmen eine kugelige Gestalt an. Die Zellen wurden anschließend in ein Medium (Quantum333), das einen Trypsininhibitor enthält, aufgenommen und mit Hilfe einer Glas - Pipette durch wiederholtes vorsichtiges Aufsaugen und Ablassen vereinzelt. Daraufhin wurden die Zellen bei 1500 U/min drei bis fünf Minuten lang zentrifugiert. Der Überschuss wurde abpipettiert und die Zellen je nach Bedarf weiterkultiviert oder für Versuche ausgesät.

Die Zellanzahl einer großen 50ml Flasche beträgt nach Anzucht von 72 Stunden etwa  $2 \times 10^6$  Zellen.

#### 3.1.4.2. Kultivierung von adhärenenten HGF

Die Anzucht adhärenenten HGF erfolgte zunächst auf speziellen Quarzglas - Objektträgern (Hellma mit 40µl Füllvolumen), die über Nacht autoklaviert wurden. In einer Petrischale mit 15cm Durchmesser wurden dann Objektträger platziert, auf denen dann die Hellma - Objektträger quer zu liegen kamen. Diese Konstruktion war nötig, da sonst das Medium der HGF über Nacht verdunstet. Ein Objektträger wurde mit 30µl fötalem Bovinen Serum (FBS), der zweite Objektträger wurde mit 30µl Kollagen (Boehringer Mannheim, calf skin KollagenS TypI) beschichtet, der dritte blieb unbeschichtet. Daraufhin wurde in jeden Objektträger 40µl Zellsuspension gegeben. Um ein Austrocknen des Mediums zu verhindern, wurden 50ml filtersterilisiertes (Sartorius, Minisart 0,2µm) Wasser in die Petrischale gegeben und mit Deckel über Nacht in den Brutschrank bei 37°C und 5% gesättigtem CO<sub>2</sub> - Dampf gegeben. Nach 12 Stunden waren die HGF auf dem FBS - beschichteten Objektträger zum Teil angewachsen, auf dem Kollagen - beschichteten alle angewachsen und auf dem unbeschichteten keine angewachsen. In den mit Kollagen beschichteten Objektträgern befanden sich nach 12 Stunden in den 40µl etwa  $1,4 \times 10^4$  Zellen.

Nach dem ersten Vorversuch mit dem Femtosekundenlaser wählten wir 8 Well LabTek - Permanox Chamber slides von NUNC, die speziell für Zellkulturen geeignet sind und mit denen eine größere Anzahl von HGF über Nacht kultiviert werden können. Es wurden pro Well 200µl Quantum333 und 200µl aus einer Zellsuspension, die in 12ml etwa  $3,5 \times 10^6$  Zellen enthielt, in das jeweilige Well gegeben. Nach einer Übernachtskultur im Brutschrank waren dann etwa  $5,4 \times 10^5$  Zellen pro Well angewachsen. Mit diesen Objektträgern wurden die weiteren Versuche vorgenommen.

#### 3.1.5. Farbe - Kits

Für die Überprüfung der Viabilität der Zellen nach der Bestrahlung mit dem Femtosekundenlaser wählten Tsen et al. [81] [82] den sogenannten MTT - Test [82], ein kolorimetrisches Verfahren auf einer Tetrazoliumsalz - Basis, das ausschließlich lebende Zellen quantitativ erfasst und an einem multiwell Spektralphotometer (ELISA) abgelesen werden kann [51]. Zur Aktivitätsbestimmung von M13 - Bakteriophagen wurden Plaques auf

Agarplatten gegeben, über Nacht inkubiert und am nächsten Tag ausgezählt [81]. Zur Überprüfung der Viabilität von *E. coli* benutzten Tsen et al. [81] [82] einen grün fluoreszierenden Farbstoff [82]. In Anlehnung an Tsen et al. [81] [82] verwendeten wir ebenfalls fluoreszierende Farbstoffe, einen für Bakterien und einen für Säugetierzellen.

Die in unserer Studie verwendeten Färbemethoden sollen nachfolgend detailliert dargestellt werden:

#### 3.1.5.1. Auswahl der Färbe - Kits

Für die Überprüfung der Viabilität der Zellen verwendeten wir Färbe - Kits der Firma Invitrogen®, die sowohl für die Lebend- als auch Totdiskriminierung von Bakterien als auch für humane Zellen geeignet sind. Hier kam *LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit # (L 7012)* zur Färbung von Bakterien zum Einsatz. Zur Färbung von HGF wurde das *LIVE/DEAD® Reduced Biohazard Viability/Cytotoxicity Kit# (L 7013)* verwendet.

#### 3.1.5.2. Vorbereitung der bakteriellen Suspension für die Färbung

Vor dem Färben muss das Nährmedium durch eine einmalige Waschung entfernt werden. Dabei darf kein Phosphatpuffer für die Waschung verwendet werden, da dieser den Färbeeffect vermindern würde.

Vor Beginn der Färbung werden etwa 15ml der Bakterienkulturen *E. coli* und *S. mutans* angezüchtet. Diese müssen dann bei  $10,000 \times g$  für 10-15 Minuten zentrifugiert und dadurch konzentriert werden. Der dadurch entstandene Überschuss wird entfernt und das entstandene Pellet in Hepes - buffered - Saline - Solution gegeben. Aus dieser bakteriellen Suspension wird in Acryl - Absorptionsküvetten, die Hepes - buffered - Saline - Solution enthalten, die optische Dichte von 600nm ( $OD_{600}$ ) bestimmt, wobei diese bei *E. coli* - Suspensionen etwa einer  $OD_{600} = 0,08$  entsprechen soll, bei *S. mutans* hingegen einer optischen Dichte von ungefähr  $OD_{600} = 0,1$ .

### 3.1.5.3. Verwendetes #L7012- Färbe - Kit von Invitrogen für Bakterien [49]

Das LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (#L7012) der Firma Invitrogen® enthält ein Zwei - Farben - Fluoreszenz - System, das die Funktionsfähigkeit von Bakterien widerspiegelt und das sich für eine Vielfalt von Bakterien anwenden lässt.

Die herkömmlichen Systeme beziehen sich auf metabolische Eigenschaften oder die Unversehrtheit der Membran. Die auf metabolischen Eigenschaften basierenden Methoden lassen sich meist nur bei einer kleinen Gruppe von Bakterien anwenden, und Methoden, die die Integrität der bakteriellen Membran betreffen, haben meist einen hohen Grad an Hintergrund - Fluoreszenz. Diese beiden Arten sind sehr anfällig für Kultur- und Färbebedingungen.

Mit dem LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit gelingt es jedoch einfach, verlässlich und quantitativ, lebende und tote Bakterien innerhalb von Minuten voneinander zu unterscheiden.

Das LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit enthält SYTO®9, einen grün fluoreszierenden Nukleinsäuren markierenden Farbstoff und einen rot fluoreszierenden Nukleinsäuren markierenden Farbstoff, das Propidiumjodid (s. Abb. 1, Anhang).

Diese beiden unterscheiden sich einerseits in ihren spektralen Eigenschaften und andererseits in ihrer Fähigkeit, intakte Zellmembranen zu überwinden.

Wenn nur mit dem SYTO®9 - Farbstoff gefärbt wird, werden alle Bakterien einer Population, sowohl diejenigen mit intakter Membran als auch die mit beschädigter Membran, markiert [14]. Im Gegensatz dazu kann Propidiumjodid nur in Bakterien mit beschädigter Membran eindringen und verursacht dadurch, wenn beide Farbstoffe anwesend sind, eine Minderung des SYTO®9 grün fluoreszierenden Farbstoffes. Folglich fluoreszieren bei einer adäquaten Mischung von SYTO®9 und Propidiumjodid die Bakterien mit intakten Zellmembranen grün und die mit beschädigten Membranen rot [68]. Das Anregungsmaximum ist hierbei für SYTO®9 480nm und für Propidiumjodid 490nm, das Emissionsmaximum hingegen beträgt für SYTO®9 500nm und für Propidiumjodid 635nm. Außerdem erlaubt dieses Kit eine Feinabstimmung der Farbmischung, so dass eine optimale Färbung unter verschiedenen Umwelteinflüssen erreicht werden kann.

Das LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit ist mit einer Vielfalt von Bakterien unter verschiedenen Bedingungen getestet worden und ist zur Verwendung mit dem

Fluoreszenzmikroskop gut geeignet. Ein weiterer Vorteil des Kit L7012 sind die getrennt aufbewahrten Lösungen von SYTO<sup>®</sup>9 und Propidiumjodid, da dies die Eichung der bakteriellen Fluoreszenz bei quantitativen Verfahren vereinfacht [49].

Das Kit enthält:

- SYTO 9 dye, 3.34mM (Component A), 300µl Lösung in DMSO (Dimethylsulfoxid)
- Propidiumjodide, 20mM (Component B), 300µl Lösung in DMSO
- *BacLight* mounting oil (Component C), 10ml, for bacteria immobilized on membranes.

Der Brechungsindex ist bei 25°C:  $1.517 \pm 0.003$ .

Das Kit sollte bei -20°C und lichtgeschützt gelagert werden. Bei Verwendung der Reagenzien sollten sie sich auf Zimmertemperatur erwärmen und dann, vor dem Öffnen, zügig zentrifugiert werden.

Wenn bei der Färbung durch eine 1:1 Mischung nicht gut zwischen grün und rot unterschieden werden kann, kann man versuchen, dies zu optimieren, indem man die Konzentration von SYTO9 (Komponente A) und die von Propidiumjodid (Komponente B) entsprechend verändert. In diesem Fall kann man 3µl verschiedener Konzentrationen der Komponenten A und B mit 1,0ml bakterieller Suspension mischen. In unseren Experimenten hat sich das 1:1 Mischungsverhältnis der Komponente A im Verhältnis zur Komponente B als reliable Färbemethode erwiesen.

Bei Verwendung mit einem Fluoreszenzmikroskop kann man verschiedene optische Filter auswählen. Entweder man betrachtet gleichzeitig lebende und tote Bakterien mit Fluoreszin - Langpassfiltern oder man verwendet Fluoreszin - und Texas Red Bandpassfilter zur separaten Betrachtung von lebenden und toten Bakterien [49].

#### 3.1.5.4. Vorbereitung der HGF für die Färbung

Die adhären HGF müssen am Vorabend des Versuches auf 8-Well LabTek - Objektträgern angezüchtet werden, um über Nacht auf dem Objektträger anwachsen zu können, und unmittelbar vor Bestrahlung mit dem Laser muss das Nährmedium durch Hepes - Buffered - Saline - Solution ersetzt werden.

HGF für die Suspension sollten erst kurz vor dem Versuch trypsiniert und somit vom Kulturflaschenboden abgelöst werden, in Hepes - Buffered - Saline - Solution gewaschen, zentrifugiert und anschließend in Hepes - BSS aufgenommen werden.

#### 3.1.5.5. Verwendetes #L7013-Färbefarben - Kit von Invitrogen für HGF [50]

Das LIVE/DEAD® Reduced Biohazard Viability/Cytotoxicity Kit (#L 7013) der Firma Invitrogen® ist ein Zwei - Farben - Fluoreszenz - System, um die Funktionsfähigkeit tierischer Zellen zu überprüfen. Das Kit ist einfach und schnell zu handhaben und kann mit Fluoreszenzmikroskopen verwendet werden. SYTO®10, ein grün fluoreszierender Nukleinsäuren markierender Farbstoff, ist ein stark membrangängiger Farbstoff, der alle Zellen markiert, auch die mit intakter Zellmembran. DEAD RED™ (Ethidiumhomodimer - 2, s. Abb.2) ist ein nicht zellgängiger rot fluoreszierender Nukleinsäuren markierender Farbstoff, der nur in Zellen mit beschädigter Zellmembran eindringen kann [4]. Die Farbkonzentrationen sind so gewählt, dass die lebenden Zellen nach der Färbung grün fluoreszieren und die toten Zellen rot.

Das Anregungsmaximum beträgt hierbei für SYTO®10 490nm und für DEAD RED™ 490nm, während das Emissionsmaximum für SYTO®10 505 nm und für DEAD RED™ 620 nm beträgt. Bei Verwendung mit einem Fluoreszenzmikroskop kann man verschiedene optische Filter auswählen. In dieser Studie wurden zum einen lebende und tote Bakterien mit Fluoreszin - Langpassfiltern gleichzeitig betrachtet und zum anderen wurden lebende und tote Bakterien mit Fluoreszin - und Texas Red Bandpassfiltern separat betrachtet.

Für Fixationsverfahren, bei denen Zellen inaktiviert werden, deren generelle Morphologie aber erhalten bleiben soll, ist Glutaraldehyd geeignet, da es irreversibel die Aktivität von humanen Retroviren hemmt und außerdem schneller und effektiver wirkt als Alkohol [50].

Das Kit enthält [50]:

- Syto10grün fluoreszierende Nukleinsäurefärbung (Komponente A), 50µl Lösung in DMSO
- DEAD Red (Ethidiumhomodimer-2) Nukleinsäurefärbung (Komponente B), 50µl Lösung in 20% DMSO

Material, das für den Versuch zusätzlich erforderlich ist:

- HEPES<sup>\*1</sup> - buffered saline solution (HBSS): 135mM NaCl, 5mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,8mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM HEPES, pH 7.4
- 4% Glutaraldehyd in HBSS, frisch zubereitet.

\*<sup>1</sup>HEPES= 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- Ethansulfonsäure

## **3.2. Methoden: Mikrobiologischer Versuchsaufbau**

### **3.2.1. Färbung von *S. mutans* und *E. coli* mit Invitrogen® - Färbekits**

Um für eine Färbung der Bakterien eine genaue Anzahl an Bakterien zu bestimmen, wird mit Hilfe eines Eppendorf Photometers zunächst die optische Dichte eingestellt. Für *E. coli* - Suspensionen stellt man eine optische Dichte von etwa  $OD_{600} = 0,08$  ein, was einer Anzahl von  $5,2 \times 10^6$  Bakterien/ml entspricht. Für den *S. mutans* wählt man eine optische Dichte von etwa  $OD_{600} = 0,1$ , was einer Anzahl von  $6,7 \times 10^6$  Bakterien/ml entspricht.

Bei Anwendung des Kit L7012 wurde erst eine Vorverdünnung der Färbelösung hergestellt, wobei pro ml HEPES - BSS - Puffer 12µl der Komponente A und 12µl der Komponente B vermischt werden. Nach der Bestrahlung der Probe mit dem Femtosekundenlaser werden 100µl der Färbelösung mit den 100µl Bakteriensuspension auf dem LabTek<sup>TM</sup> - Chamber - Slide<sup>TM</sup> durchmischt und für 15 Minuten bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Daraufhin werden 10µl der gefärbten Bakteriensuspension zwischen einen Objektträger und ein Deckglas gegeben oder auf einen C - Chip® aufgetragen. Bei Versuchen, bei denen die bakteriellen Proben mehrere Stunden in einer 2ml - Fluoreszenz - Küvette belichtet wurden, können 10µl dieser Bakteriensuspension abpipettiert und auf den C - Chip® geben werden und anschließend mit 10µl Färbelösung direkt auf dem C - Chip® vermischt werden und ebenfalls für 15 Minuten bei 25°C im Dunkeln inkubiert werden. Nun kann man die gefärbten Bakterien unter einem Fluoreszenzmikroskop, das mit Filtersätzen ausgestattet ist, betrachten.

### 3.2.2. Direkte und indirekte Auszählung der Bakterien auf dem C – Chip von PeQLab

Bei dem C - Chip® der Firma PeQLab handelt es sich um eine Einmalzählkammer aus Kunststoff. Der Chip enthält zwei getrennte Zählkammern mit jeweiliger Injektionsöffnung. Das Zählraster entspricht einer Neubauer - improved - Zählkammer. Es besteht aus neun Quadraten mit einer Kantenlänge von jeweils 1mm und einer definierten Tiefe von 0,1mm. Der C - Chip besteht aus vier Eckquadraten, die in 16 kleine Quadrate mit einer Kantenlänge von 0,25mm unterteilt sind. Das zentrale Großquadrat wiederum ist in 25 kleinere Gruppenquadrate mit je 0,2mm Kantenlänge unterteilt. Das Besondere an der Neubauer - improved - Zählkammer sind die dreifachen Begrenzungslinien der Gruppenquadrate, bei denen die mittlere Linie die Begrenzung zwischen zwei Feldern darstellt.

Um eine Zellsuspension auszählen zu können, muss die Probe gut gemischt werden und es müssen 10µl bis 20µl einer Probe in die Injektionsöffnung pipettiert werden, so dass die Probe durch Kapillarkräfte in die Zählkammer gesogen wird. Daraufhin kann man die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop entweder direkt auszählen oder indirekt am Computer. Hierfür fotografiert man mit der im Fluoreszenzmikroskop von Nikon (DS 5M E50i), das mit einer Kamera und Nikon Software (D1Fi) ausgestattet ist, einmal die Zählkammer und danach mit der gleichen Vergrößerung die jeweiligen Proben, die man auszählen möchte. Über das Computerprogramm Photomatrix können dann die Bilder des Zählrasters und der Probe übereinandergelegt und am Computer ausgezählt werden. Dies hat den Vorteil, dass das Auszählen der Bakterien wesentlich genauer durchgeführt werden kann als die direkte Auszählung, da nicht die Gefahr besteht, Bakterien doppelt zu zählen. In dieser Studie wurden die Zellen indirekt gezählt und mit folgender Formel wurde die Zellanzahl pro ml berechnet:

$$\text{Zellen pro ml} = (\text{Zellzahl in 5 Quadraten}/5) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumenfaktor} (10^4)$$

### 3.2.3. Färbung von HGF

#### 3.2.3.1. Anfärben der HGF in Suspension

Als erstes wird eine Arbeitslösung hergestellt, wobei 2µl der Komponente A und 2µl der Komponente B in 1ml HBSS- Volumen gegeben werden (Verdünnung 1:500 jeweils). Als nächstes wird diese Lösung gemischt.

Dann werden  $10^5$  bis  $10^6$  HGF aus einer Kultur pipettiert und in geeignete Gefäße (Eppendorf Zentrifugenröhrchen) gegeben und bei  $250\times g$  für 10 Minuten zentrifugiert. Daraufhin wird das Kulturmedium komplett entfernt und das Zentrifugierröhrchen kräftig geschüttelt, bevor 200 µl verdünnte Farbe zugegeben werden und die Suspension damit vervollständigt wird, bis eine Zelldichte zwischen  $5\times 10^5$  und  $5\times 10^6$  Zellen/ml erreicht ist. Dann wird das Zentrifugiergefäß 15 Minuten bei vollständiger Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert, um ein Pellet zu gewinnen, wobei die überschüssige Lösung entfernt wird. Die Zellen werden daraufhin in ein kleines Volumen von 50 µl frischen Hepes - BSS - Puffer gegeben, da die Zellen ansonsten aggregieren. Als nächstes werden 50 µl frisch zubereiteten 4%igen Glutaraldehyds der Pufferlösung zugefügt, bis eine Zelldichte von weniger als  $10^6$  Zellen/ml erreicht ist. Diese Zellen müssen dann 15 Minuten in der Fixationslösung belassen werden, bevor man sie unter dem Fluoreszenzmikroskop anschaut.

In einem Vorversuch wurde diese Methode getestet, erwies sich allerdings aufgrund der langen Prozedur von Zentrifugieren, Inkubieren und Fixieren als zu aufwändig und langwierig und wegen der möglichen Beschädigung von Zellen durch das mehrmalige Pipettieren und Zentrifugieren der Lösung als zu ungenau.

Daraufhin entschieden wir uns für Objektträger (s. 3.1.4.2.), die für Zellkulturen geeignet sind und auf denen die adhärenen Zellen direkt gefärbt werden können [50].

#### 3.2.3.2. Färbung der adhärenen HGF auf Objektträgern

Um die Färbung direkt auf Objektträgern durchzuführen, werden adhärenen HGF über Nacht auf diesen gezüchtet und es wird eine Farbmischung erstellt, die aus 2µl der Komponente A und 2µl der Komponente B besteht, gelöst in 1ml Hepes - BSS (Verdünnung 1:500 jeweils).

Vor dem Versuch wird der Nährboden (Quantum333) der Zellen entfernt und mit einem entsprechenden Volumen Hepes - BSS gewaschen und durch Hepes - BSS ersetzt.

Als nächstes werden die Zellen dann mit dem Femtosekundenlaser bestrahlt. Daraufhin wird der Hepes - BSS- Puffer entfernt und durch die verdünnte Färbelösung ersetzt, wobei 100µl bis 200µl den Boden des LabTek - Objektträgers, der eine Fläche von 8,0mm<sup>2</sup> hat, vollkommen benetzen. Dann muss die Lösung 15 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert werden. Darauf folgend wird die Färbelösung entfernt und das Ganze mit frischem Hepes - BSS gewaschen. Als nächstes wird der Puffer entfernt und durch 100µl bis 200µl 4%iges Glutaraldehyd ersetzt und erneut 15 Minuten inkubiert. Für ein besseres Färbergebnis sollte man die Zellen eine Stunde lang in der Glutaraldehyd - Fixationslösung belassen [50].

#### **3.2.4. Direkte und indirekte Auszählung der HGF in der Neubauer – Zählkammer**

Bei der Neubauer - Zählkammer handelt es sich um eine etwa 30mm x 80mm große und etwa 5 mm dicke Glasplatte mit einer um einen definierten Betrag vertieften Mittelfläche, auf der quadratische Felder definierter Größe eingätzt sind. In der Mitte der Glasplatte befindet sich die Zählfläche mit unterschiedlichen Liniennetzen. Auf die zwei seitlichen, plan geschliffenen Glasstege wird ein dünnes, plan geschliffenes Deckglas gelegt. Bei aufgelegtem Deckglas wird die auszählende Suspension seitlich aufpipettiert und wird dann durch Kapillarkräfte in diesen Zwischenraum gesaugt. So breitet sich die Teilchensuspension in einer Schicht mit genau bekannter Dicke aus. Das Zählgitter besteht bei der Neubauer - Zählkammer aus 3x3 Großquadraten von je 1mm Kantenlänge. Bei der alten Neubauer - Zählkammer (entspricht der Thoma - Zählkammer) ist das mittlere Großquadrat in 4x4 Gruppenquadrate von ebenfalls 0,2mm Kantenlänge unterteilt. Diese sind auch durch dreifache Grenzlinien getrennt, von denen aber nur jeweils die linke bzw. rechte als eigentliche Begrenzung anzusehen ist. Außerdem sind die Dreifachlinien nur an zwei Seiten zu finden. Weiterhin ist jedes Gruppenquadrat in 4x4 Kleinstquadrate mit je 0,05mm Kantenlänge aufgeteilt.

Auch hier kann man die Zellen dann unter dem Fluoreszenzmikroskop entweder direkt auszählen oder indirekt am Computer über das Computerprogramm Photomatrix (wie in

3.2.2. Färbung von *S. mutans* und *E. coli* beschrieben). In diesem Versuch wurden die Zellen indirekt ausgezählt und mit folgender Formel wurde die Zellanzahl pro ml berechnet:

$$\text{Zellen pro ml} = (\text{Zellzahl in 4 Quadraten}/4) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 (\text{Volumenfaktor})$$

### **3.3. Vergleichender Versuchsaufbau des Femtosekundenlasers zur Bestrahlung von HGF und Bakterien bei den Versuchen von Tsen et al. [81] [82]**

Die Anregungsquelle bei Tsen et al. [81] [82] ist ein diodengepumpter CW modengekoppelter Ti-Saphir-Laser.

In ihrem ersten Experiment verwenden Tsen et al. [81] [82] einen kontinuierlichen Pulszug von 80fs und einer Repetitionsrate von 80 MHz. Der Anregungslaser, der eine durchschnittliche Leistung von 40mW besitzt, arbeitet bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 425 \text{ nm}$  und  $\lambda = 850 \text{ nm}$ . Er verfügt über einen beinahe veränderungsbegrenzten Pulszug mit einer Pulslänge von 'full width half maximum' FWHM zwischen 80fs bis 100fs. Eine Linse mit extra langer Fokusslänge ( $f = 36 \text{ cm}$ ) wurde verwendet, um den Laserstrahl in die Probenebene zu fokussieren. Die Probenbestrahlungszeit betrug zwischen einer und 10 Stunden [81].

In einem weiteren Versuch änderten Tsen et al. [81] [82] einige Einstellungen und verkürzten die Bestrahlungszeit der Proben von 10 Stunden auf 1 Stunde.

Die durchschnittlich verwendete Leistung bei Tsen et al. [81] [82] lag bei 100 mW. Die verschiedenen Anregungsleistungen betragen zwischen  $1 \text{ MW/cm}^2$  und  $60 \text{ GW/cm}^2$  und werden über den Laserstrahldurchmesser, der über eine geeignete Linse eingestellt wird, erreicht. Die Interaktion der Photonen mit Mikroorganismen oder Säugetierzellen erfolgte in einer wässrigen Lösung innerhalb einer 2ml - Quarzküvette und wird von einem magnetischen Rührstab umgerührt.

### **3.4. Versuchseinstellungen zur Bestrahlung von HGF und Bakterienkulturen**

Innerhalb unserer Experimente wählten wir zwei verschiedene Lasereinstellungen.

Die Anregungsquelle in dem einen Experiment ist ein gepulster Femtosekunden – Ti:Saphir – Laser, der Spitfire XP, von Newport Spectra Physics. Er arbeitet bei einer fixen Zentralwellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , bei einer Repetitionsrate von 1kHz mit einem kontinuierlichen Pulszug von 80fs und einer maximalen Leistung von 3,5mJ. In unseren Versuchen wurde eine maximale Leistung von 2,8mJ verwendet und für die jeweiligen Versuche weiter abgeschwächt. Innerhalb dieses Experiments wurde eine zweite Harmonische mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 400\text{nm}$  eingestellt, da Autoren [81] [82] behaupten, dass das Experiment auch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 425\text{nm}$  durchführbar sei. Daher wurde auch in unserem Experiment die Zentralwellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$  auf  $\lambda = 400\text{nm}$  verringert, indem das rote Licht durch einen  $\beta$  – Barium – Borat – Kristall geleitet wurde.

In einem weiteren Experiment wurde ein Tsunami Femtosekundenlaser von Newport Spectra Physics als Anregungsquelle benützt. Dieser arbeitet bei einer Zentralwellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , allerdings bei einer Repetitionsrate von 80MHz, bei einer Pulslänge von 80fs und einer Bandbreite von  $\lambda \sim 45\text{nm}$ .

In den Experimenten wurde eine maximale Leistung von 520mW verwendet und für die jeweiligen Versuche abgeschwächt.

#### **3.4.1. Vorversuche mit HGF**

In unseren ersten Experimenten verwenden wir einen kontinuierlichen Pulszug von 80fs und eine Repetitionsrate von 1kHz. Bei diesem Laser ist eine fixe Zentralwellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$  eingestellt. Die durchschnittliche Laserleistung wird in unseren Versuchen, im Vergleich zu Tsen et al. [81] [82], variiert. Die Leistungsdichte hingegen, die bei Tsen et al. [81] [82] variierte, bleibt bei unserem Versuch mit  $5\text{GW}/\text{cm}^2$  konstant. In diesem Experiment variieren wir die Belichtungszeiten und mittleren Laserleistungen. Über Veränderung der drei

Parameter, Laserleistung, Leistungsdichte und Belichtungszeit, erhalten wir physikalisch dieselben Werte von  $1,8 \times 10^5 \text{ mWsec/ml}$  wie Tsen et al. [81] [82] in ihrem Versuch, wobei der Raman - Effekt auftreten sollte, da die entscheidende physikalische Größe ( $\text{mWsec/ml}$ ) gleich bleibt. Des Weiteren verfügt der Femtosekundenlaser über einen beinahe veränderungsbegrenzten Pulszug mit einer Pulslänge von `full width half maximum` FWHM= 80fs. Eine Linse mit extra langer Fokusslänge ( $f= 100 \text{ mm}$ ) wurde verwendet, um den Laserstrahl in die Probenebene zu fokussieren. Der Laserdurchmesser wird mit 4mm konstant belassen.

Zunächst wurde ein Vorversuch (s. Tab. 3, Anhang) unternommen, bei dem nur die HGF bestrahlt wurden mit der Intention, einen Schwellenwert mit einer gewissen Intensität festzulegen, bei dem alle HGF absterben, um danach weitere Versuche mit Bakterien durchzuführen, die dann, wenn es sich um den Raman - Effekt handelt, unterhalb dieses Schwellenwertes zugrunde gehen müssten.

Diese Vorversuche wurden mit adhärennten Zellen, die in einer Übernacktkultur auf speziellen Objektträgern (Hellma OG 730.000) angezüchtet wurden, durchgeführt. Die absolute Zellzahl auf den Hellma Objektträgern betrug  $1,4 \times 10^4$  Zellen/ml (s. Tab. 3, Anhang). Weitere Versuche wurden mit Zellen in Suspension durchgeführt, welche eine Zellzahl von  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml beinhaltete.

### **3.4.2. 1kHz Versuche/ $\lambda= 800\text{nm}$ mit adhärennten HGF**

In den Versuchsreihen mit HGF (s. Tab. 4, Anhang) (s. Tab. 5, Anhang) wird ein kontinuierlicher Pulszug von 80fs, eine Repetitionsrate von 1kHz gewählt, die durchschnittliche Leistung wird variiert und die Wellenlänge beträgt  $\lambda= 800\text{nm}$ . Die Leistungsdichte bleibt mit  $5\text{GW/cm}^2$  konstant, die Belichtungszeiten werden variiert. Durch Veränderung der drei Parameter Laserleistung, Leistungsdichte und Belichtungszeit, erhalten wir physikalisch dieselben Werte wie Tsen et al. [81] [82] in ihrem Versuch und der Raman - Effekt müsste auftreten. Des Weiteren verfügt der Femtosekundenlaser über einen beinahe veränderungsbegrenzten Pulszug mit einer Pulslänge von `full width half maximum` FWHM = 80fs. Der Strahldurchmesser wurde konstant mit 4mm eingestellt. Eine Linse mit extra langer

Focuslänge ( $f= 100\text{mm}$ ) wurde verwendet, um den Laserstrahl in die Probenebene zu fokussieren.

### **3.4.3. 1kHz Versuche/ $\lambda= 800\text{nm}$ mit *S. mutans* und *E. coli***

In Versuchen mit *S. mutans* (s. Tab. 6, Anhang) und *E. coli* (s. Tab. 9, Anhang) wurde ein Probenvolumen von  $100\mu\text{l}$ , eine Wellenlänge von  $\lambda= 800\text{nm}$ , ein kontinuierlicher Pulszug von 80fs, eine Repetitionsrate von 1kHz und ein konstanter Strahldurchmesser von 4mm gewählt. Um unsere Dosis an die Dosis von  $1.8 \times 10^5\text{mWsec/ml}$  von Tsen et al. [81] [82] anzupassen wurden die Laserleistung und auch die Belichtungszeit variiert.

### **3.4.4. 80MHz Versuche/ $\lambda= 800\text{nm}$ mit *S. mutans* und *E. coli***

Da bei den 1kHz-Experimenten keine Inaktivierung der Keime möglich war, erhöhten wir in einem weiteren Experiment die Repetitionsrate von 1kHz auf 80MHz und das Probenvolumen von 0,1ml auf 2ml. Diese Versuchseinstellung entsprach der von Tsen et al. [81] [82] (s. Tab. 12, Anhang). Die Bakterien *S. mutans* (s. Tab. 7, Anhang) und *E. coli* (s. Tab. 10, Anhang) wurden in Proben von 2ml innerhalb einer Quarzküvette (QS 10.00 mm) unter Einsatz eines magnetischen Rührstabes (2x5mm, H+P Labortechnik AG) auf einem magnetischen Rühr Tisch (VARIOMAG) belichtet. Es wurden konstante Belichtungszeiten von 0,5, einer, zwei und drei Stunden gewählt. Bei diesem Experiment betrug die Wellenlänge des Lasers  $\lambda= 800\text{nm}$ , die Pulsdauer 80fs, die Repetitionsrate 80MHz und die durchschnittliche Laserleistung 520mW. Der Strahldurchmesser betrug konstant  $100\mu\text{m}$ , wodurch eine Leistungsdichte von  $1\text{GW/cm}^2$  erreicht wurde. Da Tsen et al. [81] [82] in früheren Experimenten jedoch 10 Stunden lang belichteten, bestrahlten wir *E. coli* einmal 17 Stunden lang (s. Tab. 10, Anhang), um auszuschließen, dass die längere Belichtungszeit für die Inaktivierung der Bakterien verantwortlich ist.

### **3.4.5. 1kHz Versuche/ $\lambda= 400\text{nm}$ mit adhärenen HGF**

Autoren behaupten [81] [82], dass das Experiment auch mit einer Wellenlänge von  $\lambda= 425\text{nm}$  durchführbar ist. Daher verringerten wir in unserem Experiment die Wellenlänge auf die, in unserem Labor, kleinstmöglich einstellbare Wellenlänge, indem wir die Wellenlänge von  $\lambda= 800\text{nm}$  durch einen  $\beta$  - Barium - Borat (BBO) - Kristall leiteten, wodurch wir eine Wellenlänge von  $\lambda= 400\text{nm}$  erhielten, und führten Experimente mit HGF durch (s. Tab. 5, Anhang). Des Weiteren vergrößerten wir den Laserdurchmesser von  $100\mu\text{m}$  auf  $2\text{mm}$ , wählten eine Repetitionsrate von  $1\text{kHz}$ , eine Pulsweite von  $80\text{fs}$ , eine mittlere Laserleistung von  $58\text{mW}$ , eine Leistungsdichte von  $1,6\text{GW}/\text{cm}^2$  bis zu  $18\text{GW}/\text{cm}^2$  und Probenbestrahlungszeiten von  $1800\text{s}$  bis zu  $3600\text{s}$ .

#### **3.4.5.1. 1kHz Versuche/ $\lambda= 400\text{nm}$ / $1,6\text{GW}/\text{cm}^2$ mit adhärenen HGF**

Die  $1\text{kHz}$  - Experimente wurden mit einer Wellenlänge von  $\lambda= 400\text{nm}$ , einer Leistungsdichte von  $1,6\text{GW}/\text{cm}^2$ , einem Laserdurchmesser von  $2\text{mm}$ , einer Pulsweite von  $80\text{fs}$ , einer mittleren Laserleistung von  $58\text{mW}$  und einer Bestrahlungszeit von  $1800\text{s}$  bis  $3600\text{s}$  durchgeführt (s. Tab. 5, Anhang).

#### **3.4.5.2. 1kHz Versuche/ $\lambda= 400\text{nm}$ / $18\text{GW}/\text{cm}^2$ mit adhärenen HGF**

In einem weiteren Experiment wurde die Leistungsdichte des Lasers auf  $18\text{GW}/\text{cm}^2$  bei sonst gleichen Versuchseinstellungen wie in 3.4.5.1. erhöht (s. Tab. 5, Anhang).

### **3.4.6. 1kHz Versuche/ $\lambda= 400\text{nm}$ mit *S. mutans* und *E. coli***

Der gleiche Versuchsaufbau, wie in 3.4.5. beschrieben, wurde ebenfalls mit *S. mutans* (s. Tab. 8, Anhang) und *E. coli* (s. Tab. 11, Anhang) durchgeführt.

#### 3.4.6.1. 1kHz Versuche/ $\lambda= 400\text{nm}/ 1,6\text{GW}/\text{cm}^2$ S. mutans und E. coli

Die 1kHz - Experimente wurden mit einer Wellenlänge von  $\lambda= 400\text{nm}$ , einer Leistungsdichte von  $1,6\text{GW}/\text{cm}^2$ , einem Laserdurchmesser von 2mm, einer Pulsweite von 80fs, einer mittleren Laserleistung von 58mW und einer Bestrahlungszeit von 1800s bis 3600s durchgeführt (s. Tab. 8, Anhang) (s. Tab. 11, Anhang).

#### 3.4.6.2. 1kHz Versuche/ $\lambda= 400\text{nm}/ 18\text{GW}/\text{cm}^2$ S. mutans und E. coli

In einem weiteren Experiment wurde die Leistungsdichte des Lasers auf  $18\text{GW}/\text{cm}^2$  bei sonst gleichen Versuchseinstellungen wie in 3.4.6.1. erhöht (s. Tab. 8, Anhang) (s. Tab. 11, Anhang).

### 3.5. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Für die statistische Auswertung wurden zwei Testverfahren angewandt, zum einen der  $t$ -Test [24] und zum anderen eine Regressionsanalyse [13].

### 3.6. Erläuterung der statistischen Testverfahren

Für die Tabellen 3 – 11 werden dabei alle Beobachtungen gepoolt, woraufhin die Differenz des Anteils an toten Zellen zwischen Kontrollgruppe und bestrahlter Gruppe berechnet wird. Mittels  $t$ -Test wurde überprüft, inwieweit diese Differenz signifikant von 0 verschieden ist.

Des Weiteren wird der Einfluss der Variablen mittlere Laserleistung, Leistungsdichte und Bestrahlungszeit auf die Differenz des Anteils toter Zellen in der bestrahlten Probe und in der Kontrollprobe im Rahmen einer linearen Regressionsanalyse ermittelt. Hierbei werden alle Daten für den gleichen Zelltyp, also einmal für HGF, dann für S. mutans und für E. coli, gepoolt und anhand einer Regressionsanalyse ausgewertet, wodurch gleichzeitig der Einfluss der verschiedenen Variablen auf die Differenz zwischen Kontroll- und bestrahlter Gruppe

gemessen werden kann. Eine ausführliche Darstellung der Regressionsanalyse findet sich beispielsweise bei Bortz [13]. Insgesamt wurden drei Regressionen durchgeführt, bei denen jeweils die Versuchsergebnisse für HGF (Tab. 3/ 4/ 5, Anhang), für *S. mutans* (Tab. 6/ 7/ 8, Anhang) und für *E. coli* (Tab. 9/ 10/ 11, Anhang) gepoolt und für HGF (s. Tab. 22, Anhang), für *S. mutans* (s. Tab. 23, Anhang) und für *E. coli* (s. Tab. 24, Anhang) dargestellt werden.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Ergebnisse der Versuchsreihen**

#### **4.1.1. Ergebnisse für HGF**

Die statistische Auswertung der HGF (s. Tab. 3/ 4/ 5, Anhang) zeigte keinen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) der Anzahl toter HGF zwischen der bestrahlten Probe und der Kontrollgruppe nach Berechnung des t-Tests (s. Tab. 13/ 14/ 15, Anhang).

Die Auswertung der Regressionsanalyse für HGF ergab Folgendes:

Die Regressionsergebnisse für die HGF zeigen (s. Tab. 22, Anhang), dass weder die mittlere Laserleistung, noch die Leistungsdichte noch die Bestrahlungszeit einen signifikanten Einfluss auf die Differenz des Anteils toter Zellen in Kontroll- und bestrahlter Gruppe haben (s. Tab. 22, Anhang).

#### **4.1.2. Ergebnisse für *E. coli***

Auch für *E. coli* (s. Tab. 9/ 10/ 11, Anhang) zeigte die statistische Auswertung keinen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen dem Anteil toter *E. coli* in der bestrahlten und in der nicht bestrahlten Probe (s. Tab. 19/ 20/ 21, Anhang). Lediglich bei Versuchen mit hohen Leistungsdichten von  $18 \text{ GW/cm}^2$  mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 400 \text{ nm}$  war ein signifikanter Unterschied zwischen der Differenz des Anteils an toten Zellen zwischen Kontrollgruppe und bestrahlter Gruppe feststellbar (s. Tab. 21, Anhang).

Die Ergebnisse der Regressionsanalyse für E. coli (s. Tab. 24, Anhang) zeigen einen signifikanten Einfluss der unabhängigen Variablen auf das Überleben der Zellen: Zum einen zeigt sich, dass eine längere Bestrahlungsdauer in der bestrahlten Gruppe zu einer höheren Zellsterblichkeit führt als in der Kontrollgruppe. Ein analoges Ergebnis findet sich für die Leistungsdichte (s. Tab. 24, Anhang). Je höher die Leistungsdichte ist, desto höher ist der Anteil toter Zellen in der bestrahlten Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe. Jedoch findet sich in dieser Regressionsanalyse für E. coli auch ein gegenläufiger Effekt für die mittlere Laserleistung, der ebenfalls signifikant ist. Mit zunehmender mittlerer Laserleistung nimmt der Anteil toter Zellen in der bestrahlten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ab.

#### **4.1.3. Ergebnisse für S. mutans**

Die statistische Auswertung der Anzahl toter S. mutans Bakterien (s. Tab. 6/ 7/ 8, Anhang) zwischen der bestrahlten Probe und der Kontrollgruppe zeigte keinen signifikanten Unterschied ( $p < 0,005$ ) (s. Tab. 16/ 17/ 18, Anhang). Tabelle 23 enthält die Ergebnisse der Regressionsanalyse für S. mutans. Wie auch schon bei den HGF zu beobachten war, ist auch hier kein signifikanter Einfluss der genannten unabhängigen Variablen auf das Überleben von Zellen feststellbar (s. Tab. 23, Anhang).

## **4.2. Auswertung der Versuchsergebnisse**

### **4.2.1. Ergebnisse der Vorversuche mit HGF**

In den Vorversuchen, wie in 4.4.1. beschrieben (s. Tab. 3, Anhang), überlebten bei einer Laserleistung von 34mW, einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Volumen von 0,04ml, einer konstanten Leistungsdichte von  $5\text{GW}/\text{cm}^2$  und Belichtungszeiten von 20s bis 330s in der bestrahlten und nicht - bestrahlten Probe der HGF einmal 99%, während nur 1% tot war, und einmal 90%, wobei 10% der HGF tot waren. Die weiteren Versuche in Suspension waren nicht auszählbar, da die HGF in Suspension aggregierten (s. Tab. 3, Anhang).

#### **4.2.2. Ergebnisse der 1kHz Versuche/ $\lambda= 800\text{nm}$ mit adhärennten HGF**

In den Experimenten, wie in 3.4.2. beschrieben, überlebten sowohl in der bestrahlten als auch in der nicht-bestrahlten Kontrolle 98% der HGF, während nur 2% überlebten (s. Tab. 4, Anhang). Bei allen Versuchen wurde eine Alkoholkontrolle mitgeführt, d.h. die HGF wurden mit 70%igem Ethanol behandelt, wobei ca. 99% der HGF abgetötet wurden, während nur etwa 1% überlebte.

#### **4.2.3. Ergebnisse der 1kHz Versuche/ $\lambda= 800\text{nm}$ mit *S. mutans* und *E. coli***

Bei Versuchen mit *S. mutans* und einer, im Vergleich zu Tsen et al. [81] [82], 73-fachen Dosiserhöhung überlebten sowohl in der bestrahlten Probe als auch in der nicht - bestrahlten Kontrolle durchschnittlich 97% von *S. mutans*, während 3% starben (s. Tab. 6, Anhang). Bei Versuchen mit *E.coli* und ebenfalls einer, im Vergleich zu Tsen et al. [81] [82], 73-fachen Dosiserhöhung überlebten sowohl in der bestrahlten Probe als auch in der unbestrahlten Kontrolle durchschnittlich 56%, während 44% tot waren (s. Tab. 9, Anhang). Dieses Ergebnis resultierte vermutlich daraus, dass der eingesetzte Keim aus einer fortgeschritteneren Passage stammte und dadurch das Procedere des Einfrierens und Auftauens nicht verkraftete. Da bei diesen Versuchen der *E. coli* - Keim von vornherein etwa zur Hälfte tot war, führten wir zur Überprüfung dieser Ergebnisse erneut Versuche mit einem über zwei Tage frisch kultivierten *E. coli* durch, wobei sowohl in der bestrahlten Probe als auch in der Kontrolle jetzt durchschnittlich 95% lebten, während 5% tot waren (s. Tab. 9, Anhang). Daraufhin wurden dieselben Versuche mit einem frischen *E. coli* wiederholt und dabei überlebten durchschnittlich 96% von *E. coli* sowohl in der bestrahlten als auch in der unbestrahlten Probe und nur etwa 4% von *E. coli* waren tot.

Bei allen Versuchen wurde eine Alkoholkontrolle mitgeführt, d.h. *S. mutans* und *E. coli* wurden mit 70%igem Ethanol behandelt, wobei ca. 99% der Bakterien abgetötet wurden, während nur etwa 1% überlebte.

#### **4.2.4. Ergebnisse der 80MHz Versuche/ $\lambda= 800\text{nm}$ mit *S. mutans* und *E. coli***

Bei den 80MHz-Versuchen, wie in 3.4.4. beschrieben, überlebten bei zweifacher, fünf- und sogar 15facher Dosiserhöhung im Vergleich zu Tsen et al. [81] [82] sowohl in der bestrahlten als auch in der nicht - bestrahlten Probe von *S. mutans* 96%, während 4% von *S. mutans* tot waren (s. Tab. 7, Anhang). Bei diesen Experimenten mit *E. coli* überlebten bei einer zwei- bis sogar 23fachen Dosiserhöhung im Vergleich zu Tsen et al. [81] [82] sowohl in der bestrahlten Probe als auch in der nicht-bestrahlten Kontrolle durchschnittlich 96% von *E. coli*, während 4% starben (s. Tab. 10, Anhang).

#### **4.2.5. Ergebnisse der 1kHz Versuche/ $\lambda= 400\text{nm}$ mit adhärenen HGF**

##### 4.2.5.1. Ergebnisse der 1kHz Versuche/ $\lambda= 400\text{nm}/ 1,6\text{GW}/\text{cm}^2$ mit adhärenen HGF

Bei den 1kHz - Experimenten mit der Wellenlänge von  $\lambda= 400\text{nm}$ , einer Leistungsdichte von  $1,6\text{GW}/\text{cm}^2$ , einem Laserdurchmesser von 2mm, einer Pulsweite von 80fs, einer mittleren Laserleistung von 58mW und einer Bestrahlungszeit von 1800s bis 3600s überlebten in der bestrahlten sowie in der nicht - bestrahlten Probe 99% der HGF, während nur 1% der HGF überlebte (s. Tab. 5, Anhang).

##### 4.2.5.2. Ergebnisse der 1kHz Versuche/ $\lambda= 400\text{nm}/ 18\text{GW}/\text{cm}^2$ mit adhärenen HGF

Der Versuch, wie in 4.2.5.1. beschrieben, wurde mit einer höheren Leistungsdichte von  $18\text{GW}/\text{cm}^2$  durchgeführt. Dabei wurden in der bestrahlten Probe 99% der HGF abgetötet und nur 1% der HGF überlebte, während in der nicht - bestrahlten Probe 99% der HGF überlebten und lediglich 1% tot war (s. Tab. 5, Anhang).

Auch hier war im t-Test kein signifikanter Unterschied feststellbar, obwohl zwei Beobachtungen mit der Leistungsdichte von  $18\text{GW}/\text{cm}^2$  einen signifikanten Unterschied aufwiesen.

#### **4.2.6. Ergebnisse der 1kHz Versuche/ $\lambda= 400\text{nm}$ mit *S. mutans* und *E. coli***

##### 4.2.6.1. Ergebnisse der 1kHz Versuche/ $\lambda= 400\text{nm}$ / $1,6\text{GW}/\text{cm}^2$ *S. mutans* und *E. coli*

Bei den 1kHz - Experimenten mit einer Wellenlänge von  $\lambda= 400\text{nm}$ , einer Leistungsdichte von  $1,6\text{GW}/\text{cm}^2$ , einem Laserdurchmesser von 2mm, einer Pulsweite von 80fs, einer mittleren Laserleistung von 58mW und einer Bestrahlungszeit von 1800s bis 3600s überlebten in der bestrahlten sowie in der nicht - bestrahlten Probe von *S. mutans* 98% und lediglich 2% waren tot (s. Tab. 8, Anhang). Bei Proben mit *E. coli* überlebten sowohl in der nicht - bestrahlten als auch in der bestrahlten Probe 97% des *E. coli*, während 3% des *E. coli* tot waren (s. Tab. 11, Anhang).

##### 4.2.6.2. Ergebnisse der 1kHz Versuche/ $\lambda= 400\text{nm}$ / $18\text{GW}/\text{cm}^2$ *S. mutans* und *E. coli*

In dem 1kHz - Experiment mit der erhöhten Leistungsdichte von  $18\text{GW}/\text{cm}^2$ , bei sonst gleichen Versuchseinstellungen wie in 4.2.6.1., überlebten in der bestrahlten und nicht - bestrahlten Probe von *S. mutans* 97%, während nur 3% des *S. mutans* starben (s. Tab. 8, Anhang). Bei *E. coli* hingegen wurden in der bestrahlten Probe einmal 72% des *E. coli* inaktiviert und nur 28% des *E. coli* überlebten und einmal 92% des *E. coli* inaktiviert, während 8% des *E. coli* überlebten. Hingegen überlebten in der nicht - bestrahlten Probe 98% des *E. coli* und lediglich 2% waren tot (s. Tab. 11, Anhang).

## **5. Diskussion**

### **5.1. Diskussion verschiedener Therapieansätze**

Autoren behaupten [81] [82], dass der Raman - Effekt zur selektiven Inaktivierung von Bakterien oder Bakteriophagen (Viren) führen kann, während humane Zellen unbeschädigt bleiben. In diesen ‚in – vitro‘ - Versuchen prüfen wir diese Hypothese und testen, ob durch den Raman - Effekt Bakterien selektiv inaktiviert werden können.

Anders als Tsen et al. [81] [82], die den Effekt für die Desinfektion oder gegen HIV verwenden wollen, testeten wir die Methode der selektiven Bakterienabtötung im Feld der Zahnmedizin zur Desinfektion von tiefen Zahntaschen. Bakterien in tiefen Zahntaschen können heutzutage durch chirurgische und nicht - chirurgische Methoden reduziert werden, jedoch nicht vollständig entfernt noch selektiv inaktiviert werden [38] [67]. Obwohl neue Methoden wie die photodynamische Therapie zukunftsorientiert erscheinen, können sie nicht in die Tiefe der Biofilme eindringen, weil der Photosensitizer nur einen Verlust an Zellen im Biofilm verursacht, aber nicht alle Bakterien in den parodontalen Taschen beseitigen kann [74]. Daher ist das Ziel unserer Studien, in die Tiefe dieser Biofilme einzudringen und die Bakterien in der Tiefe der Tasche zu erreichen und zu inaktivieren.

Im Nachfolgenden wird auf die gewählten Materialien, die Methode und die daraus resultierenden Ergebnisse aus den Versuchsreihen kritisch eingegangen.

### **5.2. Diskussion von Material und Methode**

In unseren Versuchen kamen menschliche Schleimhautzellen der Mundhöhle, die HGF [31] [83], zum Einsatz, da der Einsatz des Femtosekundenlasers für den zahnmedizinischen Bereich untersucht werden sollte. Im Experiment wurde zunächst eine Zellsuspension eingesetzt, die etwa  $1,9 \times 10^6$  Zellen/ml enthielt. Da die Zellen in Suspension durch das mehrmalige Auf- und Abpipettieren stark gereizt werden oder an der Pipettenspitze zugrunde

gehen und zusätzlich durch das Abzentrifugieren aggregieren, war eine verlässliche Auszählung und Aussage nach Versuchen in Suspension nicht möglich (s. Tab. 3, Anhang). Um die HGF verlässlich auszuwerten und unter dem Mikroskop betrachten zu können, wurden die Versuchsbedingungen optimiert und adhärente Zellen zu Versuchszwecken benützt. Die adhären Zellen wurden für Versuche auf LabTek - Chamber - slides (Nunc™) in einer Anzahl von  $4 \times 10^5$  Zellen pro Well über Nacht kultiviert.

Da wir das Experiment im Bereich der Zahnmedizin überprüfen wollen, kam zum einen das in der Mundhöhle Karies erzeugende Bakterium *S. mutans* und zum anderen das Bakterium *E. coli* zum Einsatz, das in kleinen Teilen ebenfalls in der Mundhöhle vorkommt und auch von Tsen et al. [81] [82] zur Erforschung des Lasers an Bakterien eingesetzt wurde.

Nach der Laserbestrahlung wurde die Viabilität der HGF mit dem LIVE/DEAD® Reduced Biohazard Viability/Cytotoxicity Kit # (L7013) von Invitrogen® überprüft [4] [50] und die Lebend- wie auch Totdiskriminierung von Bakterien wurde mit dem *LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit # (L 7012)* getestet [14] [49] [68]. Mit dieser Färbemethode konnte schnell, innerhalb von einer bis fünf Stunden, eine verlässliche Tot - lebend - Bestimmung der Zellen unter dem Mikroskop vorgenommen werden. Durch den Einsatz dieser Färbekits konnten viele verschiedene Versuche in kurzer Zeit durchgeführt werden, da direkt nach der Bestrahlung gefärbt werden konnte und daher anschließend das Ergebnis der Bestrahlung betrachtet werden konnte. Nach jedem Versuch mit einer Übernacht - Agar - Platten - Kultur zu arbeiten [81], um zu sehen, wie viele Zellen überlebt oder inaktiviert worden sind, hätte Zeit gekostet und wäre, wie die ähnlichen Ergebnisse der Versuchs - und Kontrollgruppen zeigen, nicht sinnvoll gewesen. Auch ein MTT - Test [10] [11] [51], der die mitochondriale Dehydrogenase - Aktivität der lebenden Zellen misst, schien für unser Experiment nicht geeignet, da dieser Test lediglich lebende Zellen aufspüren und deren Aktivität und Proliferation testen, nicht aber quantitativ erfassen kann.

Als Alternative zur Auswertung der humanen Zellen unter dem Mikroskop hätte man diese nach der Fluoreszenz - Färbung in einem Durchflusszytometer auszählen können [23]. Dabei werden Einzelzellen an einem Lichtstrahl (Laser) vorbeigeführt, wobei die Zellen in Abhängigkeit ihrer Größe, Gestalt und spezifischen Anfärbung charakteristische Lichtsignale aussenden, die mittels geeigneter Detektoren gemessen werden [27] [46]. Eine Lebend - tot - Diskriminierung der humanen Zellen hätte mit dem Durchflusszytometer durchgeführt

werden können, allerdings ist die Lebend - tot - Diskriminierung der Bakterien, wegen ihrer geringeren Größe, nicht reliabel [55] [15]. Daher entschied man sich für die einheitliche Auszählung aller lebenden und toten Zellen unter dem Mikroskop.

Tsen et al. [81] [82] verwenden in ihren Experimenten unterschiedliche Wellenlängen: einmal  $\lambda = 850\text{nm}$  und einmal  $\lambda = 425\text{nm}$  bei einer Repetitionsrate von 80MHz. Da wir in unseren Experimenten mit einem Laser arbeiten, der eine Fixwellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$  besitzt, konnten wir einerseits Versuche mit  $\lambda = 800\text{nm}$  und einer Repetitionsrate von 80MHz und 1kHz durchführen und andererseits mit Hilfe eines  $\beta$  - Barium - Borat - Kristalls die Wellenlänge auf 400nm halbieren und dadurch Versuche mit einer Repetitionsrate von 1kHz durchführen. In unseren Experimenten wurden die weiteren Parameter von Tsen et al. [81] [82] so modifiziert, dass die relative Dosis von  $1,8 \times 10^5 \text{ mWsec/ml}$  von Tsen et al. [81] [82] beibehalten oder sogar vervielfacht wurde. Wenn es sich um den ISRS, also den Raman - Effekt, handelte, würde der Effekt auch bei den von uns gewählten Wellenlängen auftreten, da die Abweichung unserer Wellenlänge im Vergleich zu der von Tsen et al. [81] [82] physikalisch zu gering ist. Nach einem Austausch mit Prof. Tsen, der ebenfalls von nur geringfügigen Unterschieden zwischen seinem und unserem Experiment sprach und die unterschiedlichen Wellenlängen nicht erwähnte, kann man von einem vernachlässigbar geringen Unterschied ausgehen.

Ein weiterer Unterschied zu Tsen et al. [81] [82], die Zellen in Suspension für ihre Experimente verwendeten, ist, dass wir in unseren Experimenten adhärente Zellen (HGF) wählten und daher keinen so kleinen Durchmesser wie Tsen et al. [81] [82] wählen konnten, da der bestrahlte Bereich auf einer  $1\text{cm}^2$  - Fläche des Wells nicht sichtbar war. Zunächst wurden 1kHz - Einstellungen mit Leistungsdichten von  $5\text{GW/cm}^2$  bis zu  $68\text{GW/cm}^2$  und ein durchschnittlicher Durchmesser von 4mm (s. Tab. 4, Anhang) gewählt. Obwohl dabei in unserem Experiment eine geringere Repetitionsrate von nur 1kHz gewählt wurde, müsste der postulierte Raman - Effekt trotzdem auftreten, da der Effekt von einer adäquat gewählten Wellenlänge und Pulslänge abhängig sein soll und nicht von der Repetitionsrate, der Belichtungszeit, dem Volumen, der Leistungsdichte oder der durchschnittlichen Laserleistung. Nachdem bei gleichbleibender relativer Dosis ( $1,8 \times 10^5 \text{ mWsec/ml}$ ) keine selektive Abtötung von Zellen zu beobachten war, vervielfachten wir die relative Dosis von Tsen al. [81] [82], was ebenfalls zu keiner selektiven Inaktivierung von Bakterien führte. Nachdem auch bei einer Belichtungszeitverlängerung und einer Erhöhung der Repetitionsrate

von 1kHz auf 80MHz keine Inaktivierung beobachtet werden konnte, waren diese Parameter als Ursache für den Effekt auszuschließen. Daraufhin wurde eine Repetitionsrate von 1kHz und der am niedrigsten einstellbaren Wellenlänge von  $\lambda = 400\text{nm}$  gewählt, mit einem Laserdurchmesser von 2mm und Leistungsdichten von  $1,6\text{GW}/\text{cm}^2$  und  $18\text{GW}/\text{cm}^2$  (s. Tab. 5/ 8/ 11, Anhang). Bei der wesentlich höher energetischen Wellenlänge von  $\lambda = 400\text{nm}$  und  $1,6\text{GW}/\text{cm}^2$  konnte keine Inaktivierung von Zellen beobachtet werden, jedoch wurden bei dem Experiment mit  $18\text{GW}/\text{cm}^2$  sowohl E. coli als auch HGF inaktiviert (s. Tab. 5/ 11, Anhang), während S. mutans (s. Tab. 8, Anhang) von der hoch energetischen Wellenlänge unbeeinflusst blieb und in keinem der Experimente inaktiviert werden konnte.

### **5.3. Diskussion der Ergebnisse**

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Inaktivierung von HGF und E. coli abhängig ist von einer hochenergetischen Wellenlänge von  $\lambda = 400\text{nm}$ , einer adäquat gewählten Pulsweite von 80fs und zusätzlich von der Leistungsdichte, die größer sein muss als  $1,6\text{GW}/\text{cm}^2$ . Bei der statistischen Auswertung von E. coli (s. Tab. 24, Anhang) war ein signifikanter Einfluss der unabhängigen Variablen (mittlere Laserleistung, Leistungsdichte und Bestrahlungszeit) auf das Überleben der Zellen sichtbar: Die längere Bestrahlungsdauer und die höhere Leistungsdichte führten zu einem größeren Totanteil in der bestrahlten Gruppe als in der Kontrollgruppe. Jedoch findet sich hier für die mittlere Laserleistung ein gegenläufiger Effekt, der ebenfalls signifikant ist. Mit zunehmender mittlerer Laserleistung nimmt der Anteil toter Zellen in der bestrahlten Gruppe relativ zur Kontrollgruppe ab. Dieses Ergebnis ließe sich dadurch erklären, dass, sobald die mittlere Laserleistung erhöht wird, die Bestrahlungszeit verkürzt wird. Es kann somit also indirekt mit der geringeren Bestrahlungsdauer korrelieren. Möglich wäre aber auch, dass durch die kürzere Bestrahlungsdauer noch kein Schaden an den Zellmembranen entsteht, aber eine minimale Temperaturveränderung, von den ursprünglichen  $25^\circ\text{C}$  Zimmertemperatur ausgehend, hervorgerufen wird, durch die sich die Bakterien schneller teilen und vermehren können, was den geringeren Tot - Anteil in der bestrahlten Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe erklären könnte.

Dass *S. mutans* nicht inaktiviert wurde, könnte an dem grampositiven Zellwandaufbau liegen. Die geringere Größe der Streptokokken sollte laut Tsen et al. [81] [82] eher dazu führen, dass diese schneller inaktiviert werden als größere Zellen, da die angeregte Raman - Schwingung für kleinere Moleküle größer sein kann [82]. Auch dieses Resultat führt zu dem Schluss, dass in unseren Experimenten keine impulsiv stimulierte Raman - Streuung auftritt.

#### **5.4. Schlussbetrachtung**

Für die bereits eingangs formulierte Fragestellung (siehe 2.), ob es gelingt Bakterien (*S. mutans* oder *E. coli*) selektiv abzutöten, während HGF überleben, ergibt sich folgende Antwort:

Sowohl in den 1kHz Versuchen mit  $\lambda = 800\text{nm}$  als auch in den 80MHz Versuchen mit  $\lambda = 800\text{nm}$  konnten weder HGF noch *S. mutans* noch *E. coli* inaktiviert werden. Auch bei 1kHz-Versuchen mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 400\text{nm}$  und einer Leistungsdichte von  $1,6\text{GW}/\text{cm}^2$  konnte keine Inaktivierung von Bakterien und HGF beobachtet werden. Lediglich bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 400\text{nm}$  und einer Leistungsdichte von  $18\text{GW}/\text{cm}^2$  konnte eine Inaktivierung von HGF und dem gramnegativen Keim *E. coli* beobachtet werden, während der grampositive Keim *S. mutans* überlebte.

Eine selektive Abtötung von Bakterien, während HGF überleben, konnte somit nicht belegt werden.

Auf die Frage, ob der Raman - Effekt für die Inaktivierung von Bakterien und humanen Zellen verantwortlich ist, ergab sich Folgendes:

In unseren Experimenten konnte nicht belegt werden, dass Bakterien selektiv abgetötet werden können, während humane Zellen überleben. Daher konnte auch der Raman - Effekt in unserem Experiment nicht beobachtet werden. Die Ergebnisse unserer Versuche sprechen für die Inaktivierung von HGF und *E. coli* durch eine hochenergetische Wellenlänge und eine entsprechend hohe Leistungsdichte.

Ob die Abtötung von E. coli und den HGF abhängig von der mittleren Laserleistung, den Leistungsdichten, der Belichtungszeit oder der Repetitionsrate ist, wurde ebenfalls eingangs gefragt und wird nun beantwortet:

Da bei den Experimenten mit 400nm sowohl bei  $1,6\text{GW}/\text{cm}^2$  als auch bei  $18\text{GW}/\text{cm}^2$  die mittlere Laserleistung konstant bei 58mW gewählt wurde, allerdings bei  $1,6\text{GW}/\text{cm}^2$  keine Inaktivierung zu beobachten war, spricht dafür, dass die Inaktivierung des E. coli und der HGF unabhängig von der mittleren Laserleistung ist. Die Leistungsdichte hingegen trägt entscheidend zur Inaktivierung der Zellen bei, da bei einer Wellenlänge von 400nm bei den  $1,6\text{GW}/\text{cm}^2$  Experimenten keine Zellen inaktiviert werden konnten, jedoch bei den  $18\text{GW}/\text{cm}^2$  Experimenten schon. Die Belichtungszeit ist für die Inaktivierung nicht von primärer Bedeutung, da bei Experimenten mit einer Wellenlänge von  $\lambda=800\text{nm}$  bei längeren Belichtungszeiten als bei den  $\lambda=400\text{nm}$  Experimenten keine Zellen inaktiviert werden konnten. Da in ersten Experimenten mit  $\lambda=800\text{nm}$  Zellen weder mit einer Repetitionsrate von 80MHz noch mit 1kHz inaktiviert werden konnten und bei Experimenten mit  $\lambda=400\text{nm}$  und der niedrigen Repetitionsrate von 1kHz Zellen erst bei einer hohen Leistungsdichte von  $18\text{GW}/\text{cm}^2$  inaktiviert werden konnten spricht dafür, dass die Repetitionsrate keinen Einfluss auf die Abtötung von Zellen hat.

Unsere Versuche sprechen also dafür, dass für die Inaktivierung der Zellen die Leistungsdichte und die Wellenlänge entscheidend sind.

## **5.5. Schlussfolgerung**

In unseren Experimenten konnte also nicht beobachtet werden, dass der Raman – Effekt für die selektive Abtötung von Bakterien verantwortlich ist. Die Anwendung eines Femtosekundenlasers zur selektiven Bakterienabtötung im Bereich der Zahnmedizin ist derzeit noch nicht ausgereift.

## 6. Zusammenfassung

Autoren [81] [82] postulieren, eine unkonventionelle und revolutionäre Methode zur selektiven Abtötung von Bakterien gefunden zu haben, bei der Säugetierzellen überleben. Sie behaupten, diesen Effekt über die sogenannte Raman - Streuung (ISRS impulsive stimulated Raman - scattering) zu erzielen, die durch Nahinfrarot - Femtosekundenlaser - Pulse erzeugt wird [80] [82]. Diese Raman – Streuung, auch Raman – Effekt genannt, kann als Interaktion von Licht mit optischen Phononen beschrieben werden.

Tsen et al. [81] [82] behaupten, dass es ein Fenster in der Leistungsdichte gibt, wenn Wellenlänge und Impulslänge des Femtosekundenlasers adäquat gewählt sind, das es ermöglicht, selektiv Viren und Bakterien zu inaktivieren, ohne auf Säugetierzellen zytotoxisch zu wirken [82].

In dieser Studie wollen wir diese Methode, anders als Tsen et al. [81] [82], im Bereich der Zahnmedizin, mit oralen Mundschleimhautzellen, den HGF, einem grampositiven Mundhöhlenkeim, dem *S. mutans*, und einem gramnegativen Keim, dem *E. coli*, an einem Femtosekundenlaser durchführen, um die Hypothese zu überprüfen, dass die ISRS tatsächlich für die selektive Abtötung von Bakterien verantwortlich ist, und um dies, bei Erfolg, später zur Desinfektion tiefer Zahntaschen einzusetzen. Wir wollten überprüfen, ob eine selektive Abtötung von Mikroorganismen durch die ISRS möglich ist und von welchen physikalischen Parametern diese Inaktivierung abhängig ist [16] [80] [82].

Die Anregungsquelle in dem einen Experiment ist ein gepulster Femtosekunden – Ti:Saphir – Laser, der Spitfire XP, von Newport Spectra Physics. Er arbeitet bei einer fixen Zentralwellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , bei einer Repetitionsrate von 1kHz und einem kontinuierlichen Pulszug von 80fs. Für weitere Experimente wurde an diesem Laser eine zweite Harmonische bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 400\text{nm}$  eingestellt. In einem weiteren Experiment wurde ein Tsunami Femtosekundenlaser von Newport Spectra Physics als Anregungsquelle benützt. Dieser arbeitet bei einer Zentralwellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , allerdings bei einer Repetitionsrate von 80MHz und ebenfalls bei einer Pulslänge von 80fs.

In ‚in – vitro‘ - Versuchen wurden folgende Parameter variiert:

- der Laserdurchmesser von 100 $\mu\text{m}$  bis 4mm
- die mittlere Laserleistung von 58mW bis 2200mW

- die Leistungsdichte von  $1\text{GW}/\text{cm}^2$  bis  $68\text{GW}/\text{cm}^2$
- die Probenbestrahlungszeit von 8 Sekunden bis 17 Stunden

Zudem lag:

- die Wellenlänge einmal bei  $\lambda=800\text{nm}$  und einmal bei  $\lambda=400\text{nm}$
- das Probenvolumen bei  $0,1\text{ml}$  und bei  $2\text{ml}$
- die Repetitionsrate bei  $1\text{kHz}$  und bei  $80\text{MHz}$

und der Pulszug lag kontinuierlich bei  $80\text{fs}$ .

Um die Viabilität der HGF, des *S. mutans* und des *E. coli* zu testen, wurden Färbe - Kits von Invitrogen® verwendet, die einen grün fluoreszierenden nukleinsäurebindenden Farbstoff beinhalten, der lebende HGF und Bakterien grün markiert, und einen rot fluoreszierenden Farbstoff enthalten, der die toten HGF und Bakterien rot markiert [4].

Da wir in unseren ersten Versuchsreihen mit  $100\mu\text{l}$  ein geringeres Probenvolumen als Tsen et al. [81] [82] mit  $2\text{ml}$  wählten, verkürzten wir dementsprechend die Belichtungszeiten, die Leistungsdichten und durchschnittlichen Laserleistungen, wodurch der Raman - Effekt, wenn es sich um diesen handelte, auch auftreten müsste. Dabei verwendeten wir einen kontinuierlichen Pulszug von  $80\text{fs}$  mit einer Repetitionsrate von  $1\text{kHz}$ . Der Anregungslaser, dessen durchschnittliche Leistung von uns variiert wurde, arbeitet bei einer Wellenlänge von  $\lambda=800\text{nm}$ . Die Leistungsdichte bleibt mit  $5\text{GW}/\text{cm}^2$  konstant, die Belichtungszeiten werden variiert. Über Veränderung dieser drei Parameter, Laserleistung, Leistungsdichte und Belichtungszeit, erhalten wir physikalisch dieselben Werte wie Tsen et al. [81] [82].

Bei Tsen et al. [81] [82] wurde der Durchmesser der Linse variiert, wodurch sich eine durchschnittliche Leistung von  $100\text{mW}$  ergab und Leistungsdichten zwischen  $1\text{MW}/\text{cm}^2$  und  $60\text{GW}/\text{cm}^2$  erzielt wurden, wobei die Belichtungsdauer konstant  $1$  bzw.  $10$  Stunden betrug.

Da Tsen et al. [81] [82] eine Repetitionsrate von  $80\text{MHz}$  einstellten, erhöhten auch wir in weiteren Versuchen die Repetitionsrate von  $1\text{kHz}$  auf  $80\text{MHz}$ , stellten eine Wellenlänge von  $\lambda=800\text{nm}$  ein, eine Pulsdauer von  $80\text{fs}$ , erhöhten das Probenvolumen von  $0,1\text{ml}$  auf  $2\text{ml}$  und wählten eine konstante durchschnittliche Laserleistung von  $520\text{mW}$ . Der Strahldurchmesser wurde mit  $100\mu\text{m}$  ebenfalls konstant gehalten, wodurch Leistungsdichten von  $1\text{GW}/\text{cm}^2$  erreicht wurden.

In weiteren Experimenten wurden eine Repetitionsrate von 1kHz, eine Wellenlänge von  $\lambda=400\text{nm}$ , eine Pulsweite von 80fs und Leistungsdichten von  $1,6\text{GW}/\text{cm}^2$  und  $18\text{GW}/\text{cm}^2$  eingestellt.

In Experimenten mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$  und in Experimenten mit einer Wellenlänge von  $\lambda=400\text{nm}$  mit einer Leistungsdichte von  $1,6\text{GW}/\text{cm}^2$  konnten weder HGF noch *S. mutans* noch *E. coli* inaktiviert werden. Bei Experimenten mit einer Wellenlänge von  $\lambda=400\text{nm}$  und einer Leistungsdichte von  $18\text{GW}/\text{cm}^2$  konnten HGF und *E. coli* inaktiviert werden. Nur der grampositive Keim *S. mutans* konnte in keinem unserer Experimente inaktiviert werden.

Somit konnte unsere Studie die Hypothese von Autoren, dass die durch einen Femtosekundenlaser impulsiv stimulierte Raman-Streuung (ISRS) zur selektiven Abtötung von Bakterien führt, während humane Zellen überleben, unter den momentan zur Verfügung stehenden Versuchsbedingungen, nicht belegt werden.

Ein Femtosekundenlaser zur selektiven Bakterienabtötung und damit zur Anwendung im Bereich der Zahnmedizin ist derzeit noch nicht ausgereift.

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] Ackerknecht EH. Die Entwicklung der Chirurgie und Gynäkologie im 19. Jahrhundert, In: Ackerknecht EH (Hrg.). Kurze Geschichte der Medizin. 7. Auflage, Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag 1992, S. 123-139.
- [2] Andrian E, Grenier D, Rouabhia M. In Vitro Models of Tissue Penetration and Destruction by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 2004;72:4689–98.
- [3] Arno A, Waerhaug J, Lovdal A, Schei O. Incidence of gingivitis as related to sex, occupation, tobacco consumption, toothbrushing and age. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1958;11:587-95.
- [4] Arregui C, Pathre P, Lilien J, Balsamo J. The nonreceptor tyrosine kinase fer mediates cross-talk between N-cadherin and beta1-integrins. *J Cell Biol* 2000;149:1263-74.
- [5] Azarpazhooh A, Limeback H. The application of ozone in dentistry: A systematic review of literature. *J Dent* 2008;36:104–16.
- [6] Badersten A, Nilveus R, Egelberg J. Effect of non-surgical periodontal therapy: I. Moderately advanced periodontitis. *J of Clin Periodontol* 1981;8:57-72.
- [7] Badersten A, Nilveus R, Egelberg J. Effect of non-surgical periodontal therapy, II. Severely advanced periodontitis. *J Clin Periodontol* 1984;11:63-76.
- [8] Balashova NV, Diaz R, Balashov SV, Crosby JA, Kachlany SC. Regulation of *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* leukotoxin secretion by iron. *J Bacteriol* 2006;188:8658–61.
- [9] Beighton D, Manji F, Baelum V, Fejerskov O, Johnson NW, Wilton JMA. Associations between salivary levels of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacilli* and caries experience in Kenyan adolescents. *J Dent Res* 1989;68:1242-6.

- [10] Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 1993;303:474-82.
- [11] Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 1996;4:14-9.
- [12] American Academy of Periodontology. Parameter on Periodontitis Associated With Systemic Conditions. *J Periodontol* 2000; 71:876-9.
- [13] Bortz J (Hrsg.). *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler*. 6. Auflage, Heidelberg: Springer Medizin Verlag 2005, S. 448f.
- [14] Boulos L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R. LIVE/DEAD *BacLight*: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods* 1999;37:77-86.
- [15] Boye E, Steen HB, Skarstad K. Flow Cytometry of Bacteria: a promising tool in experimental and clinical microbiology. *J Gen Microbiol* 1983;129:973-80.
- [16] Brooks CL, Montgomery Pettitt B, Karplus M. Structural and energetic effects of truncating long ranged interactions in ionic and polar fluids. *J Chem Phys* 1985;83:5897-908.
- [17] Cerf R, Michels B, Schulz JA, Witz J, Pfeiffer P, Hirth L. Ultrasonic absorption evidence of structural fluctuations in viral capsids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:1780-2.
- [18] Cobb CM. Lasers in Periodontics: A Review of the Literature. *J Periodontol* 2006;77:545-64.

- [19] Collins RJ, Nelson DF, Schawlow AL, Bond W, Garrett CG, Kaiser W. Coherence, narrowing, directionality and relaxation oscillation in the light emission from Ruby. *Phys Rev Letters* 1960;5:303-5.
- [20] De Gruyter W (Hrsg.). *Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch*. 261. Auflage, Berlin: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG 2007, S. 1829.
- [21] De Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, Taba M. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. *J Periodontol* 2007;78:965-73.
- [22] Flamm H. Von der Antiseptik zur Aseptik. *Wien Klin Wochenschr* 2007;119: 685–96.
- [23] Fouchet P, Jayat C, Héchard Y, Ratinaud MH, Frelat G. Recent advances of flow cytometry in fundamental and applied microbiology. *Biol Cell* 1993;78:95-109.
- [24] Forst HAT. Probleme des multiplen Testens und Schätzens in der Arzneimittelforschung. *Arzneim Forsch/Drug Res* 1985;35:3-5.
- [25] French PMW. The generation of ultrashort laser pulses. *Rep Prog Phys* 1995;58:169-267.
- [26] Gängler P, Hoffmann T, Willershausen B, Schwenzer N, Ehrenfeld M (Hrsg.). *Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie*. 2. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG 2005.
- [27] Givan Longbardi A. Seeing the light: Lasers, Fluorochromes, and Filters. In: Givan AL (Hrsg.). *Flow cytometry: first principles*. 2. Auflage, New York: John Wiley and Sons 2001, S. 61f.

- [28] Habs H. Historische Entwicklung der medizinischen Mikrobiologie. In: Brandis H, Pulverer G (Hrsg.). Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. 6. Auflage, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag 1988, S. 3-12.
- [29] Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* 1994;5:78-111.
- [30] Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 1980;44:331-84.
- [31] Hassell TM. Tissues and cells of the periodontium. *Periodontology 2000* 1993;3:9-38.
- [32] Heasman PA, Seymour RA. Pharmacological control of periodontal disease. I. Antiplaque agents. *Journal of Dentistry* 1994;22: 323-35.
- [33] Heidemann D (Hrsg.). Parodontologie, Bd 4: Praxis der Zahnheilkunde. 4. Auflage, München: Urban & Fischer 2005, S.2.
- [34] Hellwig E, Klimek J, Attin T (Hrsg.): Hellwig: Einführung in die Zahnerhaltung. 3. Auflage, München: Urban und Fischer 2003.
- [35] Hoffmann-Axthelm W (Hrsg.): Lexikon der Zahnmedizin. 6. Auflage, Berlin: Quintessenz 1995, S. 565.
- [36] Houang ET, Gilmore OJA, Reid C, Shaw EJ. Absence of bacterial resistance to povidone iodine. *J Clin Pathol* 1976;29:752-5.
- [37] Johnson JD, Chen R, Lenton PA, Zhang G, Hinrichs JE, Rudney JD. Persistence of extracrevicular bacterial reservoirs after treatment of aggressive Periodontitis. *J Periodontol* 2008;79:2305-12.

- [38] Karlsson MR, Diogo Löfgren CI, Jansson HM. The effect of laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment in subjects with chronic periodontitis: A systematic review. *J Periodontol* 2008;79:2021-8.
- [39] Krekeler G. Parodontologie. In: Schwenzer N, Ehrenfeld M (Hrsg.). Bd3: Zahnärztliche Chirurgie. 3. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2000, S. 170f.
- [40] Leach SA, Saxton CA. An electron microscopic study of the acquired pellicle and plaque formed on the enamel of human incisors. *Arch Oral Biol* 1966;11:1081-90.
- [41] Lindenberger M, Strutz J. Laserchirurgie. Physikalische Grundlagen des Lasers. In: Strutz J, Mann W (Hrsg.). Praxis der HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie. 1. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2001. S. 782.
- [42] Listgarten MA. Pathogenesis of periodontitis. *J Clin Periodontol* 1986;13:418-25.
- [43] Listgarten MA, Levin S. Positive correlation between the proportions of subgingival spirochaetes and motile bacteria and susceptibility of human subjects to periodontal deterioration. *J Clin Periodontol* 1981;8:122-38.
- [44] Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986;50:353-80.
- [45] Maiman TH. Stimulated optical radiation in ruby. *Nature* 1960;187:493-4.
- [46] Marrone BL, Habbersett RC, Jett JH, Keller RA, Yan X, Yoshida TM. DNA Fragment Sizing by High-Sensitivity Flow Cytometry: Applications in Bacterial Identification. In: Sklar LA (Hrsg.). Flow cytometry for biotechnology. 9. Auflage, New York: Oxford University Press Inc. 2005. S. 123ff.

- [47] Marsh P, Martin MV. Zahnkaries. In: Marsh P, Martin MV (Hrsg.). Orale Mikrobiologie. 4. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2003; S.114.
- [48] Miller BJ, Hodson N. Assessment of the safety of two ozone delivery devices. J Dent 2007;35:195-200.
- [49] Molecular Probes LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kits. Molecular Probes Inc. 2004; probes.invitrogen.com/media/pis/mp07007.pdf
- [50] Molecular Probes LIVE/DEAD<sup>®</sup> Biohazard Viability/Cytotoxicity Kit #1 (L7013). Molecular Probes Inc. 2001; probes.invitrogen.com/media/pis/mp07013.pdf
- [51] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65:55-63.
- [52] Müller HP (Hrsg.). Parodontologie. 1. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2001, S. 22.
- [53] Müller-Richter UDA, Bele S, Roldán JC, Grün B, Driemel O, Brawanski A, Reichert TE. Die Bedeutung der zahnbezogenen Focussanierung am Fallbeispiel eines pontinen Abszesses durch Streptokokken der Viridans Gruppe. Mund Kiefer GesichtsChir 2007;11:161–6.
- [54] Napimoga MH, Kamiya RU, Rosa RT, Rosa EAR, Höfling JF, Mattos-Graner RO, Gonçalves RB. Genotypic diversity and virulence traits of Streptococcus mutans in caries-free and caries-active individuals. J Med Microbiol 2004; 53: 697-703.
- [55] Nebe-von-Caron G, Stephens PJ, Hewitt CJ, Powell JR, Badley RA. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. J Microbiol Meth 2000;42:97-114.

- [56] Nightingale F. Notes on Nursing. What it is, and what it is not, (unabridged republication of the first American edition 1860), New York: Dover Publications 1969; S. 24-34, 87-93, 126-127.
- [57] Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, Garlet GP, de Souza RF, Taba M, Scombatti de Souza SL, Ribeiro FJ. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. *J periodontol* 2009;80:98-105.
- [58] Overmann P (Herg.). Vergleichsprüfung von Betaisodona® Mund-Antiseptikum versus Octenisept® zur kurzfristigen, prophylaktischen Keimreduzierung in der Mundhöhle. Diss Johann Wolfgang Goethe Univ Frankfurt am Main 1992.
- [59] Parsons GJ, Patterson SS, Miller CH, Katz S, Kafrawy AH, Newton CW. Uptake and release of chlorhexidine by bovine pulp and dentin specimens and their subsequent acquisition of antibacterial properties. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980;49:455-9.
- [60] Perelman A, Uzan A, Hacoheh D, Schwarz R. Oxidative stress in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: various mechanisms for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification with different physiological roles. *J Bacteriol* 2003;185:3654–60.
- [61] Petala M, Samaras P, Zouboulis A, Kungolos A, Sakellaropoulos GP. Influence of ozonation on the in vitro mutagenic and toxic potential of secondary effluents. *Water Res* 2008;42:4929–40.
- [62] Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol* 2004;75:1343-49.
- [63] Polydorou O, Pelz K, Hahn P. Antibacterial effect of an ozone device and its comparison with two dentin-bonding systems. *Eur J Oral Sci* 2006;114: 349-53.

- [64] Präger TM, Mischkowski R, Laube N, Jost-Brinkmann PG, Müller-Hartwich R. Remodeling along the Bone-screw Interface (Remodelling am Knochen-Schraube-Interface). *J Orofac Orthop* 2008;69:337-48.
- [65] Raman CV. A new radiation. *Indian J Phys* 1928;2:387-98.
- [66] Raman CV, Krishnan KS. A new type of secondary radiation. *Nature* 1928;121:501-2.
- [67] Ramfjord SP, Caffesse RG, Morrison EC, Hill RW, Kerry GJ, Appleberry EA, Nissle RR, Stults DL. Four modalities of periodontal treatment compared over 5 years. *J Clin Periodontol* 1987;14:445-52.
- [68] Rasgon JL, Gamston CE, Ren X. Survival of *Wolbachia pipientis* in Cell-Free Medium. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:6934–7.
- [69] Reichl FX, Mohr K, Hein L, Hickel R (Hrsg.). Taschenatlas der Pharmakologie und Toxikologie für Zahnmediziner. 2. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2007.
- [70] Russell AD, Day MJ. Antibacterial activity of chlorhexidine. *J Hosp Infect* 1993;25:229-38.
- [71] Schmelzle R, Schwenzer N. Weichteilinfektionen. In: Schwenzer N, Ehrenfeld M (Hrsg.). *Allgemeine Chirurgie Bd 1*. 3. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2000, S. 130.
- [72] Schwabe U, Paffrath D (Hrsg.). *Arzneiverordnungs-Report 2003*. 1. Auflage, Berlin: Springer Medizin Verlag 2003, S.647f.

- [73] Seichter U, van der Schelling D. Bakteriologische Untersuchungen zur desinfizierenden Wirkung von Chlorhexidin als Spülmittel bei der Wurzelkanalbehandlung. Dtsch Zahnärztl Z 1987;42:763-6.
- [74] Sharma M, Visai L, Bragheri F, Cristiani I, Gupta PK, Speziale P. Toluidine Blue-mediated photodynamic effects on staphylococcal biofilms. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:299–305.
- [75] Shen YR, Bloembergen N. Theory of simulated Brillouin and Raman scattering. Phys Rev 1965;137:A1787-A1805.
- [76] Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. Periodontology 2000 1994;5:7-25.
- [77] Spielman AI. The birth of the most important 18th century dental text: Pierre Fauchard's *Le Chirurgien Dentist*. J Dent Res 2007;86:922-6.
- [78] Steurer W, Lutz-Dettinger U. Organische Desinfektionsmittel. In: Steurer W, Lutz-Dettinger U. (Hrsg.): *Leitfaden der Desinfektion, Sterilisation und Entwesung*. 3. Auflage, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag 1980, S. 53.
- [79] Tirlapur UK, König K. Targeted transfection by femtosecond laser. Nature 2002;418:290-1.
- [80] Tsen KT, Tsen SWD, Chang CL, Hung CF, Wu TC, Kiang JG. Inactivation of viruses by coherent excitations with a low power visible femtosecond laser. Virol J 2007;4:50.
- [81] Tsen KT, Tsen SWD, Chang C-L, Hung C-F, Wu T-C, Kiang JG. Inactivation of viruses with a very low power visible femtosecond laser. J Phys Condens Matter 2007;19:322102(9pp).

- [82] Tsen KT, Tsen SWD, Sankey OF, Kiang JG. Selective inactivation of micro-organisms with near-infrared femtosecond laser pulses. *J Phys Condens Matter* 2007;19:472201(7pp).
- [83] Wang PL, Ohura K, Fujii T, Oido-Mori M, Kowashi Y, Kikuchi M, Suetsugu Y, Tanaka J. DNA microarray analysis of human gingival fibroblasts from healthy and inflammatory gingival tissues. *Biochem and Biophys Res Commun* 2003; 305:970–3.
- [84] Wolff LF, Aepli DM, Pihlstrom B, Anderson L, Stoltenberg J, Osborn J, Hardie N, Shelburne C, Fischer G. Natural distribution of 5 bacteria associated with periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1993; 20:699-706.

## 8. Anhang: Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

### 8.1. Tabellen

Tab. 3

Repetitionsrate [kHz]	Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [GW/cm <sup>2</sup> ]	Belichtung [s]	Relative Tsen-Dosis [mWsec/ml]	Kontrolle in [%]		Probe bestrahlt in [%]	
					lebend	tot	lebend	tot
1	34	5	330	1,6	99	1	98	2
1	524	5	20	1,5	90	10	91	9
1	490	5	195	13	aggregiert*			
1	1390	5	70	13,5	aggregiert*			

\*Zellen in Suspension

Vorversuche mit HGF und einem Volumen von 0,04ml. Tsen-Dosis:  $1,8 \times 10^5$  mWsec/ml.

Tab. 4

Repetitionsrate [kHz]	Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [GW/cm <sup>2</sup> ]	Belichtung [s]	Relative Tsen-Dosis [mWsec/ml]	Kontrolle in [%]		Probe bestrahlt in [%]	
					lebend	tot	lebend	tot
80MHz	520	116MW/ cm <sup>2</sup>	3600	104	98	2	99	1
1	161,5	5	110	1	98	2	98	2
1	646	20	27	1	98	2	98	2
1	969	30	18	1	98	2	99	1
1	1615	50	11	1	98	2	99	1
1	1615	50	22	2	99	1	98	2
1	1615	50	44	4	97	3	99	1
1	2200	68	8,2	1	98	2	98	2
1	2200	68	16,4	2	98	2	98	2

Laser bestrahlte und nicht bestrahlte Probe von HGF bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 800$ nm, mit einer Repetitionsrate von 1kHz und 80MHz, einem Laserdurchmesser von 4mm, einem Volumen von 0,1ml und einer Pulslänge von 80fs. Tsen-Dosis:  $1,8 \times 10^5$  mWsec/ml.

(s. Abb. 6-14)

Tab. 5

Repetitionsrate [kHz]	Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [GW/cm <sup>2</sup> ]	Belichtung [s]	Relative Tsen-Dosis [mWsec/ml]	Kontrolle in [%]		Probe bestrahlt in [%]	
					lebend	tot	lebend	tot
1	58	1,6	1800	5,8	98	2	98	2
1	58	1,6	3600	11,6	99	1	98	2
1	58	18	1800	5,8	99	1	1	99
1	58	18	3600	11,6	99	1	1	99

Laser bestrahlte und nicht bestrahlte Probe von HGF bei einer Wellenlänge von  $\lambda=400\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 2mm einem Volumen von 0,1ml und einer Pulslänge von 80fs. Tsen-Dosis:  $1,8 \times 10^5$  mWsec/ml.

(s. Abb. 15-18)

Tab. 6

Repetitionsrate [kHz]	Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [GW/cm <sup>2</sup> ]	Belichtung [s]	Relative Tsen-Dosis [mWsec/ml]	Kontrolle in [%]		Probe bestrahlt in [%]	
					lebend	tot	lebend	tot
1	161,5	5	110	1	99	1	98	2
1	2200	68	8,2	1	98	2	97	3
1	2200	68	110	13	99	1	99	1
1	2200	68	30	3,5	98	2	99	1
1	2200	68	120	14,6	98	2	98	2
1	2200	68	600	73	98	2	98	2

Laser bestrahlte und nicht bestrahlte Probe von S. mutans bei einer Wellenlänge von  $\lambda=800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 4mm einem Volumen von 0,1ml und einer Pulslänge von 80fs Tsen-Dosis:  $1,8 \times 10^5$  mWsec/ml.

(s. Abb. 19-24)

Tab. 7

Repetitionsrate [MHz]	Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [GW/cm <sup>2</sup> ]	Belichtung [s]	Relative Tsen-Dosis [mWsec/ml]	Kontrolle in [%]		Probe bestrahlt in [%]	
					lebend	tot	lebend	tot
80	520	1	0	0	94	6	94	6
80	520	1	1800	2,5	94	6	95	5
80	520	1	1800	2,5	94	6	93	7
80	520	1	3600	5	96	4	96	4
80	520	1	3600	5	97	3	98	2
80	520	1	5400	7,8	97	3	96	4
80	520	1	5400	7,8	95	5	94	6
80	520	1	7200	10,4	97	3	97	3
80	520	1	10800	15,6	96	4	96	4

Laser bestrahlte und nicht bestrahlte Probe von *S. mutans* bei einer Wellenlänge von  $\lambda=800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 80MHz, einem Laserdurchmesser von 100 $\mu\text{m}$  einem Volumen von 2ml und einer Pulslänge von 80fs. Tsen-Dosis:  $1,8 \times 10^5$  mWsec/ml.  
(s. Abb. 25-33)

Tab. 8

Repetitionsrate [kHz]	Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [GW/cm <sup>2</sup> ]	Belichtung [s]	Relative Tsen-Dosis [mWsec/ml]	Kontrolle in [%]		Probe bestrahlt in [%]	
					lebend	tot	lebend	tot
1	58	1,6	3600	0,6	99	1	98	2
1	58	1,6	3600	0,6	97	3	98	2
1	58	18	3600	0,6	97	3	98	2
1	58	18	3600	0,6	96	4	97	3
1	58	18	3600	0,6	98	2	97	3
1	58	18	7200	1,16	96	4	97	3

Laser bestrahlte und nicht bestrahlte Probe von *S. mutans* bei einer Wellenlänge von  $\lambda=400\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 2mm einem Volumen von 2ml und einer Pulsweite von 80fs. Tsen-Dosis:  $1,8 \times 10^5$  mWsec/ml.  
(s. Abb.34-39)

Tab. 9

Repetitionsrate [kHz]	Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [GW/cm <sup>2</sup> ]	Belichtung [s]	Relative Tsen-Dosis [mWsec/ml]	Kontrolle in [%]		Probe bestrahlt in [%]	
					lebend	tot	lebend	tot
1	161,5	5	110	1	55	45	56	44
1	2200	68	120	14,6	55	45	54	46
1	2200	68	600	73	56	44	55	45
1	161,5	5	110	1	95	5	96	4
1	2200	68	30	3,5	98	2	97	3
1	2200	68	120	14,6	95	5	94	6
1	2200	68	600	73	96	4	95	5

Laser bestrahlte und nicht bestrahlte Probe von E. coli bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 4mm einem Volumen von 0,1ml und einer Pulslänge von 80fs. Tsen-Dosis:  $1,8 \times 10^5$  mWsec/ml.

(s. Abb.40-46)

Tab. 10

Repetitionsrate [MHz]	Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [GW/cm <sup>2</sup> ]	Belichtung [s]	Relative Tsen-Dosis [mWsec/ml]	Kontrolle in [%]		Probe bestrahlt in [%]	
					lebend	tot	lebend	tot
80	520	1	0	0	93	7	94	6
80	520	1	1800	2,5	95	5	94	6
80	520	1	1800	2,5	93	7	93	7
80	520	1	3600	5,2	96	4	94	6
80	520	1	3600	5,2	95	5	95	5
80	520	1	5400	7,8	98	2	96	4
80	520	1	5400	7,8	96	4	97	3
80	520	1	7200	10,4	96	4	95	5
80	520	1	16200	23,4	95	5	93	7
80	520	1	61200	88,4	97	3	96	4

Laser bestrahlte und nicht bestrahlte Probe von E. coli bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 80MHz, einem Laserdurchmesser von 100 $\mu\text{m}$  einem Volumen von 2ml und einer Pulslänge von 80fs. Tsen-Dosis:  $1,8 \times 10^5$  mWsec/ml.

(s. Abb.47-56)

Tab. 11

Repetitionsrate [kHz]	Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [GW/cm <sup>2</sup> ]	Belichtung [s]	Relative Tsen-Dosis [mWsec/ml]	Kontrolle in [%]		Probe bestrahlt in [%]	
					lebend	tot	lebend	tot
1	58	1,6	3600	0,6	98	2	97	3
1	58	1,6	3600	0,6	97	3	97	3
1	58	18	3600	0,6	98	2	28	72
1	58	18	3600	0,6	97	3	30	70
1	58	18	3600	0,6	98	2	32	68
1	58	18	7200	1,16	99	1	8	92

Laser bestrahlte und nicht bestrahlte Probe von E. coli bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 400\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 2mm einem Volumen von 2ml und einer Pulslänge von 80fs. Tsen-Dosis:  $1,8 \times 10^5 \text{ mWsec/ml}$ . (s. Abb.57-62)

Tab. 12

	Tsen et al. [1][5]	Experiment A*		Experiment B**
Volumen [ml]	2ml	0,1ml	0,1ml, 2ml	2ml
Bestrahlungszeit [s / h]	1h and 10h	Varied	1800s and 3600s	1800s-5400s
Wellenlänge [nm]	425nm and 850nm	800nm	400nm	800nm
Pulsweite [fs]	80fs	80fs	80fs	80fs
Repetitionsrate [kHz] / [MHz]	80MHz	1kHz	1kHz	80MHz
Mittlere Laserleistung [mW]	100mW	161,5mW-2200mW	58mW	520mW
Laserdurchmesser [ $\mu\text{m}$ ] / [mm]	1 $\mu\text{m}$ -100 $\mu\text{m}$	4mm	2mm	100 $\mu\text{m}$
Leistungsdichte [GW/cm <sup>2</sup> ]	1 GW/cm <sup>2</sup> -100GW/cm <sup>2</sup>	5GW/cm <sup>2</sup> -68GW/cm <sup>2</sup>	1,6GW/cm <sup>2</sup> and 18GW/cm <sup>2</sup>	1GW/cm <sup>2</sup>

\* Ti:Saphir – Laser Spitfire XP von Newport Spectra Physics

\*\* Tsunami Femtosekundenlaser von Newport Spectra Physics

Vergleich der Parameter von früher veröffentlichten Studien [81] [82] im Vergleich zu den Parametern in unserem Experiment A mit dem Ti:Saphir – Laser Spitfire XP von Newport Spectra Physics und mit dem Experiment B mit dem Tsunami Femtosekundenlaser von Newport Spectra Physics.

Tab. 13: [Test zu Tab. 3].

Variable (n=2)		Mittelwert	Standard- abweichung	95% Konfidenz- intervall	p-Wert
Differenz des Anteils toter Zellen		0	1.41	[-12.71; 12.71]	1

Vorversuche mit HGF. Ergebnisse eines ungerichteten t-tests, ob der Unterschied des Anteils toter HGF in Kontroll- und bestrahlter Gruppe signifikant verschieden von null ist [Test zu Tab. 3].

Tab. 14: [Test zu Tab. 4].

Variable (n=9)		Mittelwert	Standard- abweichung	95% Konfidenz- intervall	p-Wert
Differenz des Anteils toter Zellen		0.44	0.88	[-0.23; 1.12]	0.17

Ergebnisse eines ungerichteten t-tests, ob der Unterschied des Anteils toter HGF in Kontroll- und bestrahlter Gruppe signifikant verschieden von null ist [Test zu Tab. 4].

Tab. 15: [Test zu Tab. 5]

Variable (n=4)		Mittelwert	Standard- abweichung	95% Konfidenz- intervall	p-Wert
Differenz des Anteils toter Zellen		-49.25	56.29	[-138.82; 40.32]	0.18

Ergebnisse eines ungerichteten t-tests, ob der Unterschied des Anteils toter HGF in Kontroll- und bestrahlter Gruppe signifikant verschieden von null ist [Test zu Tab. 5].

Tab. 16: [Test zu Tab. 6].

Variable (n=6)		Mittelwert	Standard- abweichung	95% Konfidenz- intervall	p-Wert
Differenz des Anteils toter Zellen		-0.17	0.75	[-0.95; 0.62]	0.61

Ergebnisse eines ungerichteten t-tests, ob der Unterschied des Anteils toter S. mutans in Kontroll- und bestrahlter Gruppe signifikant verschieden von null ist [Test zu Tab. 6].

Tab. 17: [Test zu Tab. 7].

Variable (n=9)		Mittelwert	Standard- abweichung	95% Konfidenz- intervall	p-Wert
Differenz des Anteils toter Zellen		-0.11	0.78	[-0.71; 0.48]	0.68

Ergebnisse eines ungerichteten t-tests, ob der Unterschied des Anteils toter S. mutans in Kontroll- und bestrahlter Gruppe signifikant verschieden von null ist [Test zu Tab. 7].

Tab. 18: [Test zu Tab. 8].

Variable (n=6)	Mittelwert	Standard- abweichung	95% Konfidenz- intervall	p-Wert
Differenz des Anteils toter Zellen	0.33	1.03	[-0.75; 1.42]	0.47

Ergebnisse eines ungerichteten t-tests, ob der Unterschied des Anteils toter S. mutans in Kontroll- und bestrahlter Gruppe signifikant verschieden von null ist [Test zu Tab. 8].

Tab. 19: [Test zu Tab. 9].

Variable (n=7)	Mittelwert	Standard- abweichung	95% Konfidenz- intervall	p-Wert
Differenz des Anteils toter Zellen	-0.43	0.98	[-1.33; 0.47]	0.29

Ergebnisse eines ungerichteten t-tests, ob der Unterschied des Anteils toter E. coli in Kontroll- und bestrahlter Gruppe signifikant verschieden von null ist [Test zu Tab. 9].

Tab. 20: [Test zu Tab. 10].

Variable (n=9)	Mittelwert	Standard- abweichung	95% Konfidenz- intervall	p-Wert
Differenz des Anteils toter Zellen	-0.66	1.22	[-1.61; 0.27]	0.14

Ergebnisse eines ungerichteten t-tests, ob der Unterschied des Anteils toter E. coli in Kontroll- und bestrahlter Gruppe signifikant verschieden von null ist [Test zu Tab. 10].

Tab. 21: [Test zu Tab. 11].

Variable (n=6)	Mittelwert	Standard- abweichung	95% Konfidenz- intervall	p-Wert
Differenz des Anteils toter Zellen	-49.17	38.79	[-89.87; -8.46]	0.03

Ergebnisse eines ungerichteten t-tests, ob der Unterschied des Anteils toter E. coli in Kontroll- und bestrahlter Gruppe signifikant verschieden von null ist [Test zu Tab. 11].

Tab. 22: [aus Tab. 3, 4, 5].

Variablen	Koeffizient	Standfehler	p-Wert
Mittlere Laserleistung	0.00	0.02	0.85
Leistungsdichte	0.30	0.43	0.51
Bestrahlungszeit	-0.01	0.01	0.20
Konstante	-7.05	18.76	0.71
F-Statistik (3,17)	1.38		
R <sup>2</sup>	0.27		
Beobachtungen	15		

Ergebnisse einer Regressionsanalyse, bei der der Einfluss unabhängiger Variablen auf die Differenz des Anteils toter HGF zwischen Kontroll- und bestrahlter Gruppe untersucht wird. Die Analyse wurde aus den Tab. 3, 4 und 5 erstellt.

Tab. 23: [aus Tab. 6, 7, 8].

Variablen	Koeffizient	Standfehler	p-Wert
Mittlere Laserleistung	0.00	0.00	0.37
Leistungsdichte	0.02	0.02	0.30
Bestrahlungszeit	0.00	0.00	0.66
Konstante	-0.09	0.45	0.85
F-Statistik (3,17)	0.41		
R <sup>2</sup>	0.07		
Beobachtungen	21		

Ergebnisse einer Regressionsanalyse, bei der der Einfluss unabhängiger Variablen auf die Differenz des Anteils toter S. mutans - Zellen zwischen Kontroll- und bestrahlter Gruppe untersucht wird. Die Analyse wurde aus den Tab. 6, 7 und 8 erstellt.

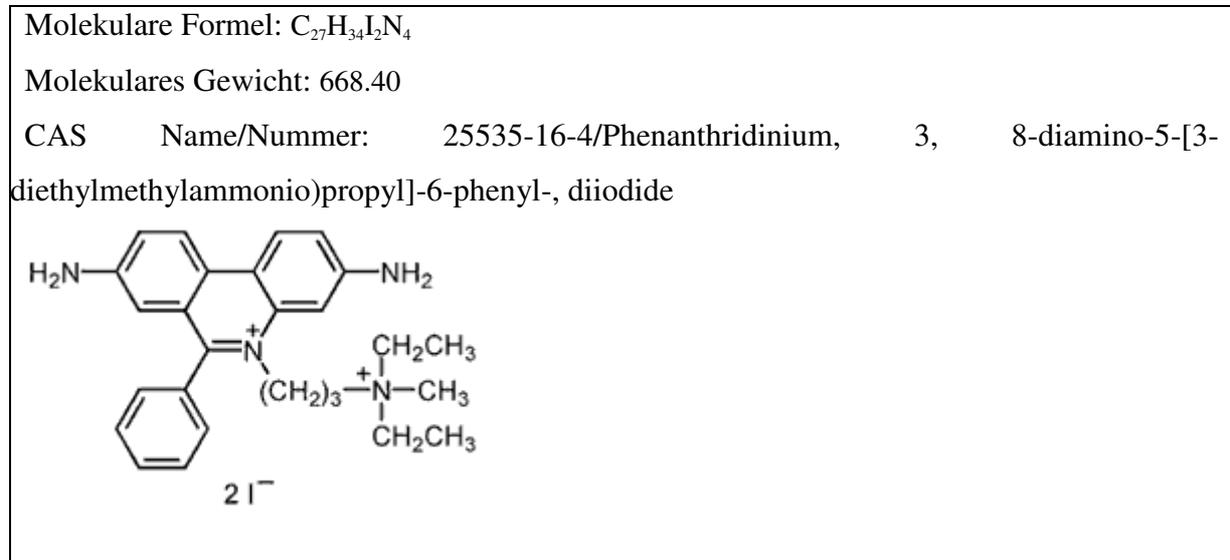
Tab. 24: [aus Tab. 9, 10, 11].

<b>Variablen</b>		<b>Koeffizient</b>	<b>Standfehler</b>	<b>p-Wert</b>
Mittlere Laserleistung		0.07	0.01	0.00
Leistungsdichte		-2.04	0.28	0.00
Bestrahlungszeit		-0.002	0.00	0.06
Konstante		-19.97	6.00	0.01
F-Statistik (3,18)		21.9		
R <sup>2</sup>		0.79		
Beobachtungen		22		

Ergebnisse einer Regressionsanalyse, bei der der Einfluss unabhängiger Variablen auf die Differenz des Anteils toter E. coli - Zellen zwischen Kontroll- und bestrahlter Gruppe untersucht wird. Die Analyse wurde aus den Tab. 9, 10 und 11 erstellt.

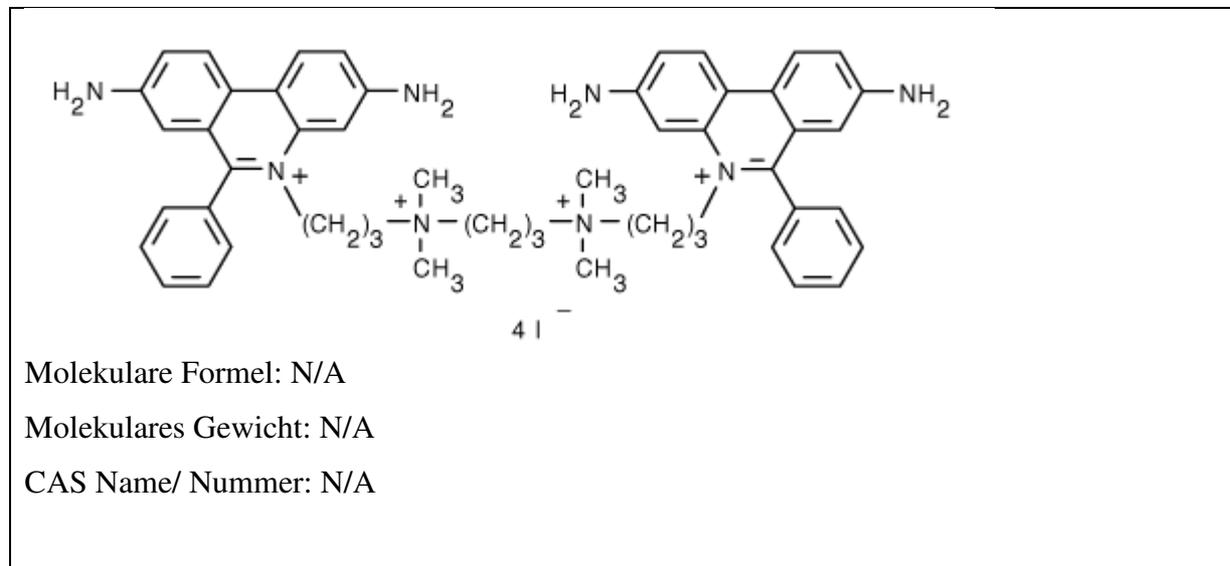
## 8.2. Abbildungen

Abb. 1



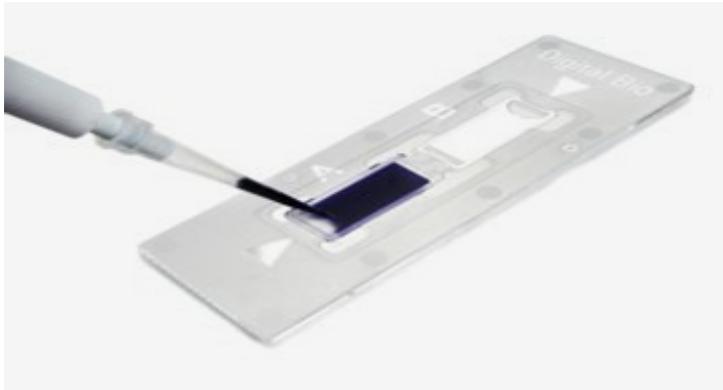
Struktureller Aufbau von Propidiumjodid, das in dem Färbe Kit LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kit # (L 7012) von Invitrogen enthalten ist und die Bakterien rot färbt.

Abb. 2



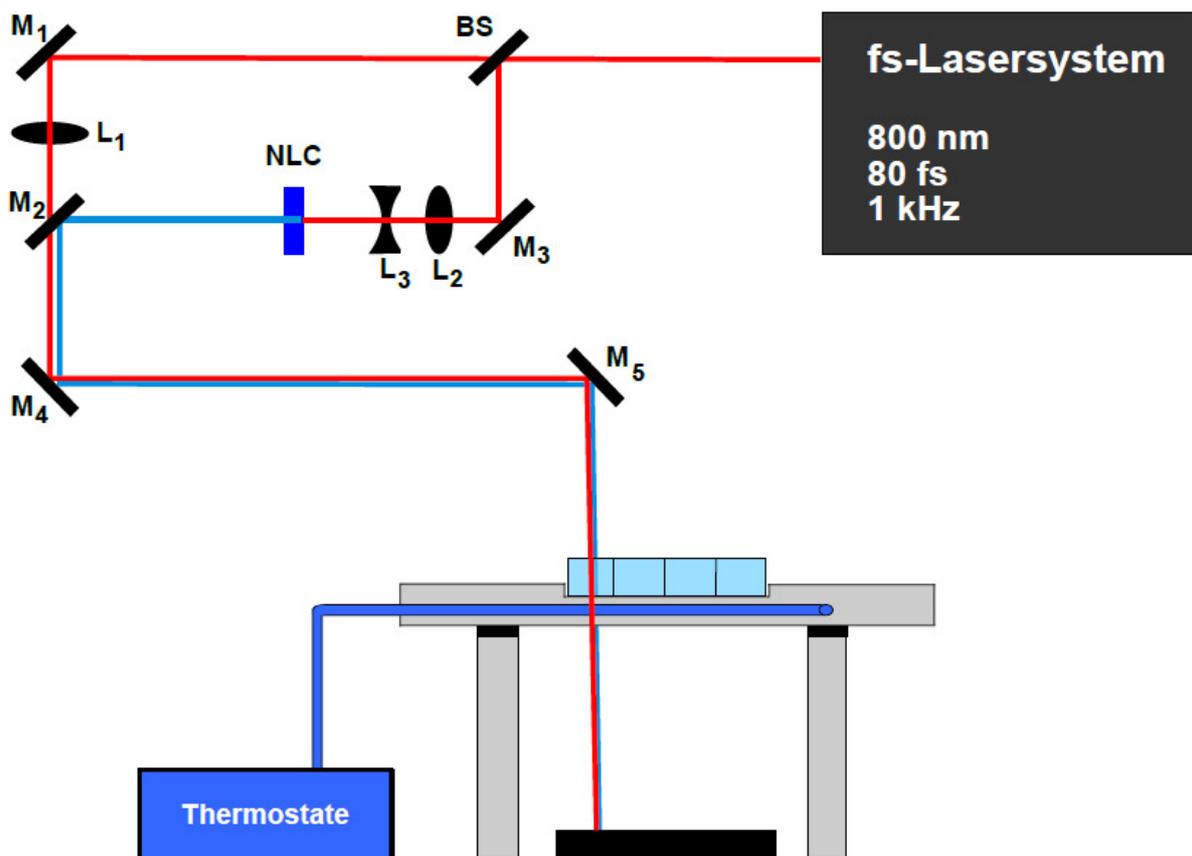
Struktureller Aufbau von DEAD<sup>™</sup>Red (Ethidiumhomodimer-2), das in dem LIVE/DEAD<sup>®</sup>Reduced Biohazard Viability/Cytotoxicity Kit# (L 7013) von Invitrogen enthalten ist und die humanen Zellen rot färbt.

Abb. 3:



PeQLab C-Chip zum Auszählen von Bakterien mit zwei separaten Zählkammern für die Auswertung bestrahlter und unbestrahlter Bakterien.

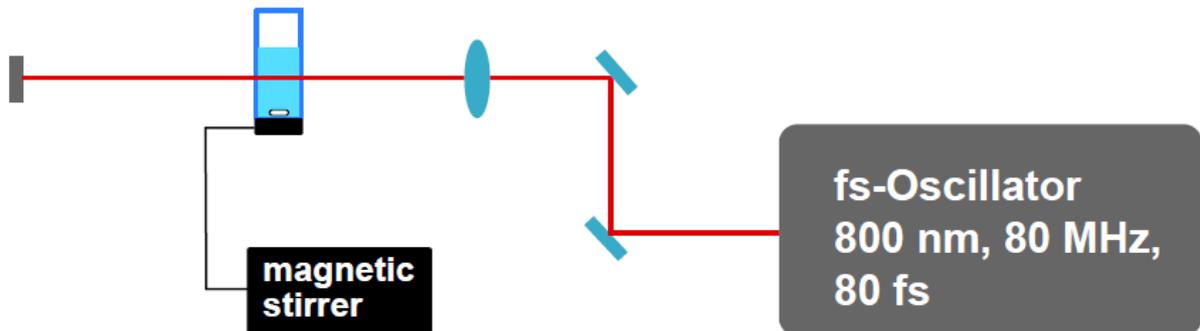
Abb. 4



Experimenteller Aufbau mit einer Repetitionsrate von 1kHz und einerseits einer Wellenlänge von 800nm und andererseits mit der zweiten Harmonischen von  $\lambda = 400\text{nm}$ . Der Laserstrahl wird mit einem Strahlenteiler [beamsplitter (BS)] in zwei Laserstrahle aufgesplittet. Als erstes wird der Laserstrahldurchmesser durch Teleskoplinsen ( $L_2$  and  $L_3$ ) verringert und dann durch

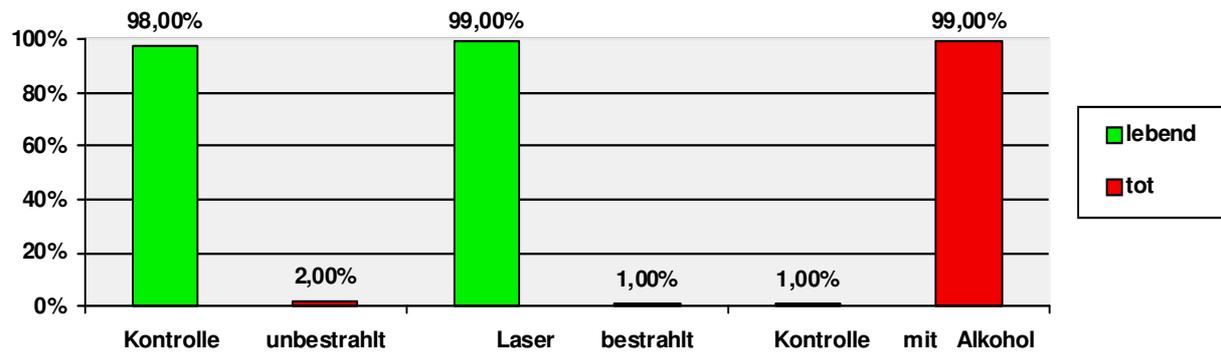
einen nichtlinearen Kristall [Non linear crystal (NLC)] geleitet, um eine zweite Harmonische bei 400nm zu generieren. Für das Experiment mit 800nm kann ein Spiegel entfernt werden. Die Linse  $L_1$  verringert den Strahldurchmesser für die Probe auf 4mm.

Abb.5



Experimenteller Aufbau bei einer Zentralwellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$  und einer Repetitionsrate von 80MHz. Für die Bestrahlung wird der Laserstrahl auf die Küvette mit der Probenlösung fokussiert, die mit einem magnetischen Rührstab vermischt wird. Der Durchmesser des Laserstrahls ohne jegliche Optik beträgt etwa 3mm. Um höhere Leistungsdichten zu erhalten, wird der Strahl auf einen Durchmesser von  $100\mu\text{m}$  mit einer Linse von 100mm Brennweite fokussiert.

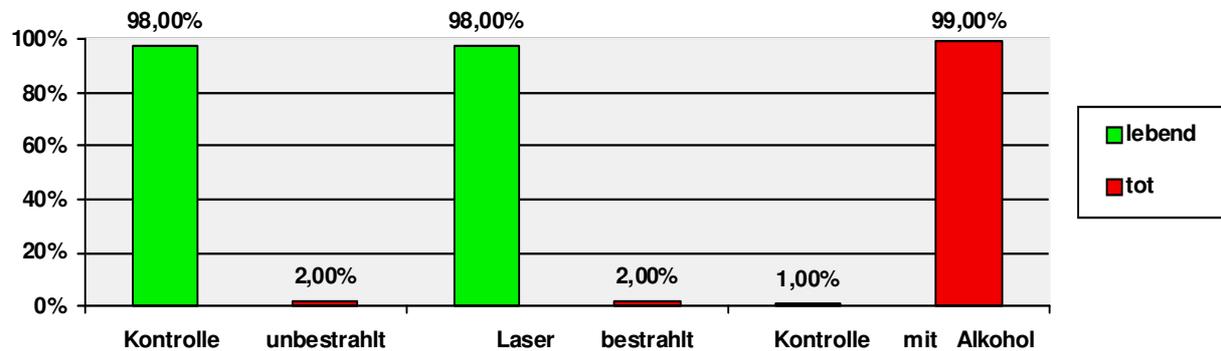
Abb. 6



Repetitionsrate [MHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
80	0,1	520	116	3600	1,8 x 10 <sup>5</sup>	104

Graphik zu Tabelle 4; HGF mit einer Wellenlänge von  $\lambda= 800\text{nm}$ , Repetitionsraten von 1kHz und 80MHz und einem Laserdurchmesser von 4mm und einer Pulslänge von 80fs

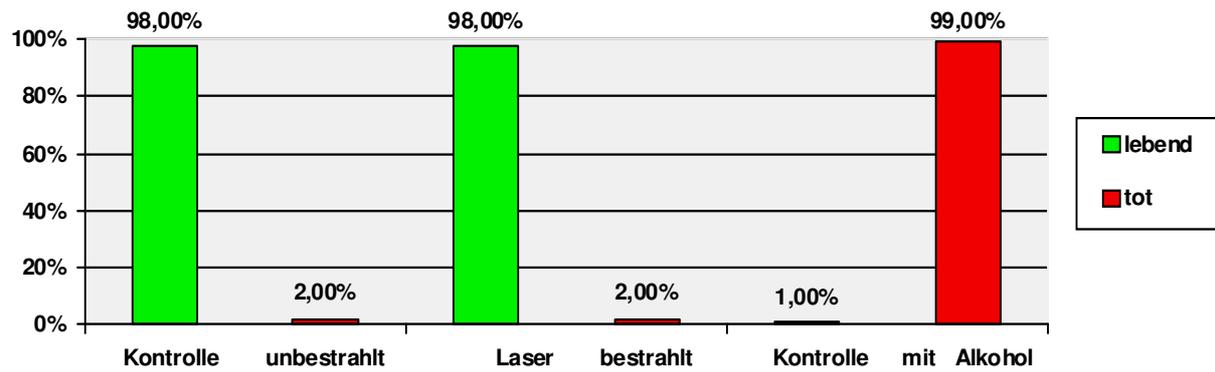
Abb. 7



Repetitionsrate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	0,1	161,5	5	110	1,8 x 10 <sup>5</sup>	1

Graphik zu Tabelle 4; HGF mit einer Wellenlänge von  $\lambda= 800\text{nm}$ , Repetitionsraten von 1kHz und 80MHz und einem Laserdurchmesser von 4mm und einer Pulslänge von 80fs

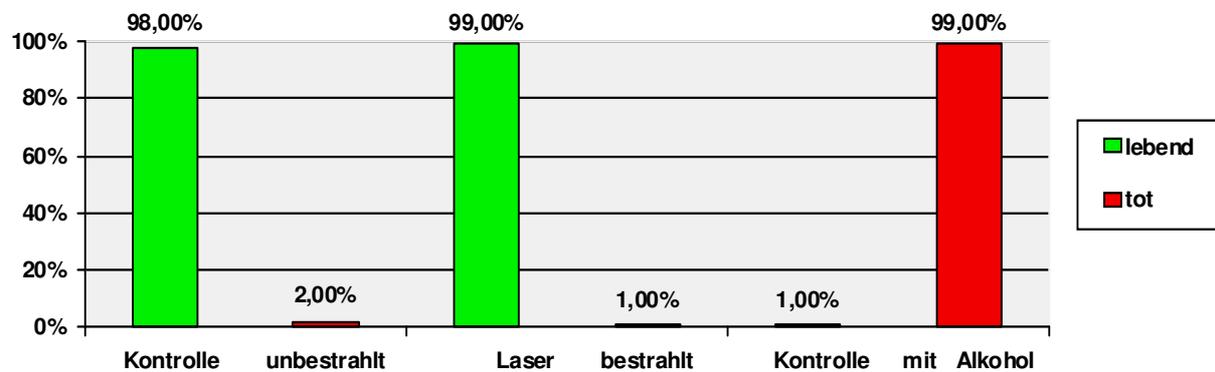
Abb. 8



Repetitions-rate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungs-zeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	0,1	646	20	27	1,8 x 10 <sup>5</sup>	1

Graphik zu Tabelle 4; HGF mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , Repetitionsraten von 1kHz und 80MHz und einem Laserdurchmesser von 4mm und einer Pulslänge von 80fs

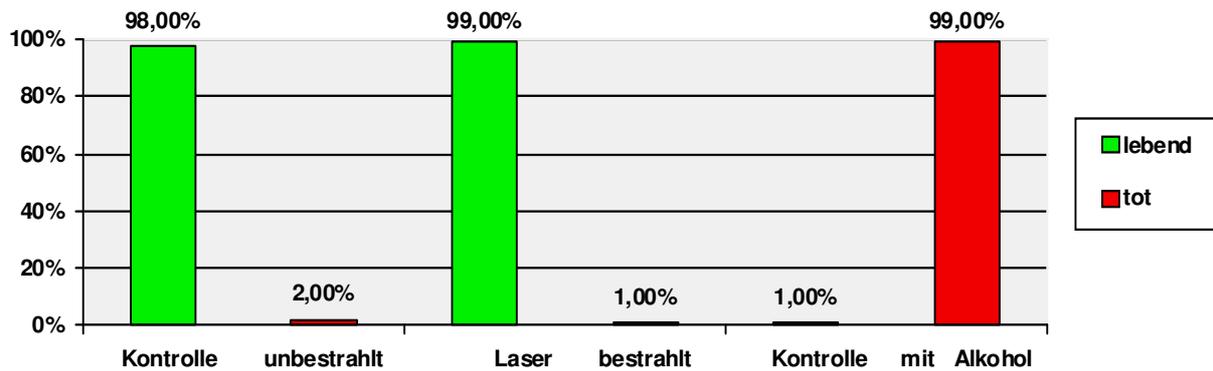
Abb. 9



Repetitions-rate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungs-zeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	0,1	969	30	18	1,8 x 10 <sup>5</sup>	1

Graphik zu Tabelle 4; HGF mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , Repetitionsraten von 1kHz und 80MHz und einem Laserdurchmesser von 4mm und einer Pulslänge von 80fs

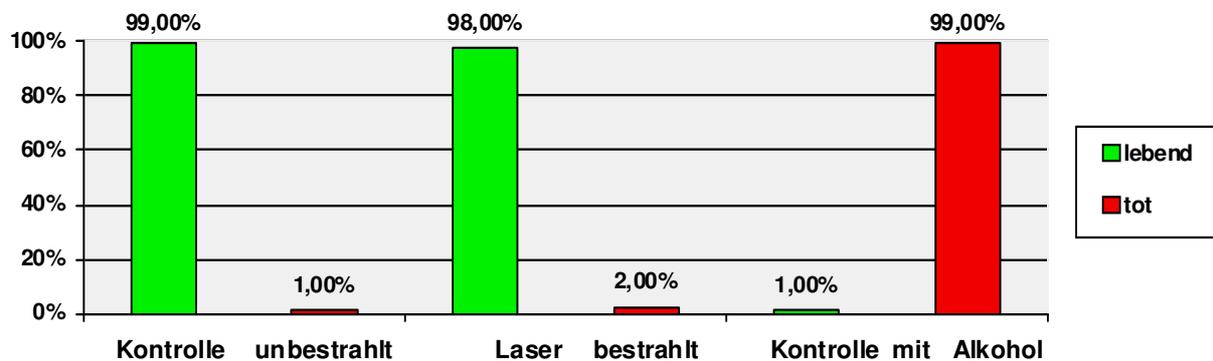
Abb. 10



Repetitionsrate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	0,1	1615	50	11	1,8 x 10 <sup>5</sup>	1

Graphik zu Tabelle 4; HGF mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , Repetitionsraten von 1kHz und 80MHz und einem Laserdurchmesser von 4mm und einer Pulslänge von 80fs

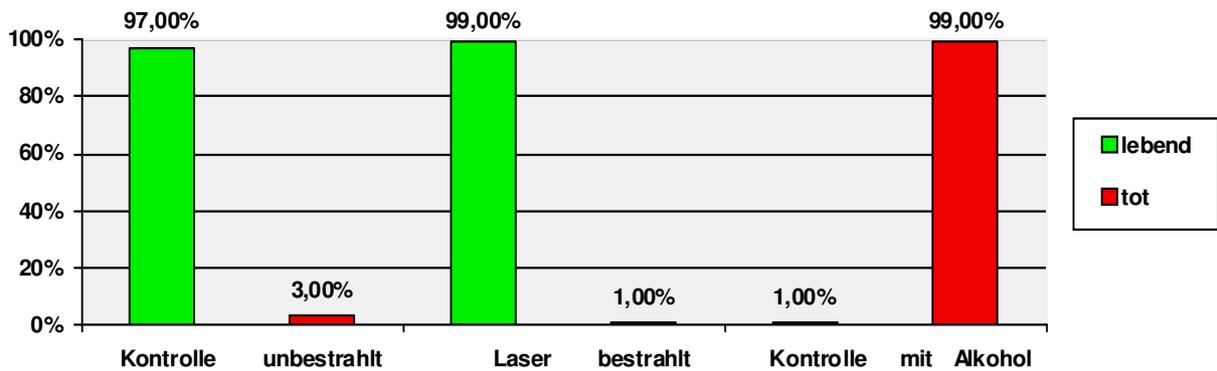
Abb. 11



Repetitionsrate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	0,1	1615	50	22	1,8 x 10 <sup>5</sup>	2

Graphik zu Tabelle 4; HGF mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , Repetitionsraten von 1kHz und 80MHz und einem Laserdurchmesser von 4mm und einer Pulslänge von 80fs

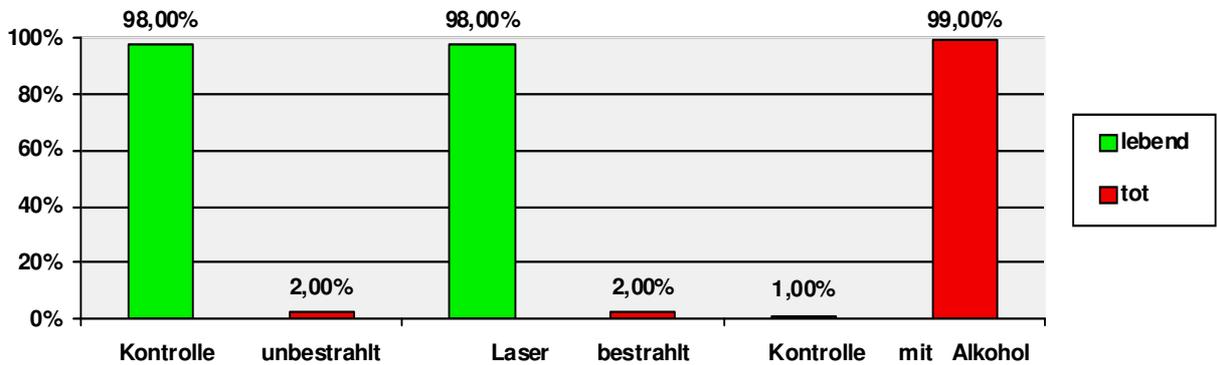
Abb. 12



Repetitionsrate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	0,1	1615	50	44	1,8 x 10 <sup>5</sup>	4

Graphik zu Tabelle 4; HGF mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , Repetitionsraten von 1kHz und 80MHz und einem Laserdurchmesser von 4mm und einer Pulslänge von 80fs

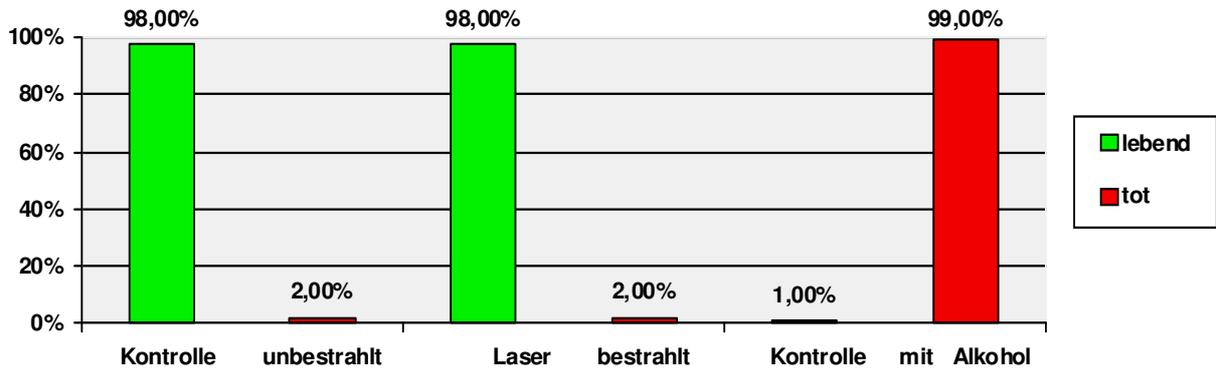
Abb. 13:



Repetitionsrate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	0,1	2200	68	8,2	1,8 x 10 <sup>5</sup>	1

Graphik zu Tabelle 4; HGF mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , Repetitionsraten von 1kHz und 80MHz und einem Laserdurchmesser von 4mm und einer Pulslänge von 80fs

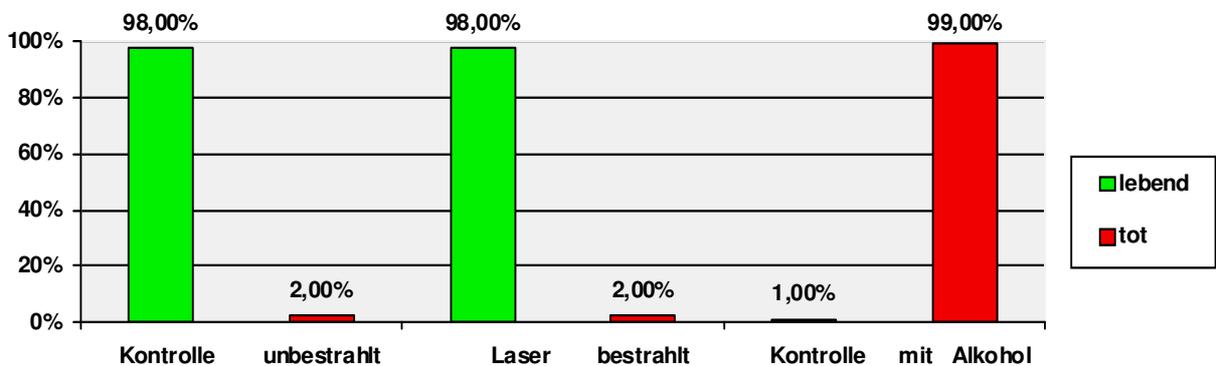
Abb. 14



Repetitionsrate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	0,1	2200	68	16,4	1,8 x 10 <sup>5</sup>	2

Graphik zu Tabelle 4; HGF mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , Repetitionsraten von 1kHz und 80MHz und einem Laserdurchmesser von 4mm und einer Pulslänge von 80fs

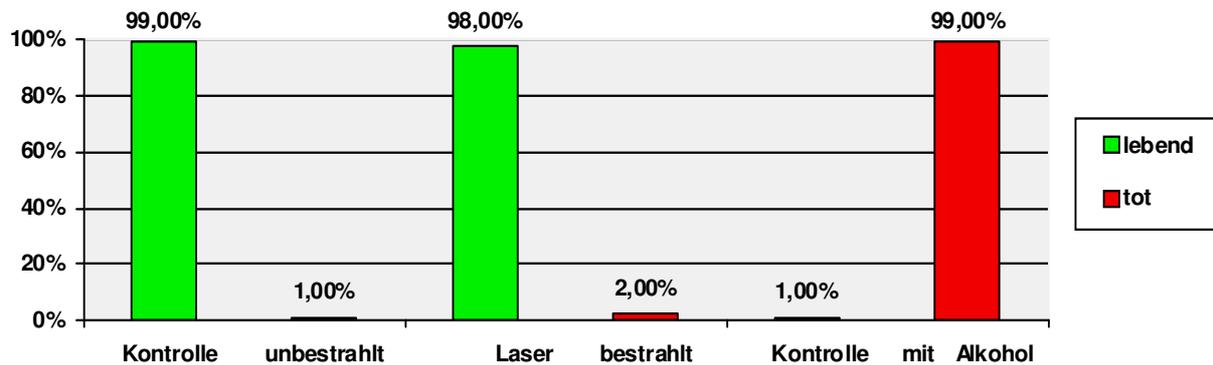
Abb. 15



Repetitionsrate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	0,1	58	1,6	1800	1,8 x 10 <sup>5</sup>	5,8

Graphik zu Tabelle 5; HGF mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 400\text{nm}$ , einer Repetitionsrate von 1kHz und einem Laserdurchmesser von 2mm und einer Pulslänge von 80fs

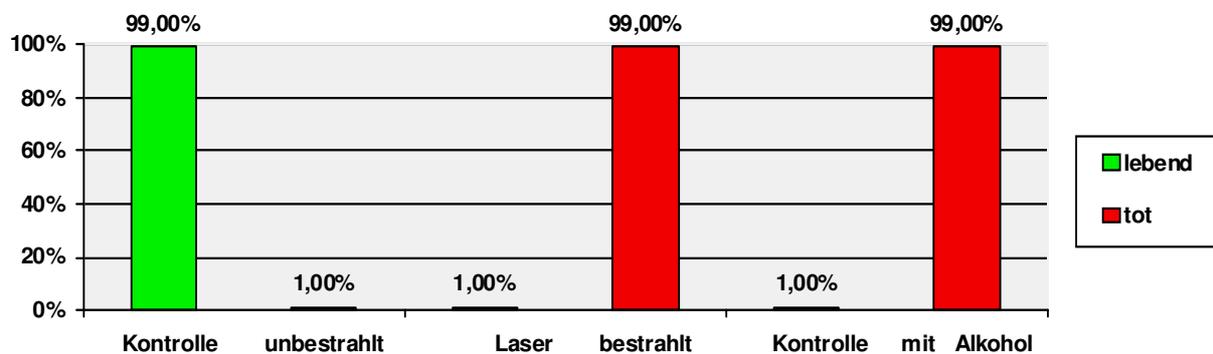
Abb. 16



Repetitionsrate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	0,1	58	1,6	3600	1,8 x 10 <sup>5</sup>	11,6

Graphik zu Tabelle 5; HGF mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 400\text{nm}$ , einer Repetitionsrate von 1kHz und einem Laserdurchmesser von 2mm und einer Pulslänge von 80fs

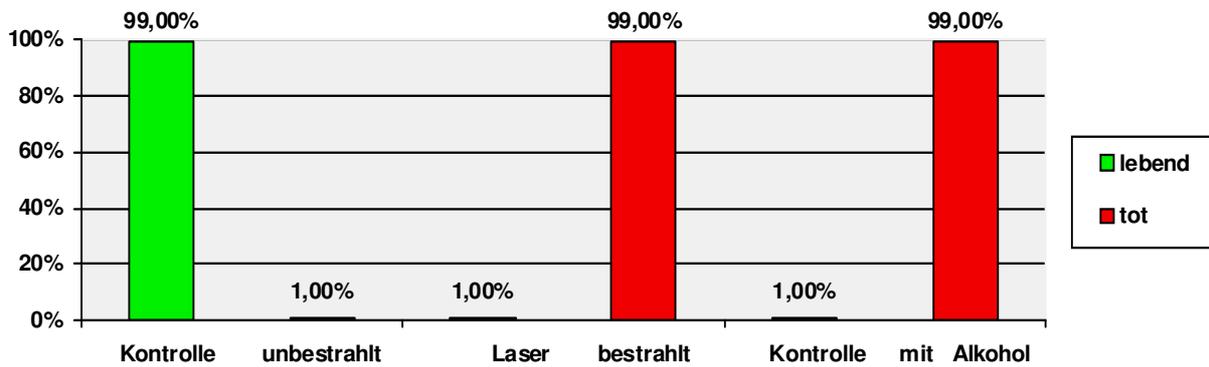
Abb. 17



Repetitionsrate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	0,1	58	18	1800	1,8 x 10 <sup>5</sup>	5,8

Graphik zu Tabelle 5; HGF mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 400\text{nm}$ , einer Repetitionsrate von 1kHz und einem Laserdurchmesser von 2mm und einer Pulslänge von 80fs

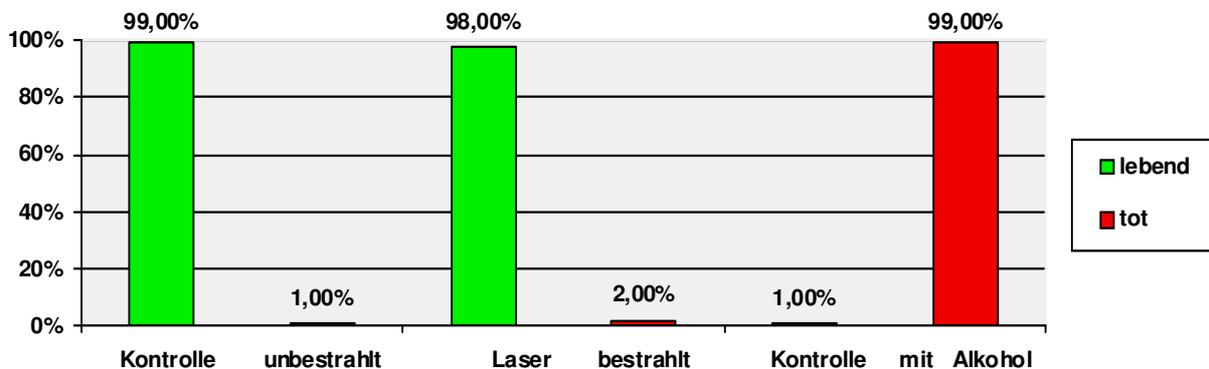
Abb. 18



Repetitionsrate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	0,1	58	18	3600	$1,8 \times 10^5$	11,6

Graphik zu Tabelle 5; HGF mit einer Wellenlänge von  $\lambda=400\text{nm}$ , einer Repetitionsrate von 1kHz und einem Laserdurchmesser von 2mm und einer Pulslänge von 80fs

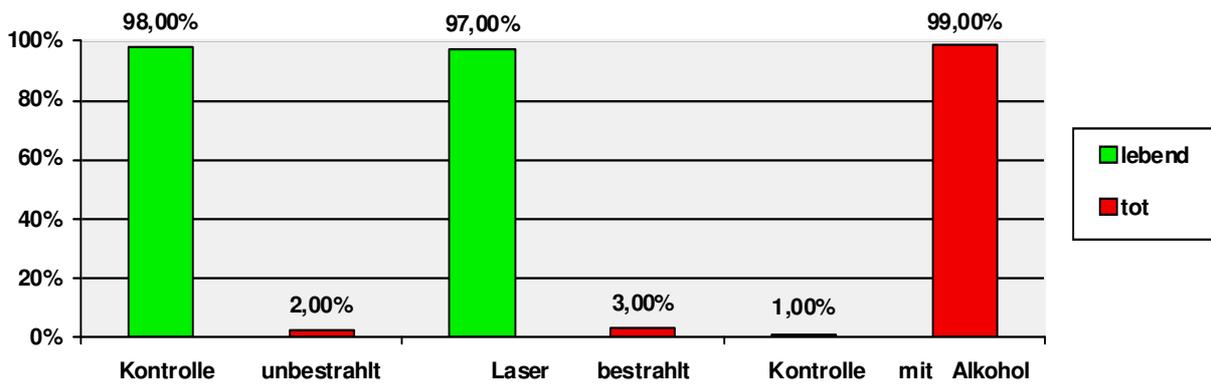
Abb. 19



Repetitionsrate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	0,1	161,5	5	110	$1,8 \times 10^5$	1

Graphik zu Tabelle 6; S. mutans mit einer Wellenlänge von  $\lambda=800\text{nm}$ , einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 4mm und einer Pulslänge von 80fs

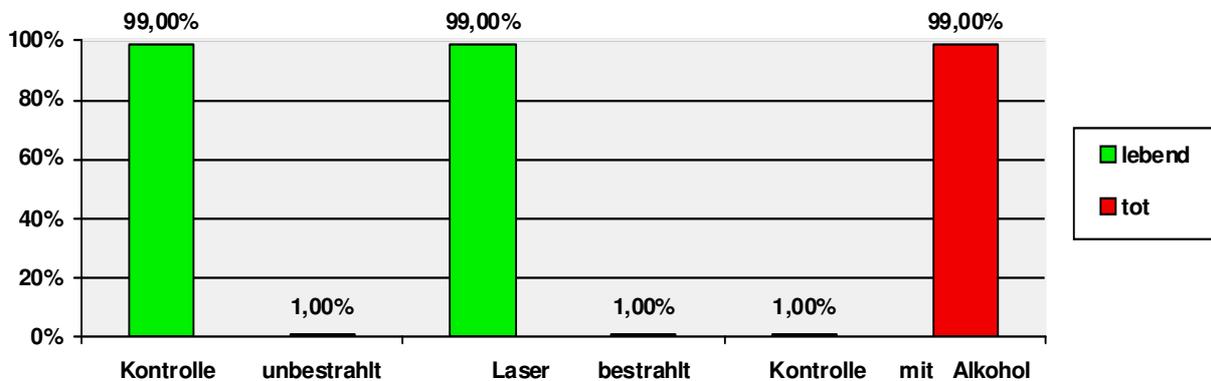
Abb. 20



Repetitions-rate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungs-zeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	0,1	2200	68	8,2	$1,8 \times 10^5$	1

Graphik zu Tabelle 6; S. mutans mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 4mm und einer Pulslänge von 80fs

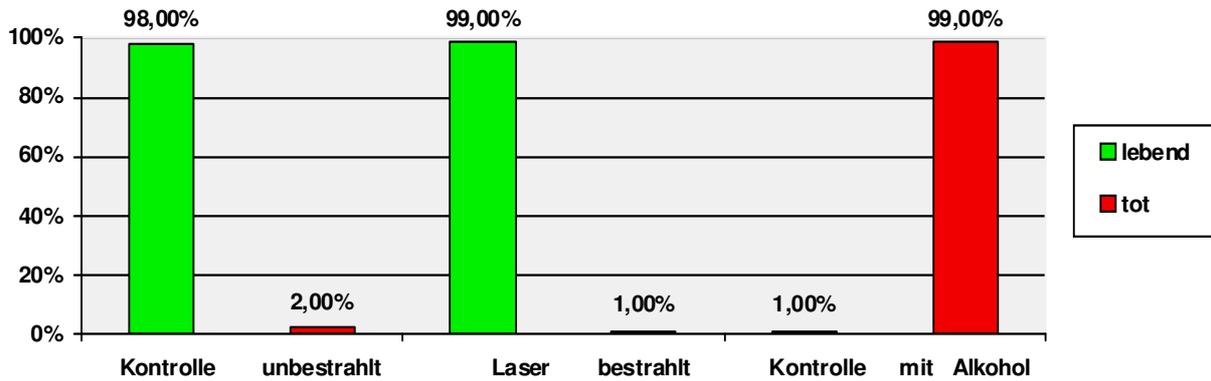
Abb. 21



Repetitions-rate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungs-zeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	0,1	2200	68	110	$1,8 \times 10^5$	13

Graphik zu Tabelle 6; S. mutans mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 4mm und einer Pulslänge von 80fs

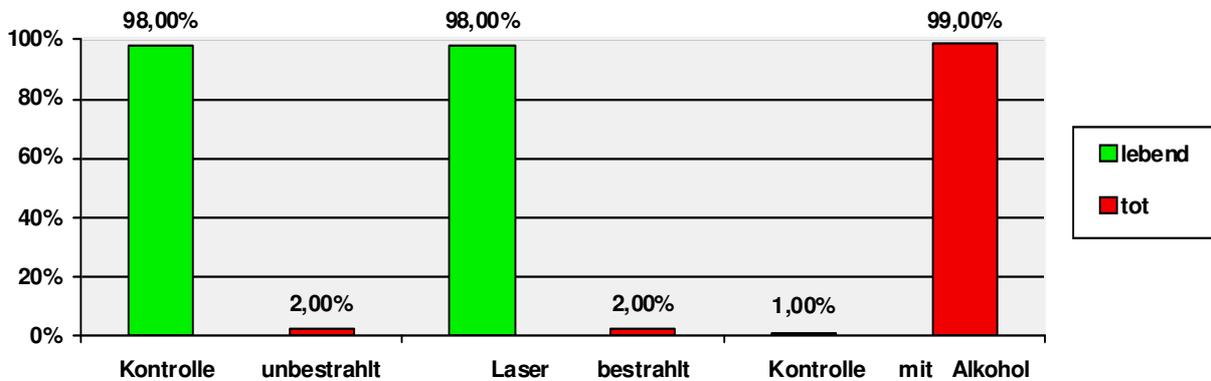
Abb. 22



Repetitions-rate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungs-zeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	0,1	2200	68	30	1,8 x 10 <sup>5</sup>	3,5

Graphik zu Tabelle 6; S. mutans mit einer Wellenlänge von  $\lambda= 800\text{nm}$ , einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 4mm und einer Pulslänge von 80fs

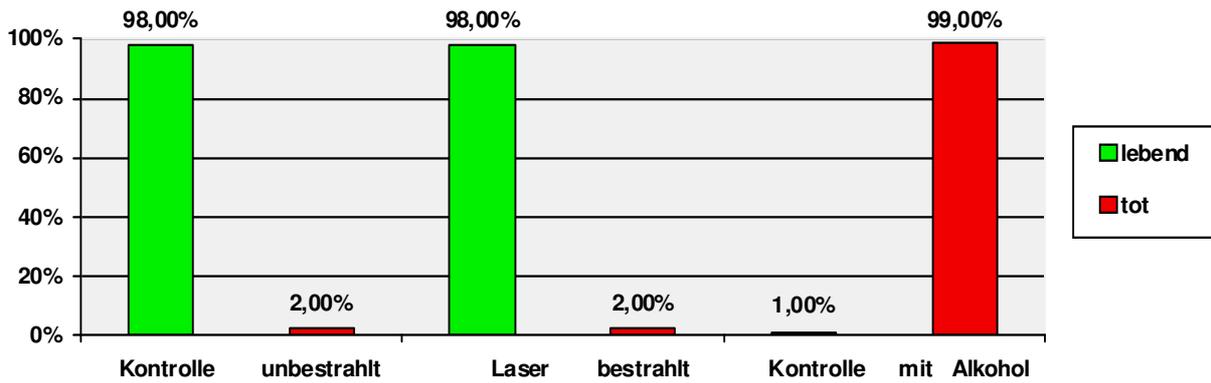
Abb. 23



Repetitions-rate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungs-zeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	0,1	2200	68	120	1,8 x 10 <sup>5</sup>	14,6

Graphik zu Tabelle 6; S. mutans mit einer Wellenlänge von  $\lambda= 800\text{nm}$ , einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 4mm und einer Pulslänge von 80fs

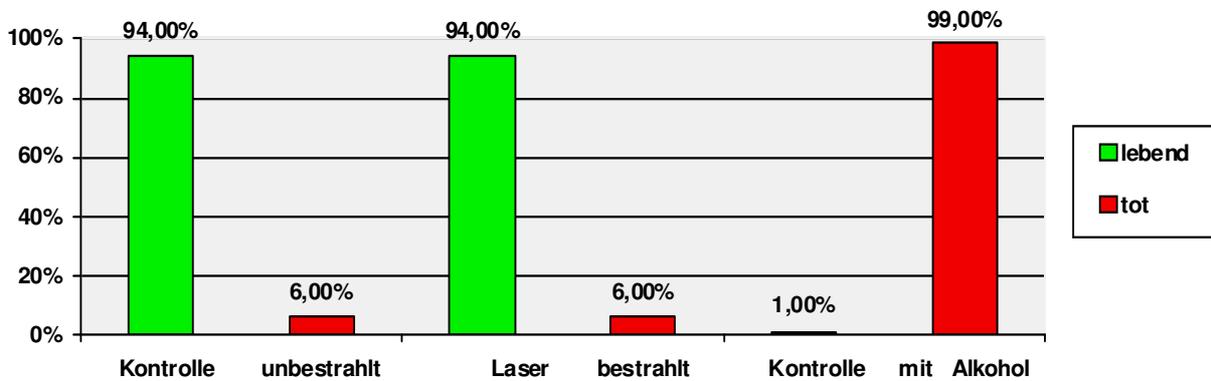
Abb. 24



Repetitions-rate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungs-zeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	0,1	2200	68	600	1,8 x 10 <sup>5</sup>	73

Graphik zu Tabelle 6; S. mutans mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 4mm und einer Pulslänge von 80fs

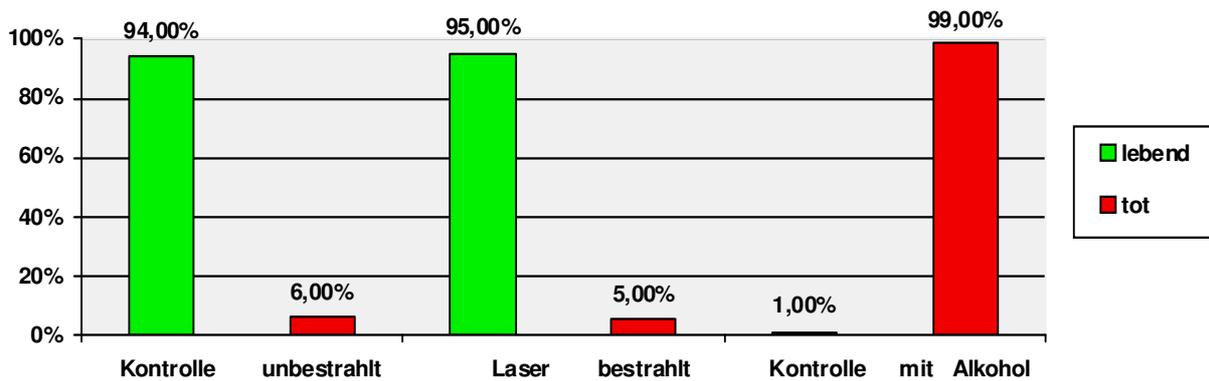
Abb. 25



Repetitions-rate [MHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungs-zeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
80	2	520	1	0	1,8 x 10 <sup>5</sup>	0

Graphik zu Tabelle 7; von S. mutans mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 80MHz, einem Laserdurchmesser von 100 $\mu\text{m}$  und einer Pulslänge von 80fs

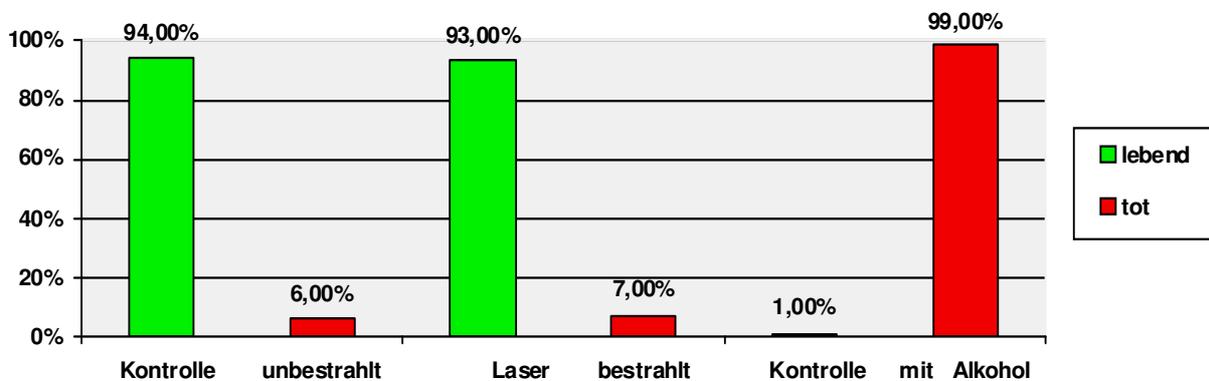
Abb. 26



Repetitionsrate [MHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
80	2	520	1	1800	1,8 x 10 <sup>5</sup>	2,5

Graphik zu Tabelle 7; von *S. mutans* mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 80MHz, einem Laserdurchmesser von 100 $\mu\text{m}$  und einer Pulslänge von 80fs

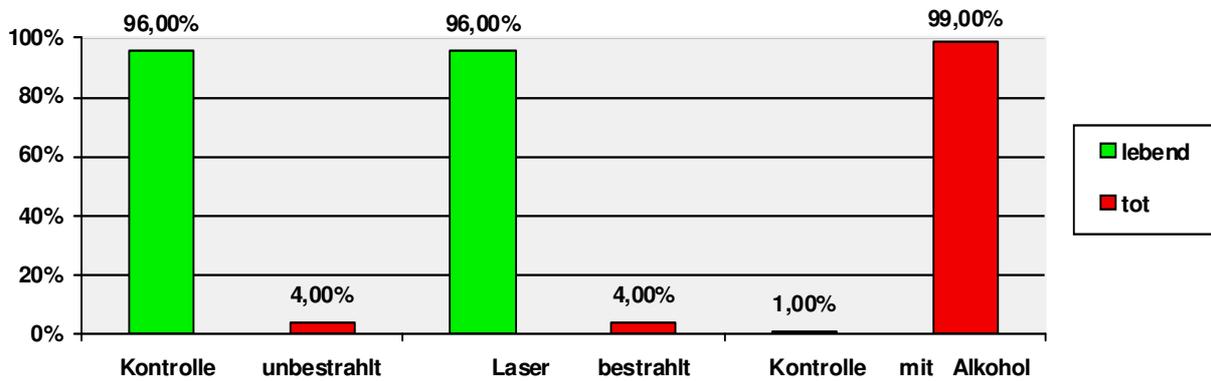
Abb. 27



Repetitionsrate [MHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
80	2	520	1	1800	1,8 x 10 <sup>5</sup>	2,5

Graphik zu Tabelle 7; von *S. mutans* mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 80MHz, einem Laserdurchmesser von 100 $\mu\text{m}$  und einer Pulslänge von 80fs

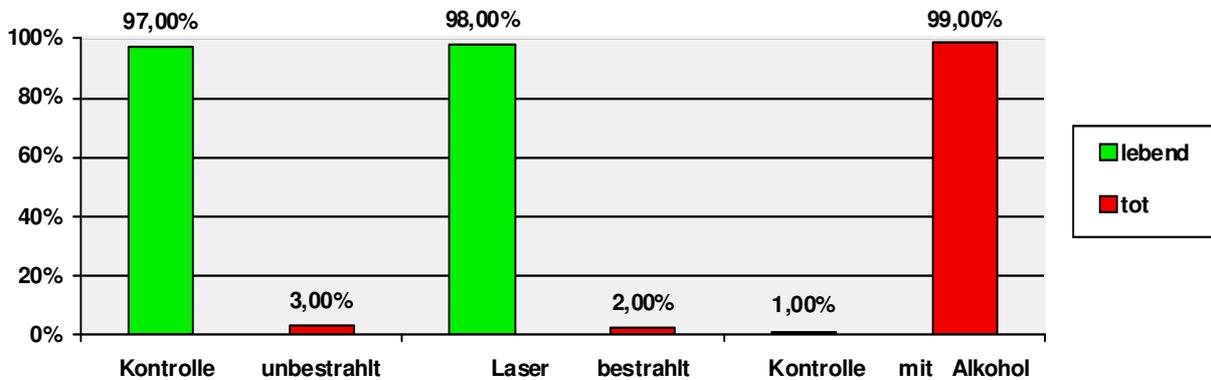
Abb. 28



Repetitionsrate [MHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
80	2	520	1	3600	1,8 x 10 <sup>5</sup>	5

Graphik zu Tabelle 7; von *S. mutans* mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 80MHz, einem Laserdurchmesser von 100 $\mu\text{m}$  und einer Pulslänge von 80fs

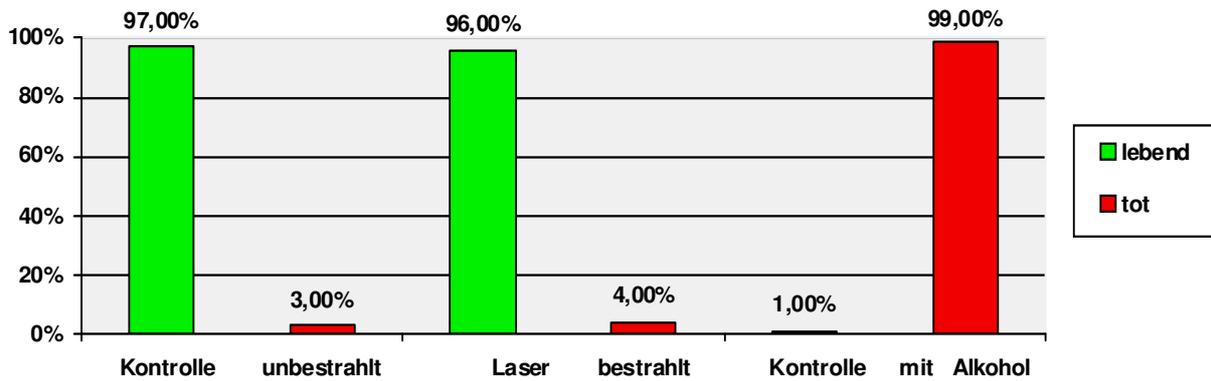
Abb. 29



Repetitionsrate [MHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
80	2	520	1	3600	1,8 x 10 <sup>5</sup>	5

Graphik zu Tabelle 7; von *S. mutans* mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 80MHz, einem Laserdurchmesser von 100 $\mu\text{m}$  und einer Pulslänge von 80fs

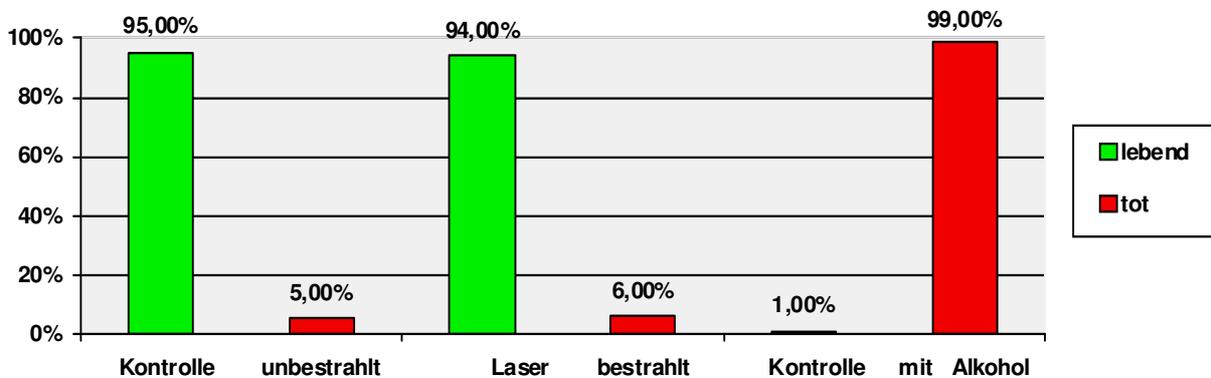
Abb. 30



Repetitionsrate [MHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
80	2	520	1	5400	1,8 x 10 <sup>5</sup>	7,8

Graphik zu Tabelle 7; von *S. mutans* mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 80MHz, einem Laserdurchmesser von 100 $\mu\text{m}$  und einer Pulslänge von 80fs

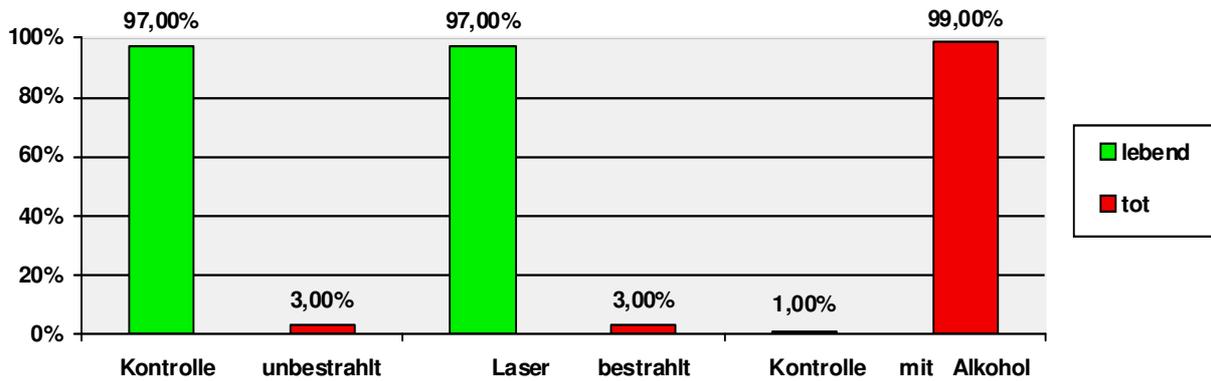
Abb. 31



Repetitionsrate [MHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
80	2	520	1	5400	1,8 x 10 <sup>5</sup>	7,8

Graphik zu Tabelle 7; von *S. mutans* mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 80MHz, einem Laserdurchmesser von 100 $\mu\text{m}$  und einer Pulslänge von 80fs

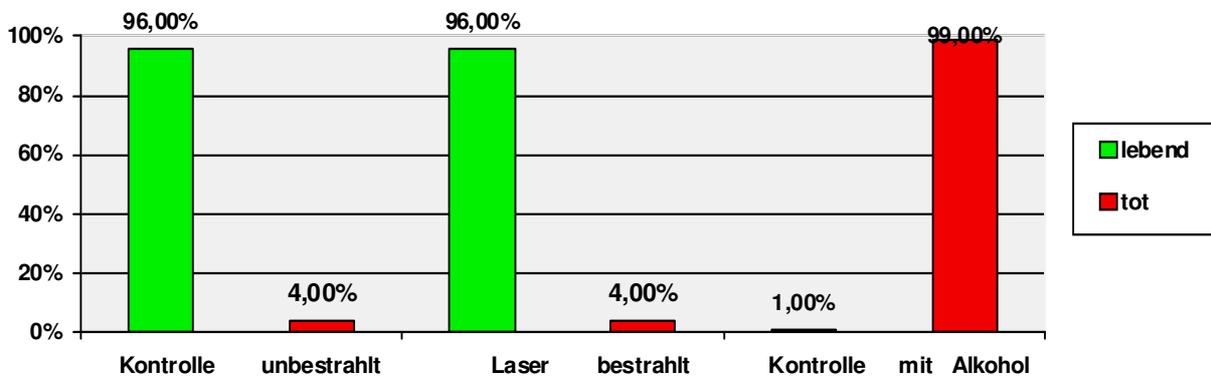
Abb. 32



Repetitionsrate [MHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
80	2	520	1	7200	1,8 x 10 <sup>5</sup>	10,4

Graphik zu Tabelle 7; von *S. mutans* mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 80MHz, einem Laserdurchmesser von 100 $\mu\text{m}$  und einer Pulslänge von 80fs

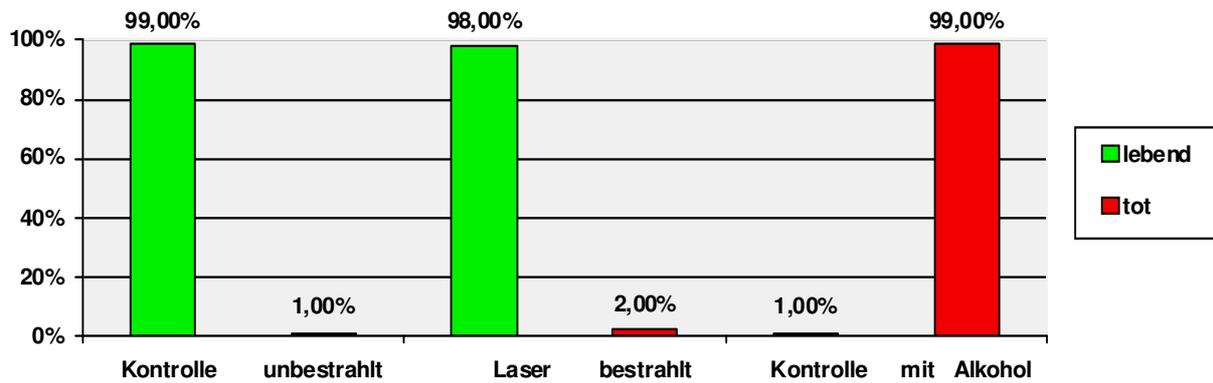
Abb. 33



Repetitionsrate [MHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
80	2	520	1	10800	1,8 x 10 <sup>5</sup>	15,6

Graphik zu Tabelle 7; von *S. mutans* mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 80MHz, einem Laserdurchmesser von 100 $\mu\text{m}$  und einer Pulslänge von 80fs

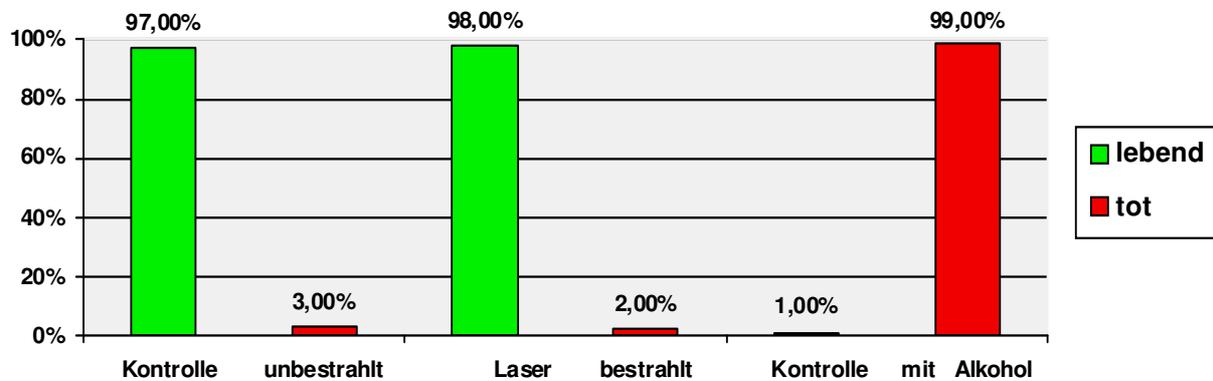
Abb. 34



Repetitions-rate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungs-zeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	2	58	1,6	3600	1,8 x 10 <sup>5</sup>	0,6

Graphik zu Tabelle8; S. mutans mit einer Wellenlänge von  $\lambda= 400\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 2mm und einer Pulsweite von 80fs

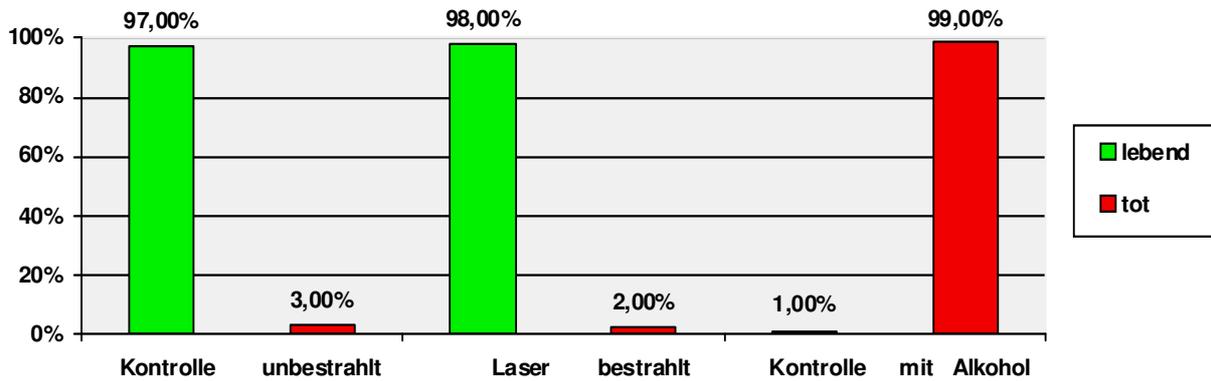
Abb. 35



Repetitions-rate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungs-zeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	2	58	1,6	3600	1,8 x 10 <sup>5</sup>	0,6

Graphik zu Tabelle8; S. mutans mit einer Wellenlänge von  $\lambda= 400\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 2mm und einer Pulsweite von 80fs

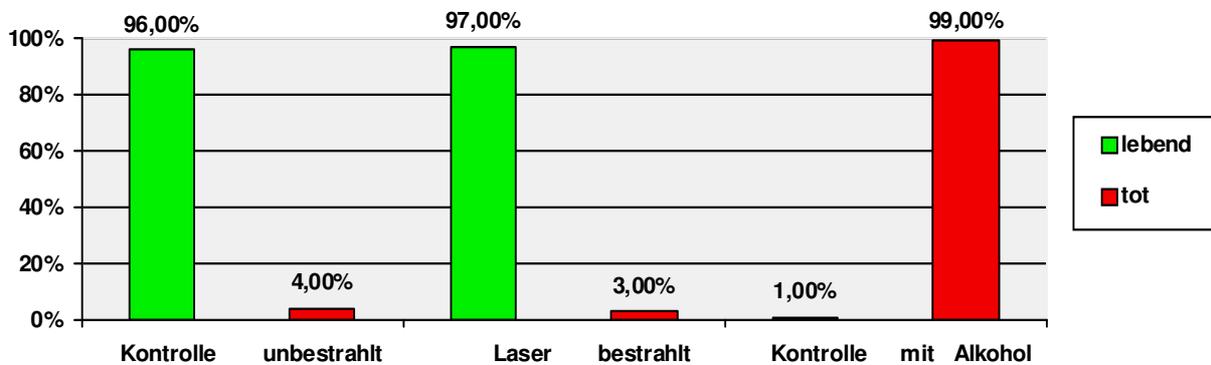
Abb. 36



Repetitions-rate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungs-zeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	2	58	18	3600	1,8 x 10 <sup>5</sup>	0,6

Graphik zu Tabelle8; S. mutans mit einer Wellenlänge von  $\lambda= 400\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 2mm und einer Pulsweite von 80fs

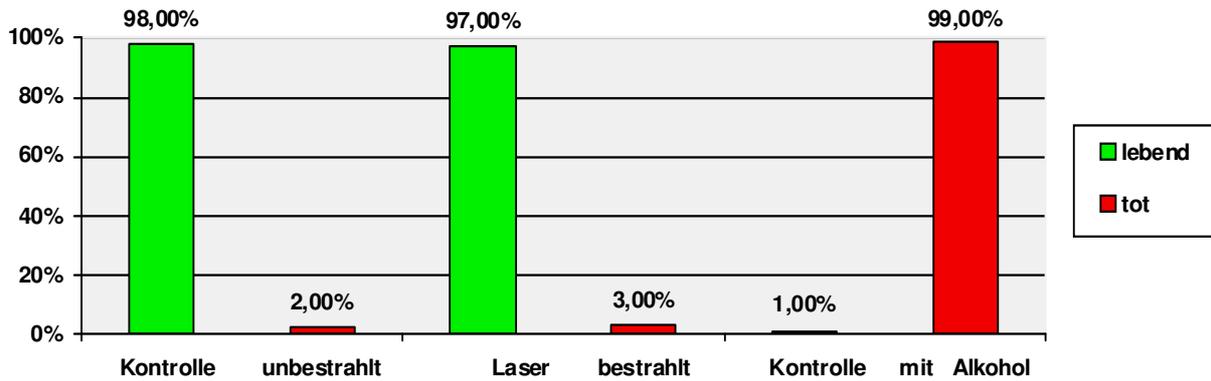
Abb. 37



Repetitions-rate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungs-zeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	2	58	18	3600	1,8 x 10 <sup>5</sup>	0,6

Graphik zu Tabelle8; S. mutans mit einer Wellenlänge von  $\lambda= 400\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 2mm und einer Pulsweite von 80fs

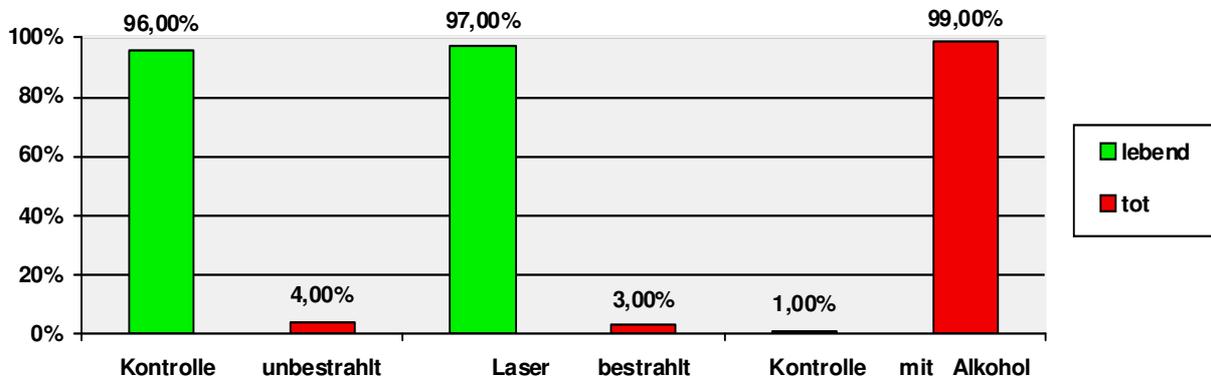
Abb. 38



Repetitionsrate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	2	58	18	3600	1,8 x 10 <sup>5</sup>	0,6

Graphik zu Tabelle8; S. mutans mit einer Wellenlänge von  $\lambda= 400\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 2mm und einer Pulsweite von 80fs

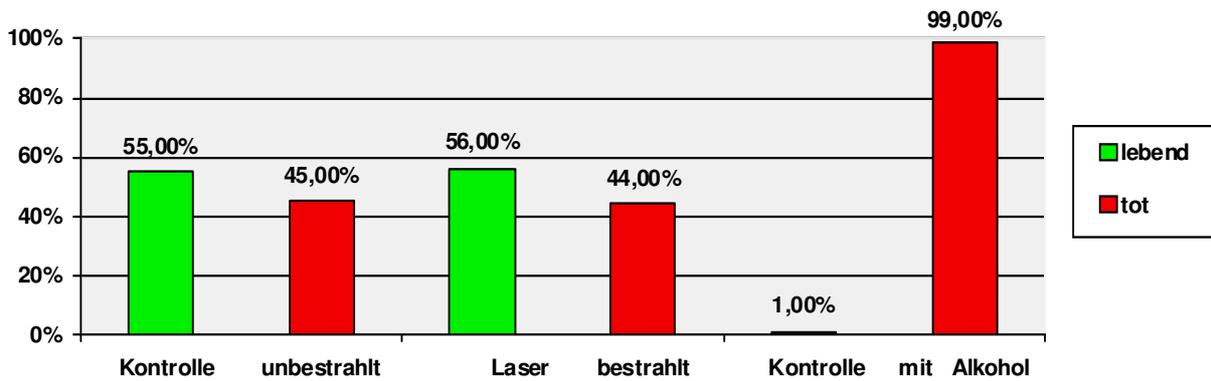
Abb. 39



Repetitionsrate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	2	58	18	7200	1,8 x 10 <sup>5</sup>	1,16

Graphik zu Tabelle8; S. mutans mit einer Wellenlänge von  $\lambda= 400\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 2mm und einer Pulsweite von 80fs

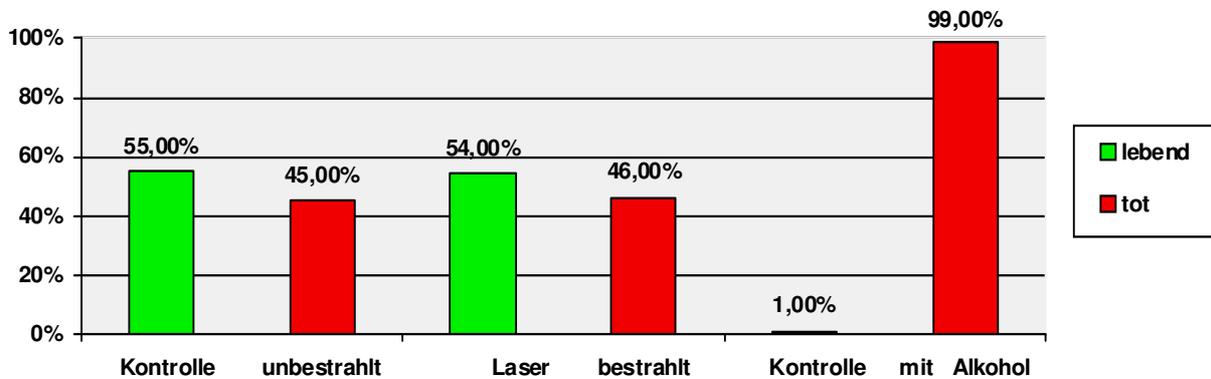
Abb. 40



Repetitionsrate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	0,1	161,5	5	110	1,8 x 10 <sup>5</sup>	1

Graphik zu Tabelle 9; E. coli mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 4mm und einer Pulslänge von 80fs

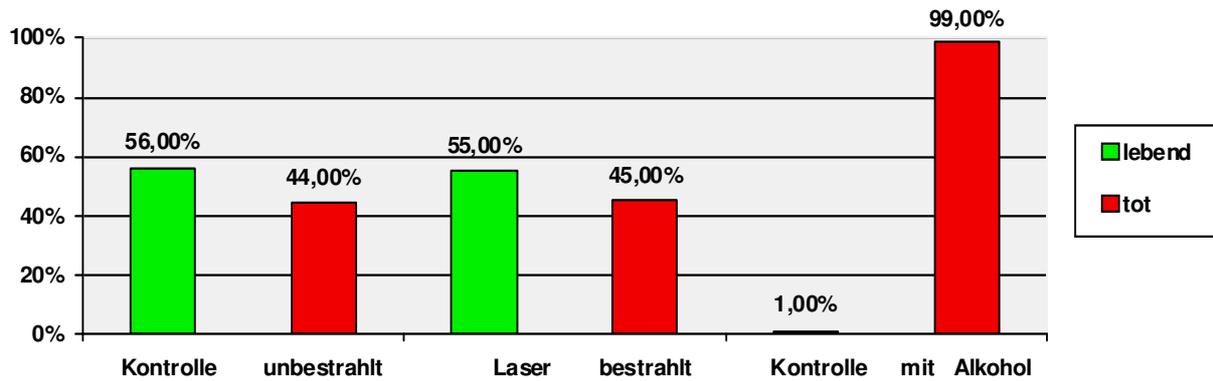
Abb. 41



Repetitionsrate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	0,1	2200	68	120	1,8 x 10 <sup>5</sup>	14,6

Graphik zu Tabelle 9; E. coli mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 4mm und einer Pulslänge von 80fs

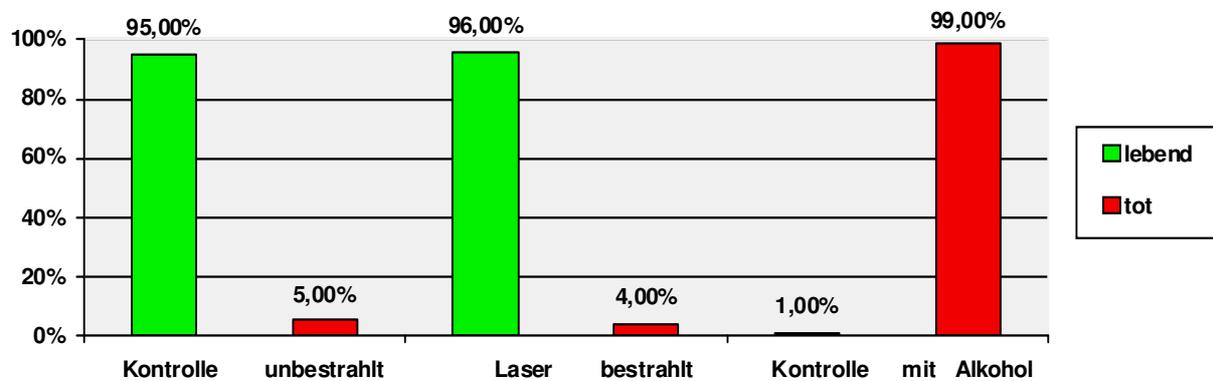
Abb. 42



Repetitions-rate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungs-zeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	0,1	2200	68	600	1,8 x 10 <sup>5</sup>	73

Graphik zu Tabelle 9; E. coli mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 4mm und einer Pulslänge von 80fs

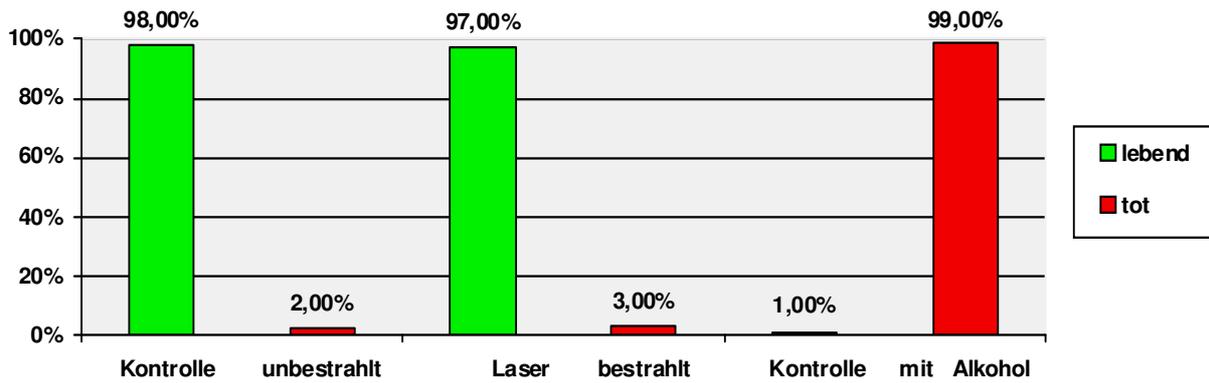
Abb. 43



Repetitions-rate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungs-zeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	0,1	161,5	5	110	1,8 x 10 <sup>5</sup>	1

Graphik zu Tabelle 9; E. coli mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 4mm und einer Pulslänge von 80fs

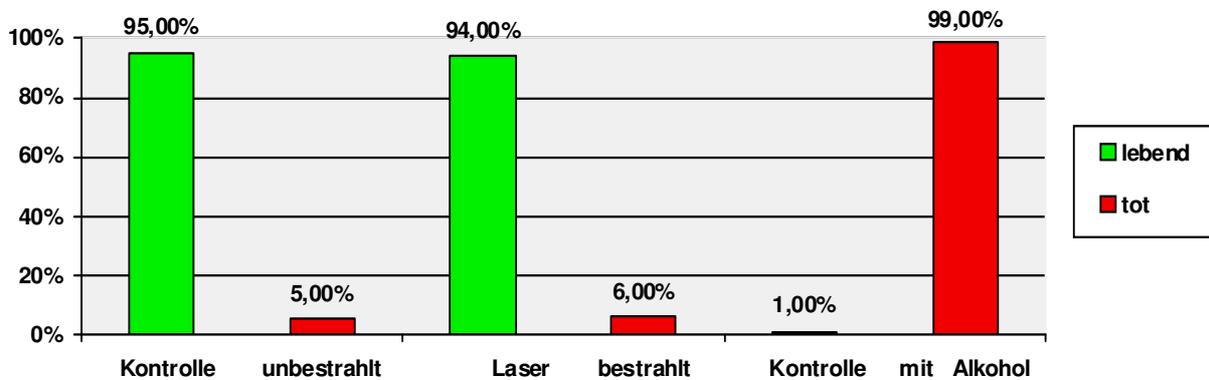
Abb. 44



Repetitions-rate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungs-zeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	0,1	2200	68	30	1,8 x 10 <sup>5</sup>	3,5

Graphik zu Tabelle 9; E. coli mit einer Wellenlänge von  $\lambda= 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 4mm und einer Pulslänge von 80fs

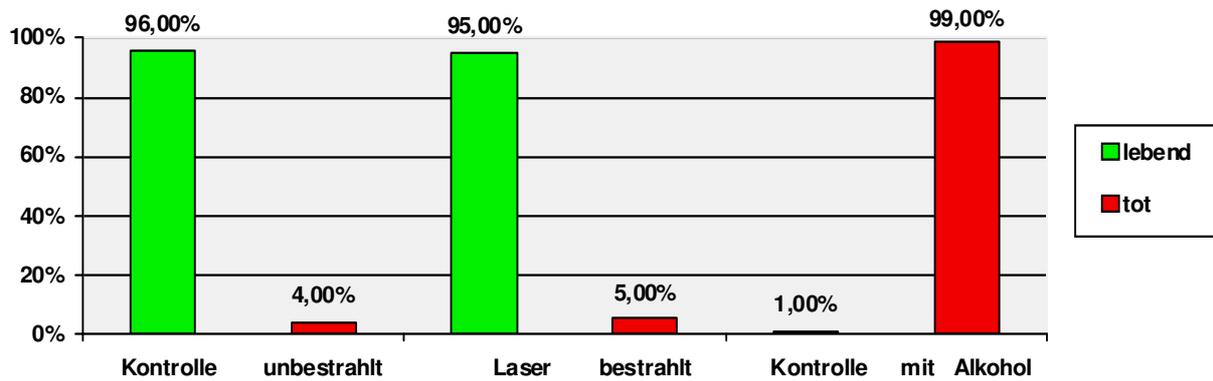
Abb. 45



Repetitions-rate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungs-zeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	0,1	2200	68	120	1,8 x 10 <sup>5</sup>	14,6

Graphik zu Tabelle 9; E. coli mit einer Wellenlänge von  $\lambda= 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 4mm und einer Pulslänge von 80fs

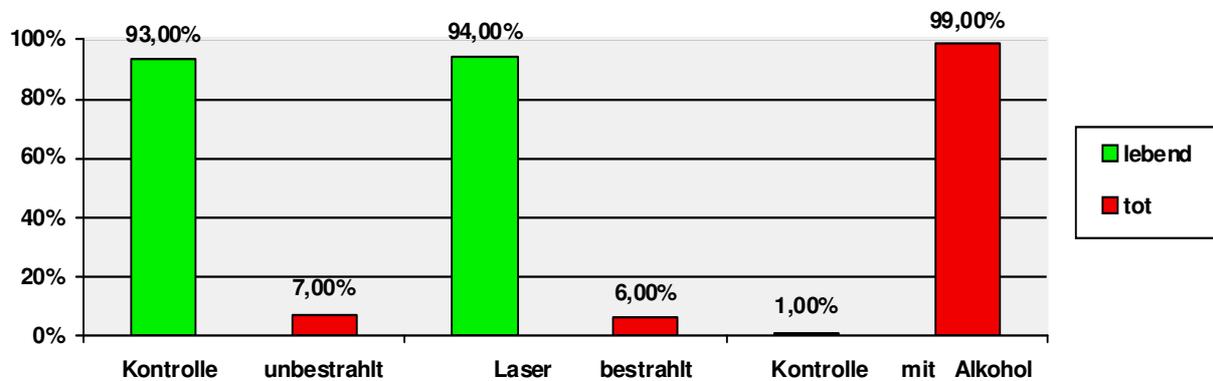
Abb. 46



Repetitionsrate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	0,1	2200	68	600	1,8 x 10 <sup>5</sup>	73

Graphik zu Tabelle 9; E. coli mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 4mm und einer Pulslänge von 80fs

Abb. 47



Repetitionsrate [MHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
80	2	520	1	0	1,8 x 10 <sup>5</sup>	0

Graphik zu Tabelle 10; E. coli mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 80MHz, einem Laserdurchmesser von 100 $\mu\text{m}$  und einer Pulslänge von 80fs

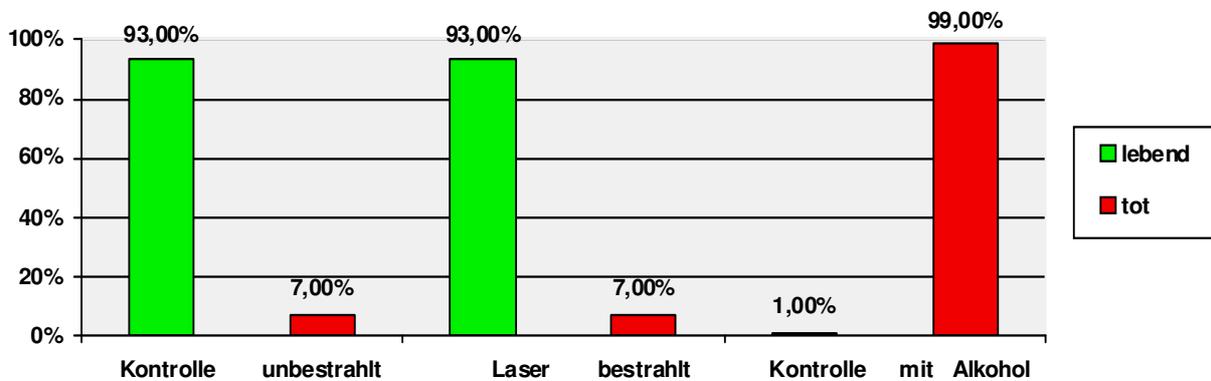
Abb. 48



Repetitions-rate [MHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungs-zeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
80	2	520	1	1800	1,8 x 10 <sup>5</sup>	2,5

Graphik zu Tabelle 10; E. coli mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 80MHz, einem Laserdurchmesser von 100 $\mu\text{m}$  und einer Pulslänge von 80fs

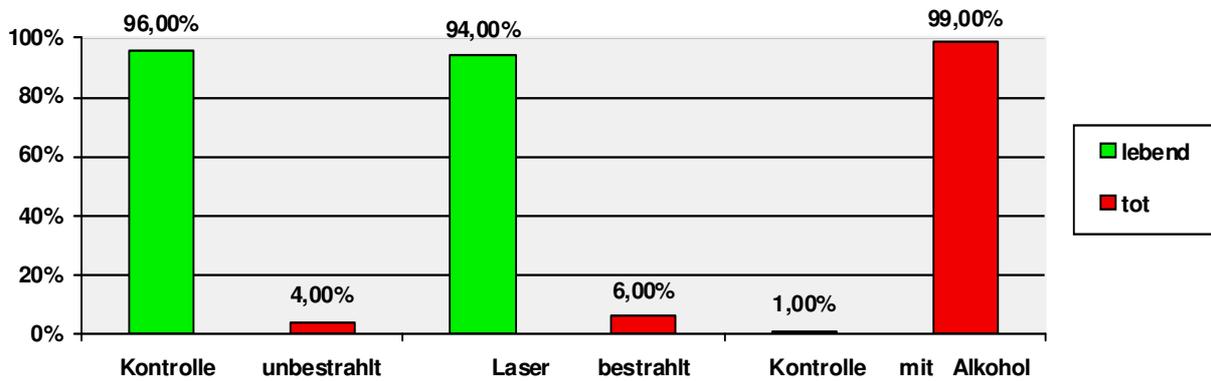
Abb. 49



Repetitions-rate [MHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungs-zeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
80	2	520	1	1800	1,8 x 10 <sup>5</sup>	2,5

Graphik zu Tabelle 10; E. coli mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 80MHz, einem Laserdurchmesser von 100 $\mu\text{m}$  und einer Pulslänge von 80fs

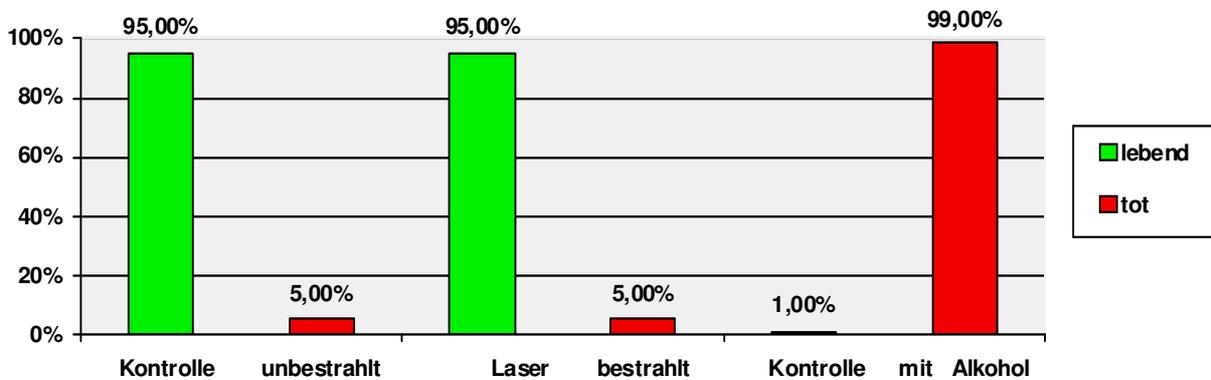
Abb. 50



Repetitions-rate [MHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungs-zeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
80	2	520	1	3600	1,8 x 10 <sup>5</sup>	5,2

Graphik zu Tabelle 10; E. coli mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 80MHz, einem Laserdurchmesser von 100 $\mu\text{m}$  und einer Pulslänge von 80fs

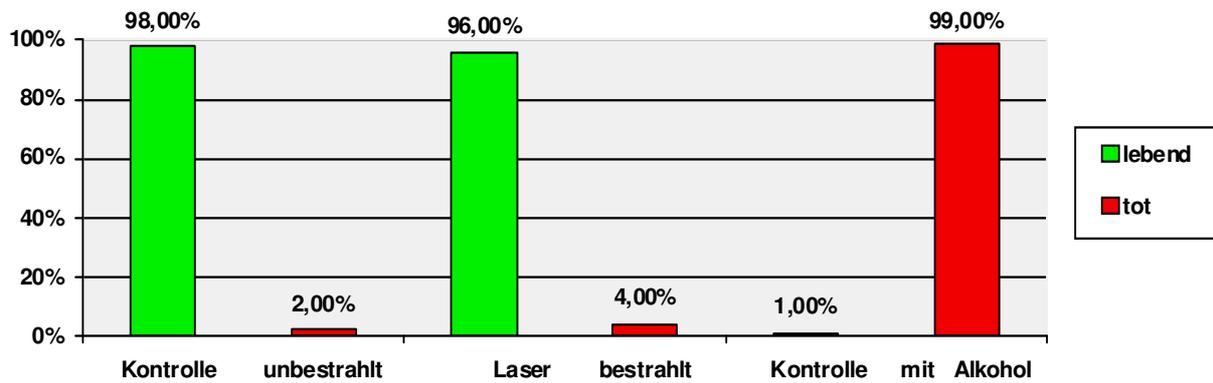
Abb. 51



Repetitions-rate [MHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungs-zeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
80	2	520	1	3600	1,8 x 10 <sup>5</sup>	5,2

Graphik zu Tabelle 10; E. coli mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 80MHz, einem Laserdurchmesser von 100 $\mu\text{m}$  und einer Pulslänge von 80fs

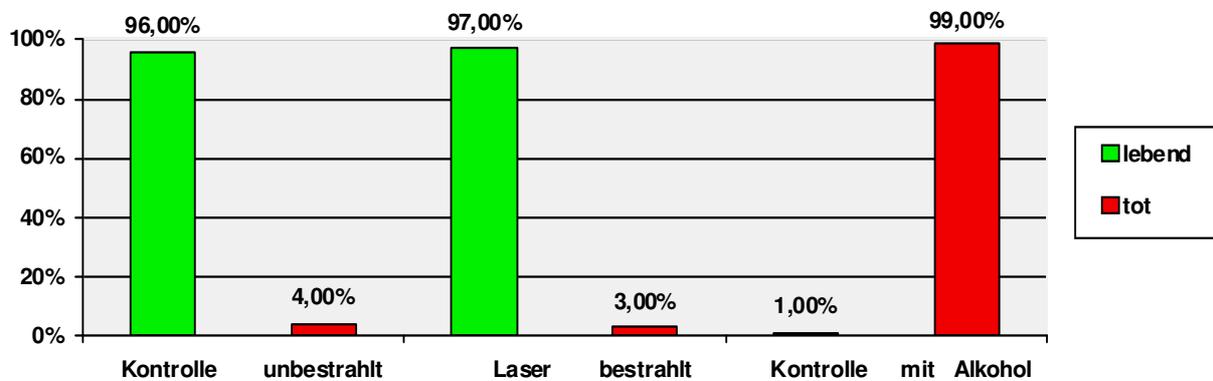
Abb. 52



Repetitions-rate [MHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungs-zeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
80	2	520	1	5400	1,8 x 10 <sup>5</sup>	7,8

Graphik zu Tabelle 10; E. coli mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 80MHz, einem Laserdurchmesser von 100 $\mu\text{m}$  und einer Pulslänge von 80fs

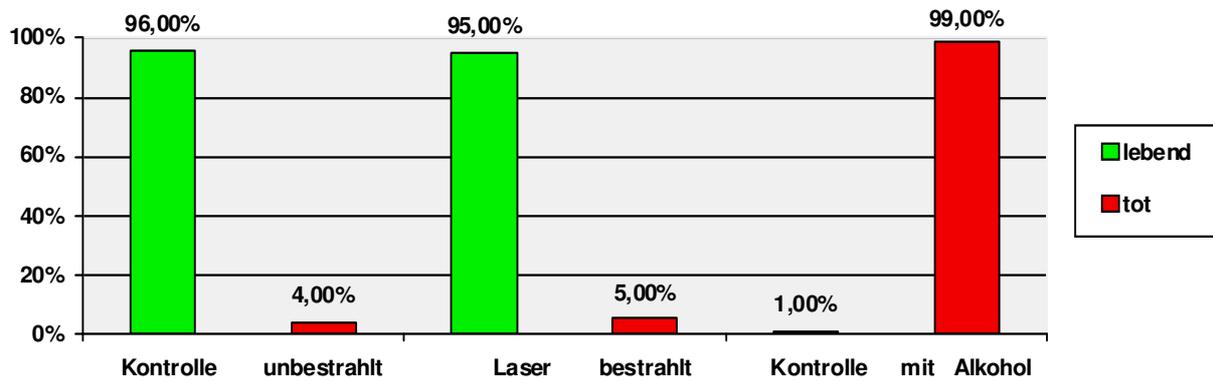
Abb. 53



Repetitions-rate [MHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungs-zeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
80	2	520	1	5400	1,8 x 10 <sup>5</sup>	7,8

Graphik zu Tabelle 10; E. coli mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 80MHz, einem Laserdurchmesser von 100 $\mu\text{m}$  und einer Pulslänge von 80fs

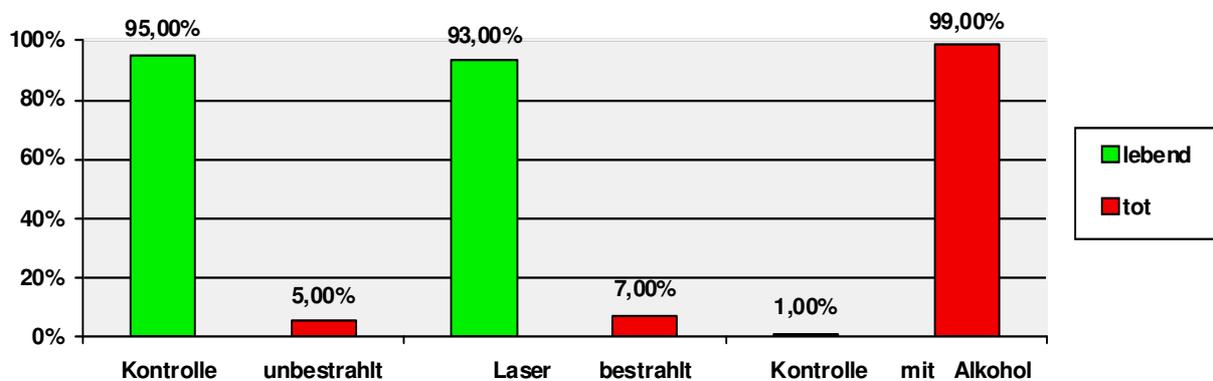
Abb. 54



Repetitionsrate [MHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
80	2	520	1	7200	1,8 x 10 <sup>5</sup>	10,4

Graphik zu Tabelle 10; E. coli mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 80MHz, einem Laserdurchmesser von 100 $\mu\text{m}$  und einer Pulslänge von 80fs

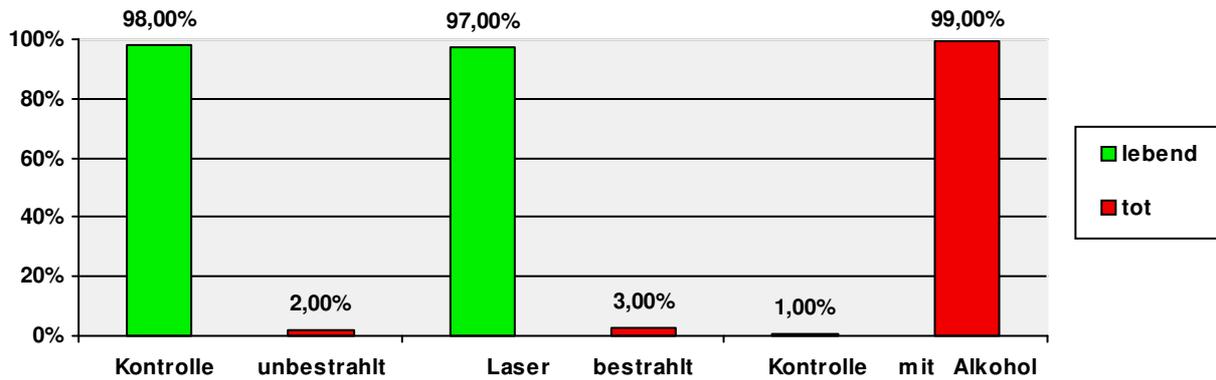
Abb. 55



Repetitionsrate [MHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
80	2	520	1	16200	1,8 x 10 <sup>5</sup>	23,4

Graphik zu Tabelle 10; E. coli mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 80MHz, einem Laserdurchmesser von 100 $\mu\text{m}$  und einer Pulslänge von 80fs

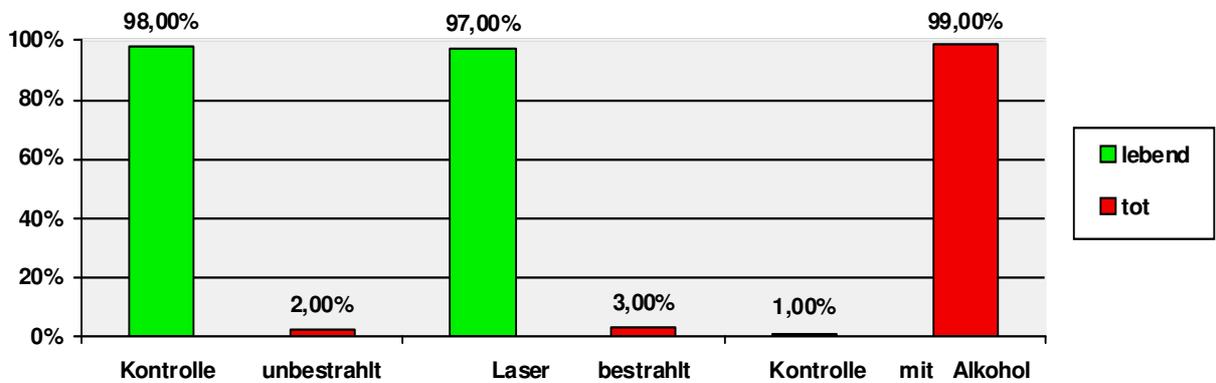
Abb. 56:



Repetitions-rate [MHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungs-zeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
80	2	520	1	61200	1,8 x 10 <sup>5</sup>	88,4

Graphik zu Tabelle 10; E. coli mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 800\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 80MHz, einem Laserdurchmesser von 100 $\mu\text{m}$  und einer Pulslänge von 80fs

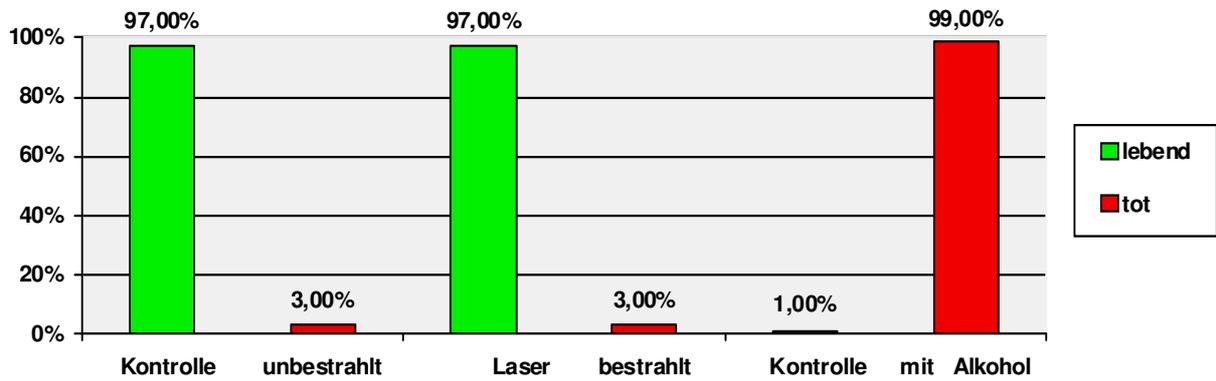
Abb. 57



Repetitions-rate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungs-dichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungs-zeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	2	58	1,6	3600	1,8 x 10 <sup>5</sup>	0,6

Graphik zu Tabelle 11; E. coli mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 400\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 2mm und einer Pulslänge von 80fs

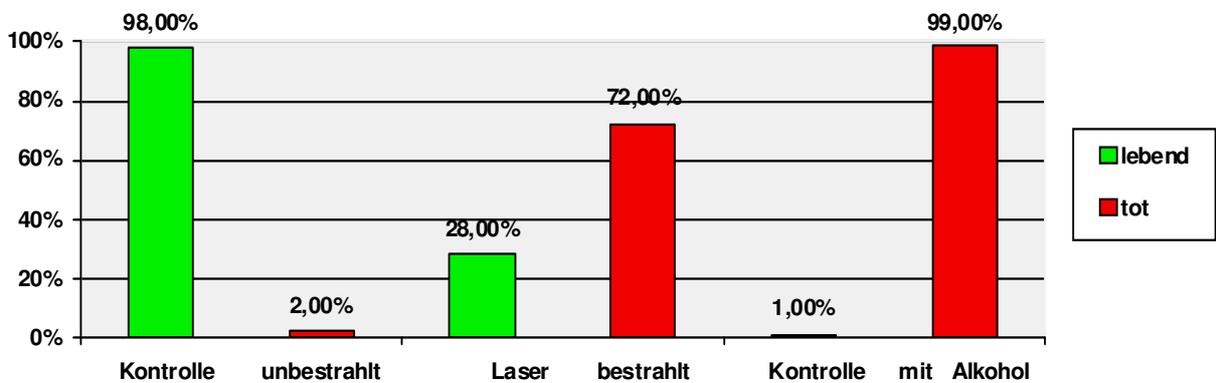
Abb. 58



Repetitionsrate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	2	58	1,6	3600	1,8 x 10 <sup>5</sup>	0,6

Graphik zu Tabelle 11; E. coli mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 400\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 2mm und einer Pulslänge von 80fs

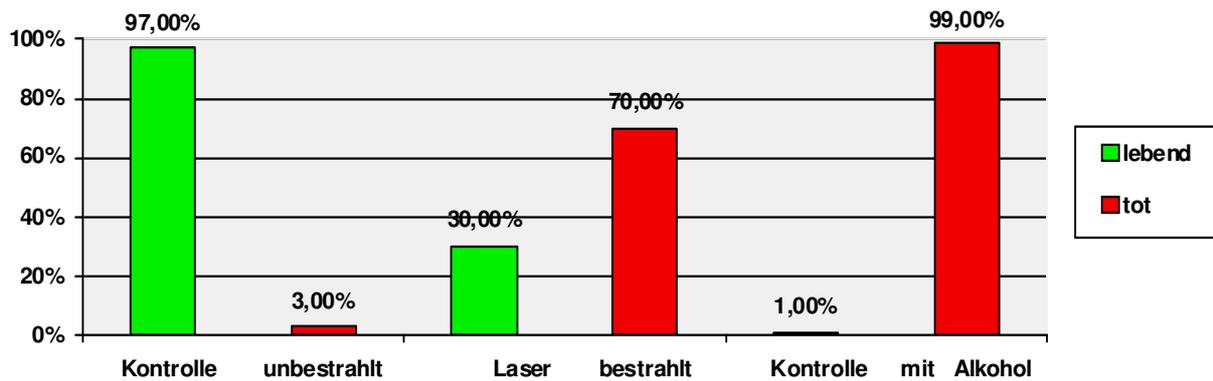
Abb. 59



Repetitionsrate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	2	58	18	3600	1,8 x 10 <sup>5</sup>	0,6

Graphik zu Tabelle 11; E. coli mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 400\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 2mm und einer Pulslänge von 80fs

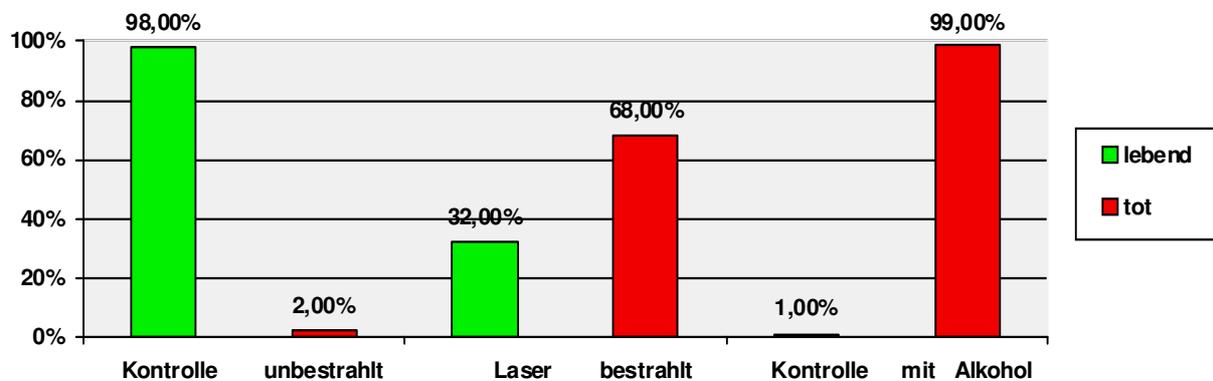
Abb. 60



Repetitionsrate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	2	58	18	3600	1,8 x 10 <sup>5</sup>	0,6

Graphik zu Tabelle 11; E. coli mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 400\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 2mm und einer Pulslänge von 80fs

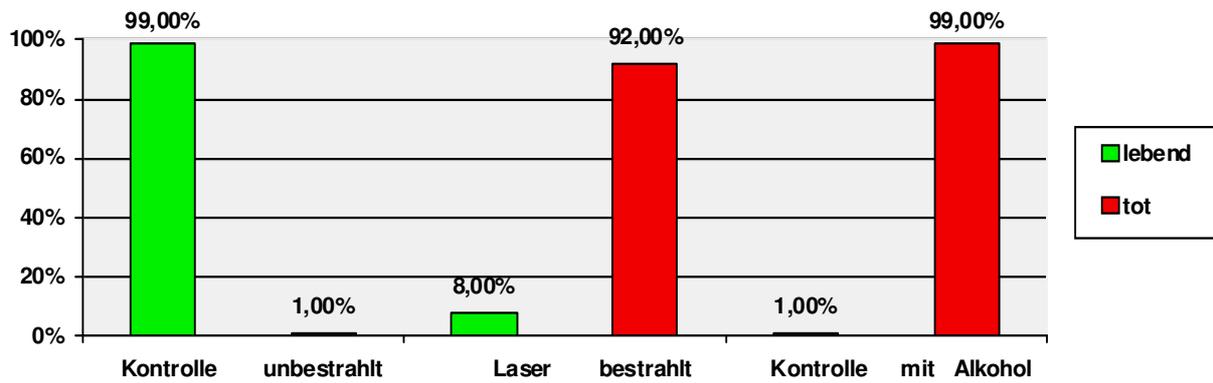
Abb. 61



Repetitionsrate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	2	58	18	3600	1,8 x 10 <sup>5</sup>	0,6

Graphik zu Tabelle 11; E. coli mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 400\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 2mm und einer Pulslänge von 80fs

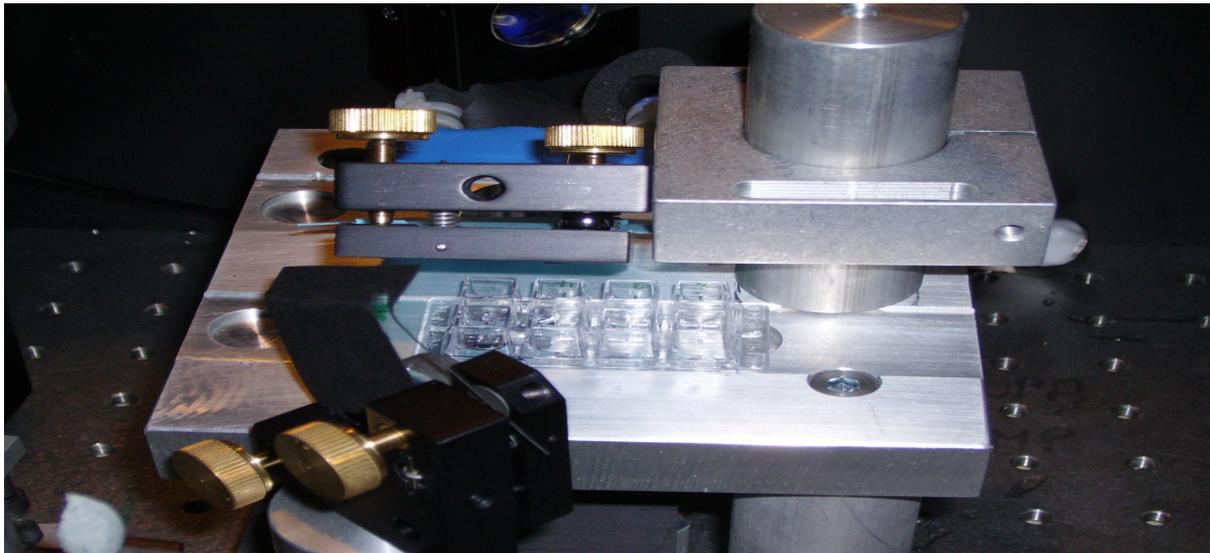
Abb. 62



Repetitionsrate [kHz]	Volumen [ml]	Mittlere Laserleistung [mW]	Leistungsdichte [MW/cm <sup>2</sup> ]	Bestrahlungszeit [s]	Tsen-Dosis [mWs/ml]	Relative Tsen-Dosis [mWs/ml]
1	2	58	18	7200	1,8 x 10 <sup>5</sup>	1,16

Graphik zu Tabelle 11; E. coli mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 400\text{nm}$ , mit einer Repetitionsrate von 1kHz, einem Laserdurchmesser von 2mm und einer Pulslänge von 80fs

Abb. 62:



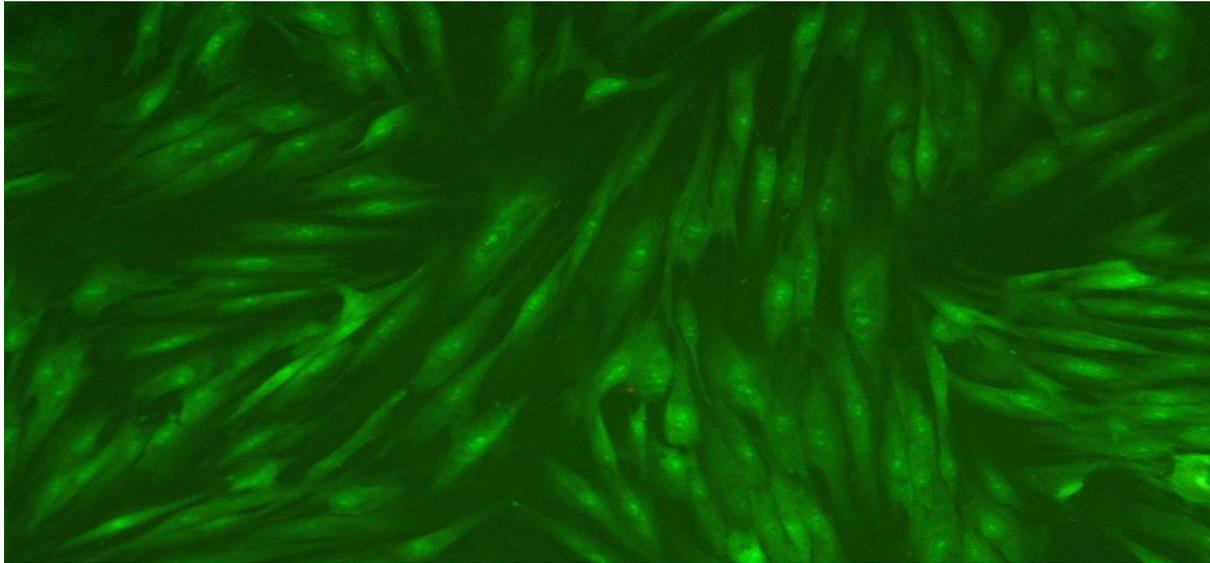
Experimenteller Aufbau mit einer Repetitionsrate von 1kHz und einerseits einer Wellenlänge von 800nm und andererseits mit der zweiten Harmonischen von  $\lambda = 400\text{nm}$  zu Bestrahlung von HGF, *S. mutans* und *E. coli*.

Abb. 63



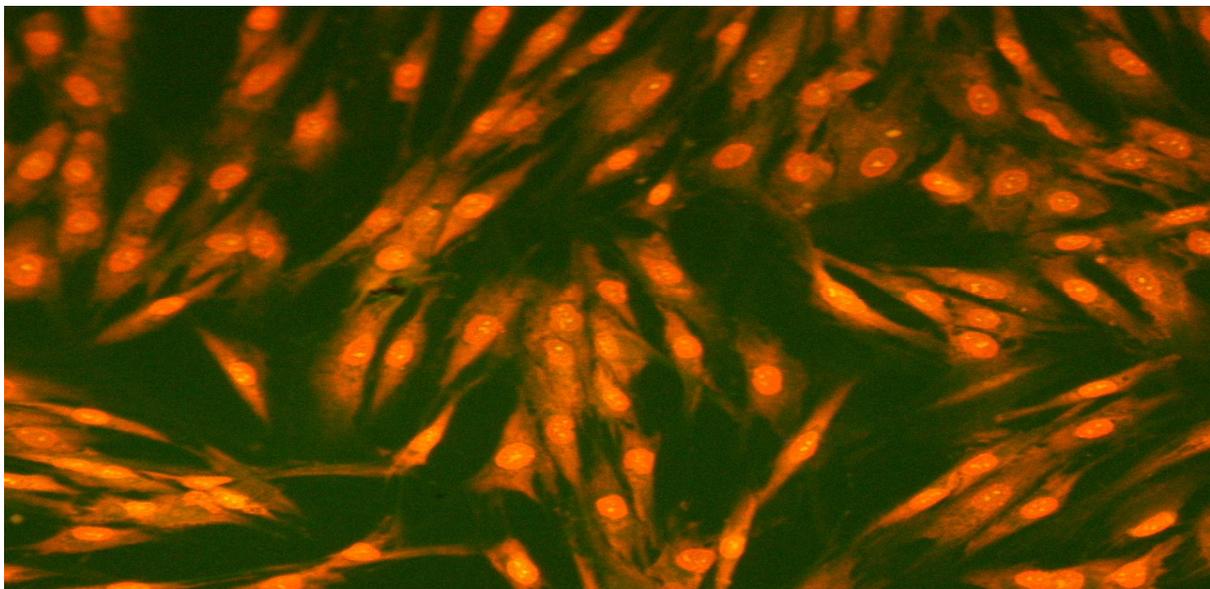
Experimenteller Aufbau mit einer Repetitionsrate von 80MHz und einer Wellenlänge von 800nm zur Bestrahlung von *S. mutans* und *E. coli* in einer Quarzküvette (QS 10.00 mm) unter Einsatz eines magnetischen Rührstabes (2x5mm, H+P Labortechnik AG) auf einem magnetischen Rühr Tisch (VARIOMAG)

Abb. 64:



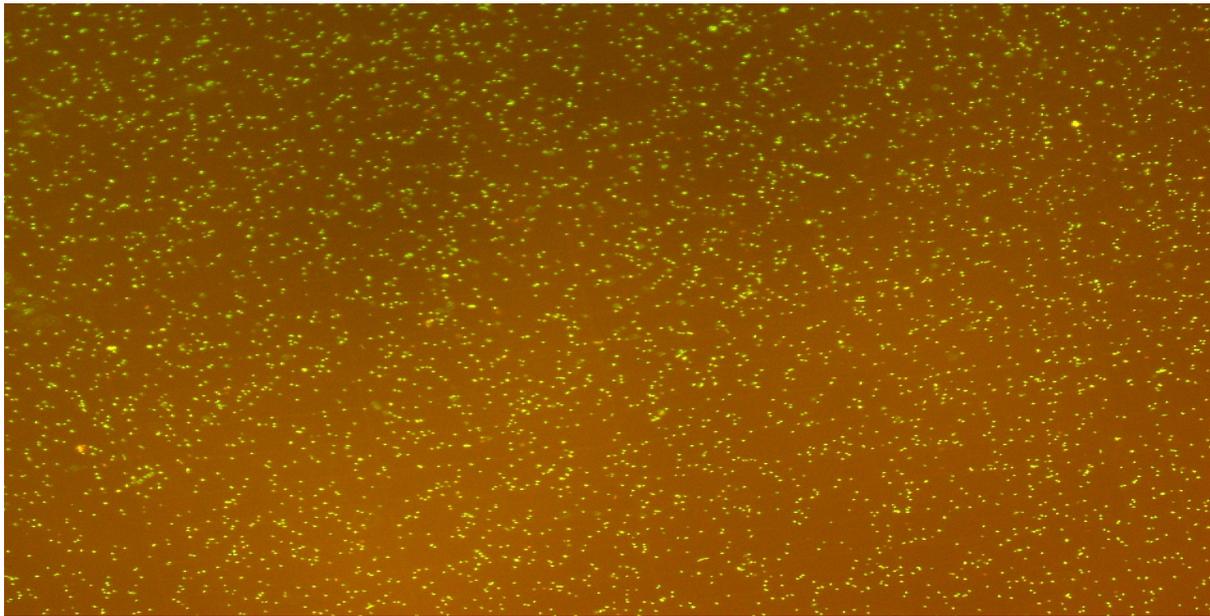
HGF unbestrahlt und mit LIVE/DEAD<sup>®</sup> Reduced Biohazard Viability/Cytotoxicity Kit# (L7013)gefärbt; Aufnahme in 20facher Vergrößerung der HGF mit dem Nikon – Mikroskop (DS 5M E50i).

Abb. 65:



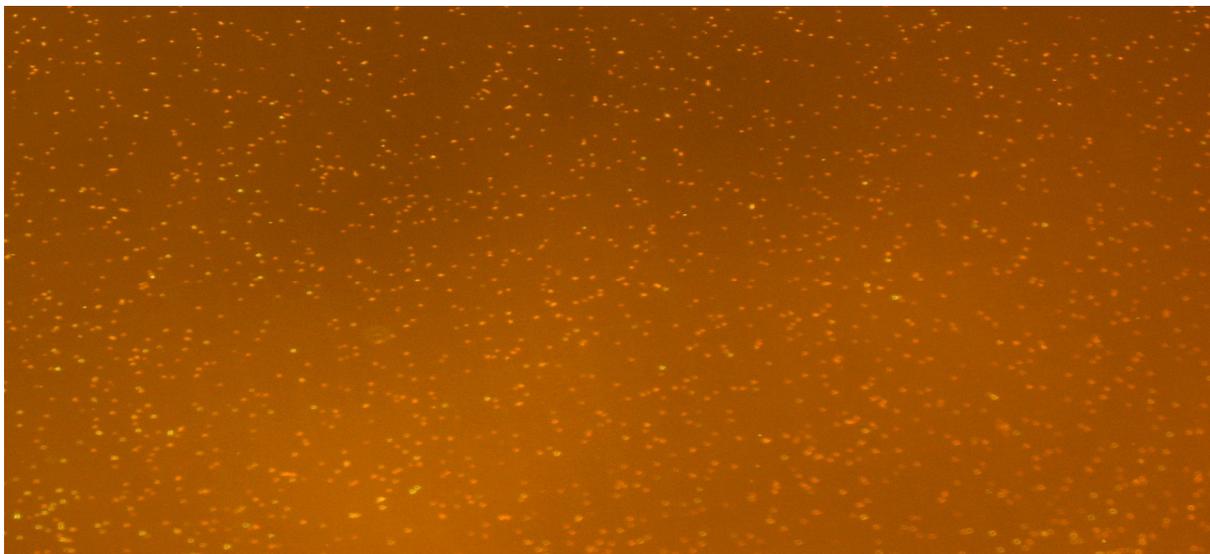
HGF mit 70%igem Ethanol abgetötet und mit dem LIVE/DEAD<sup>®</sup> Reduced Biohazard Viability/Cytotoxicity Kit# (L 7013)gefärbt; Aufnahme in 20facher Vergrößerung der HGF mit dem Nikon - Mikroskop (DS 5M E50i).

Abb. 66



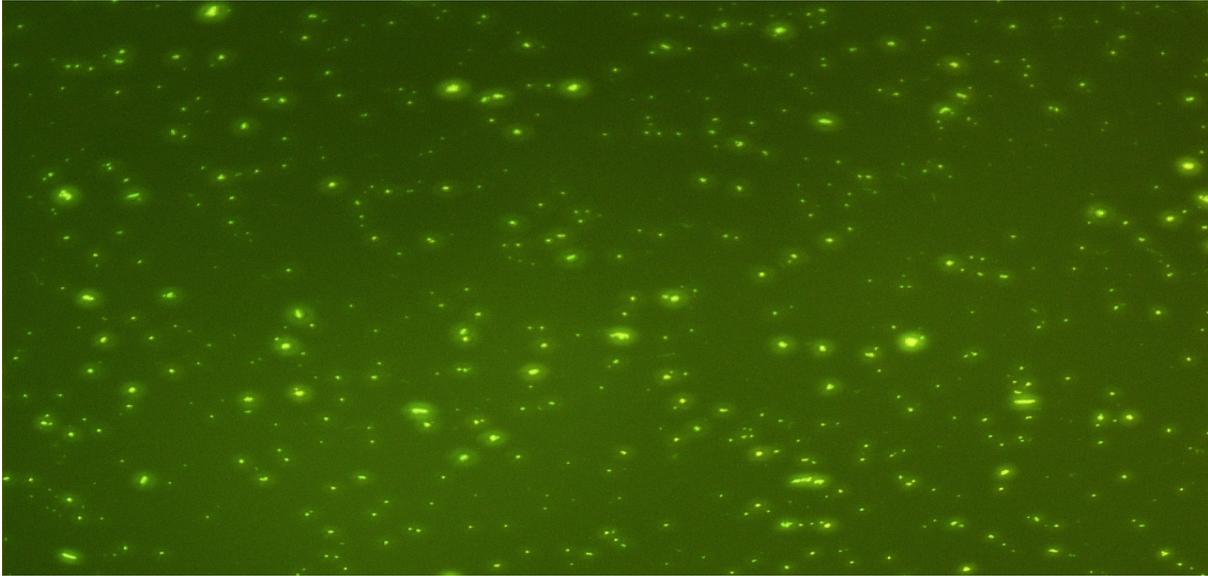
E. coli mit LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kit # (L 7012) gefärbt und in 10facher Vergrößerung mit dem mit dem Nikon - Mikroskop (DS 5M E50i) aufgenommen.

Abb. 67:



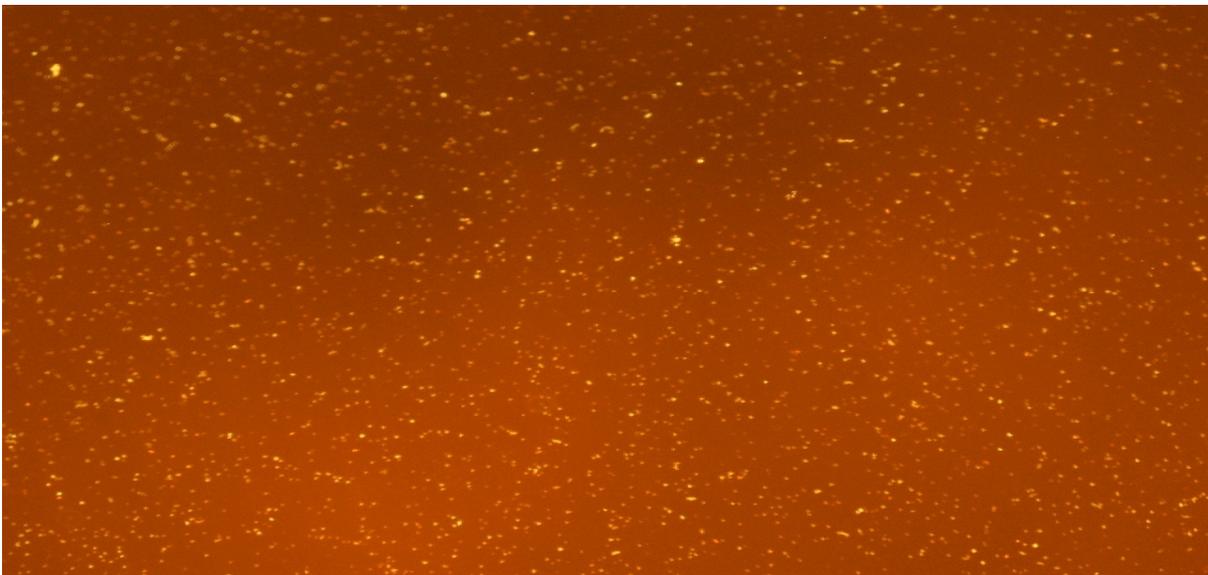
E. coli 1,5h mit dem Femtosekundenlaser bestrahlt und mit dem LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kit # (L 7012) gefärbt; Aufnahme in 10facher Vergrößerung mit dem Nikon - Mikroskop (DS 5M E50i).

Abb. 68:



S. mutans unbestrahlt und mit LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kit # (L 7012) gefärbt; Aufnahme mit dem Nikon - Mikroskop (DS 5M E50i) in 20facher Vergrößerung.

Abb. 69:



S. mutans nach Abtötung mit 70%igem Ethanol und Färbung mit LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kit # (L 7012) gefärbt; mit dem Nikon - Mikroskop (DS 5M E50i) wurde die Aufnahme mit 10facher Vergrößerung gemacht.

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. F. - X. Reichl für die Überlassung des Themas, die Hilfestellung bei der Planung der Arbeit, deren Korrektur und schließlich für die stetige, freundliche und äußerst zuverlässige Betreuung.

Besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. W. Zinth und der Diplom - Physikerin K. Haiser für die ständige Unterstützung bei den Versuchen und auch sonst allen Mitarbeitern der Abteilung für biomolekulare Optik der LMU, die an meinen Versuchstagen ihre eigenen Projekte nicht durchführen konnten. Die Arbeit konnte nur durch die interdisziplinäre Zusammenarbeit der verschiedenen Fakultäten durchgeführt werden.

Sehr entgegenkommend war Diplom - Biologe H. Derschum von der Bundeswehr Neuherberg, der mir an allen Versuchstagen das Elektronenmikroskop zur Verfügung stellte.

Dank C. J. Gschrei, C. Hopfer, S. Schulz und PD Dr. Dr. H. Mückter erlernte ich zügig den Umgang mit der HGF – Zellkultur, dank PD Dr. K. C. Huth die Kultivierung von *S. mutans*. Die *E.coli* – Zellkultur erhielt ich dankenswerterweise von Prof Dr. D. Schüler.

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung danke ich dem Betriebswirt Dr. S. Wagner.

## 10. Lebenslauf

### Ursula Haertel

Geboren am: 08.06.1983  
Geburtsort: Bad Tölz  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
Mutter: Haertel, Rita (geb. Schägger)  
Vater: Haertel, Manfred  
Anschrift: Bahnhofstr. 4  
83043 Bad Aibling  
Telefon: +49178/ 2337237  
E-Mail: ursula.haertel@gmx.net

### Ausbildung:

Seit 05/ 2009: Assistenz Zahnärztin  
Seit 09/ 2008: Promotion an der LMU  
08/ 2008: Beendigung des Studiums der Zahnmedizin an der  
Ludwig - Maximilians - Universität München mit  
dem Staatsexamen  
04/ 2005: Physikum  
09/ 2003: Vorphysikum  
10/ 2002: Beginn des Studiums der Zahnmedizin an der  
Ludwig - Maximilians - Universität München  
06/ 2002: Abitur am Gymnasium Tegernsee  
1993- 2002: Gymnasium Tegernsee  
1989- 1993: Grundschule Rottach-Egern