

Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Leiter: Univ. Prof. Dr. Bernhard Schick

Etablierung einer Biokompatibilitätsanalysen- strategie für nicht invasive Laserapplikation anhand humaner Zelllinien

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

vorgelegt von:

Lukas Pillong

geb. am: 22.07.1989 in Saarbrücken

Tag der Promotion: 30.09.2021

Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Gentiana Wenzel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Lipp

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1	Deutsche Zusammenfassung	1
1.2	Summary.....	2
2	EINLEITUNG	3
2.1	Die Vision: Hören mit Licht.....	3
2.2	Klinische Relevanz	5
2.3	Physiologie des Hörens und Formen der Schwerhörigkeit.....	5
	2.3.1 Anatomie und Physiologie des Hörens.....	5
	2.3.2 Formen der Schwerhörigkeit	12
2.4	Aktuell verfügbare Hörsysteme	12
2.5	Laser-Gewebe-Wechselwirkungen.....	18
	2.5.1 Reflexion und Brechung	19
	2.5.2 Absorption	20
	2.5.3 Streuung.....	21
	2.5.4 Mechanismen der Laser-Gewebe-Wechselwirkung.....	22
2.6	Ziel der vorliegenden Arbeit.....	25
3	MATERIAL UND METHODEN	26
3.1	Verwendete Zelllinien	26
3.2	96-Well-Mikrotiterplattenmodell	26
3.3	Zell-Kultivierung	29
	3.3.1 Auftauen der Zellen aus der Stickstoff-Kryo-Konservierung	29

3.3.2	Passagieren der Zellen	29
3.3.3	Einfrieren und Auftauen der Zellen	30
3.4	Laserbestrahlung	31
3.4.1	Aufbau	31
3.4.2	Ablauf	32
3.4.3	Besonderheiten zum Versuchsaufbau	34
3.4.4	Einfluss des Faserabstandes zum Zellrasen	35
3.5	Fluoreszenz-Färbung	38
3.6	Versuchsvorbereitung	39
3.7	Laktatdehydrogenase (LDH)-Test	40
3.7.1	Durchführung des LDH-Tests	42
3.8	WST-1-Test	43
3.8.1	Durchführung	45
3.8.2	Auswertung	46
3.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	47
3.9.1	Quantitative PCR (qPCR)	48
3.9.2	Mathematische Grundlage zur Datenanalyse nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode	52
3.9.3	RNA-Isolation	56
3.9.4	cDNA-Synthese	59
3.9.5	qPCR-Array	60
3.10	Statistik	61
3.10.1	LDH-Test und WST-Test	61
3.10.2	qPCR-Analysen	62

4	ERGEBNISSE	63
4.1	Fluoreszenz- Differenzierungsfärbung	63
4.2	LDH-Test	67
4.3	WST-1-Test	70
4.4	Genexpressionsanalysen	74
4.4.1	Ergebnisse der Genexpressionsanalyse nach Bestrahlung der NHDF mit 500 mW	74
4.4.2	Ergebnisse der Genexpressionsanalyse nach Bestrahlung der NHDF mit 199 mW	78
4.4.3	Ergebnisse der Genexpressionsanalyse nach Bestrahlung der HCH mit 500 mW	80
4.4.4	Ergebnisse der Genexpressionsanalyse nach Bestrahlung der HCH mit 199 mW	82
4.4.5	Ergebnisse der Genexpressionsanalyse nach Bestrahlung der HOB mit 500 mW	84
4.4.6	Ergebnisse der Genexpressionsanalyse nach Bestrahlung der HOB mit 199 mW	86
5	DISKUSSION	88
5.1	Kritische Bewertung der Arbeit	88
5.1.1	Nutzen der vorliegenden Arbeit	88
5.1.2	Kritische Bewertung und Interpretation der Fluoreszenzfärbung	90
5.1.3	Kritische Bewertung der Ergebnisse und Interpretation von WST-1- und LDH-Test	91
5.2	Interpretation der qPCR-Ergebnisse	93
5.2.1	Gesteigerte Genexpression aus dem Bereich DNA-Reparatur und Zellzykluskontrolle	94

5.2.2 Hinweis auf HSP-Antwort durch Laserbestrahlung	98
5.2.3 Hinweise auf eine Beteiligung des ER-Stress-Signalwegs.....	100
5.2.4 Oxidativer Stress-Signalweg	104
5.3 Biostimulation.....	107
5.4 Vergleichsuntersuchungen im Tiermodell.....	109
5.5 Schlussfolgerung und Ausblick	110
6 LITERATURVERZEICHNIS	112
7 PUBLIKATION / DANKSAGUNG	120
7.1 Publikationen	120
7.2 Danksagung	121
8 LEBENSLAUF	122
9 ANHANG	124

Abkürzungsverzeichnis:

%	Prozent
°C.....	Grad Celsius
Å	Ångström
ABR.....	auditory brainstem response
AKR1B1	Aldo-keto reductase family 1
AOM.....	Akustooptischer Modulator
AQP1	Aquaporin 1
AQP4.....	Aquaporin-4
ARNT	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATF6	Activating transcription factor 6
ATF6B.....	Activating Transcription Factor 6 Beta, Activating Transcription Factor 6 Beta
ATG12.....	Autophagy related 12, Autophagy Related 12
ATG16L	Autophagy-related protein 16-like
ATG5.....	Autophagy Related 5, Autophagy Related 5
ATG7.....	Autophagy Related 7, Autophagy Related 7
BAHA.....	bone-anchored hearing aid
BBC3	BCL2 Binding Component 3
BIP.....	Binding immunoglobulin protein
CA9	Carbonic Anhydrase 9
CALR	Calreticulin
CASP1	Caspase-1
CCL2	C-C Motif Chemokine Ligand 2
CD40LG	CD40 Ligand
cdk	cyclin-dependent kinase (Zyclin-abhängige Kinase)
CDKN1A.....	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A

cDNA	complementary deoxyribonucleic acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CFTR.....	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CHEK2	Checkpoint kinase 2
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C _t	threshold cycle (Schwellenwertzyklus)
DDIT3	DNA Damage Inducible Transcript 3
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EPO	Erythropoetin
ER.....	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation
FAS.....	Fas Cell Surface Death Receptor, Fas Cell Surface Death Receptor
FCS.....	fetal calf serum (Fetales Kälberserum)
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FTH1	Ferritin Heavy Chain 1, Ferritin Heavy Chain 1, Ferritin Heavy Chain 1
GADD45A	Growth Arrest And DNA Damage Inducible Alpha
GADD45G	Growth Arrest And DNA Damage Inducible Gamma
GOI.....	gene of interest
GW	Gigawatt
h	hour (Stunde)
HBV	Hepatitis B-Virus
HCH	Humane Chondrozyten
HCV	Hepatitis C-Virus
HEJ	homologous end-joining (Homologe Endverknüpfung)
HEPES BSS.....	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid buffered saline solution
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus

HKG	housekeeping gene (Haushaltsgen)
HMOX1.....	Heme Oxygenase 1
HOB	Humane Osteoblasten
HSP90AA1	Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class A Member 1
HSP90B1	Heat Shock Protein 90 Beta Family Member 1
HSPA4.....	Heat Shock Protein Family A Member 4
HSPA4L	Heat Shock Protein Family A Member 4-Like
HSPA5.....	Heat Shock Protein Family A Member 5)
HTLV	Humanes T-lymphotropes Virus
IFNG.....	Interferon gamma
IL1B	Interleukin-1 β
IL6	Interleukin-6
INT	2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-Tetrazolium-Chlorid
J	Joule
kHz	Kilohertz
LDH.....	Laktatdehydrogenase
LDHA	Lactate dehydrogenase A
LED	light emitting diode
MCL1	myeloid cell leukemia 1
mJ	Millijoule
ml.....	Milliliter
mm.....	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MMP9.....	Matrix metalloproteinase 9
MRE11A	MRE11 Homolog, Double Strand Break Repair Nuclease
mV	Millivolt
mW	Milliwatt

MW.....	Megawatt
NBN	Nibrin
Nd:YVO ₂	Neodymium-doped yttrium orthovanadate
NFAT 5	Nuclear factor of activated T-cells 5
NFAT5	Nuclear Factor of Activated T Cells 5
ng.....	Nanogramm
NHDF	Normale Humane Dermale Fibroblasten
NHEJ	nonhomologous end-joining (Nicht-homologe Endverknüpfung)
nm.....	Nanometer, Nanometer
PBS.....	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Standardsalzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
ps	Pikosekunde
qPCR	quantitative polymerase chain reaction (Quantitative Polymerasekettenreaktion)
RAD9A.....	RAD9 Checkpoint Clamp Component A
RIPK1	Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 1
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROS	reactive oxygen species (Reaktive Sauerstoffspezies)
SERPINE1.....	Serpin Family E Member 1
SLC2A1.....	Solute Carrier Family 2 Member 1
SLC5A3.....	Solute Carrier Family 5 Member 3, Solute Carrier Family 5 Member 3
SOD.....	Superoxiddismutase
SQSTM1.....	Sequestosome-1
TLR4	Toll-like receptor 4
TNFRSF10A	TNF Receptor Superfamily Member 10a
TNS	Trypsin Neutralization Solution
TXN.....	Thioredoxin
TXNL4B.....	Thioredoxin-like protein 4B

TXNRD1	Thioredoxin Reductase 1
U/min.....	Umdrehungen pro Minute
ULK1	Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1
UPR	unfolded protein response
UV	Ultraviolett
VEGFA.....	Vascular endothelial growth factor A
W	Watt
WST	water soluble tetrazolium
XPC	Xeroderma pigmentosum, complementation group C
µg.....	Mikrogramm
µJ.....	Mikrojoule
µm	Mikrometer

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Weltweit leiden ca. 466 Millionen Menschen an einer behandlungsbedürftigen Schwerhörigkeit. Trotz der raschen technischen Fortschritte im Bereich der Hörsystemtechnologie sind viele Patienten noch immer unzureichend versorgt. Die optoakustische Stimulation bietet eine vielversprechende Grundlage für die Entwicklung einer neuen Generation lichtbasierter Hörsysteme.

Die Biokompatibilität eines solchen Systems ist eine wesentliche Voraussetzung, um einen sicheren klinischen Einsatz gewährleisten zu können. Um die Biokompatibilitätsgrenzen unserer Laseramplitudenmodulationsstrategie in einem *in vitro*-Zellkulturmodell festzulegen, etablierten wir ein Modell, in dem wir drei für Mittelohrstrukturen repräsentative humane Zelltypen (humane Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoblasten) untersuchten.

Die Zellen wurden mit 532 nm Laserpulsen über eine Zeitspanne von 120 Sekunden mit unterschiedlichen Laserleistungen unter Anwendung unserer Amplitudenmodulationsstrategie bestrahlt. Die Zytotoxizität wurde anschließend mittels Fluoreszenzfärbung, funktioneller Tests sowie qPCR-Untersuchungen im Hinblick auf 84 Schlüsselgene aus den Bereichen Zellstress und Zytotoxizität bestimmt.

Wir konnten eine erste Grenze für die Anwendung unserer Stimulationsstrategie anhand humaner Zellen bei einer Laserleistung zwischen 200 mW und 223 mW (3348 J/cm^2) feststellen. Lediglich die Fibroblasten zeigten in der qPCR-Analyse nach Bestrahlung mit einer subphototoxischen Leistung von 199 mW (2988 J/cm^2) eine Hochregulation von *GADD45G*.

Weiterführende Untersuchungen sind geplant, um die Parameter zur optoakustischen Stimulation des Hörorgans zu optimieren. Die in dieser Arbeit beschriebenen Ansätze und Daten bezüglich Laser-Gewebewechselwirkungen könnten außerdem, insbesondere im Zusammenhang mit translationaler Laser-Forschung und im Hinblick auf eine Applikation in zahlreichen weiteren biologischen Strukturen als wertvolle Referenz dienen.

1.2 Summary

Approximately 466 million people worldwide suffer from disabling hearing impairment. Despite rapid advances in hearing aid technology, many of these are still not sufficiently supplied with auditory prostheses. The optoacoustic stimulation of the peripheral hearing organ is a promising novel technology for the development of a new generation of light-based hearing devices.

Since the biocompatibility of such a device is an essential prerequisite to ensure its safe clinical use, we sought to define the safety margins of our laser amplitude modulation strategy. For the herein presented *in vitro* analysis, we established a model in which we examined three human cell types that are representative for outer and middle ear structures (human fibroblasts, chondrocytes, and osteoblasts).

Cells were irradiated with 532 nm laser pulses for a period of 120 seconds at different laser powers using our amplitude modulation strategy. Cytotoxicity was then determined by fluorescence staining, viability assays, and qPCR-analysis with respect to 84 key player genes for cell stress and cytotoxicity.

We were able to establish a first set of limits for the application of our stimulation strategy at laser power between 200 mW and 223 mW (3348 J/cm²). Additionally, only the fibroblasts demonstrated a significant upregulation of GADD45G in qPCR analysis after irradiation with a sub-phototoxic power of 199 mW (2988 J/cm²).

Further studies are planned to optimize the parameters for optoacoustic stimulation of the auditory system. The protocol and data described in this work, regarding laser-tissue interactions, can serve as a valuable reference for translational laser technologies from the perspective of further applications in numerous other biological structures as well.

2 Einleitung

2.1 Die Vision: Hören mit Licht

Im August 1880 stellte Alexander Graham Bell auf der 29. Jahresversammlung der „Amerikanischen Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften zu Boston“ die Idee der Schallübertragung mit Hilfe von moduliertem Licht vor (Bell 1880b). Die Entwicklung bezeichnete er als *Photophon*, ein Instrument, welches das Licht der Sonne zur drahtlosen Informationsübertragung nutzte. Diese Mitteilung erfolgte einige Jahre vor der ersten Funkübertragung.

Die Funktionsweise des *Photophons* beruhte auf der Umwandlung akustischer in optische Energie am Sendeort sowie der erneuten Konversion in akustische Information am Empfangsort.

Sonnenlicht wurde mit Hilfe eines Sammellinsensystems auf einem dünnen Spiegel, der als akustooptischer Modulator diente, gebündelt und beim Empfänger durch einen Parabolspiegel auf einen im Fokus befindlichen optoakustischen Wandler übertragen. Dieser wurde später durch eine Selenzelle als optoelektrisches Bauteil abgelöst (Bell 1880a). Abbildung 1 zeigt einen Auszug aus der Patentschrift mit Schemazeichnung des Photophon-Transmitters aus dem Jahr 1880.

Alexander Graham Bell bezeichnete das *Photophon* als seine größte Erfindung und schrieb in einem Brief an seinen Vater: „Ich hörte artikulierte Sprache durch das Sonnenlicht! Ich hörte einen Sonnenstrahl lachen und husten und singen! [...] Auf diese Weise war ich in der Lage einen Schatten zu hören und habe sogar mit dem Ohr das Wandern einer Wolke über die Sonnenscheibe wahrgenommen. [...] Du bist der Großvater des Photophons und ich möchte meine Freude über den Erfolg mit dir teilen [...]“ (frei ins Deutsche übersetzt aus "The Alexander Graham Bell Family Papers"; 2014). Im Zeitalter der Laser- und Wellenleitertechnologie erlebt die Optoakustik, neben analytischen Anwendungen wie der optoakustischen Spektroskopie, eine Renaissance basierend auf Bells Idee: Hören mit Hilfe von Licht.

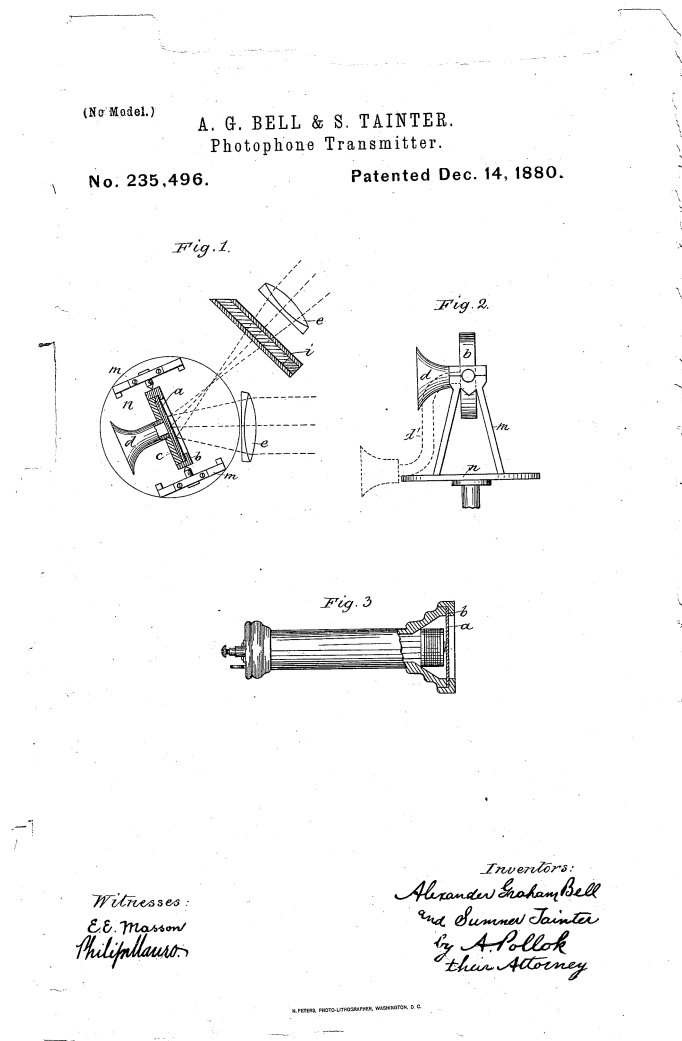


Abbildung 1: Auszug aus der Patentschrift des „Photophone Transmitters“ vom 14.12.1880 (Bell & Tainter 1880). Die Zeichnung in Fig. 1 zeigt das Sammellinsensystem (e), welches Sonnenlicht auf einem mit einem Sprachrohr (d) verbundenen, dünnen und schwingungsfähigen Spiegel/Reflektor (a), welcher in einem Rahmen (b) fixiert ist, fokussiert. Dieses Bauteil entspricht dem akustooptischen Modulator. In den Strahlengang ist ein hitzeabsorbierendes Element (i) eingefügt, um Verzerrungen oder Interaktionen am Reflektor zu verhindern. Schallwellen werden in Form mechanischer Schwingungen auf den Spiegel übertragen und das dort gebündelte Licht durch einen Parabolspiegel am Empfangsort erneut fokussiert. Das gebündelte, modulierte Licht wird schließlich auf einen optoakustischen Wandler übertragen und somit in Schall umgewandelt. Fig. 2 und Fig. 3 zeigen Variationen des Transmitters, wobei die Membran (a) in Fig 3. durch magnetische Impulse in Schwingung versetzt werden kann.

2.2 Klinische Relevanz

Weltweit leiden ca. 466 Millionen Menschen unter einer Hörbehinderung. Die Ursachen hierfür sind vielfältig und reichen von genetischen Faktoren über perinatale Komplikationen, Infektionserkrankungen, chronische Entzündungen des Ohres, den Gebrauch ototoxischer Medikamente, eine vermehrte Exposition gegenüber Umgebungslärm bis hin zur Presbyakusis, aufgrund einer steigenden Lebenserwartung. Unbehandelter Hörverlust führt nicht nur zu einer Einschränkung der Lebensqualität und der aktiven Teilnahme am gesellschaftlichen Leben, sondern verursacht außerdem jährlich Kosten von ca. 750 Milliarden Dollar.

Maßnahmen zur Prävention, Diagnostik und Behandlung von Schwerhörigkeit sind kosteneffektiv und von einem hohen individuellen Nutzen für die Betroffenen. Diese profitieren von einer frühzeitigen Diagnostik, dem Gebrauch von Hörsystemen sowie weiteren supportiven Maßnahmen (World Health Organization 2020).

2.3 Physiologie des Hörens und Formen der Schwerhörigkeit

Das menschliche Ohr lässt sich in einen peripheren und einen zentralen Anteil unterteilen. Der periphere Teil setzt sich aus dem äußeren Ohr, mit Ohrmuschel und Gehörgang, Mittel- und Innenohr sowie dem Nervus vestibulocochlearis zusammen. Der zentrale Teil besteht aus Hörbahn, Vestibularbahnen und Teilen des N. facialis, welche zum Innenohr ziehen.

2.3.1 Anatomie und Physiologie des Hörens

Äußeres Ohr

Die Architektur der Ohrmuschel mit ihren charakteristischen Faltungen und Leisten wird durch das Gerüst aus elastischem Knorpel gebildet, welcher sich bis in den knorpeligen Teil des äußeren Gehörgangs erstreckt. Ohrmuschel und äußerer Gehörgang bilden die Aufnahme­fläche für Schallwellenfronten, welche den Gehörgang durchdringen, um ins Mittelohr zu gelangen (Abbildung 2).

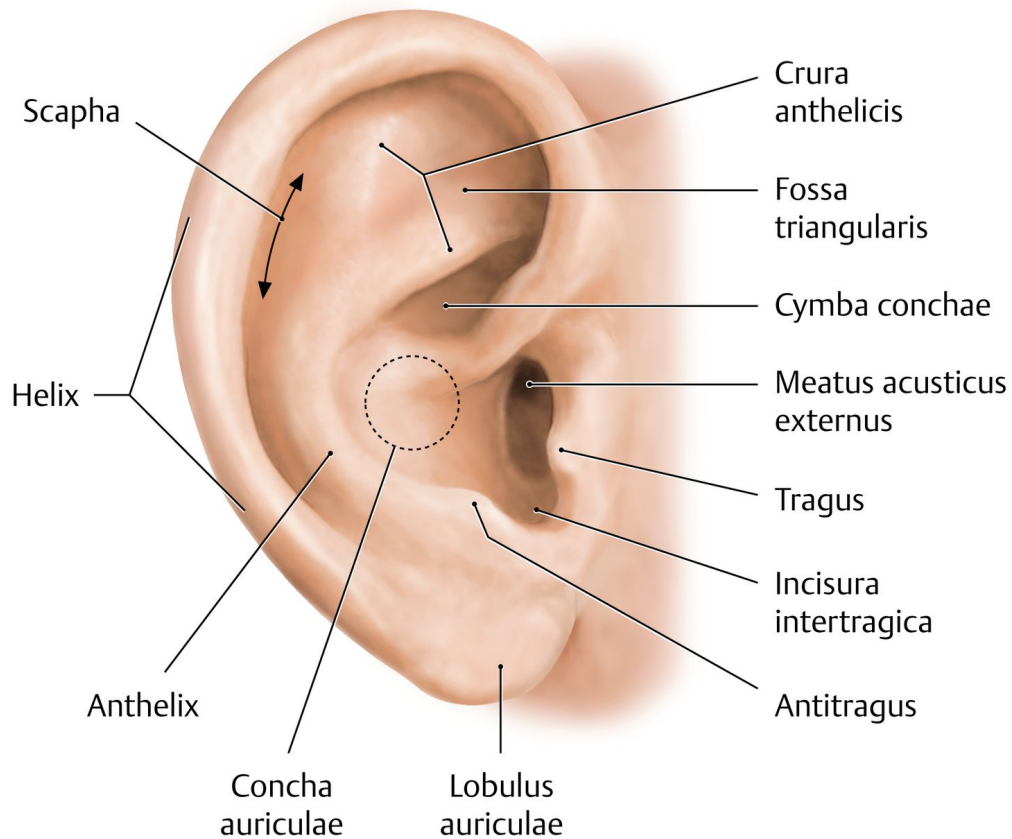


Abbildung 2: Äußeres Ohr mit Darstellung des Gehörgangseingangs sowie der charakteristischen anatomischen Landmarken der Ohrmuschel. (Modifiziert nach Voll und Wesker aus „Prometheus-Lernatlas der Anatomie: Kopf, Hals und Neuroanatomie“ (Schünke *et al.* 2018)).

Mittelohr

Dieses besteht aus Trommelfell, den Ossikeln (Hammer, Amboss, Steigbügel), Paukenhöhle, Tube und den pneumatischen Räumen.

Das Trommelfell stellt die Grenzfläche zwischen Gehörgang und Paukenhöhle dar. Die etwa 100 µm dicke Membran lässt sich in einen straff gespannten Anteil (*pars tensa*), welche den größten Teil des Trommelfells bildet, sowie einen kleineren, nicht gespannten Anteil (*pars flaccida*, Shrapnell-Membran) unterteilen (Abbildung 3).

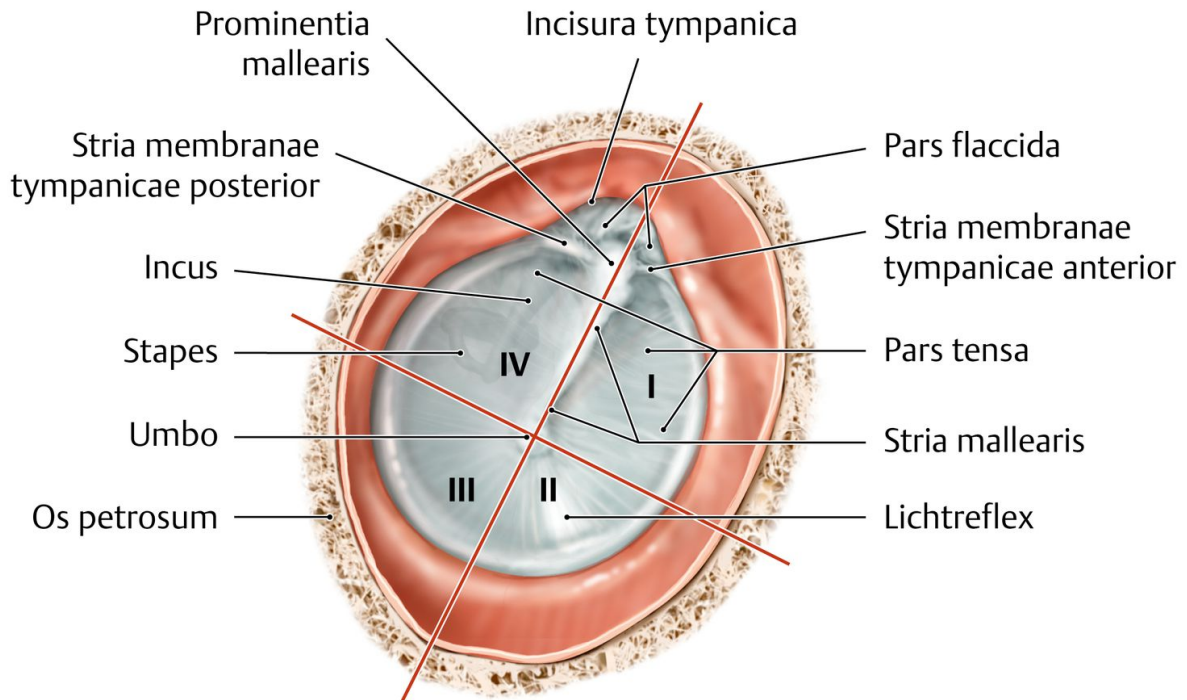


Abbildung 3: Darstellung des rechten Trommelfells mit Einteilung in seine Quadranten, in pars tensa und pars flaccida sowie Projektion von Mittelohrstrukturen auf die entsprechenden Quadranten (Modifiziert nach Voll und Wesker aus „Prometheus-Lernatlas der Anatomie: Kopf, Hals und Neuroanatomie“ (Schünke *et al.* 2018)).

Die Pars tensa ist dreischichtig aufgebaut und zum Gehörgang hin mit einschichtigem Epithel ausgestattet. Die mittlere, bindegewebsartige Schicht (lamina propria) weist zum Gehörgang hin radiäre (stratum radiatum), zur Paukenhöhle hin zirkulär verlaufende Fasern (stratum circulare) auf.

Das Trommelfell spannt sich vom faserknorpeligen Rand (Anulus fibrosus (= fibrocartilagineus), Limbus), welcher in den knöchernen Sulcus tympanicus eingebettet ist, von dorsocranial nach ventrocaudal auf und weist zentral eine trichterförmige Senke auf, an deren Spitze sich der Umbo, der Nabel des Trommelfells, befindet. Dieser wird durch das Ende des Hammergriffes, der von dieser Senke aus nach ventrokranial aufsteigt, hervorgerufen.

Das Trommelfell erfüllt zum einen wichtige Schutzfunktionen als physiologische Barriere zwischen äußerem Ohr und Mittelohr und dient zugleich aufgrund seiner elastischen Eigenschaften der Aufnahme und dem Transport der Schallenergie. Durch seine Architektur (Abbildung 4)

und die damit verbundenen elastischen Eigenschaften sind komplexe Schwingungsmodi möglich. Die inhomogene Struktur verleiht ihm unterschiedliche Absorptionscharakteristika mit zahlreichen Möglichkeiten komplexer Laser-Gewebe-Wechselwirkungen.



Abbildung 4: Schematische Darstellung des histologischen Aufbaus des Trommelfells. Der äußere, dem äußeren Gehörgang zugewandte, epitheliale Anteil besteht aus vier Schichten: Stratum corneum, stratum granulosum, stratum spinosum und stratum basale. An diese epitheliale Schicht schließt sich die sogenannte lamina propria, eine Bindegewebsschicht, an. Diese besteht wiederum aus einer subepidermalen und einer submukösen Schicht mit eingelagerten Fibroblasten. Zwischen diese beiden Anteile sind eine Kollagenfaserschicht mit radiärem und eine mit zirkulärem Faserverlauf eingelagert. An die submuköse Bindegewebsschicht grenzt schließlich die epitheliale Schicht der Mittelohrmukosa (Modifiziert nach Teh *et al.* 2013).

Die Paukenhöhle weist eine dreistöckige Architektur auf (Abbildung 5). Das Epitympanum (Kuppelraum, Attikus) steht über den Aditus ad antrum mit dem Mastoid in Verbindung, grenzt mit seinem Dach, dem Tegmen tympani et antri, an die mittlere Schädelgrube und beinhaltet Hammerkopf und Ambosskörper mit ihrer Bandaufhängung (Boenninghaus & Lenarz 2007). Das Mesotympanum umfasst lateral Trommelfell und Hammergriff, medial Promontorium sowie rundes und ovales Fenster mit Steigbügel Fußplatte und Ringband sowie die Verbindung zum Nasenrachenraum über die Tuba auditiva Eustachii im anterioren Bereich. Den Paukenboden cranial des Bulbus venae jugularis superior bildet das Hypotympanum.

Die miteinander artikulierenden Gehörknöchelchen (Hammer (Malleus), Amboss (Incus), Steigbügel (Stapes)) übertragen die vom Trommelfell absorbierte Schallenergie an die Steigbügelfußplatte und das damit verbundene ovale Fenster auf das Innenohr.

Da der Schallwellenwiderstand (Impedanz) von Flüssigkeiten höher als der von Luft ist, käme es bei einer Schallübertragung an der Grenzfläche zwischen Luft des Mittelohres und Perilymphe der Cochlea zu einem starken Verlust der Energie durch Reflexion der Schallwellen am ovalen Fenster. Das Zusammenspiel aus hebelmechanischer Verstärkung der vom Trommelfell aufgenommenen Schwingungsenergie durch die Gehörknöchelchenkette und der Flächendifferenz von Trommelfell zu ovalem Fenster führt zu einer Impedanzanpassung, sodass Energieverluste bei der Übertragung auf das Innenohr verringert werden. Durch die Hebelwirkung der Ossikel wird so eine 1,3-fache, durch die Flächendifferenz von Trommelfell zu ovalem Fenster eine 17-fache Verstärkung erzeugt, sodass eine Gesamtverstärkung um den Faktor 22 und somit ein Schalldruckpegel von 27 dB resultiert (Klinke et al. 2005; Schünke et al. 2018).

Zugleich kann durch Kontraktion der Binnenohrmuskeln (M. stapedius und M. tensor tympani) die Schwingungsfähigkeit und Hebelwirkung der Gehörknöchelchen stark reduziert werden, sodass bei hohen Schalldruckpegeln die Impedanzanpassung deutlich verschlechtert wird (Klinke *et al.* 2005). Die Verbindung über die Tuba auditiva Eustachii zum Nasenrachenraum ermöglicht einen Druckausgleich zwischen Luft im Mittelohr und der Außenluft, sodass unter physiologischen Bedingungen eine optimale Schwingungsfähigkeit des Trommelfells gewährleistet werden kann (Boenninghaus & Lenarz 2007).

Wesentliche Aufgaben des Mittelohres umfassen somit Schalldrucktransformation, Schutz- und Dämpfungsfunktionen sowie den Druckausgleich.

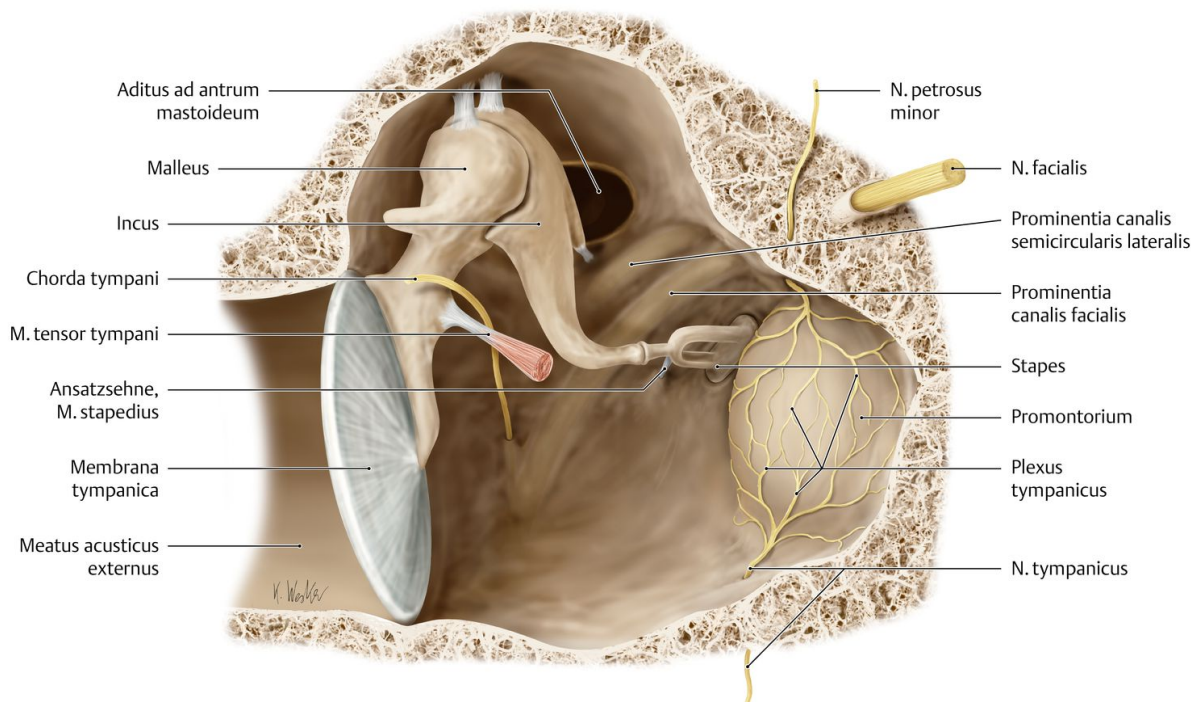


Abbildung 5: Darstellung der Anatomie des Mittelohrs. Das Trommelfell bildet die Grenze zwischen äußerem Gehörgang und Paukenhöhle. Der Hammer (Malleus) ist mit dem Trommelfell verbunden und bildet im Kuppelraum (Epitympanon) ein Gelenk mit dem Amboss (Incus). Zwischen diesem Gelenk und dem am Hammergriff ansetzenden M. tensor tympani verläuft die aus dem Facialiskanal austretende, Geschmacksfasern führende Chorda tympani. Kranial des knöchernen Facialiskanals ist der laterale Bogengang des Gleichgewichtsorgans in seinem Verlauf abgebildet. Der Amboss artikuliert mit dem Steigbügel (Stapes), welcher mit seiner Fußplatte mit dem ovalen Fenster und gelenknah mit der Ansatzsehne des M. stapedius verbunden ist (Modifiziert nach Voll und Wesker aus „Prometheus-Lernatlas der Anatomie: Kopf, Hals und Neuroanatomie“ (Schünke *et al.* 2018)).

Innenohr

Das Innenohr enthält das Gleichgewichts- und das Hörorgan, die Schnecke (Cochlea). Diese besteht aus einem dreistöckigen, knöchernen, ca. 2,5-fach um seine Achse (Modiolus) gewundenen Schneckenkanal (Canalis spiralis cochleae). Der Modiolus enthält die Perikarya der afferenten Neurone im Ganglion spirale. Das ovale Fenster grenzt an eines der drei im Inneren der Cochlea befindlichen Kompartimente, die Scala vestibuli. Diese kommuniziert an der Spitze der Cochlea (Helicotrema) mit der Scala tympani, die sich bis zum runden Fenster windet und von dessen Membran zum Mittelohr hin begrenzt wird. Scala vestibuli und Scala tympani sind mit Perilymphe, einem Na^+ -reichen und K^+ -armen Ultrafiltrat des Blutplasmas gefüllt. Von Scala vestibuli durch die Reissner-Membran und Scala tympani durch die Basilarmembran getrennt, liegt zwischen diesen Kompartimenten der Ductus cochlearis, welcher mit Endolymphe gefüllt ist. Dieses K^+ -reiche und N^+ -arme Filtrat wird von der Stria vascularis sezerniert, sodass

ein elektrochemischer Gradient zwischen Peri- und Endolymphraum mit einem positiven endolymphatischen Potential von etwa +80 mV resultiert (Klinke *et al.* 2005).

Am Boden des Ductus cochlearis befindet sich die Basilarmembran. Sie trägt auf ihrer Oberfläche das Corti-Organ, bestehend aus Stützzellen, einer Reihe innerer Haarzellen und drei Reihen äußerer Haarzellen. An ihrer in den Endolymphraum ragenden Oberfläche befinden sich durch Proteinfäden („tip links“) miteinander verbundene Stereozilien. Die äußeren Haarzellen sind mit dem Ende ihrer Stereozilien an der das Corti-Organ bedeckenden Tektorialmembran (membrana tectoria) befestigt. Die Schwingung der Stapesfußplatte am ovalen Fenster wird auf die Perilymphsäule der Scala vestibuli und somit auf alle Membranen des Innenohres übertragen, sodass sich eine Wanderwelle entlang des Schneckenverlaufes ausbreitet. Da die Basilarmembran vom ovalen Fenster bis zum Helicotrema in ihrer Steifigkeit abnimmt, findet sich auf dieser Strecke ein frequenzspezifisch optimales Schwingungsverhalten. Die Schwingungsamplitude wird dort maximal, wo Eigenfrequenz der Basilarmembran und Anregungsfrequenz übereinstimmen. Da somit jede Frequenz einem Ort der maximalen Schwingungsamplitude auf der Basilarmembran zugeordnet werden kann, wird dieses Phänomen als Frequenz-Orts-Abbildung oder Tonotopie bezeichnet.

Die äußeren Haarzellen fungieren hierbei als Verstärker. Am Schwingungsmaximum kommt es zu einer maximalen Abscherung der Stereozilien und durch Zug an den „tip links“ kommt es zu einer Öffnung von Transduktionskanälen (Klinke *et al.* 2005). Das spannungsabhängige Motorprotein „Prestin“ führt zu einer aktiven oszillierenden Längenveränderung der äußeren Haarzelle, sodass diese als cochleärer Verstärker die Wanderwelle mit zusätzlicher Schwingungsenergie unterstützt (Zheng *et al.* 2000).

Dadurch werden nun auch die Stereozilien der inneren Haarzellen abgebogen, sodass es nach Öffnung der Transduktionskanäle zur Depolarisation der inneren Haarzellen und zur Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat kommt. Es werden Aktionspotentiale generiert, welche über den Hörnerv und die zentrale Hörbahn geleitet werden, um im auditorischen Kortex aufgelöst zu werden.

2.3.2 Formen der Schwerhörigkeit

Pathophysiologisch können an jeder der oben genannten Stationen der Schallübertragung und -verarbeitung, Störungen auftreten. Je nach Lokalisation der Störungsursache unterscheidet man zwischen Schallleitungs-, Innenohr- und retrocochleärer bzw. zentraler Schwerhörigkeit.

Ursachen für eine Schallleitungsschwerhörigkeit liegen in einer Behinderung der Schallleitung und -übertragung im Bereich des äußeren Ohres und des Mittelohres.

Störungen im Bereich des Innenohres können wiederum in Motorinnenohrschwerhörigkeit (Typ I: Funktionsstörung oder -verlust der äußeren Haarzellmotilität), Transduktionsinnenohrschwerhörigkeit (Typ II: mechanoelektrische Transduktionsstörung im Bereich der inneren Haarzellen) und Transformationsinnenohrschwerhörigkeit (Typ III: Störungen im Bereich der Synapse zwischen äußerer Haarzelle und afferenter Hörnervenfasern) und extrasensorische Innenohrschwerhörigkeit (Typ IV: extrasensorische sensorineurale Schwerhörigkeit, z.B. Störungen im Bereich der Stria vascularis) unterteilt werden, wobei auch kombinierte Störungen möglich sind (Reiß 2009).

Wenn eine operative Hörverbesserung nicht zu erreichen ist, kann auf die Option der Hörsystemversorgung zurückgegriffen werden. Je nach Art und Ursache der Schwerhörigkeit sind hierbei zahlreiche Systeme, die auf Grundlage der mechanischen oder elektrischen Stimulation arbeiten, verfügbar.

2.4 Aktuell verfügbare Hörsysteme

Hörgeräte dienen der symptomatischen Behandlung von Hörstörungen. Herkömmliche Systeme bestehen aus einer Mikrofon-Einheit, welche das eingehende Schallsignal aufnimmt, filtert und vorverstärkt sowie aus einem Audioprozessor, der eine individuelle Anpassung des Schallsignals ermöglicht und dieses über einen Wandler an die zu stimulierende Struktur weitergibt. Luftleitungshörgeräte arbeiten mit Hilfe einer hinter oder im Ohr gelegenen Mikrofon-Einheit und eines elektroakustischen Wandlers im Sinne eines Lautsprechers, der das amplifizierte Signal auf das Trommelfell überträgt. Knochenleitungshörgeräte ermöglichen eine Überbrückung des von äußerem Ohr und Mittelohr gebildeten Schallleitungsapparats durch Übertragung der Schallinformation auf den Schädelknochen. Hierzu kommen Körper-

schallgeber bzw. implantierbare piezoelektrische oder elektromagnetische Wandler zum Einsatz. Implantierbare perkutane Hörsysteme wie das BAHA (Bone Anchored Hearing Aid) – System übertragen die Schallinformation über eine perkutan in den Schädelknochen eingebrachte Titanschraube. Diese Systeme bieten eine gute Verstärkungsleistung, Nachteile bestehen hierbei in der spontanen Implantatlockerung, Hautreaktionen wie Rötungen im Bereich des Implantats, der Bildung von Granulationsgewebe sowie chronische Entzündungen mit Notwendigkeit der chirurgischen Revision und Reimplantation (Håkansson *et al.* 2008). Transkutane Systeme wie das Baha® Attract System (Cochlear AG, Sidney, Australia) (Nelissen *et al.* 2014), das Sophono™ (Mulla *et al.* 2012) oder das Bonebridge-System (MED-EL GmbH, Innsbruck, Austria) (Huber *et al.* 2013) umgehen diese Nachteile durch eine magnetische transkutane Verbindung zwischen auf der Kopfhaut getragendem Soundprozessor und der subkutan platzierten Stimulationseinheit. Aktive Systeme wie das Vibrant Soundbridge (Cochlear AG, Sidney, Australia) (Fisch *et al.* 2001) oder das System Carina® (Cochlear AG, Sidney, Australia) (Klein *et al.* 2012) stellen mit ihren Stimulationseinheiten eine direkte Verbindung zu den Ossikeln bzw. dem runden Fenster her. Eine suffiziente Ankopplung an der zu stimulierenden Struktur ist maßgeblich für das funktionelle Ergebnis verantwortlich, kann sich bei komplexen Mittelohrpathologien jedoch als schwierig erweisen (Colletti *et al.* 2006). Bei einem Ausfall der Innenohrfunktion und erhaltenem Hörnerv kann die Implantation eines Cochlea-Implantats eine Möglichkeit der Hörrehabilitation bieten. Durch Einbringen einer Elektrode in die Cochlea wird mittels elektrischer Stimulation der Hörnerv direkt angeregt und somit ein Höreindruck erzeugt (Klinke & Hartmann 1979). Verbesserungen des Elektrodendesigns und der Verfügbarkeit einer zunehmenden Elektrodenkanalzahl haben zu einer raschen Entwicklung der Implantate geführt. Dennoch kommt es durch eine Verteilung des durch die Elektrodenkanäle freigesetzten Stroms im umliegenden Gewebe zu einem Verlust der Frequenzspezifität.

Laserlicht wird bereits als Bestandteil des Hörsystems „Earlens“ eingesetzt. Hierbei werden eintreffende Schallinformationen von einer hinter der Ohrmuschel getragenen Einheit aufgenommen, in elektrische Signale umgewandelt und diese in Form von Lichtpulsen mittels Diode auf das Trommelfell projiziert. Eine auf dem Trommelfell platzierte Empfänger-Aktuator-Einheit ermöglicht die Umwandlung der Schallinformationen in Form der Lichtpulse in mechanische Schwingung des Trommelfells (Puria *et al.* 2016).

Bislang erprobte Laser-basierte Hörsysteme, welche eine Stimulation an Trommelfell (Puria *et al.* 2016) und rundem Fenster (Goll *et al.* 2013) nutzen, konnten bereits ausreichende Schwingungsamplituden zeigen, um den Bedarf schwer hörgeschädigter Patienten bis zu Frequenzen

von mindestens 10 kHz zu erfüllen (Fay *et al.* 2013). Dennoch vermögen diese Systeme nicht, Lichtenergie direkt in mechanische oder elektrische Anregung des Hörorgans umzusetzen, sondern benötigen einen aktiven, schwingungsfähigen Überträger, der am Stimulationsort angekoppelt werden und dort zur langfristigen, effizienten und zuverlässigen Anwendung verbleiben muss.

Trotz der raschen Entwicklung im Bereich der Hörsystemtechnologie sind viele Patienten noch immer unzureichend versorgt. Außerdem tragen viele Patienten trotz Indikation und Verordnung einer Hörhilfe diese nicht regelmäßig. Gründe für eine unzureichende Compliance im Hinblick auf die Verwendung herkömmlicher Hörsysteme bestehen unter anderem in einem mangelhaften Tragekomfort, konstruktionsbedingter Rückkopplungsanfälligkeit mit unzureichendem Verstärkungsvermögen sowie schlechter Sprachverständlichkeit im Störgeräusch. Ein mangelhaftes Frequenzauflösungsvermögen, Okklusionseffekte und rezidivierende Entzündungen des äußeren Gehörgangs durch den chronischen Fremdkörperreiz stellen weitere Faktoren dar (McCormack & Fortnum 2013). Vor diesem Hintergrund sind neue Stimulationsstrategien und innovative Technologien notwendig, um eine spezifischere Stimulation des Hörorgans zu ermöglichen und somit besser auf individuelle Bedürfnisse hörgeschädigter Patienten eingehen zu können.

Eine vielversprechende Alternative mit dem Ziel der spezifischen Aktivierung des Hörorgans stellt die optische Stimulation mittels Laserlichts unter Ausnutzung des optoakustischen Effekts dar. Laserlicht bietet einige Vorteile gegenüber herkömmlicher mechanischer oder elektrischer Stimulationsmethoden. Aufgrund hoher örtlicher und zeitlicher Kohärenz kann es sehr präzise fokussiert werden, die Eigenschaften des Lichts machen außerdem eine kontaktfreie Ankopplung mit hohen Übertragungsgeschwindigkeiten möglich. Einen Ansatz im Hinblick auf einen therapeutischen Lasereinsatz im Bereich des Innenohres lieferten bereits 2004 Wenzel *et al.* Sie zeigten, dass mit Hilfe von Laserbestrahlung, Änderungen hinsichtlich der Kollagenanordnung innerhalb der Basilarmembran im Sinne eines cochleären „Retunings“ erzeugt werden konnten (Wenzel *et al.* 2004). Die erste lokale mechanische Stimulation des Hörorgans mittels Laserlichts wurde 2006 von Fridberger und Ren beschrieben (Fridberger & Ren 2006). 2009 konnten Wenzel und Zhang *et al.* die Aktivierung der Cochlea durch Laserlicht der Wellenlänge von 532 nm unter Ausnutzung des optoakustischen Effekts nachweisen (Wenzel *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2009). Bereits ein Jahr später konnte die Anwendung dieser Methode auch auf Trommelfell- und Mittelohrebene gezeigt werden (Wenzel *et al.* 2010).

Die Vorteile der Laser-optischen Aktivierung der Cochlea könnten, im Vergleich zur elektrischen Stimulation, wie sie in gängigen Cochlea-implantaten verwendet wird, in der höheren Frequenzspezifität liegen. Während der Strom, welcher von einer Elektrode eines Cochlea-Implantats ausgeht im Gewebe einer Streuung unterliegt, könnte die optische Stimulation eine streuungsärmere, selektivere Anregung ermöglichen (Zhang *et al.* 2009; Hernandez *et al.* 2014). Voraussetzung dazu ist jedoch eine Cochlea mit funktionstüchtigen inneren Haarzellen. Ansätze zur optischen Anregung des Hörnervs mit Hilfe von Infrarotlicht waren bereits zuvor von Izzo *et al.* berichtet worden. Die genauen Mechanismen hinter diesen Beobachtungen sind nicht vollständig geklärt, diskutiert werden jedoch eine Korrelation mit den spezifischen Absorptionseigenschaften von oxigeniertem Hämoglobin (Stimulationswellenlänge < 845 nm) und von Wasser (Stimulationswellenlänge > 845 nm) (Schultz *et al.* 2012) sowie die damit assoziierte Ausbildung eines thermischen Gradienten, der durch direkte oder indirekte Aktivierung von Ionenkanälen zur Generierung von Aktionspotentialen führt (Liljemalm *et al.* 2013; Wells *et al.* 2007). Shapiro *et al.* fanden in ihren Versuchen anhand eines Zellkulturmodells Hinweise dafür, dass gepulste Infrarotbestrahlung und die damit verbundenen Temperaturänderungen zu reversiblen Änderungen des Zellmembranpotentials und somit zu Depolarisationen der Zielzelle führen könnten (Shapiro *et al.* 2012). Ob diese Energie zur Depolarisation von Spiralganglienneuronen führen kann, ist jedoch fraglich.

Rettenmaier *et al.* untersuchten mittels Patchclamp-Technik die Effekte der Bestrahlung im Wellenlängenbereich von 420 – 1950 nm auf Spiralganglienzellen. In ihren Versuchen war zwar eine Pulsenergie- und Wellenlängenabhängigkeit bezüglich der Zellreaktionen zu beobachten, doch reichten diese nicht aus, um Aktionspotentiale auszulösen. Da die in diesen Versuchen eingesetzte Energiedichte einem Vielfachen der in *in vivo*-Versuchen deklarierten Schwellenenergie (25 μ J) entsprach, schlussfolgerten Rettenmaier *et al.*, dass eine direkte neuronale Stimulation mittels gepulster Infrarotstrahlung nicht den grundlegenden Mechanismus der cochleären Stimulation darstellt (Rettenmaier *et al.* 2014). Als weiterer Mechanismus wurde die Induktion akustischer Druckwellen durch gepulste Infrarotlaserbestrahlung beschrieben. Teudt *et al.* bezeichneten diese auf optoakustischen Effekten beruhende optische Stimulation der Cochlea als „Optophonie“ und betonten die Notwendigkeit der Begriffsabgrenzung gegenüber der „optoneuralen“ Antwort (Teudt *et al.* 2011). Auch Verma *et al.* konnten eine neurale Stimulation des Nucleus cochlearis durch Infrarotlicht nach Ertaubung der Versuchstiere nicht mehr beobachten, sodass auch hier ein zugrundeliegender optoakustischer Effekt vermutet wurde (Verma *et al.* 2014). Kallweit *et al.* verglichen die Ergebnisse der cochleären

Laserstimulation mit Druckmessungen in wässriger Flüssigkeit und kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass optoakustische Effekte der intra-cochleären Laserstimulation zu Grunde liegen (Kallweit *et al.* 2016).

Eine weitere Strategie zur Anwendung der optischen Energie für die Aktivierung des Hörsystems ist die optogenetische Stimulation. Die Optogenetik basiert auf der Aktivierung genetisch modifizierter Zellen, welche mit einem Lichtsensor-Protein, einem sogenannten Rhodopsin bzw. Channelrhodopsin, ausgestattet sind. So kann durch Lichtstimuli je nach Kanalfunktion eine gezielte Aktivierung bzw. Inhibition erzielt werden (Dugué *et al.* 2012). Diesen Ansatz machte man sich bereits früh in der Neurobiologie zur spezifischen Stimulation von Channelrhodopsin-exprimierenden Neuronen zu Nutze. Hernandez *et al.* verfolgten diesen Ansatz, indem sie Mäusecochleae, welche neuronal Channelrhodopsine exprimierten, mittels Mikro-LEDs und Laserfaser bestrahlten. In ihren Versuchen konnten sie mit Hilfe von Hirnstamm- und Colliculus inferior-Ableitungen die erfolgreiche Stimulation der Spiralganglienneurone zeigen (Hernandez *et al.* 2014).

Die parallel dazu analysierte Anregung des Hörorgans mit Hilfe von Lichtpulsen ist die optoakustische Stimulation. Diese bietet den Vorteil, Lichtenergie direkt in die schwingungsfähigen Bestandteile des Hörorgans zu leiten und somit eine unmittelbare Anregung biologischer Strukturen zu erzielen. Um eine Kodierung von Informationen in Form monochromatischer Lichtpulse zur Induktion unterschiedlicher optoakustischer Schwingungen in einem biologischen System zu erreichen, musste eine entsprechende Modulationsstrategie entwickelt werden.

Mit Hilfe einer eigens für diesen Zweck entwickelten Laserpuls-Amplitudenmodulation konnten Stahn *et al.* im Tierversuch eine frequenzspezifische Aktivierung der Hörbahn mittels optisch evozierter Hirnstammpotentiale (oABR) sowie Ableitungen im Colliculus inferior nachweisen (Stahn *et al.* 2019).

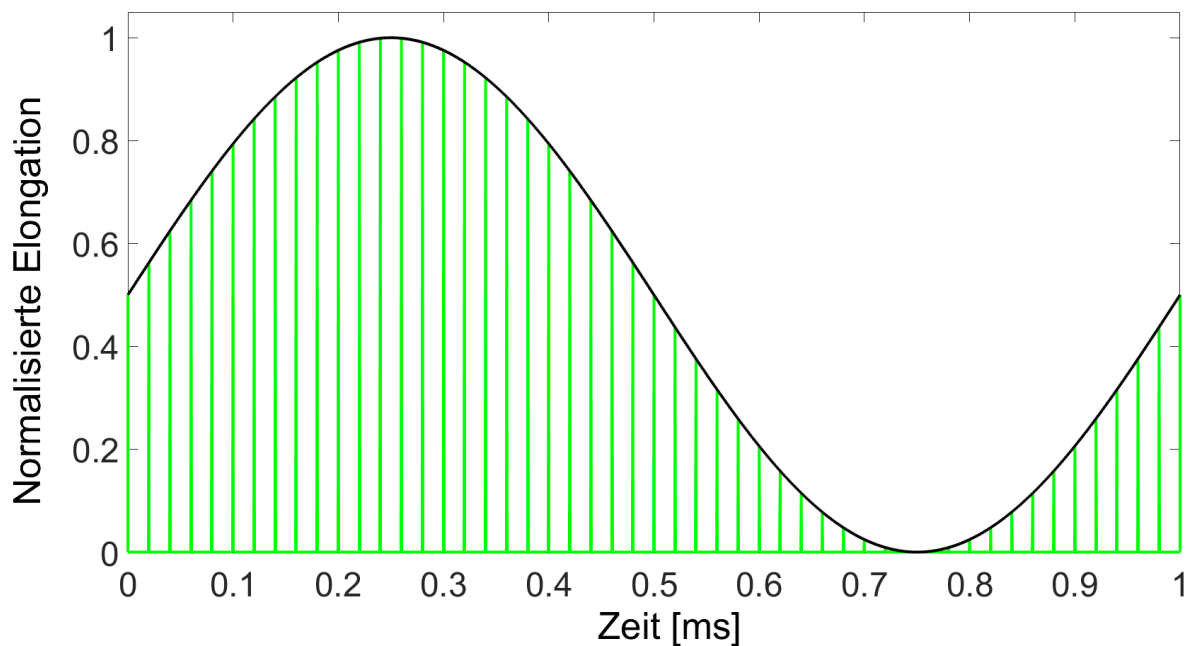


Abbildung 6: Schematische Darstellung der von Wenzel und Stahn *et al.* entwickelten Laserpuls-Amplitudenmodulationsstrategie zur optoakustischen Schwingungserzeugung in biologischen Systemen. Exemplarisch ist eine 1 kHz-Schwingung dargestellt, wobei die Trägerfrequenz durch die Laserpulsrate und das modulierte Signal durch die Laserpulsamplitude bestimmt wurde (Modifiziert nach Stahn *et al.* 2019).

Abbildung 6 zeigt die von Wenzel und Stahn *et al.* entwickelte Laserpuls-Amplitudenmodulationsstrategie. Die Trägerfrequenz wird durch die Laserpulsrate bestimmt, das sinusförmige Nutzsignal durch die Höhe der Laserpulsamplitude generiert.

Die Etablierung dieser Stimulationsstrategie mit der damit im Tierversuch erfolgreich erzielten frequenzspezifischen Stimulation des Hörorgans, verdeutlicht das Potential optoakustischer Stimulationsmethoden als Grundlage der Entwicklung einer neuen Hörsystemgeneration.

Eine elementare Bedingung für den klinischen Einsatz eines solchen Laser-basierten Hörsystems ist der biologisch sichere Einsatz im menschlichen Körper. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Effekte des oben genannten Lasersystems und der von Wenzel *et al.* entwickelten Stimulationsstrategie auf menschliche Zellen in einem *in vitro*-Zellkulturmodell. Dabei sollten Laserbestrahlungs-assoziierte zytotoxische Effekte detektiert, in ihrer Kinetik analysiert und eine Grenze hinsichtlich der maximal applizierbaren Laserleistung gefunden werden.

Ein Modell zur Beurteilung der biologischen Verträglichkeit von Medizinprodukten bildet die EN ISO 10993-Normenserie. Bestandteil jeder Biokompatibilitätsbeurteilung ist die Prüfung eines Medizinproduktes auf Zytotoxizität (ISO 10993-5). Sie entspricht der Fähigkeit eines Reizes bei Interaktion mit Zellen und Geweben, diese zu schädigen. Charakteristische Befunde

zytotoxischer Reaktionen sind ein Verlust der Membranintegrität, verringerte Stoffwechselaktivität oder eine Einschränkung im Proliferationsverhalten. Die ISO 10993-Norm empfiehlt zur Beurteilung von *in vitro*-Zytotoxizität, Untersuchungen hinsichtlich unterschiedlicher Endpunkte, die als Hinweis für Zellschädigung dienen können: Begutachtung der Zellmorphologie, Messung von Zellschädigung, Beurteilung von Zellwachstum und spezifischer Aspekte des Zellmetabolismus (ISO 10993-5:2009 2009).

Die Norm bezieht sich jedoch auf Substanzen und Materialien, die in direktem oder indirektem Kontakt mit biologischen Geweben stehen. Die OECD-Leitlinie zur Beurteilung von Phototoxizität stellt einen Zytotoxizitätstest anhand der Fibroblastenzelllinie 3T3 dar. Hierbei wird das phototoxische Potential einer Testsubstanz bestimmt. Phototoxizität beschreibt dabei die Fähigkeit einer Chemikalie nach Lichtanregung einen toxischen Reiz auf die zu untersuchenden Zellen auszuüben (OECD 2004; Peters & Holzhütter 2002). Der Test wurde jedoch lediglich zur Untersuchung einer photochemisch wirksamen Testsubstanz *in vitro* entwickelt und dient somit nicht der Untersuchung der intrinsischen Zytotoxizität von Licht einer bestimmten Wellenlänge. Zur Beurteilung der Biokompatibilität Laser-basierter Anwendungen auf *in vitro*-Zellkulturebene existieren bislang keine einheitlichen Testverfahren. Oben genannte *in vitro*-Testverfahren bieten jedoch wertvolle Anhaltspunkte hinsichtlich etablierter Prüfungsverfahren und Beurteilungskriterien. Wir berücksichtigen somit im Rahmen dieser Arbeit zur Untersuchung der Biokompatibilität unserer Lasermodulationsstrategie einige im Zusammenhang mit Zytotoxizitätsprüfungen etablierte Testsysteme und Beurteilungsmethoden in unserem *in vitro*-Zellkulturmodell.

2.5 Laser-Gewebe-Wechselwirkungen

Um die Effekte von Licht auf unser Zellkultursystem nachzuvollziehen, ist es notwendig, die physikalischen Grundlagen der Interaktion zwischen Licht und biologischen Geweben zu verstehen. Wenn Licht auf Gewebe trifft, resultieren aus den Eigenschaften des Lichts und des Materials, auf welches dieses trifft, Interaktions-Effekte, die sich auf die weitere Ausbreitung der Photonen auswirken. Abbildung 7 zeigt schematisch Mechanismen der Laser-Gewebe-Wechselwirkung beim Auftreffen von Licht auf eine Grenzfläche sowie beim Ein- und Durchdringen eines Materials oder Gewebes.

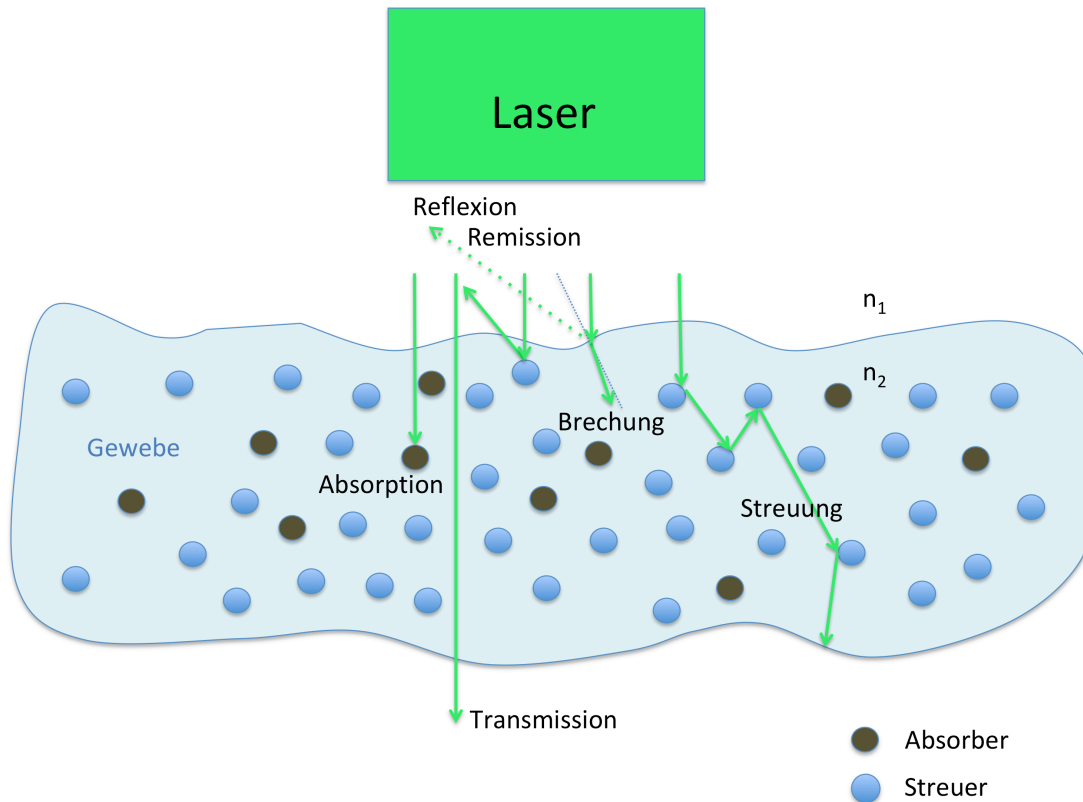


Abbildung 7: Mechanismen der Laser-Gewebe-Wechselwirkung: Beim Auftreffen der vom Laser (grün) ausgehenden Photonen auf eine Grenzfläche kommt es je nach Oberflächenkonfiguration und Einfallswinkel der Photonen zur Reflexion (grüne unterbrochene Linie) bzw. zur Brechung. Der in das Gewebe eindringende Anteil wird transmittiert, absorbiert oder gestreut (Modifiziert nach R. Steiner aus „Lasertherapie der Haut“ (Raulin *et al.* 2012)).

2.5.1 Reflexion und Brechung

Beim Übergang der Lichtquanten von einem ins andere Medium wird ein Teil durch die Änderung des Brechungsindex in Abhängigkeit von Einfallswinkel der Photonen an der Oberfläche des Materials reflektiert. Der in das Gewebe eindringende Anteil erfährt durch Brechung an der Grenzfläche eine Änderung der Ausbreitungsrichtung. Diese lässt sich durch das Snelliussche Gesetz beschreiben mit:

$$\frac{\sin \alpha_1}{\sin \alpha_2} = \frac{n_2}{n_1} = n_{12}$$

Bei der Ausbreitung im Material unterscheidet man zwei grundsätzliche Mechanismen:

Streuung und Absorption.

2.5.2 Absorption

Die Energie eines Photons ist gegeben durch die Plancksche Gleichung:

$$E=hf$$

Hierbei entspricht f der Frequenz des Lichts und h dem Planckschen Wirkungsquantum. Energieübergänge eines Moleküls sind gequantelt. Daher werden nur Photonen, deren Energie $E=hf$ der Differenz zwischen zwei quantisierten Energieniveaus entspricht, absorbiert. Bei diesem Vorgang kommt es zur Anregung des Moleküls durch eine Anhebung von Elektronen auf ein energetisch höheres Niveau (elektronischer Übergang) oder zu einer Veränderung des molekularen Schwingungszustandes (Schwingungsübergang) (Raulin *et al.* 2012). Wenn die angeregten Ladungsträger unter Emission eines Quants auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurückkehren, spricht man von Fluoreszenz bzw. Phosphoreszenz. Zelluläre molekulare Absorber stellen Porphyrine, Hämoglobin, Melanin, Flavin, Retinol, Nukleinsäuren und Nicotinamidadenindinukleotid dar (Raulin *et al.* 2012). Der Absorptionskoeffizient μ_a (cm^{-1}) eines Stoffes beschreibt die materialeigene, durch die Absorption auftretende Intensitätsschwächung der auftreffenden Photonen.

Das Lambert-Beersche Gesetz beschreibt die Abschwächung der eingestrahltten Intensität I_0 des Lichts beim Durchlaufen eines Materials der Schichtdicke d unter Berücksichtigung des Absorptionskoeffizienten μ_a :

$$I=I_0 \exp (-\mu_a d)$$

μ_a ist hierbei abhängig von der Wellenlänge des Lichtes sowie vom absorbierenden Medium. Der Kehrwert des Absorptionskoeffizienten gibt die mittlere freie Weglänge bis zum nächsten Absorptionsvorgang im Medium an (Raulin *et al.* 2012).

Die Flussdichte (fluence rate) entspricht der Laserintensität im absorbierenden Medium und berechnet sich aus der absorbierten Laserleistung pro Fläche:

$$\text{Flussdichte} = \frac{P}{A} \text{ bzw. } \frac{P}{\pi r^2} \text{ (bei kreisförmigem Bestrahlungsareal)}$$

2.5.3 Streuung

Ein weiterer Ausbreitungsmechanismus, dem Licht beim Durchwandern eines Mediums unterliegt, ist die Streuung. Sie beschreibt die energieverlustfreie Änderung der Ausbreitungsrichtung der das Material durchwandernden Photonen (Raulin *et al.* 2012) durch Wechselwirkung mit einem entsprechenden Streuzentrum des Mediums.

Bei diesem Vorgang reicht die Energie $E=h\nu$ des Photons nicht aus, um das Molekül, auf welches es trifft, anzuregen.

Je nach Größe der streuenden Struktur unterscheidet man zwei maßgebliche Streuungsarten: Rayleigh- und Mie-Streuung.

Rayleigh-Streuung tritt auf, wenn die Größe der streuenden Struktur d kleiner, Mie-Streuung, wenn d größer als die Wellenlänge des auftreffenden Lichts ist. Bei Streuungsprozessen im Gewebe liegt stets eine Mischung aus beiden Streuungsarten vor (Raulin *et al.* 2012).

Wie bei der Absorption, wird die Streuung in einem Medium durch den Streukoeffizienten μ_s [cm^{-1}] näher beschrieben. Sein Kehrwert gibt die mittlere freie Weglänge bis zum nächsten Streuvorgang an. Die Streuung wird außerdem durch den Anisotropiefaktor g charakterisiert. Bei isotroper Streuung ist $g=0$, bei Rückwärtsstreuung erreicht g negative Werte und bei direkter Vorwärtsstreuung ist $g=1$. Unter Berücksichtigung des Anisotropiefaktors kann der reduzierte Streukoeffizient μ_s' wie folgt definiert werden:

$$\mu_s' = \mu_s (1-g) [\text{cm}^{-1}]$$

Die Summe aus Absorptions- und Streukoeffizient entspricht dem absoluten Abschwächungskoeffizienten μ_t

$$\mu_t = \mu_s + \mu_a [\text{cm}^{-1}]$$

2.5.4 Mechanismen der Laser-Gewebe-Wechselwirkung

Photodisruption

Fokussierte Laser, die im Nano-, Femto- oder Pikosekundenbereich arbeiten, können sehr hohe Leistungsdichten erreichen, sodass in der bestrahlten Materie freie Elektronen im elektrischen Feld der elektromagnetischen Welle des Lasers zu schwingen beginnen und bei Kollisionsprozessen mit neutralen Atomen ebenfalls weitere Elektronen aus diesen herausreißen. Es kommt zu einer kettenreaktionsartigen Ionisation der Materie (Avalanchephase). Die Temperatur der Teilchen im entstehenden Plasma erhöht sich dabei rasch, wobei sich das Plasma schnell ausbreitet. Zugleich kommt es zur vermehrten Absorption der Laserenergie und zum konsekutiven Druck- und Temperaturanstieg im Fokusbereich mit Kavitationsblasenbildung. So kann es bei entsprechend hohen Laserintensitäten zur Plasma- mit Schockwellenbildung und Zerreißung des bestrahlten Gewebes kommen.

Photochemische Reaktionen

Bei Absorptionsprozessen im bestrahlten Gewebe kann es außerdem durch energetische Anregung von absorbierenden Molekülen zu chemischen Reaktionen im Gewebe kommen. Diese Effekte reichen von Veränderungen in Proliferationsverhalten, Zellmetabolismus (Karu 1991), Enzymaktivität (Karu 2010b), zellulärer Redoxaktivität (Lubart *et al.* 2005) und Signaltransduktionswegen bis hin zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Gao & Xing 2009) und Zelltod (L. Huang *et al.* 2010).

Photothermische Reaktionen

Zelluläre Photonenabsorber können in Abhängigkeit der Wellenlänge Nucleinsäuren, Proteine, Chromophore, Enzyme, Membranbestandteile oder Wasser sein (Raulin *et al.* 2012).

Die vom Gewebe absorbierte Laserenergie wird in Wärmeenergie umgewandelt. Die hierbei auftretende Temperaturerhöhung kann unter Berücksichtigung der absorbierten thermischen Energie pro Volumen Q [J/cm³], der Dichte ρ [g/cm³] sowie der spezifischen Wärmekapazität des bestrahlten Mediums c_w [J/gK] mit folgender Formel berechnet werden:

$$\Delta T = \frac{Q}{\rho c_w} \text{ [K]}$$

Der Wärmetransport ist abhängig von der Diffusionszeit im Gewebe. Zum Wärmeeinschluss („thermal confinement“) kommt es, wenn die Laserpulsdauer kurz in Relation zur thermischen Diffusionszeit ist. Das bestrahlte Volumen erreicht eine höhere Temperatur als die Umgebung. Dabei kann die in das Gewebe abgegebene Energie aus dem Bereich des bestrahlten, sich erwärmenden Volumens nicht in die Peripherie abfließen, sodass es zu einem selektiven Temperaturanstieg im Bestrahlungsfokus kommt (Jacques 1993).

Die Diffusionszeit kann mit folgender Formel beschrieben werden:

$$t_d = \frac{1}{\kappa \mu_a^2} \text{ [s]}$$

Wobei κ dem thermischen Diffusionskoeffizienten entspricht:

$$\kappa = \frac{\Lambda}{\rho c_w} \text{ [m}^2\text{/s]}$$

Dieser ist abhängig von der thermischen Leitfähigkeit Λ , der spezifischen Wärmekapazität c_w und der Dichte ρ des bestrahlten Mediums.

Mit Hilfe des Absorptions- und Diffusionskoeffizienten kann die thermische Relaxationszeit wie folgt berechnet werden:

$$\tau_R = \frac{1}{(4\mu_a^2\kappa)} \text{ [s]}$$

Je nach Ausprägung der Erwärmungseffekte können biologische Gewebe schrittweise eine selektive Schädigung erfahren:

Zwischen 40 °C und 45 °C kommt es zum Verlust enzymatischer Aktivität mit Hyperchromasie, Hyperthermie, zunächst reversibler, ab 43 °C dann zu irreversibler Zellschädigung. Ab ca. 60 °C können Denaturierung von Strukturproteinen und kollagener Fasern, ab 100 °C Austrocknungseffekte und Vakuolenbildung nachgewiesen werden (Thomsen 1991).

Wenn Gewebe so rasch erhitzt wird, dass die Pulsdauer kürzer ist als die Ausbreitungszeit der Spannungswelle, die durch das erwärmte Volumen läuft, kommt es zum sogenannten Spannungseinschluss (stress confinement). Diese Effekte macht man sich beispielsweise bei der Laserablation zu Nutze. Wenn die Spannungswelle das erwärmte Volumen während des Laserpulses nicht verlassen kann, löst sie sich in der Ablation des absorbierenden Materials auf.

Die interne Spannung wird hierbei durch den Grüneisen-Koeffizienten Γ beschrieben.

$$\Gamma = \frac{\alpha}{(\rho c_w \kappa_T)}$$

Wobei α dem Koeffizienten für die thermische Ausdehnung, ρ der Dichte des Materials, c_w der spezifischen Wärmekapazität und κ_T der isothermen Kompressibilität entsprechen.

Diese Mechanismen der Licht-Gewebe-Wechselwirkung bilden die Grundlage für die Optoakustik.

Die mit Hilfe des Lichts in das Gewebe eingebrachte Energie wird in kinetische Energie umgewandelt. Der Temperaturanstieg führt, bei konstantem Volumen des bestrahlten Gewebes, zu einer thermoelastischen Ausdehnung und zu einem Druckanstieg. Die während dieser thermoelastischen Expansion und anschließenden Relaxation entstehenden Druckunterschiede führen zur Entstehung einer Schallwelle, welche sich durch das bestrahlte Medium bewegt.

Die Mechanismen der Laser-Gewebe-Wechselwirkungen in Abhängigkeit von der Interaktionszeit sind, wie bereits von Boulnois *et al.* beschrieben (Boulnois 1986), in Abbildung 8 dargestellt.

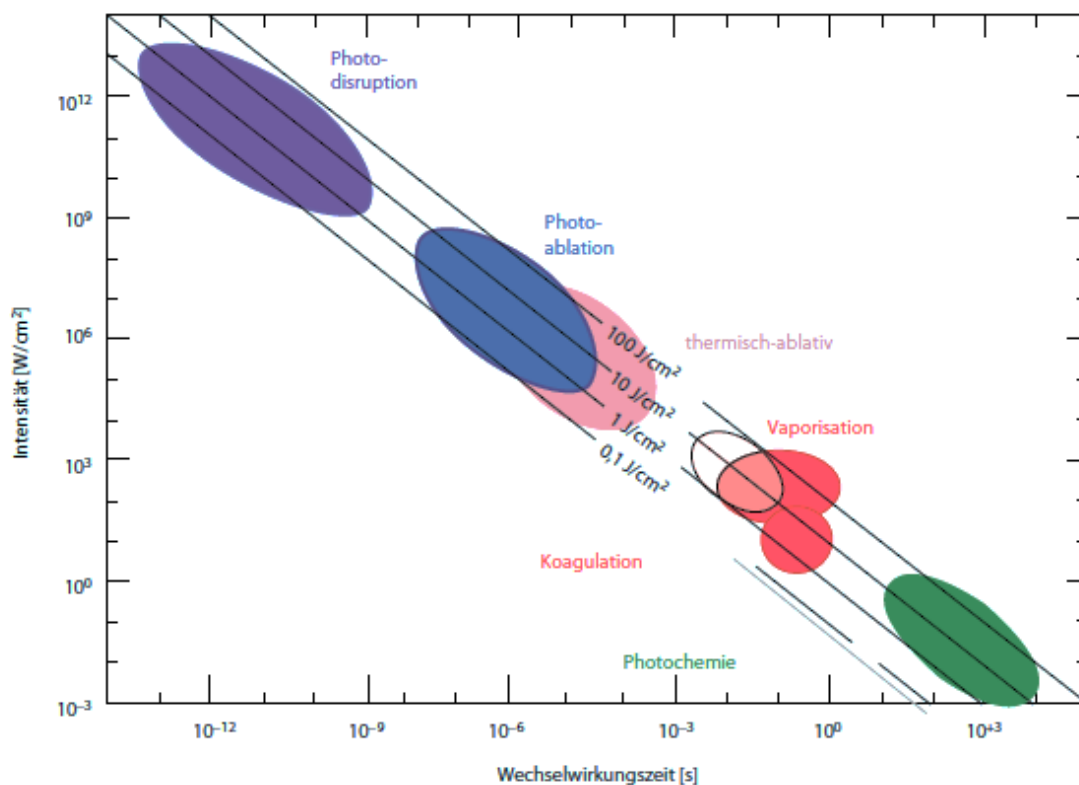


Abbildung 8: Laser-Gewebe-Wechselwirkungsmechanismen in Abhängigkeit von der Interaktionszeit (aus Raulin *et al.* 2012 modifiziert nach Boulnois 1986).

2.6 Ziel der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Untersuchungen hinsichtlich der Biokompatibilität oben gezeigter Laserpuls-Amplitudenmodulationsstrategie in einem *in vitro*-Zellkulturmodell durchzuführen. Hierbei sollten zytotoxische Laserbestrahlungs-assoziierte Effekte exemplarisch anhand dreier humaner Zelltypen, welche sich bei klinischer Anwendung am Trommelfell im Bestrahlungsfeld befinden, überprüft werden, um einerseits die bei Laser-Gewebe-Interaktion auftretenden Effekte näher zu charakterisieren und zudem einen biologisch sicheren Leistungsbereich für den Einsatz der Laserstimulationsstrategie zu definieren. Für unsere Untersuchungen verwendeten wir humane Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoblasten. In Anlehnung an etablierte Biokompatibilitätstests wurden die Zellen hinsichtlich Morphologie, Zellyse und Stoffwechselaktivität untersucht. Um einen Anhaltspunkt über die Mechanismen der Zellantwort auf die Laserbestrahlung zu erhalten, wurden außerdem anhand der Fibroblastenzelllinie, qPCR-Analysen im Hinblick auf 84 Gene aus dem Bereich der zellulären Stress- und Zytotoxizitätsantwort durchgeführt.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Zelllinien

Die im Rahmen der Arbeit verwendeten primären Zelllinien wurden von der Firma PromoCell bezogen. Die Zellen waren bereits bei Lieferung per PCR auf Mycoplasmen, HIV 1, HIV 2, HBV, HCV, HTLV 1 und HTLV 2 sowie mittels Sterilitätsprüfung auf mikrobiologische Verunreinigungen wie Pilze und Bakterien geprüft.

Ein Analysezertifikat der Firma PromoCell gab Auskunft über Zellmorphologie, Wachstumsverhalten, Viabilität und Adhärenz sowie durchflusszytometrische Untersuchungen bezüglich zellspezifischer Antigene. Dem Zertifikat der Osteoblasten und Chondrozyten war zusätzlich zu entnehmen, dass es sich bei dem jeweiligen Spender um einen 58-jährigen, männlichen Kaukasier handelte. Ursprung des Materials war Femurkopfknochen (HCH) sowie spongioser Knochen (HOB).

3.2 96-Well-Mikrotiterplattenmodell

Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Modell sollte eine Untersuchung der Laser-Gewebe-Wechselwirkung anhand eines Zellkulturmodells ermöglichen, um einerseits laserbestrahlungsassoziierte, zytotoxische Effekte aufzudecken und zugleich eine Leistungsgrenze, welche einen biologisch sicheren Einsatz des von uns eingesetzten Lasersystems mit der oben genannten Amplitudenmodulationsstrategie ermöglicht, zu finden. Das Modell sollte Aussaat, Kultivierung und Bestrahlung der Zellen sowie die anschließenden mikroskopischen und funktionellen Analysen ermöglichen. Um die sich an die Bestrahlungsversuche anschließende Manipulation und somit potentielle Störgrößen so gering wie möglich zu halten, entschieden wir uns daher für ein 96-Well-Mikrotiterplattensystem.

In Vorversuchen mit Aussaat und Bestrahlung der Zellen auf anderen Kunststoff- und Glasflächen hatten sich bereits bei geringen Laserleistungen Hinweise auf Wechselwirkungen mit dem Trägermaterial gezeigt. Nach mehreren Vorversuchen wählten wir schließlich unten aufgeführte Mikrotiterplatte der Firma PerkinElmer, da die optischen Eigenschaften eine Behandlung der adhären am Borosilikatglasboden wachsenden Zellen ohne Beeinflussung der Versuche

durch Interaktionen mit dem Trägermaterial selbst ermöglichten. Die technischen Spezifikationen, optischen Eigenschaften und Abmessungen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mikrotiterplatten, sind in Tabelle 1 und in Abbildung 9 dargestellt.

Tabelle 1: Optische Eigenschaften der verwendeten 96-Well-Mikrotiterplatte mit Borosilikatglasboden (Angaben aus dem technischen Datenblatt des Herstellers PerkinElmer)

Brechungsindex	$n = 1,5168$
Extinktionskoeffizient	$k = 1,8741 \times 10^{-8}$
Relative Permittivität (Dielektrizitätskonstante)	$\epsilon_1 = 2,3007$ $\epsilon_2 = 5,6854 \times 10^{-8}$
Absorptionskoeffizient	$\alpha = 0,0040080 \text{ cm}^{-1}$
Abbe-Zahl	$V_d = 64,13$
Chromatische Dispersion	$dn/d\lambda = -0,041800 \text{ } \mu\text{m}^{-1}$

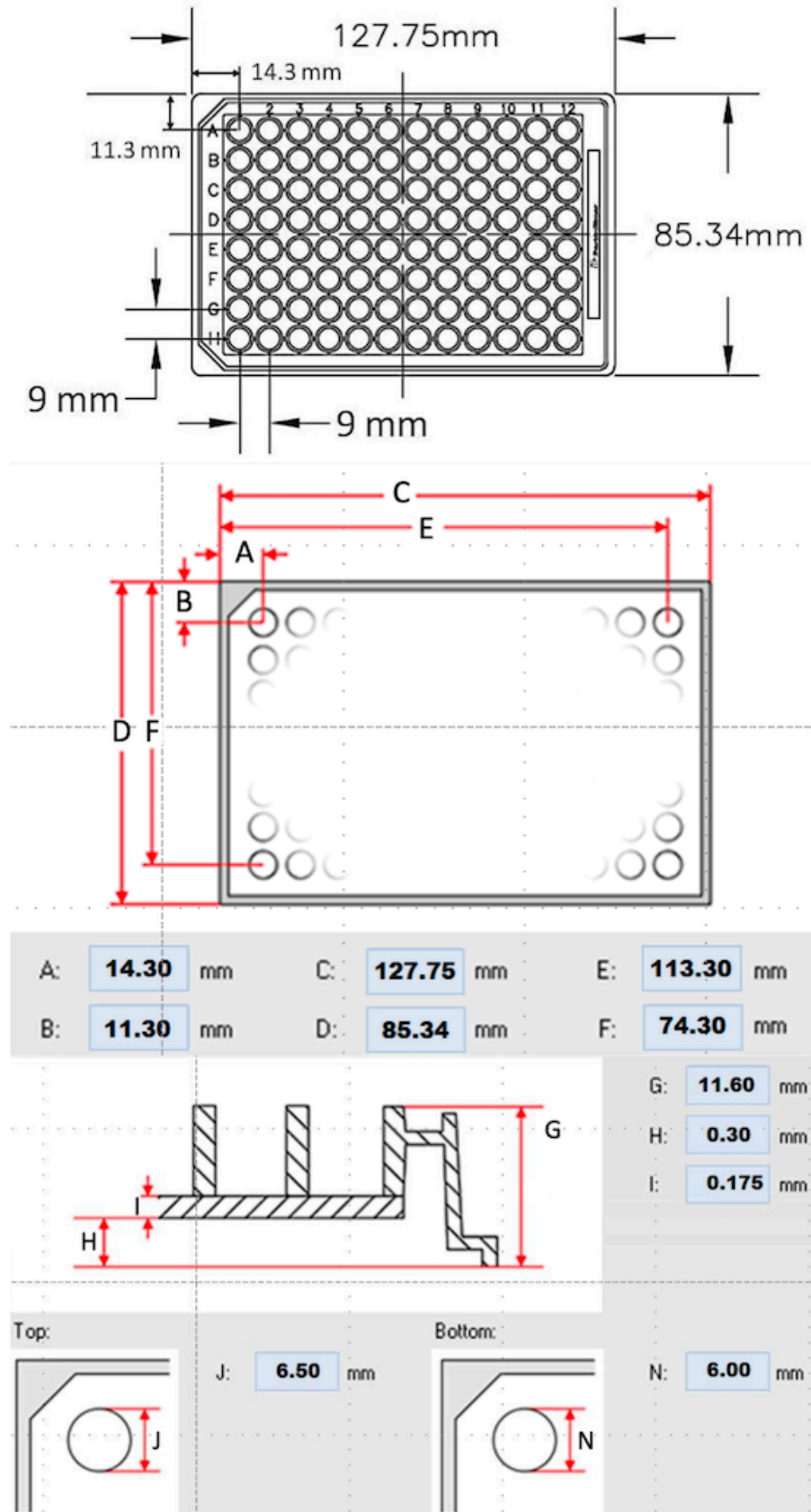


Abbildung 9: Abmessungen der verwendeten Mikrotiterplatte mit Borosilikatglasboden (modifiziert aus dem technischen Datenblatt der Firma PerkinElmer)

3.3 Zell-Kultivierung

Die Arbeiten mit den Zelllinien fanden unter sterilen Bedingungen auf einer Werkbank unter einem Abzug statt.

Die Kultivierung der humanen Fibroblasten (NHDF), Osteoblasten (HOB) und Chondrozyten (HCH) erfolgte im Wärmeschrank bei 37 °C, 5% CO₂-Atmosphäre und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden in Kulturflaschen mit Wachstumsflächen von 25 cm², 75 cm², 175 cm² und 300 cm² kultiviert. Als Nährmedien dienten die von PromoCell für die Kulturen empfohlenen „Basal-Medien“ mit Zusatz des entsprechenden „Supplement-Mix“. Nach Ansetzen des Nährmediums enthielt das Fibroblastenmedium eine Insulinkonzentration (humanes rekombinantes Insulin) von 5 µg/ml und einen Anteil humanen rekombinanten Fibroblastenwachstumsfaktors von 1 ng/ml. Die finale Konzentration an fetalem Kälberserum (FCS) in Chondrozyten- und Osteoblastenmedium betrug 0,1 ml/ml. Um potentielle photochemische Interaktionen zwischen 532 nm Laserpulsen und Phenolrot als pH-Indikator des Mediums zu vermeiden, wurde Phenolrot-freies Medium verwendet.

3.3.1 Auftauen der Zellen aus der Stickstoff-Kryo-Konservierung

Die kryokonservierten Zellen wurden nach einminütigem Auftauen im Wärmebad bei 37 °C unter Zugabe von 3 ml des entsprechenden Nährmediums in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1300 U/min für 3 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet im Kulturmedium resuspendiert, aufgenommen und in die Kulturflasche überführt. Der Mediumwechsel erfolgte jeweils nach 24-stündiger Inkubation im Wärmeschrank.

3.3.2 Passagieren der Zellen

Die Zellkulturflaschen wurden vor jedem Passagier-Vorgang zunächst auf makroskopische Auffälligkeiten wie Trübung oder Farbumschlag des Kulturmediums, dann mikroskopisch auf mikrobiologische und sonstige Verunreinigungen untersucht.

Das Kulturmedium wurde vollständig abgesaugt und der Zellrasen vorsichtig mit 100 µl „HEPES Buffered Saline Solution“ (HEPES BSS) pro cm² Wachstumsfläche gespült, um nicht-adhärenente Zellen sowie Zellbestandteile zu entfernen. Anschließend wurde HEPES BSS abgesaugt.

Zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wurden 100 µl Trypsin pro cm² Wachstumsfläche der Kulturflasche gewählt und das Kulturgefäß nach Zugabe des Trypsins für 3 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Durch leichtes Beklopfen der Kulturflasche wurden die Zellen nun mobilisiert und die Trypsin-vermittelte Adhäsionslyse und Abkuglung der Zellen mikroskopisch überprüft. Nach Zugabe von 100 µl „Trypsin Neutralization Solution“ (TNS) pro cm², um die Trypsinaktivität zu stoppen, wurde die Zellsuspension mittels Pipette in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1300 U/min für 3 Minuten zentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1000 µl des entsprechenden Kulturmediums resuspendiert. Zur Zellzahlbestimmung wurden nun 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau (0,4%) versetzt und 10 µl dieser Suspension in eine Zählkammer (Cell Counting Slide) für den Cell Counter gegeben. Die Zellzählung erfolgte automatisiert (Logos Luna Cell Counter, Logos Biosystems, Anyang-si, Südkorea).

Anschließend wurden die Zellen in einer Dichte von 10.000–20.000 pro cm² ausgesät oder für weitere Versuche verwendet.

3.3.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zur Kryokonservierung der Zellen wurden diese, wie bereits oben beschrieben, mit Hilfe des im „Detach Kit“ enthaltenen HEPES BSS gewaschen, enzymatisch mit Trypsin abgelöst und nach Hinzugabe von TNS bei 1300 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 1 ml des Einfriermediums „Cryo-SFM“ resuspendiert. Nach einer Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in einer Konzentration von 0,1-10 x 10⁶/ml in ein Kryoröhrchen überführt. Zunächst erfolgte eine kontrollierte Kühlung für zwei Stunden bei -20 °C in einem Gefrierbehälter, welcher eine schrittweise Abkühlung von 1 °C pro Minute sicherstellte. Die Zellen wurden im selben Behälter über Nacht bei -80 °C gelagert und schließlich in flüssigem Stickstoff konserviert.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese nach Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff für eine Minute im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in 5 ml frischen Mediums resuspendiert. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 1300 U/min erfolgte die Entnahme des Überstands, das Zellpellet wurde erneut in frischem Medium gelöst und die Zellen in Suspension nach Zellzählung in einer Dichte von 10.000-20.000 pro cm² in das entsprechende Kulturgefäß ausgesät.

3.4 Laserbestrahlung

3.4.1 Aufbau

Den Kern des Laser-Versuchsaufbaus bildete ein gepulster 532 nm-(Nd:YVO₂)-Laser mit Güteschaltung. Die vor jeder Bestrahlung mittels Powermeter ermittelten Leistungswerte wurden als Information über Diodenstrom- und Stepperöffnungswert an das Lasersystem übertragen. Zur Generierung des benötigten Signals, welches der für die optische Stimulation entwickelten Amplitudenmodulationsstrategie zu Grunde lag, wurde ein Arbiträrgenerator verwendet. Ein in der Software MATLAB[®] entwickeltes Programm diente der Ansteuerung des Arbiträrgenerators. Das Ausgangssignal wurde im nachgeschalteten akustooptischen Modulator (AOM) umgesetzt und auf eine Multimode-Glasfaser mit einem Durchmesser von 365 µm übertragen (Abbildung 10).

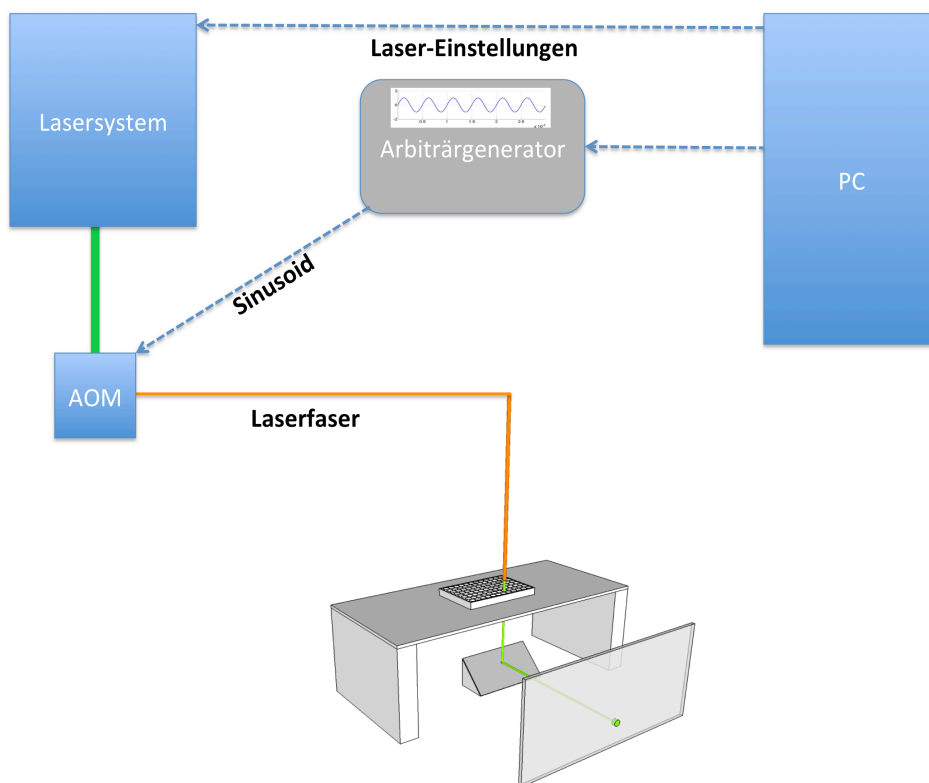


Abbildung 10: Versuchsaufbau, Signalgenerierung und –übertragung: Die Informationen des für die Amplitudenmodulation verwendeten Sinussignals wurden mit Hilfe der Software MATLAB[®] von einem Personal Computer (PC) auf den Arbiträrgenerator übertragen. Mit Hilfe des dort generierten Ausgangssignals wurde der akustooptische Modulator (AOM) angesteuert. Gleichzeitig erhielt das Lasersystem die Informationen über die zur Bestrahlung benötigten Leistungswerte. Das mittels AOM modulierte Lasersignal wurde über eine Glasfaser zum Bestrahlungsziel übermittelt.

3.4.2 Ablauf

60 Minuten vor jeder Bestrahlung wurde der Laser eingeschaltet und die Software MATLAB[®] gestartet, sodass der Laser die optimale Arbeitstemperatur erreichen konnte. Die Glasfaser wurde mit Hilfe spezieller Werkzeuge an ihrem Ende von der Ummantelung befreit, sodass ca. 1 cm des Faserkerns mit dem ihn umgebenden Claddingmaterial freigelegt wurde. Am Wellengenerator wurde zur Bestimmung der Stepper- und Diodenstromwerte eine Gleichspannung von 600 mV gewählt. Mittels Powermeter wurden die zur Bestrahlung verwendeten Laserleistungen in einer eigens für diesen Zweck in MATLAB[®] implementierten Software eingestellt und Stepper- sowie der notwendige Diodenstromwert in einer verknüpften Excel-Datei gespeichert. Zur Bestrahlung der Zellen wurde mittels Arbiträrgenerator die Amplitudenmodulationsstrategie mit den zuvor eingestellten Laserleistungen eingesetzt.

Die 96-Well-Mikrotiterplatte mit den auf dem Glasboden adhärent gewachsenen Zellen wurde auf dem Tisch platziert, sodass sich die zu bestrahlende Vertiefung der Platte über einer Lochbohrung in der Tischplatte befand. Um sich der physiologischen Situation anzunähern und sowohl Absorptions- als auch thermische Einflüsse durch das Kulturmedium auszuschließen, wurde in bestrahlter und jeweilig mitgeführter Kontroll-Kultur das Kulturmedium für die Bestrahlungsdauer von 120 Sekunden entnommen. Die Entnahme des Mediums erfolgte vor jeder Bestrahlung mittels kalibrierter 100 µl-Pipette und 100 µl-Filter-Pipettenspitzen mit sehr schmaler Spitzenarchitektur, sodass das Medium nach leichter Neigung der Platte auch aus dem Randbereich der Vertiefung entnommen werden konnte. Die Laserfaser mit einem Durchmesser von 365 µm wurde im Zentrum der Plattenvertiefung, senkrecht zum Glasboden der Platte positioniert (Abbildung 11), um die Reflexion des einfallenden Laserstrahls am Übergang zu Zellen und Plattenboden möglichst gering zu halten. Mit Hilfe eines Mikromanipulators, in dessen Aufnahme die Faser eingespannt worden war, wurde ein definierter Abstand der Faser vom Zellrasen von ca. 1,5 mm anhand einer Markierung an der Platte eingestellt, sodass eine bestrahlte Fläche von ca. 0,8 mm² resultierte. In Tabelle 2 sind die korrespondierende Flussdichte und Leistungsdichteangaben zusammengefasst. Unter der Probe wurde ein Spiegel, welcher in einem Winkel von 45 ° zur Unterlage angestellt worden war, platziert. Das einfallende Licht durchdrang die Probe somit einfach und wurde auf eine an der Vorderseite des Tisches angebrachte Leinwand projiziert. So konnte zugleich eine Kontrolle des Strahlenprofils auf Homogenität während der Bestrahlung erfolgen (Abbildung 12).

Nach jedem Versuch wurde mittels Powermeter die Leistung des Lasers kontrolliert.

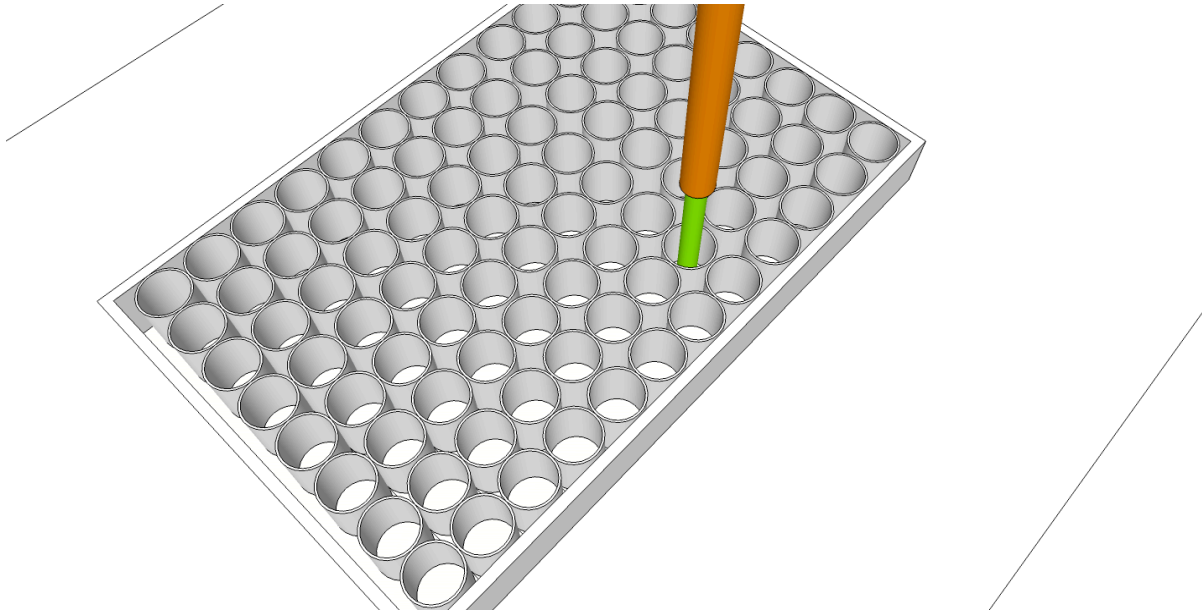


Abbildung 11: Versuchsaufbau: Eine mit den zu untersuchenden Zellen bestückte 96-Well-Mikrotiterplatte wurde mit der zu bestrahlenden Vertiefung über einer Lochbohrung im Tisch platziert. Die Spitze der Laserfaser wurde mittels Mikromanipulator nach Ausrichtung an einer Markierung der Platte in einem Abstand von ca. 1,5 mm über dem Zellrasen senkrecht zum Plattenboden ausgerichtet.

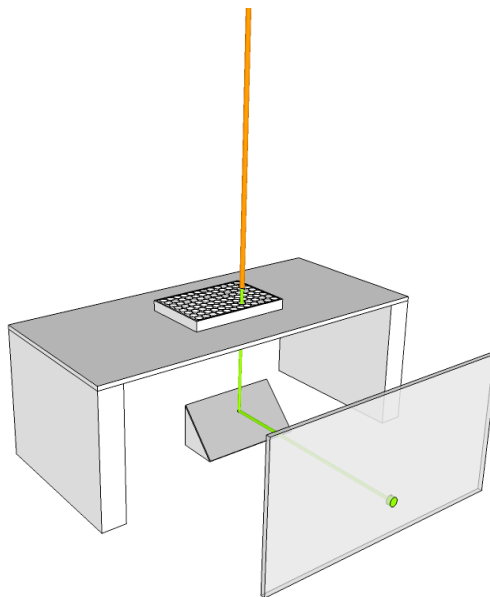


Abbildung 12: Skizze des Versuchsaufbaus: Die 96-Well-Mikrotiterplatte wurde auf dem Tisch mit der zu bestrahlenden Vertiefung über einer Lochbohrung platziert, sodass das einfallende Licht die Probe durchdringen konnte. Ein im 45 °-Winkel zur Unterlage angestellter Spiegel sorgt für eine einmalige Passage des Laserstrahls durch die Probe. Anhand eines am Ende des Tisches angebrachten Schirms konnte das Strahlenprofil in der Projektion des Lasers nachvollzogen und optisch auf Homogenität geprüft werden.

Tabelle 2: Darstellung der in unseren Versuchen verwendeten Laserleistungsangaben mit Darstellung der jeweiligen Energie pro Puls, Flussrate und Leistungsdichte

Durchschnittliche Leistung (mW)	Energie pro Puls (μJ)	Flussrate (J/cm^2)	Leistungsdichte (W/cm^2)
177	3,5	2652	22,1
199	4	2988	24,9
223	4,5	3348	27,9
250	5	3756	31,3
281	5,6	4212	35,1
315	6,3	4728	39,4
354	7	5316	44,3
397	8	5952	49,6
500	10	7500	62,5

3.4.3 Besonderheiten zum Versuchsaufbau

Da das Verständnis über die Auswirkungen des chronischen Einflusses eines optischen Hörsystems für den klinischen Einsatz obligat ist, wählten wir für alle funktionellen Versuche eine maximale Expositionsdauer von 120 Sekunden. In Vorversuchen hatten Zellen, die als Kontrollen zu jeder bestrahlten Kultur dienen sollten, innerhalb dieser zweiminütigen Expositionszeit in Abwesenheit von Zellkulturmedium keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Viabilität gegenüber einer für den selben Zeitraum mit Medium versehenen Kontrolle bei Raumtemperatur gezeigt, während bei einer Exposition der Zellen über eine Zeitspanne von 180 Sekunden ohne Kulturmedium und ohne Bestrahlung erste Hinweise für Adhäsionolyse und Nekroseinduktion festgestellt werden konnten. Für die gezeigten Versuche behielten wir so die 120-sekündige Expositionsdauer bei und variierten die jeweiligen Laserleistungen. Wie oben

beschrieben, wurden im Versuchsaufbau einige Vorkehrungen getroffen, um Störgrößen und -einflüsse auszuschließen bzw. zu minimieren. Diese Einflussfaktoren sollten dennoch bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

3.4.4 Einfluss des Faserabstandes zum Zellrasen

Einen weiteren Einflussfaktor für die Biokompatibilität der Laserbestrahlung stellt der Abstand der Laserfaser zur bestrahlten Oberfläche dar.

Abbildung 13 verdeutlicht den Zusammenhang zwischen Faserabstand und Spotfläche und somit die Auswirkung auf die Flussdichte. Anhand des Öffnungswinkels von ca. 12 ° am Faseraustrittspunkt kann, unter der Voraussetzung, dass die Faser senkrecht zur bestrahlten Oberfläche ausgerichtet ist, die Fläche des Laserspots mit folgender Formel errechnet werden:

$$A = \pi \times [0,5 \cdot (d + 2 \cdot (\tan(\alpha) \cdot x))]^2$$

Hierbei entspricht **d** dem Faserdurchmesser von 365 µm, x entspricht dem Abstand der Faser zu der bestrahlten Oberfläche und **α** dem Öffnungswinkel (12 °) des aus dem Faserende austretenden Laserstrahls.

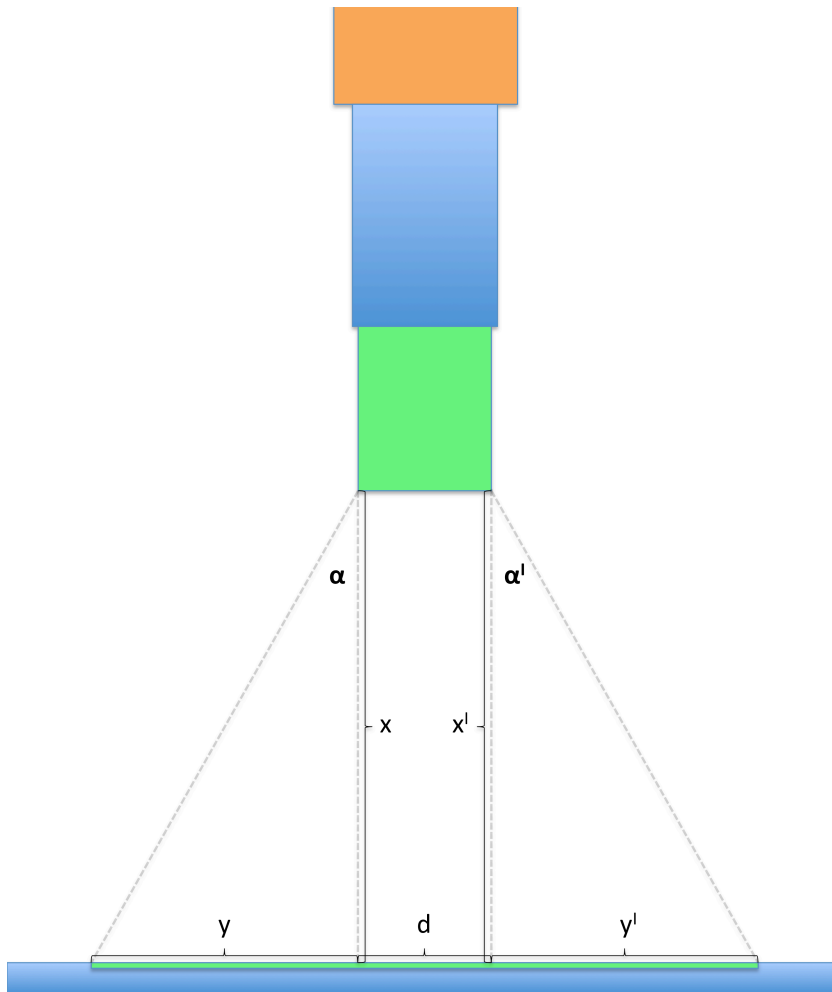


Abbildung 13: Schemazeichnung zur Verdeutlichung der Bedeutung des Faserabstandes zu der bestrahlten Oberfläche. Dargestellt ist die Laserfaserspitze in grün, welche in einem Winkel von 90° im Abstand x zur bestrahlten Oberfläche ausgerichtet ist. Der Winkel α entspricht dem Öffnungswinkel am Faserende von 12° . Der Durchmesser der bestrahlten, kreisförmigen Fläche entspricht der Strecke $y + \text{Faserdurchmesser } d (365\mu\text{m}) + y'$.

Mit zunehmendem Abstand der Faserspitze zu der bestrahlten Oberfläche nehmen selbst kleine Variationen einen größeren Einfluss auf die resultierende Laserspotgröße und somit auf die Leistungsdichte, die sich aus dem Quotienten der Laserleistung und der bestrahlten Fläche errechnet und so mit zunehmendem Faserabstand abnimmt (Abbildung 14). Bei einem festgelegten Faserabstand von $1,5 \text{ mm}$ und einer Messungenauigkeit von $\pm 250 \mu\text{m}$ ergibt sich im Hinblick auf die Flussdichte eine Variabilität bezüglich der Leistungsdichte von ca. 22% . Um die Variabilität zu minimieren wurde vor jedem Bestrahlungsversuch die Faserspitze mit Hilfe eines Fasermessers gekürzt und somit eine saubere Oberfläche sichergestellt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass nach der Kürzung kein Streulicht am Faserende auftrat und das Strahlenpro-

fil wurde optisch auf Homogenität überprüft. Auch wenn in unserem Versuchsaufbau eine Positionierung der Faser mit Hilfe eines Mikromanipulators und eine Kürzung der Faser mittels Spezialwerkzeugs erfolgte, sollten diskrete Schwankungen hinsichtlich der Homogenität des Strahlenprofils und der Flussdichte als potentielle Einflussfaktoren bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

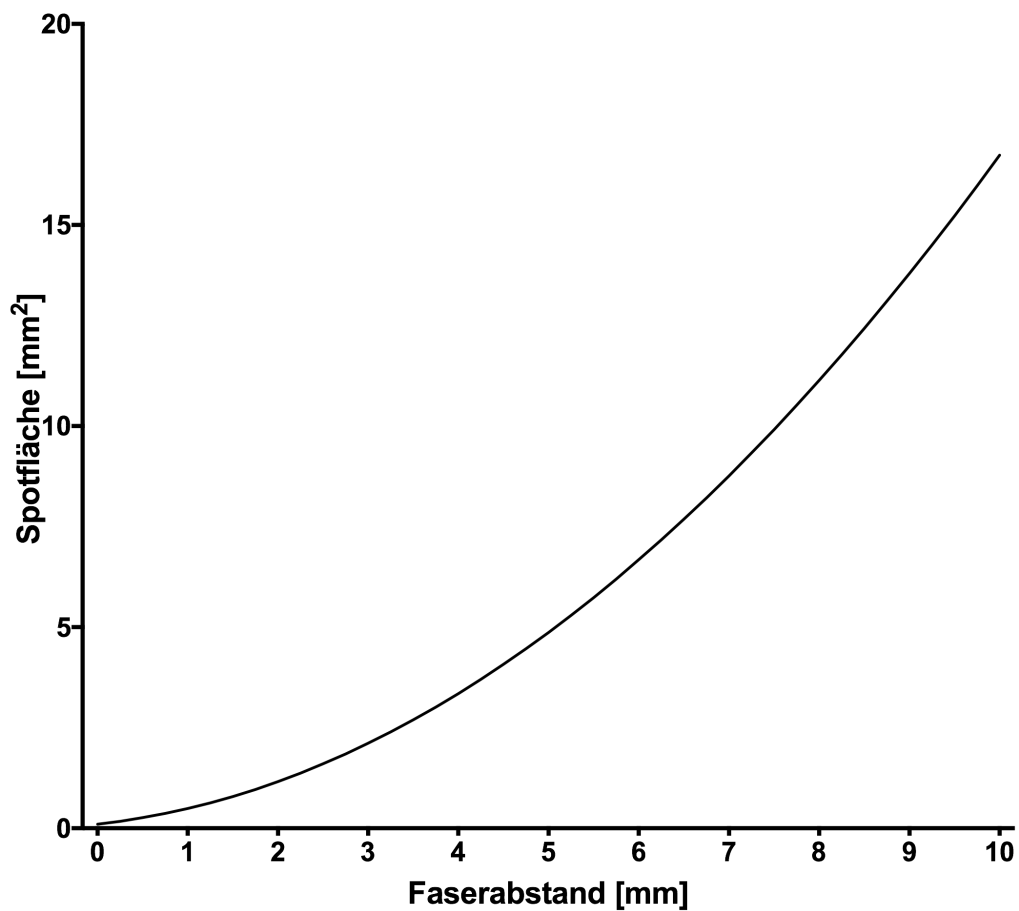


Abbildung 14: Abhängigkeit der Fläche des Laserspots vom Abstand der Faser zur bestrahlten Oberfläche.

3.5 Fluoreszenz-Färbung

Apoptose und Nekrose sind entscheidende Antwortmechanismen auf zellulären Stress.

Ein morphologisches Charakteristikum nekrotischer Zellen stellt der Verlust der Integrität von Plasma- und Organellenmembran dar. Dies führt zur konsekutiven Freisetzung von zytosolischen Inhalten und Bestandteilen beschädigter Zellkompartimente.

Ethidium Homodimer III ist ein DNA-bindender Fluoreszenzfarbstoff, der bezüglich vitaler und apoptotischer Zellen keine Membrangängigkeit aufweist. Aufgrund seiner stark positiven Ladung und hohen Affinität gegenüber Nukleinsäuren, färbt er jedoch nekrotische Zellen rot ($\lambda=528/617$ nm) an.

Hoechst 33342 ist ein an die kleine Furche der DNA bindender Farbstoff, der aufgrund seiner Membrangängigkeit die gesamte Zellpopulation anfärbt (Lalande et al. 1981; Latt & Stetten 1976).

Nach UV-Anregung bei etwa 350 nm emittiert Hoechst 33342 DNA-gebunden blaues Licht einer Wellenlänge von etwa 461 nm.

Phosphatidylserin ist ein Phospholipid der Zellmembran, welches vornehmlich im inneren Blatt lokalisiert ist. Unter physiologischen Bedingungen herrscht also eine Asymmetrie in der Phosphatidylserinverteilung innerhalb der Plasmamembran zu Gunsten des zytosolischen Anteils (Op den Kamp 1979). Im Rahmen der frühen Apoptose kommt es zum Verlust dieser Asymmetrie und zur Verlagerung von Phosphatidylserin in Richtung des äußeren Blattes der Plasmamembran, während die Membranintegrität zunächst gewahrt bleibt. Die Präsentation von Phosphatidylserin an der Membranaußenseite dient der spezifischen Erkennung und Bindung von Makrophagen zur gezielten Phagozytose der apoptotischen Zielzelle (Fadok *et al.* 1992).

Annexin-V ist ein Protein, welches in der Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen eine hohe Affinität für Phosphatidylserin aufweist (Brzoska *et al.* 2013) und somit, gekoppelt an ein Fluorochrom wie Fluoresceinisothiocyanat (FITC), einen Detektor für Veränderungen der Phosphatidylserinverteilung innerhalb der Plasmamembran darstellt (Martin *et al.* 1995).

Durch die Kombination der oben genannten Farbstoffe in dem Färbekit bietet sich die Möglichkeit apoptotische, nekrotische und gesunde Zellen einer Population zu differenzieren.

Die nekrotischen Zellen stellen sich rot, gesunde Zellen blau und apoptotische Zellen grün dar (Abbildung 15).

3.6 Versuchsvorbereitung

Die humanen Fibroblasten (NHDF), Osteoblasten (HOB) und Chondrozyten (HCH) wurden in einer 96-Well-Mikrotiterplatte in einer Konzentration von 1×10^4 Zellen/100 μ l pro Plattenvertiefung ausgesät und für 48 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Der Transport der Zellen bis zum Laser erfolgte auf einer auf 37 °C vorgewärmten, mit Wasser gefüllten Kulturflasche in einer Styroporbox.

Vor der Bestrahlung der Zellen wurde das klare, Phenol-Rot-freie Medium, sowohl in der bestrahlten als auch in der nicht behandelten Kammer, mittels Pipette abgesaugt. Die Laserfaser wurde im Zentrum der Vertiefung platziert, anschließend erfolgte die Bestrahlung über eine Dauer von 120 Sekunden. Unmittelbar nach der Bestrahlung wurden 100 μ l des Phenol-Rot-freien Mediums in die Kammern pipettiert und die Kulturen für weitere vier Stunden im Wärmeschrank inkubiert. Die Fluoreszenzfärbung erfolgte vier Stunden nach Bestrahlung mit Hilfe des „Apoptotic/Necrotic/Healthy Cells Detection Kit“ der Firma PromoKine nach folgendem Protokoll:

Der im Färbe-Kit enthaltene „5x Binding Buffer“ wurde im Verhältnis 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt. Es erfolgte eine Entnahme des Mediums und die Zellen wurden anschließend zweimal mit 100 μ l des „1x Binding Buffers“ gewaschen.

Für die Färbung der in einer Plattenvertiefung befindlichen Zellen wurden jeweils 5 μ l FITC-Annexin-, Ethidium-Homodimer III- und Hoechst 33342-Reagenz in 100 μ l Binding Buffer gelöst und lichtgeschützt bis zum Färbeschritt bei Raumtemperatur gelagert. Es folgte die Hinzugabe von 100 μ l der hergestellten Färbelösung pro Vertiefung sowie die Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur in lichtgeschützter Umgebung.

Die Zellen wurden nach der Einwirkzeit der Färbelösung zweimal mit 100 μ l Binding Buffer pro Plattenvertiefung gewaschen und mikroskopisch begutachtet.

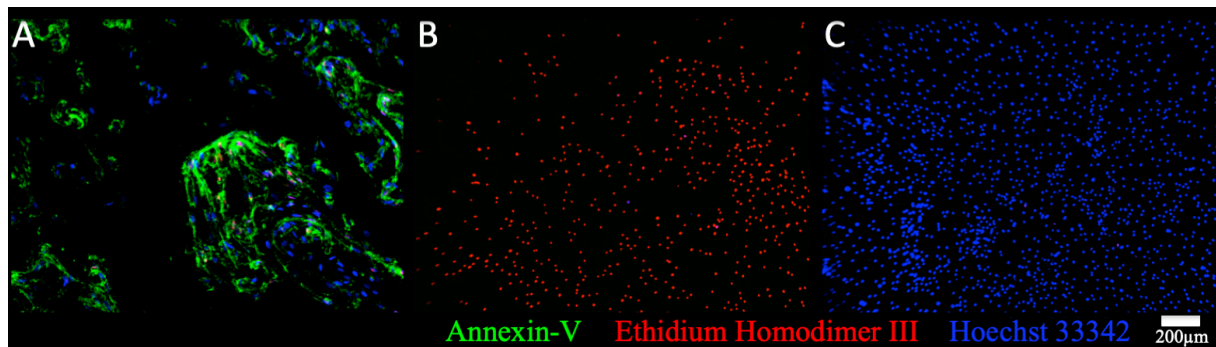


Abbildung 15: Exemplarische Darstellung der Färberegebnisse der Fluoreszenz-Differenzierungsfärbung anhand dreier Kontrollen: Eine Positivkontrolle für den Nachweis apoptotischer Zellen durch Färbung mit Hilfe von FITC-Annexin V wurde mittels Staurosporin erzeugt (A). Die Nekroseinduktion und Anfärbung der Kerne durch Ethidium Homodimer III gelang durch das Platzieren eines stark absorbierenden Filters unter der bestrahlten Probe (B). Zellkerne vitaler, unbehandelter Zellen stellten sich, lediglich durch Hoechst 33342 angefärbt, blau dar (C). Die Maßstabsleiste entspricht einer Länge von 200 µm.

3.7 Laktatdehydrogenase (LDH)-Test

Um die laserbestrahlungsbedingte Zytotoxizität zu analysieren, erfolgte eine Bestimmung der LDH-Aktivität im Kulturmedium. Da die Fluoreszenzfärbung lediglich die Induktion von Apoptose und Nekrose in adhärennten Zellen nachweisen konnte, jedoch keine Hinweise bezüglich der Zellen, die im Rahmen der Bestrahlung ihre Haftung an den Plattenboden verlieren, lieferte, wählten wir zur weiterführenden Analyse im Anschluss an die Behandlung den LDH-Test.

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein in verschiedenen Zellarten vorkommendes Enzym, welches im Zytosol unter Reduktion von NAD^+ zu NADH die Umwandlung von Laktat in Pyruvat katalysiert. Bei Verlust der Plasmamembranintegrität wird LDH freigesetzt und ist somit extrazellulär nachweisbar. Daher dient LDH auch klinisch als laborchemischer Parameter für Zelluntergang z.B. im Rahmen von Myokardinfarkten, Tumorzerfallsprozessen und Hämolyse. Im Rahmen dieser Arbeit diente ein LDH-Test der Firma ThermoFisher als Zytotoxizitätstest und zur Quantifizierung der Nekroserate nach Bestrahlung. Grundlage des Tests bildet oben genanntes Prinzip. LDH wird nach Schädigung der Plasmamembran ins Nährmedium freigesetzt und kann dort gemessen werden. Mit Hilfe des aus der Umwandlung von Laktat zu Pyruvat entstehenden Reduktionsäquivalents NADH wird das im Test-Kit enthaltene Tetrazoliumsalz INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-Tetrazolium-Chlorid) zu Formazan reduziert. Da der resultierende Farbumschlag durch die Menge an gebildetem Formazan bestimmt wird, kann so photometrisch die LDH-Freisetzung quantifiziert werden.

In einem Vorversuch wurde die optimale Zellzahl pro Plattenvertiefung bestimmt, um Folge-messungen im linearen Arbeitsbereich des LDH-Tests zu gewährleisten. Hierzu wurden in zwei Triplikate-Sets einer 96-Well-Mikrotiterplatte Zellen in einer Konzentration von 0 - 20.000 Zellen/100 µl/Vertiefung ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach vierundzwanzigstündiger Inkubation wurden 10 µl steriles, RNase-freies Wasser in jede Vertiefung eines Triplikate-Sets gegeben. Das andere Set wurde mit jeweils 10 µl des Lyse-Puffers versehen. Hierbei dienten die mit 10 µl-RNase-freiem Wasser behandelten Zellen als Anhaltspunkt für die spontane LDH-Freisetzung und die mit Lyse-Puffer behandelten Zellen als Referenz für die maximale LDH-Freisetzung. Es folgte eine fünfundvierzigminütige Inkubation bei 37 °C, 5% CO₂. Anschließend wurden 50 µl des Mediums aus jeder Vertiefung auf eine neue 96-Well-Mikrotiterplatte überführt und jeweils 50 µl der „Reaction Mixture“ hinzugegeben. Die Inkubation der Platte erfolgte lichtgeschützt für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach einer Zugabe von jeweils 50 µl „Stop-Solution“ wurde die Absorption bei 490 nm Messwellenlänge und 620 nm Referenzwellenlänge gemessen. In Vorversuchen wurde zur Bestimmung des linearen Bereichs der LDH-Freisetzung die Differenz aus maximaler und spontaner LDH-Freisetzung gegen die pro Plattenvertiefung ausgesäte Zellzahl aufgetragen. Hier zeigte sich im Bereich von 1.000 bis 12.000 Zellen ein Optimum (Abbildung 16), sodass wir uns im Hinblick auf die in den Vorversuchen bereits empirisch festgelegte Aussaatdichte von 10.000 Zellen/Plattenvertiefung für eine Beibehaltung dieser Zellzahl entschieden.

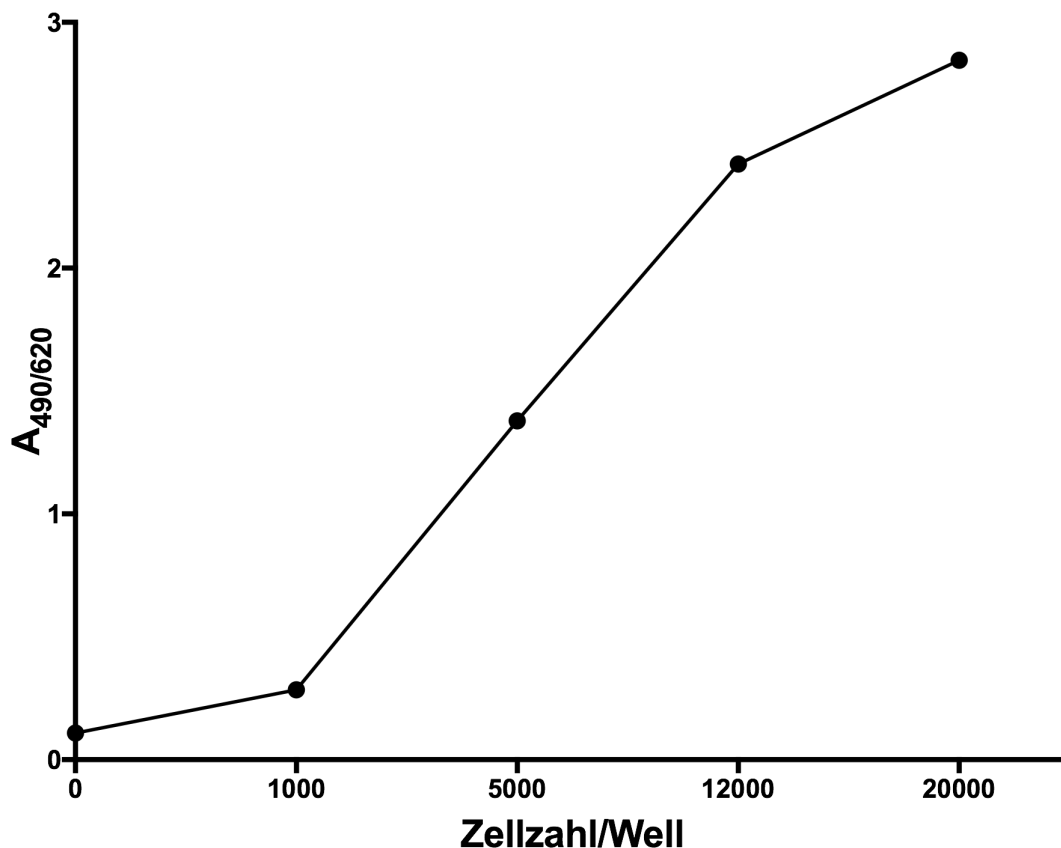


Abbildung 16: In Vorversuchen wurde der lineare Bereich des LDH-Signals in Abhängigkeit der ausgesäten Zellzahl bestimmt, um die für den Test optimale Aussaatdichte pro Well zu ermitteln. Linearität hinsichtlich der Absorption in Abhängigkeit der Zellzahl/Well konnte im Bereich zwischen 1.000 und 12.000 beobachtet werden.

3.7.1 Durchführung des LDH-Tests

Die verwendeten Zellen wurden in einer Dichte von $1 \times 10^4 / 100 \mu\text{l}$ /Plattenvertiefung ausgesät und für 48 h bei 37 °C inkubiert. Die Bestrahlung erfolgte anschließend bei einer Repetitionsrate von 50 kHz und unterschiedlichen Laserleistungen. Unmittelbar vor jeder Bestrahlung wurden 100 μl Medium mittels Pipette aus der Plattenvertiefung der zu bestrahlenden sowie der unbehandelten Kontroll-Kultur entnommen, nach der zweiminütigen Bestrahlung erfolgte die erneute Zugabe von 100 μl frischem Medium pro Vertiefung. In jeweils drei Vertiefungen der Platte, die als Kontrollen für die spontane LDH-Freisetzung dienten, wurde im Anschluss an die Bestrahlung 10 μl RNase-freies Wasser gegeben. Da die LDH-Aktivität im Serum unterschiedlicher Zelllinien variiert und zugleich ein Hintergrundsignal im Test erzeugt, wurden als Kontrolle jeweils drei Vertiefungen der Platte lediglich mit 100 μl Serum-haltigem und je

drei Vertiefungen mit 100 µl Serum-freiem Medium befüllt.

Nach vierundzwanzigstündiger Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ wurde der LDH-Test nach oben genanntem Protokoll des Vorversuchs zur Bestimmung der optimalen Aussaatdichte durchgeführt.

Bei der Auswertung der photometrisch erhaltenen Rohdaten wurden die Serumkontrollen berücksichtigt, indem die Differenz der Absorptionsmittelwerte der Serum-haltigen und der Serum-freien Kontrollen gebildet und zur Elimination des Serum-LDH-Hintergrunds von jedem Einzelabsorptionswert der Platte subtrahiert wurde. Als Grundlage für die Zytotoxizitätsbestimmung diente die Differenz aus den nach oben genannter Korrektur erhaltenen Messwellenlänge und der Referenzwellenlänge.

Aus diesen Daten wurde die Zytotoxizität nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{(\text{LDH-Aktivität nach Laserbehandlung} - \text{spontane LDH-Aktivität}) \times 100}{\text{maximale LDH-Aktivität} - \text{spontane LDH-Aktivität}}$$

3.8 WST-1-Test

Um auch zytostatische Effekte als potentielle Antwort auf die Laserbestrahlung zu berücksichtigen, entschieden wir uns für eine Methode zur Untersuchung der metabolischen Aktivität der bestrahlten Zellen.

Die Zellviabilität kann mit Hilfe des *water soluble tetrazolium-1* (WST-1)-Tests bestimmt werden. Hierbei nutzt man die Eigenschaften des Succinat-Tetrazolium-Reduktase-Systems metabolisch intakter Zellen. Dieses Enzym ist in der mitochondrialen Atmungskette aktiv und katalysiert in vitalen Zellen unter Verwendung der bei der Glykolyse entstehenden Reduktionsäquivalente (NAD(P)H) die Spaltung eines rötlichen Tetrazoliums Salzes (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) zum gelb-orangefarbenen Formazan (Abbildung 17). Je höher die Viabilität, desto stärker der resultierende Farbumschlag. Dieser kann photometrisch bestimmt werden. Die gemessene Absorption korreliert mit der Zahl metabolisch aktiver Zellen.

In Vorversuchen wurde der Inkubationszeitpunkt bestimmt, an dem der Test die höchste Sensitivität aufwies. Hierzu wurde eine Laserleistung von 397 mW zur Bestrahlung gewählt. Aus

vorausgegangen Bestrahlungsversuchen waren zytotoxische Effekte bei dieser Leistung bereits beobachtet worden. Abbildung 18 zeigt exemplarisch anhand der Zelllinie HOB zwei Kurvenverläufe der errechneten Viabilität zu zwei Zeitpunkten der WST-1-Zugabe nach Bestrahlung (t1: unmittelbar nach Bestrahlung; t2: 24 h nach Bestrahlung). Die Viabilität wurde hierbei zu unterschiedlichen Inkubationszeitpunkten nach Zugabe der WST-1-Lösung bestimmt. Da die höchste Sensitivität nach zweistündiger Inkubation und einer WST-1-Zugabe unmittelbar nach der Bestrahlung beobachtet werden konnte, wurde dieser Zeitpunkt für die Folgeversuche gewählt.

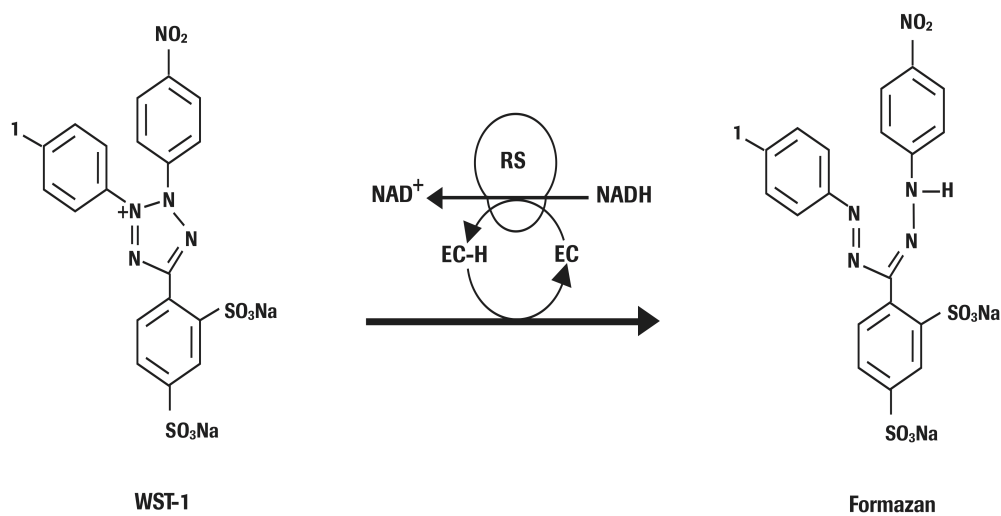


Abbildung 17: Prinzip des WST-1-Tests (modifiziert aus dem Datenblatt des Herstellers Roche®): Das WST-1-Reagenz wird mit Hilfe des mitochondrialen Succinat-Tetrazolium-Reduktase-Systems (RS) und Elektronenmediator (EC = electron coupling reagent) unter Verbrauch von Reduktionsäquivalenten zu Formazan umgesetzt. Der Farbumschlag korreliert mit der metabolischen Aktivität der Zellen.

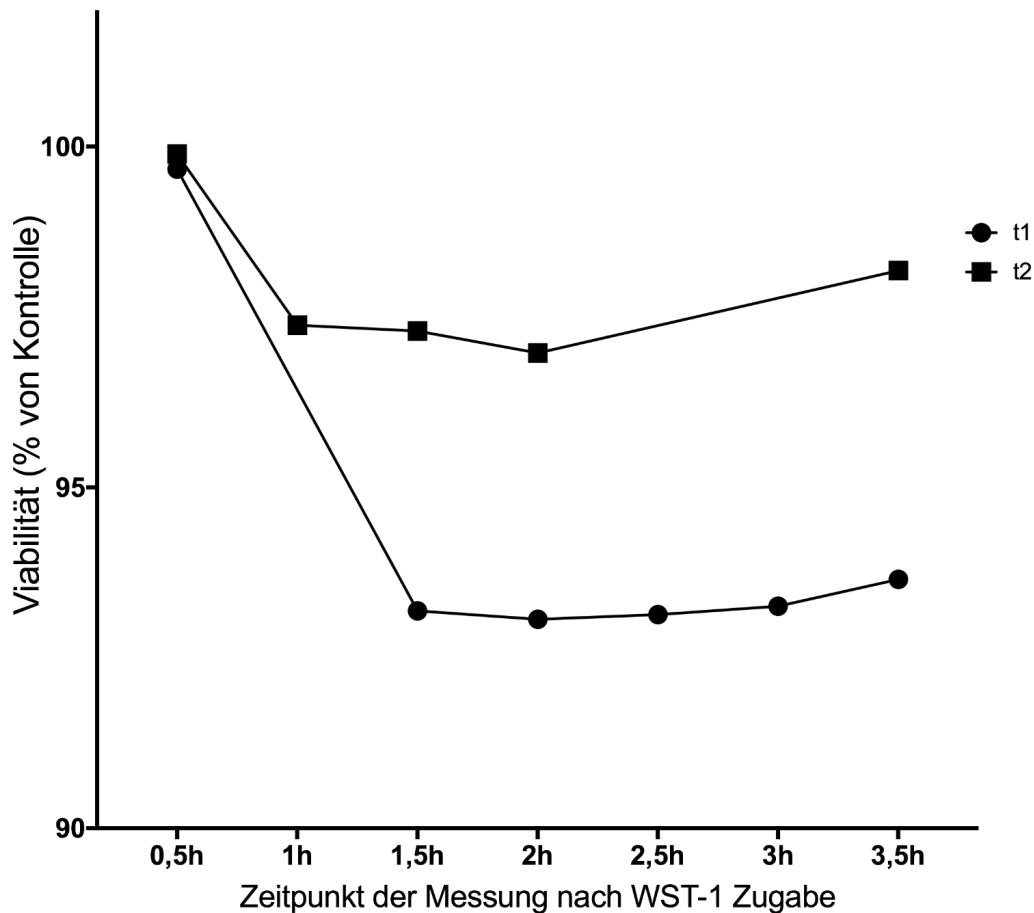


Abbildung 18: Viabilitätsbestimmung nach Bestrahlung mit Hilfe einer Laserleistung von 397 mW. Dargestellt sind exemplarisch anhand der Zelllinie HOB erhobene Viabilitätskurvenverläufe. Die WST-1-Zugabe erfolgte unmittelbar (t1) und 24h (t2) nach der Bestrahlung. In einem Zeitraum von 3,5 Stunden nach Zugabe der WST-1-Lösung wurden Viabilitätsmesspunkte derselben Probe festgehalten. Nach zwei Stunden wurde die niedrigste Viabilität beobachtet. Bis 3,5 h nach WST-1-Zugabe war in beiden Kurvenverläufen ein erneuter Anstieg der Viabilität zu erkennen.

3.8.1 Durchführung

Die zu untersuchenden Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^4 Zellen pro Vertiefung einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät, mit 100 μ l klarem, Phenolrot-freiem Medium aufgefüllt und 48 Stunden bei 37 °C, 5% CO₂ inkubiert, sodass konfluentes Wachstum erreicht wurde.

Der Transport der Platte bis zum Laser erfolgte auf einer auf 37 °C im Wasserbad vorgewärmten Kulturflasche in einer Styroporbox. Die Bestrahlung erfolgte nach oben genanntem Versuchsaufbau.

Zur Bestrahlung wurden in jeweils einem Well der bestrahlten Kultur und einem der nicht-

bestrahlten Kontrolle das Kulturmedium mittels Pipette abgesaugt, um sich den physiologischen Bedingungen anzunähern. Nach der Bestrahlung wurden wieder 100 µl des klaren, Phenolrot-freien Nährmediums in die Wells gegeben.

Als Kontrolle für das Hintergrundsignal des Kulturmediums dienten Wells, die lediglich mit 100 µl des Phenolrot-freien Mediums gefüllt waren.

Nach der Bestrahlung wurde nun das WST-1-Reagenz in einer Verdünnung von 1:10 in jede Kammer gegeben und 2 Stunden nach Zugabe der WST-1-Lösung die Absorption der Proben mittels Tecan-Plate-Reader gemessen. Die Messung erfolgte jeweils bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm. Die Werte wurden in einer Excel-Tabelle zusammengefasst.

3.8.2 Auswertung

Um das, durch das Kulturmedium bedingte, Hintergrundsignal zu berücksichtigen, wurde der Mittelwert der Absorptionswerte aus den lediglich mit Medium und WST-1-Reagenz versehenen Vertiefungen der Platte gebildet. Dieser wurde sowohl für Mess- als auch Referenzwellenlänge ermittelt und anschließend von jedem Einzelabsorptionswert bei zugehöriger Wellenlänge subtrahiert. Nun wurde die Differenz aus dem jeweiligen korrigierten Absorptionswert aus Messwellenlänge und Referenzwellenlänge gebildet.

Zur Auswertung wurden aus den resultierenden Einzelwerten die Mittelwerte der bestrahlten Proben und unbehandelten Proben (Kontrollen) errechnet:

$$\text{Viabilität (\%)} = \frac{\text{Mittelwert bestrahlte Probe} \times 100}{\text{Mittelwert unbehandelte Probe}}$$

Die Prozentangaben der funktionellen Analysen beziehen sich jeweils auf die gesamte Zellpopulation der Mikrotiterplattenvertiefung, wobei sich jedoch nur ein Bruchteil der Zellen im Bestrahlungsfeld befand. Um eine zur bereits im Tierversuch (Sorg *et al.* 2019) eingesetzten vergleichbare Flussdichte zu erreichen und gleichzeitig eine Aussage über Laserspotgröße-überschreitende Effekte auf die Zellen zu ermöglichen, wurde eine Bestrahlungsfläche von ca. 0,8 mm² eingestellt. Eine in der bestrahlten Kultur beobachtete Zytotoxizität von 10% beschreibt eine im Vergleich zur nicht-bestrahlten Kontrolle um 10% erhöhte LDH-Freisetzung. 10% der Gesamtwachstumsfläche einer Mikrotiterplattenvertiefung entsprechen ca. dem 3,5-

fachen der Laserspotfläche. Diese Zusammenhänge gilt es im Rahmen der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen.

3.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: Polymerase-chain-reaction, Abk.: PCR) ist ein molekularbiologisches Verfahren zur Vervielfältigung von DNA, wobei die in jedem Zyklus durch die DNA-Polymerase synthetisierte Menge an Basenpaaren als Ausgangsmaterial für jeden weiteren Syntheseschritt dient und somit eine exponentielle Vervielfältigung des eingesetzten Materials erfolgt.

Das Verfahren der PCR wurde 1983 vom US-amerikanischen Biochemiker Kary Mullis entwickelt, der 1993 für seine Entwicklung den Nobelpreis erhielt.

Die PCR gilt als Meilenstein der Molekularbiologie und stellt die Grundlage zahlreicher weiterer diagnostischer und analytischer molekularbiologischer Verfahren dar.

Der Ablauf einer PCR besteht im Wesentlichen aus drei Schritten pro Zyklus:

1. Denaturierung der zu vervielfältigenden DNA:

Um einen Ausgangspunkt für die Primer und die DNA-Polymerase zu schaffen, müssen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren der doppelsträngigen DNA aufgespalten werden, sodass sich Einzelstrang-DNA bildet. Dies wird durch Erhitzen der Probe auf Temperaturen um ca. 95 °C erreicht. Außerdem findet bei sogenannten Hot-Start-Polymerasen, wie in dieser Arbeit verwendet, im ersten Zyklus eine Hitzeaktivierung über etwa 10 Minuten statt. Durch rasches Abkühlen auf 60-65 °C wird die anschließende Bildung der Doppelhelix verhindert.

2. Annealing: Während des Primer-Annealings binden die Primer unter Aufrechterhaltung einer Primer-optimierten Temperatur spezifisch an die einzelsträngigen DNA-Vorlagen.

3. Elongation: Die DNA-Polymerase bindet an das 3-Ende des angelagerten Primers und synthetisiert den jeweils restlichen komplementären DNA-Strang durch Einlagern der entsprechenden, freien Nukleotide.

Durch diesen Vorgang verdoppelt sich theoretisch nach jedem Zyklus die Menge des Materials.

3.9.1 Quantitative PCR (qPCR)

Eine Methode zur Quantifizierung von genetischem Material in einer Probe stellt die qPCR, auch als Real-Time PCR bezeichnet, dar.

Hierbei kann in Echtzeit anhand eines Fluoreszenzsignals, welches mit der Menge an PCR-Produkt von Zyklus zu Zyklus proportional zunimmt, eine Quantifizierung des Ausgangsmaterials in der zu untersuchenden Probe erfolgen.

Der in dieser Arbeit verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green I bindet an die kleine Furche doppelsträngiger DNA und absorbiert gebunden an DNA bei einer Wellenlänge von $\lambda = 492$ nm und emittiert Licht der Wellenlänge $\lambda = 521$ nm.

Die Emission wird nach optischer Anregung von einer Kamera des Thermocyclers gemessen. Da SYBR[®] Green I jedoch auch an Nebenprodukte der PCR sowie an Primer-Dimere binden kann, bietet das Verfahren im Vergleich zu anderen, wie dem Taq-Man-System, hohe Sensitivität bei geringerer Spezifität. Um das PCR-Produkt hinsichtlich der Spezifität zu überprüfen wird eine Schmelzkurvenanalyse nach Ablauf der PCR-Reaktion durchgeführt. Bei Erwärmung trennt sich der DNA-Doppelstrang Sequenz-spezifisch auf, da die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren gespalten werden. Hierbei wird SYBR[®] Green I frei und die Fluoreszenz des Farbstoffes im Thermocycler detektiert. Als Schmelztemperatur (T_m) wird die Temperatur bezeichnet, bei der die Doppelhelixstruktur zu 50% denaturiert ist. Die Schmelzkurvenanalyse macht sich diese Eigenschaften zu Nutze, sodass die Schmelzkurve im Falle eines spezifischen PCR-Produkts einen deutlichen Absorptionspeak (Abbildung 19) bzw. im Falle mehrerer unspezifischer Produkte mehr als eine spezifische Schmelztemperatur zeigt (Holzapfel & Wickert 2007).

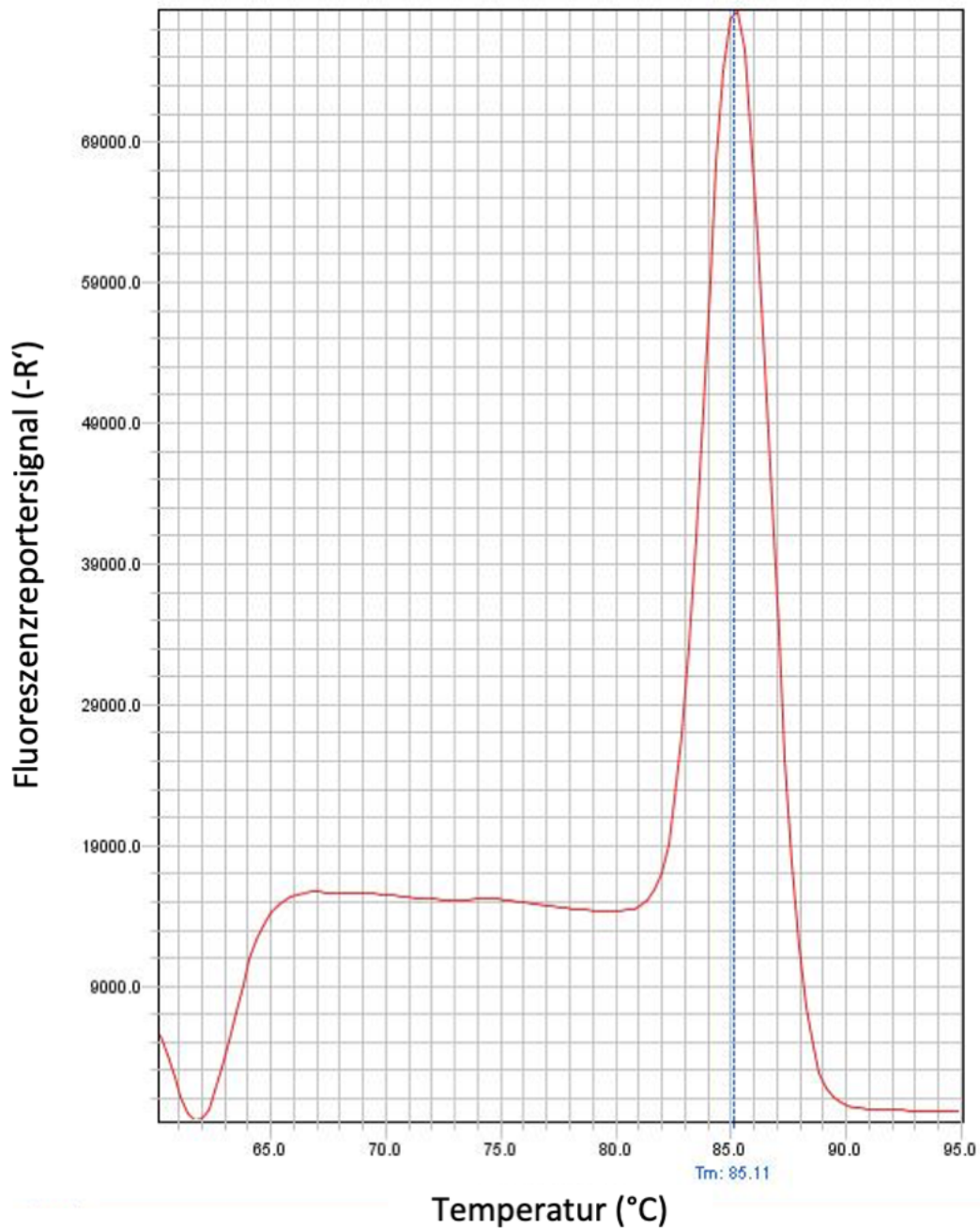


Abbildung 19: Exemplarische Originaldarstellung einer im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellten Schmelzkurve. Aufgetragen ist die erste negative Ableitung des Fluoreszenzreportersignals (-R') (y-Achse) gegen die Temperatur (x-Achse). Es zeigt sich ein singuläres Fluoreszenzmaximum bei ca. 85,11 °C (T_m) als Hinweis auf ein spezifisches PCR-Produkt.

Bei der Analyse der qPCR-Daten unterscheidet man zwei grundlegende Quantifizierungsstrategien: Absolute und relative Quantifizierung. Während die absolute Quantifizierung in der Regel durch Extrapolation anhand einer Kalibrierungskurve erfolgt, werden bei der relativen

Quantifizierung Änderungen der Genexpression einer Probe durch den Vergleich zur Genexpression einer Vergleichs- oder Referenzprobe ermittelt. Hierbei kann eine Normalisierung mit Hilfe eines nicht regulierten Referenzgens („Housekeeping Gen“) oder eines Index von nicht regulierten Referenzgenen („Housekeeping Gen-Index“) erfolgen. Des Weiteren kann hierbei zur Berechnung des Expressionsunterschieds die sogenannte $\Delta\Delta C_T$ -Methode oder ein mathematisches Softwaremodell mit Effizienz-Korrektur (REST=Relative Expression Software Tool) Anwendung finden (Abbildung 20).

Quantifizierungsstrategien in der real-time RT-PCR

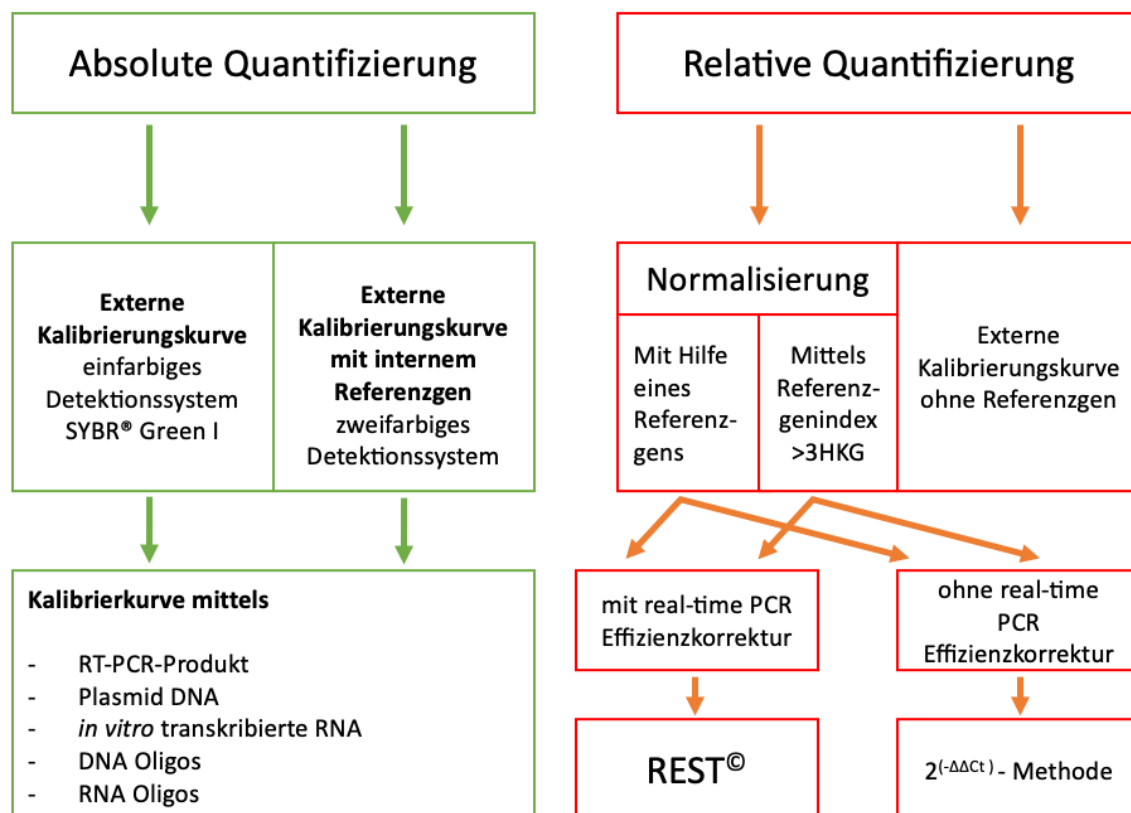


Abbildung 20: Quantifizierungsstrategien in der real-time RT-PCR (modifiziert nach Pfaffl 2004).

Zur absoluten Quantifizierung wird mit Hilfe einer Verdünnungsreihe des zu untersuchenden Materials eine Kalibrierungskurve erstellt.

Bei der relativen Quantifizierung erfolgt eine Normalisierung der Genexpression des jeweiligen Zielgens auf ein nicht reguliertes „Housekeeping Gen“ (HKG) bzw. auf einen HKG-Index, welcher sich aus mehreren HKG zusammensetzt (Pfaffl 2004).

Die qPCR lässt sich in ihrem Verlauf in drei wesentliche Abschnitte gliedern:

1. Startphase
2. Exponentielle Phase
3. Plateauphase

In der Startphase liegt zunächst das DNA-Ausgangsmaterial der jeweiligen Probe vor, welches sich während der exponentiellen Phase bei optimaler Effizienz in jedem Zyklus verdoppelt (Abbildung 21).

Im Rahmen der Auswertung wird für jedes Produkt der C_T -Wert bestimmt. Dieser auch als Schwellenwertzyklus (Threshold Cycle) bezeichnete Wert entspricht der Zykluszahl, ab der das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal die Hintergrundfluoreszenz (Background-Fluorescence) übersteigt. Somit gibt der C_T -Wert Aufschluss über die in der Probe enthaltene Menge an Zielsequenz. Je kleiner der C_T -Wert, desto größer die Menge. Zur anschließenden Analyse kann die $\Delta\Delta C_T$ -Methode verwendet werden.

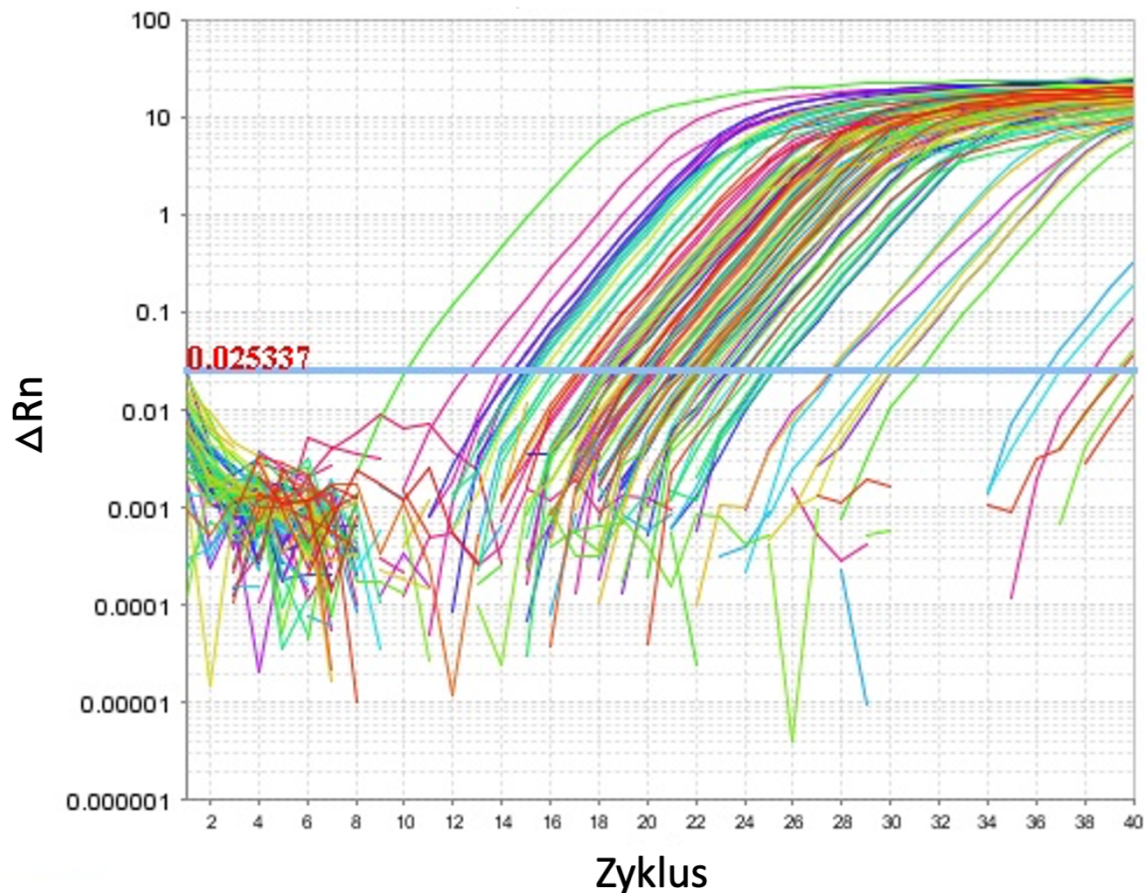


Abbildung 21: Originaldarstellung eines Amplifikationsplots: Abgebildet ist das Fluoreszenzsignal (y-Achse) in Abhängigkeit zu der Zyklenzahl (x-Achse). Der Schwellenwert ist (durch die blaue Linie gekennzeichnet) bei $\Delta Rn=0,025337$ festgelegt. Hier wird erstmals die Hintergrundfluoreszenz überschritten. Je kleiner die Zyklenzahl, in welcher der Schwellenwert überschritten wird, desto größer die Menge der in der Probe enthaltenen Zielsequenz.

3.9.2 Mathematische Grundlage zur Datenanalyse nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode

Aufgrund des umgekehrt proportionalen Verhältnisses zwischen Threshold Cycle und dem tatsächlichen Genexpressionslevel sowie unter der Annahme, dass sich bei jedem Zyklus der Reaktion das Produkt verdoppelt, wird das Expressionslevel L wie folgt ausgedrückt:

$$L=2^{-C_T}$$

Zur Berechnung des Expressionsunterschiedes erfolgt im ersten Schritt der $\Delta\Delta C_T$ -Methode zunächst die Normalisierung über ein nicht reguliertes (Haushalts-)Gen (= engl.: Housekeeping

Gene, Abk.: HKG) bzw den Mittelwert des C_T -Wertes mehrerer House Keeping Gene. Hierbei wird vom C_T -Wert des Zielgens (Gene of Interest = GOI) der C_T -Wert des HKG subtrahiert:

$$\Delta C_T = C_T(\text{GOI}) - C_T(\text{HKG})$$

Anschließend wird nach dieser ersten Normalisierung die Differenz aus C_T -Wert des Gens der behandelten Probe und dem C_T -Wert des Gens der unbehandelten Probe bzw. der Kontrollgruppe gebildet.

$$\Delta\Delta C_T = C_T(\text{behandelt}) - C_T(\text{unbehandelt/Kontrolle})$$

Der relative Expressionsunterschied (Ratio bzw. Fold change) ergibt sich aus der Formel:

$$\text{Ratio/Fold change} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Um die beobachteten Veränderungen zwischen bestrahlten und unbehandelten Zellen auf Genexpressionsebene zu untersuchen, wurde ein „Stress & Toxicity RT² Profiler PCR Array“ der Firma QIAGEN verwendet.

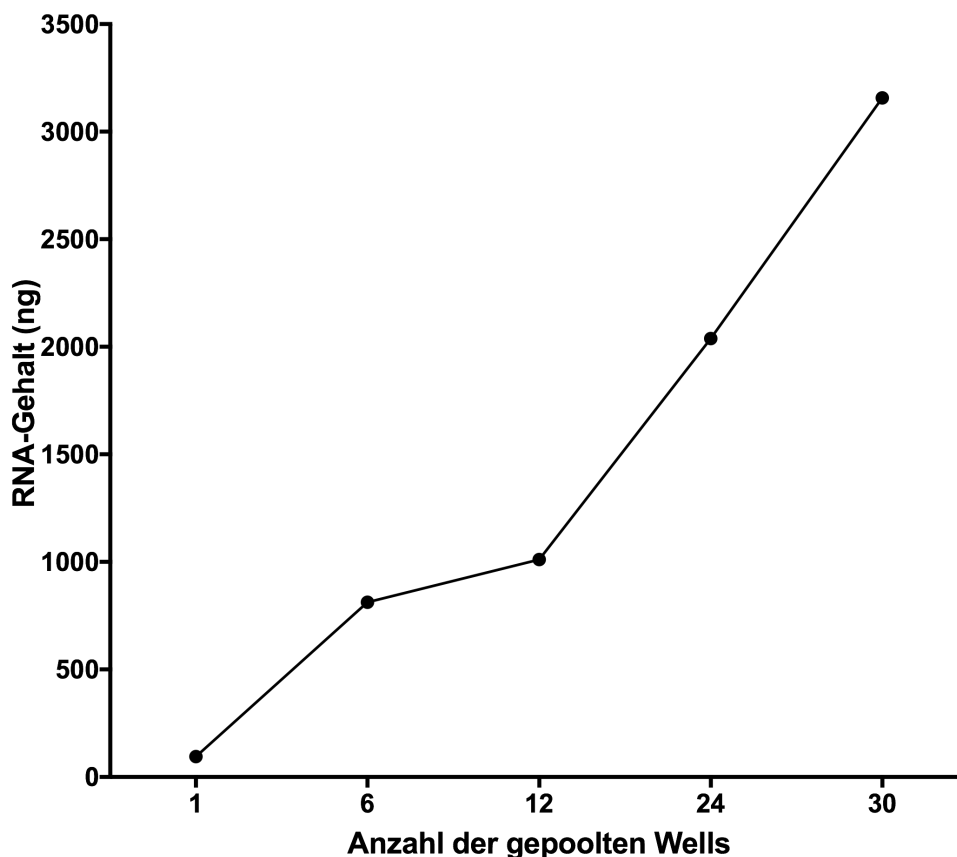


Abbildung 22: Darstellung der RNA-Ausbeute in Abhängigkeit von der Anzahl der für die RNA-Isolation gepoolten Wells. In Vorversuchen wurde der optimale Leistungsbereich der für die Isolation verwendeten Kombination aus QIAshredder spin columns und RNeasy Micro Kit der Firma QIAGEN festgelegt. Einen linearen Leistungsbereich zeigte das Kit zwischen 12 und 30 gepoolten Wells, sodass für die folgenden Analysen pro Behandlungsversuch und untersuchte Gruppe sowie die unbehandelte Kontrolle 30 Wells gepoolt wurden, um ausreichend RNA-Material zur cDNA-Synthese bereitzustellen.

In Vorversuchen wurde die für die Genexpressionsanalyse notwendige Zellzahl bestimmt. Hierzu wurden die Zellen in den oben genannten, für die Bestrahlung verwendeten Zellzahlen ausgesät. Nach achtundvierzigstündiger Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ erfolgte die RNA Isolation mittels QIAshredder spin columns und RNeasy Micro Kit der Firma QIAGEN.

Der optimale Arbeitsbereich des Isolations-Kits hinsichtlich der RNA-Ausbeute der Zellen zeigte sich im Bereich zwischen 12 und 30 gepoolten Wells (s. Abbildung 22). Da zur cDNA-Synthese mit dem von uns verwendeten „First-Strand-Kit“ mindestens 500 ng RNA-Material notwendig waren, wurde die RNA für die folgenden Versuche aus jeweils 30 Wells pro Gruppe gepoolt isoliert.

Da die qPCR im Hinblick auf einen größtmöglichen Informationsgewinn über die Genregulationsmechanismen als Antwort auf die Laserbestrahlung im Sinne eines Screenings liefern

sollte, wurde in Vorversuchen der optimale zeitliche Inkubationsrahmen bestimmt. Durchlichtmikroskopisch sowie in der Fluoreszenzfärbung hatten sich in Bestrahlungsversuchen mit NHDF ab 199 mW Laserspitzenleistung vier Stunden nach der Bestrahlung Nekrose- und Adhäsionszonen im Bestrahlungsfeld gezeigt. Um für ein Screening eine größtmögliche Inkubationszeit zur Genexpressionsantwort zu nutzen, ohne die im Bestrahlungsfeld befindlichen Zellen durch progrediente Adhäsionslyse für die RNA-Isolation zu verlieren, wurde in einem Vorversuch, nach einer Bestrahlung bei einer Laserpulsrate von 50 kHz und 500 mW Laserleistung, zu unterschiedlichen Inkubationszeitpunkten nach der Bestrahlung eine Zellzahlbestimmung durchgeführt (Abbildung 23). Die Zellen in jeder Vertiefung der Platte wurden hierbei vor der Zählung zweimalig mittels PBS gespült. Anschließend erfolgte das Ablösen der Zellen vom Plattenboden mittels Trypsins. Die Reaktion wurde mit Hilfe von TNS gestoppt und die Zellen automatisiert nach oben genanntem Protokoll zur Zellzahlbestimmung gezählt.

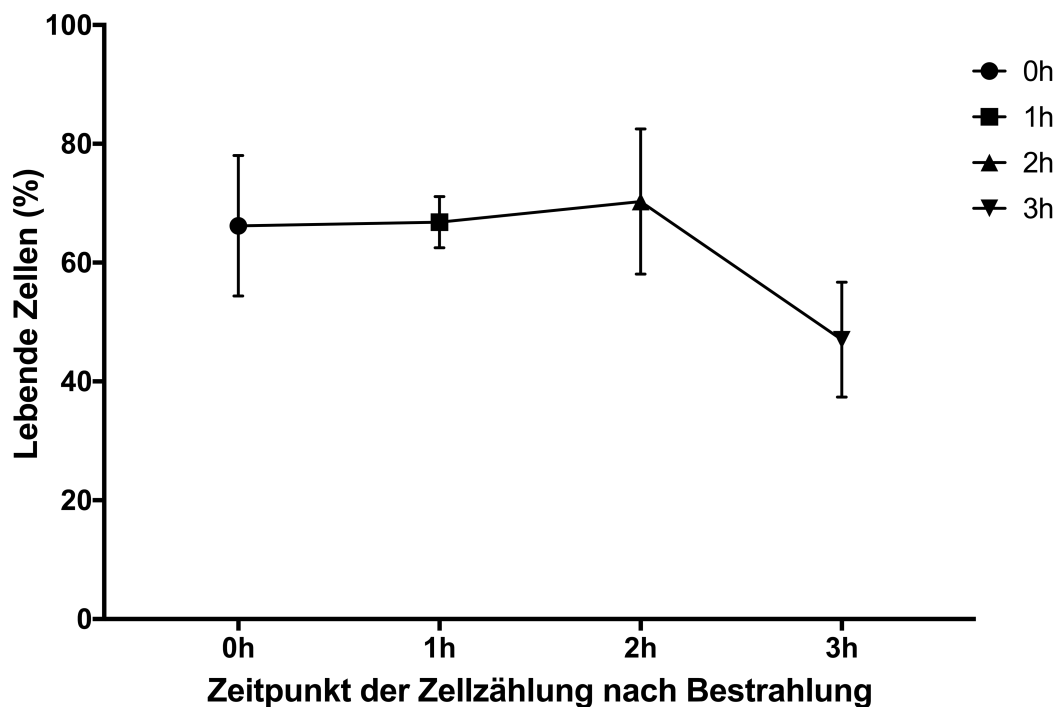


Abbildung 23: Während der Anteil lebender Zellen innerhalb der ersten zwei Stunden nach der Bestrahlung zwischen 66% und 70% lag, zeigte sich eine deutliche Abnahme der Zellzahl nach insgesamt 3 Stunden. Für die nachfolgenden Genexpressionsanalysen erfolgte die RNA-Isolation nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden nach der Bestrahlung.

3.9.3 RNA-Isolation

Um Rückschlüsse über unterschiedliche Regulationsmechanismen auf Genexpressionsebene zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen zu ziehen, machten wir uns mit Hilfe der RT-qPCR Informationen des Transkriptoms zu Nutze. Anhand des aus der zu untersuchenden Probe gewonnenen RNA-Materials wurde mittels reverser Transkription cDNA synthetisiert, die als Ausgangspunkt für die anschließende qPCR diente.

Für die folgenden Untersuchungen wurden die Zellen aus jeweils 30 Vertiefungen einer 96-Well-Mikrotiterplatte nach oben genannten Bedingungen bestrahlt, Zellen aus wiederum 30 Vertiefungen dienten als unbehandelte Kontrolle. In einem weiteren Vorversuch wurde der optimale Inkubationszeitpunkt nach Bestrahlung bestimmt, an dem nach zwei Waschvorgängen mit je 100 µl PBS noch eine ausreichende Adhärenz im Bestrahlungsfokus gewährleistet war, um den durch Adhäsionslyse bedingten Verlust an RNA-Material zu verringern. Hier zeigten sich bereits nach vierstündiger Inkubation mit anschließendem Waschschrift ausgeprägte Verluste im Bestrahlungsfeld, sodass für die weiterführenden Versuche eine Inkubationsdauer von zwei Stunden nach Bestrahlung gewählt wurde.

Nach der Bestrahlung und zweistündiger Inkubationszeit bei 37 °C und 5% CO₂ wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimalig mit 100 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden zur Lyse der Zellen pro Plattenvertiefung je 75 µl des im Kit enthaltenen, zuvor mit 10 µl β-Mercaptoethanol pro ml versetzten Lysepuffers RLT eingesetzt. Das gewonnene Lysat wurde nun in QIAshredder Columns überführt und zwei Minuten bei 13.000 U/min zentrifugiert. Es wurde ein dem nun entstandenen Lysat äquivalentes Volumen an Ethanol (70%) hinzugefügt, diese Lösung in eine RNeasy Spin Column eingesetzt und fünfzehn Sekunden bei über 10.000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Nach dem ersten Waschen mit RW1 Puffer und anschließender Zentrifugation bei über 10.000 U/min für 15 Sekunden erfolgte der DNase-Verdau mit Hilfe des RNase-free DNase-Kits. Hierzu wurden 70 µl RDD Puffer mit 10 µl der DNase Stock Solution versetzt, die entstandene Lösung ins Zentrum der Spin Column-Membran pipettiert und bei Raumtemperatur für fünfzehn Minuten auf der Säule inkubiert. In einigen Vorversuchen zur RNA-Isolation hatte sich in der photometrischen RNA-Quantifizierung ein zweigipfliger Kurvenverlauf mit Peak bei 230 nm und daraus resultierend geringem A_{260/230}-Quotienten gezeigt (siehe Abbildung 24).



Abbildung 24: Originaldarstellung eines Ergebnisses der RNA-Quantifizierung mittels NanoDrop-Spektrophotometer. In einigen Vorversuchen zeigte sich im Rahmen der RNA-Quantifizierung mittels Spektrophotometer ein zweigipfliger Kurvenverlauf mit auffälligem Peak bei einer Wellenlänge von 230 nm, welcher am ehesten durch eine Verunreinigung der Probe durch Guanidinisothiocyanat hervorgerufen wurde. Dies resultierte in einem $A_{260/230}$ -Quotienten, der deutlich unterhalb des unteren Referenzbereichs von 1,8 lag.

Der verwendete RLT-Lysepuffer enthält Guanidinisothiocyanat, welches für die oben beschriebene Beobachtung verantwortlich sein kann. Da sich derartige Verunreinigungen der RNA in einer geringeren Effizienz der reversen Transkription niederschlagen und somit das Ergebnis der qPCR-Analysen negativ beeinflussen können, erfolgte eine Modifikation des vom Hersteller empfohlenen Protokolls. Es folgten Waschschrte mit 350 μ l RW1-Puffer mit jeweils fünfzehnschündiger Zentrifugation bei über 10.000 U/min. Anschließend wurden Durchfluss und Sammelröhrchen verworfen. Die Spin Column wurde in ein neues 2 ml-Gefäß gesetzt und mit 500 μ l RPE Puffer ebenfalls zur Salzelimination zweimal gewaschen und jeweils bei über 10.000 U/min für 15 Sekunden zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses erfolgte ein zweiminütiger Waschvorgang mit Ethanol (80%) unter oben genannten Zentrifugationsparametern (siehe Abbildung 25).

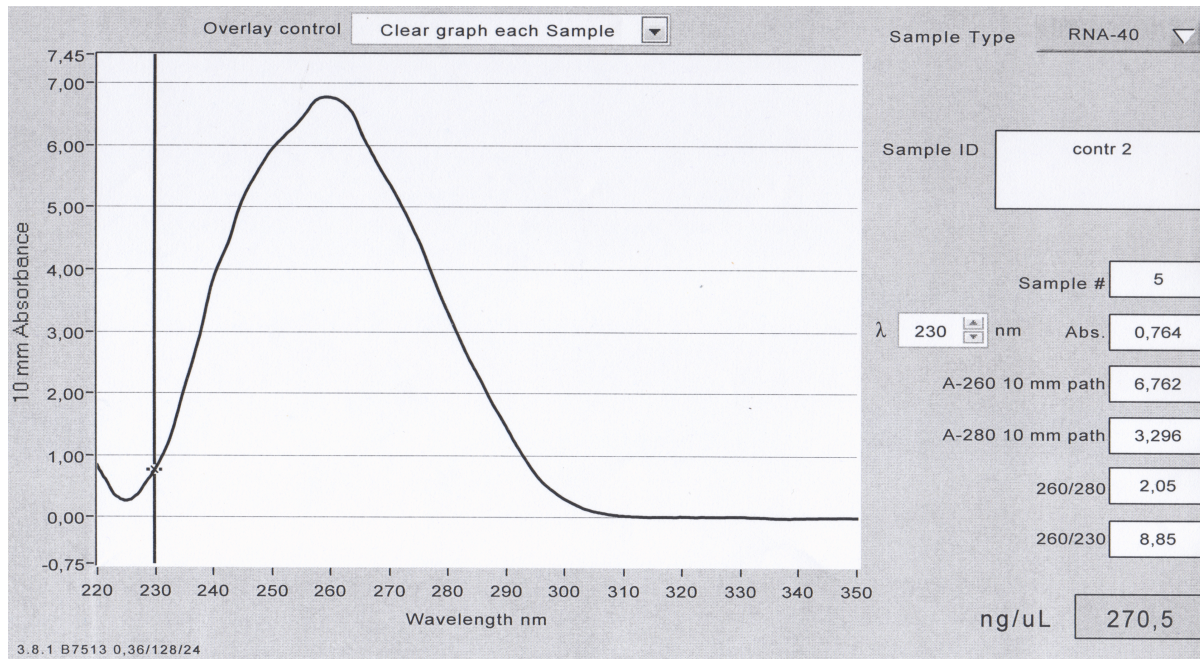


Abbildung 25: Originaldarstellung des Ergebnisses der RNA-Quantifizierung mittels NanoDrop-Spektrophotometer nach Etablierung der Waschschrte im RNA-Isolationsprotokoll. Nach den zusätzlichen im RNA-Isolationsprotokoll etablierten Waschschrten mittels RW1- und RPE-Puffer war in der spektrophotometrischen Quantifizierung ein eingipfliger Kurvenverlauf mit Maximum bei 260 nm zu beobachten. Die geringe Absorption bei 230 nm sowie der hohe $A_{260/230}$ -Quotient weisen auf eine hohe Reinheit der isolierten RNA hin.

Wie beschrieben wurden Durchfluss und Auffangröhrchen verworfen und die Spin Column in einem frischen Zentrifugenröhrchen bei geöffnetem Deckel unbeladen bei 13.000 U/min für 5 Minuten getrocknet. Nun wurde die Spin Column in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß eingesetzt und 14 μ l RNase-freies Wasser ins Zentrum der Säule pipettiert und für eine Minute zentrifugiert. Durch die Passage der Spin Column entsteht ein Verlust von 2 μ l, sodass ein Eluat aus 12 μ l resultiert. Schließlich wurde 1 μ l des Eluats im NanoDropTM-Spektrophotometer quantifiziert.

Bei der spektrophotometrischen Messung macht man sich die Absorptionseigenschaften von Nukleotiden im Wellenlangsbereich von 260 nm zu Nutze, sodass bei dieser Wellenlänge ein charakteristischer Peak zu erkennen ist. Um die Reinheit der isolierten RNA zu beurteilen, wird der $A_{260/280}$ -Quotient ermittelt. Hierbei gelten Werte von 1,9-2,1 als Hinweis für „reine“ RNA. Phenole oder Proteine absorbieren im Bereich um 280 nm, sodass ein niedriger $A_{260/280}$ -Quotient auf eine Verunreinigung der Probe durch jene Stoffe hinweisen kann (Okamoto & Okabe 2000). Ein geringer $A_{260/230}$ -Quotient kann Hinweis auf eine Kontamination durch organische Substanzen wie z.B. Phenole, TRIzol und chaotrope Salze geben. Da derartige Verunreinigungen

gen zu einer Hemmung der reversen Transkription führen können, sollte dieser Quotient, entsprechend der Herstellerangabe, für reine RNA größer als 1,7 sein.

3.9.4 cDNA-Synthese

Die aus den Zellen beider Gruppen isolierte RNA wurde mit Hilfe des „RT² First Strand Kits“ der Firma QIAGEN in cDNA umgeschrieben.

Zur cDNA-Synthese wurden 600 ng RNA eingesetzt (Tabelle 3). Um eine Kontamination der Reaktion und somit eine Verzerrung der Analyse durch genomische DNA zu verhindern, wurden mit Hilfe von 2 µl des mitgelieferten „GE-Puffers“, 600 ng RNA der entsprechenden Probe und Nuclease-freiem Wasser der „Genomic DNA Elimination Mix“ hergestellt, welcher für 5 Minuten bei 42 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gelagert wurde.

Tabelle 3: Ansatz einer Reaktion für den „Genomic DNA Elimintion Mix“:

<u>Komponente:</u>	<u>Menge:</u>
RNA	600 ng
GE-Puffer	2 µl
RNase freies Wasser	variabel
Gesamtvolumen	10 µl

Für eine cDNA-Synthese-Reaktion wurde zudem der „Reverse-Transcription Mix“ aus je 4 µl „BC3-Puffer“, 1 µl „Control P2“, 2 µl „RE3 Reverse Transcriptase Mix“ und 3 µl RNase-freiem Wasser angesetzt (Tabelle 4) und anschließend 10 µl desselben mit 10 µl des „Genomic DNA Elimination Mix“ versetzt.

Die entstandene Lösung wurde nun für genau 15 Minuten bei 42 °C inkubiert und die Reaktion durch fünfminütige Inkubation bei 95 °C gestoppt. In jedes Reaktionsgefäß wurden schließlich 91 µl RNase-freies Wasser pipettiert und vorsichtig gemischt.

Tabelle 4: Ansatz einer Reaktion für den „Reverse-Transcription Mix“

<u>Komponente:</u>	<u>Volumen für eine Reaktion:</u>
BC3-Puffer (5x)	4 µl
Control P2	1 µl
RE3 Reverse Transcriptase Mix	2 µl
RNase freies Wasser	3 µl
Gesamtvolumen	10 µl

3.9.5 qPCR-Array

Um einen Anhaltspunkt bezüglich der Genexpressionsantwort auf die Laserbestrahlung zu erhalten, entschieden wir uns bewusst für einen Stress- und Toxizitäts-Array der Firma QIAGEN (RT2-Profiler PCR Array Stress & Toxicity Pathway Finder - PAHS-003Z, QIAGEN, Hilden, Deutschland). Dieser bildet 84 Gene aus spezifischen Signalwegen wie Apoptose, Nekrose, Autophagie, oxidativem und osmotischem Stress, DNA-Schädigungs-, Entzündungs- und ungefaltete Proteinantwort auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte ab und diente somit als Screeninginstrument. Des Weiteren enthielt die Array-Platte fünf Housekeeping Gene (HKG), jeweils drei Reverse Transkriptase- und drei PCR-Positivkontrollen sowie eine Kontrolle für genomische DNA.

Für eine Reaktion im 96-Well-Format wurden 1350 µl des für den Array empfohlenen RT²-SYBR[®] Green ROX qPCR Mastermix der Firma QIAGEN mit 102 µl der zuvor synthetisierten cDNA und 1248 µl RNase-freies Wasser gemischt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Zusammensetzung des „PCR Components Mix“ für eine Reaktion:

<u>Komponente:</u>	<u>Volumen:</u>
RT ² SYBR [®] Green Mastermix	1350 µl
cDNA Synthese-Reaktion	102 µl
RNase freies Wasser	1248 µl
Gesamtvolumen	2700 µl

In jede Vertiefung der RT² Profiler PCR Array-Platte wurden nun 25 µl der entstandenen Lösung eingesetzt. Die Pipettenspitzen wurden nach jedem Pipettierschritt gewechselt, um eine Kreuzkontamination zwischen den Plattenvertiefungen zu vermeiden.

Anschließend erfolgte die Versiegelung der Platte mit Hilfe einer im Kit enthaltenen klaren selbstklebenden Folie.

Die Array-Platte wurde bei Raumtemperatur für eine Minute bei 1000 g zentrifugiert, sorgfältig inspiziert und Luftblasenrückstände ausgeschlossen.

Während der Einstellung des Real-Time Cyclers erfolgte die Lagerung der Platte auf Eis.

Am verwendeten Gerät „ABI StepOnePlus“ wurden folgende Zyklus-Bedingungen eingestellt:

1 Zyklus: 10 Minuten bei 95 °C zur Aktivierung der HotStart Polymerase

40 Zyklen: 15 Sekunden bei 95 °C

60 Sekunden bei 60 °C Fluoreszenzdatenerhebung

Nach Erstellung einer Schmelzpunktkurve wurden die erhobenen Daten ins Excel-Format exportiert und nach oben beschriebener $\Delta\Delta$ -C_t-Methode analysiert.

3.10 Statistik

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten statistischen Analysen erfolgten mit Hilfe der Programme SPSS und GraphPad Prism 7.

3.10.1 LDH-Test und WST-Test

Da zu jeder bestrahlten Kultur jeweils eine nicht-bestrahlte Kontrolle mitgeführt worden war und sofern die Differenzen der korrespondierenden Daten aus einer Normalverteilung stammten, wurde zu jeder verwendeten Laserleistung ein gepaarter t-Test durchgeführt. Dies wurde mit Hilfe des D'Agostini & Pearson-Normalverteilungs-Tests überprüft und falls keine Normalverteilung vorlag, das nicht-parametrische Äquivalent im Sinne eines Wilcoxon-Tests angewandt. Um die α -Fehler-Inflation durch multiples Testen zu berücksichtigen, wurde eine p-

Wert-Adjustierung nach Bonferroni durchgeführt. Die Nullhypothese lautete, dass die Erwartungswerte der LDH-Aktivität bzw. des WST-1-Umsatzes in bestrahlter und nicht-bestrahlter Kultur gleich sind und die Bestrahlung bei entsprechender Laserleistung somit keinen Einfluss hat. Die Alternativhypothese lautete, dass die Erwartungswerte in bestrahlter und nicht-bestrahlter Kultur ungleich sind und die Laserbestrahlung somit einen Einfluss auf die LDH-Aktivität bzw. den gemessenen WST-Umsatz hat. Bei einem festgelegten Signifikanzniveau von 0,05 wurde nach Bonferroni-Korrektur und 5 durchgeführten statistischen Tests, ein korrigiertes Signifikanzniveau von 0,01 festgelegt. Bei p-Werten $< 0,01$ wurde die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese angenommen, sodass in diesen Fällen in der vorliegenden Arbeit von einem statistisch signifikanten Ergebnis gesprochen wird. Ein p-Wert von $> 0,01$ führte nach oben genanntem Beispiel nach Bonferroni-Korrektur zu einem Verwerfen der Alternativhypothese und die Nullhypothese wurde angenommen. In der vorliegenden Arbeit wird in diesen Fällen von einem statistisch nicht signifikanten Ergebnis gesprochen.

3.10.2 qPCR-Analysen

Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Hierbei erfolgte eine Normalisierung der Daten eines jeden Arrays mit Hilfe eines Kollektivs aus 5 Haushaltsgenen. Haushaltsgene, die sich als stark reguliert erwiesen, wurden aus dem Normalisierungskollektiv ausgeschlossen. Die ΔC_t -Werte aus bestrahlter und nicht-bestrahlter Gruppe wurden für jedes Gen separat mittels t-Tests verglichen. Da der Array als Screeninginstrument konzipiert worden war, um Unterschiede in der Genexpression zwischen beiden Gruppen mit hoher Sensitivität zu detektieren und somit biologische Effekte durch einen statistischen Vergleich zu berücksichtigen, wurde auf eine p-Wert-Adjustierung verzichtet. Die Nullhypothese entsprach hierbei der Annahme, dass hinsichtlich des mittleren ΔC_t -Wertes zwischen bestrahlter und nicht-bestrahlter Gruppe kein Unterschied besteht und dass die Laserbestrahlung bei der entsprechenden Leistung keinen Einfluss auf die Expression des untersuchten Gens hat. Bei einem p-Wert $< 0,05$ wurde die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese, dass die Laserbestrahlung einen Einfluss auf die Expression des untersuchten Gens hat, angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Fluoreszenz- Differenzierungsfärbung

Nach Bestrahlung der humanen Fibroblasten konnten wir bei einer Laserpulsrate von 50 kHz und Laserleistungen bis 199 mW keine signifikanten Unterschiede zwischen der bestrahlten Kultur und der korrespondierenden, unbehandelten Kontrolle beobachten. Ab einer Laserleistung von ca. 223 mW zeigten sich diskrete, kreisförmige Nekrose- und Adhäsiolyseareale, deren Radius mit steigender Laserleistung bei konstanter Bestrahlungsdauer von zwei Minuten deutlich zunahm (Abbildung 26).

Ähnliche Effekte konnten wir nach der Bestrahlung der humanen Chondrozyten und Osteoblasten beobachten.

Die HCH zeigten nach zweiminütiger Bestrahlung bei einer Repetitionsrate von 50 kHz und oben genannten Parametern unserer Amplitudenmodulationsstrategie erste Nekrose- und Adhäsiolyseareale ab einer Laserleistung von 250 mW, während sich bei einer Leistung von 223 mW kein signifikanter Unterschied zwischen der bestrahlten Kultur und der unbehandelten Kontrolle zeigte (Abbildung 27).

Die Osteoblasten zeigten oben genannte Veränderungen hingegen erst ab einer Laserleistung von 285 mW (Abbildung 28).

Teile der in diesem Kapitel beschriebenen Daten und Ergebnisse konnten von unserer Arbeitsgruppe im Jahr 2020 im Rahmen der Arbeit „Cytotoxicity studies of an optoacoustic stimulation strategy for the development of laser-based hearing aids.“ in der Fachzeitschrift „Journal of Biomedical Optics“ publiziert werden (Pillong *et al.* 2020).

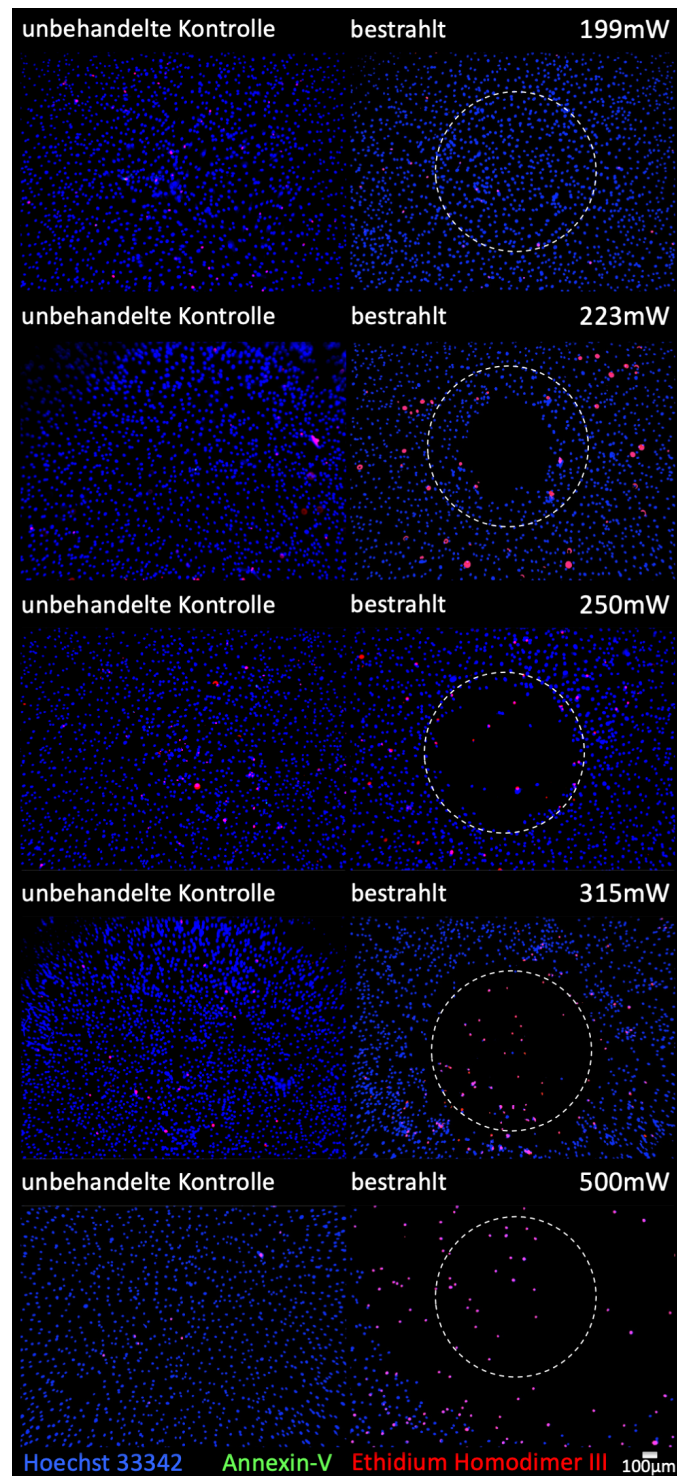


Abbildung 26: Fluoreszenzfärbung der Zelllinie NHDF zur Differenzierung zwischen vitalen, nekrotischen und apoptotischen Zellen. Exemplarisch sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der bestrahlten Kultur (rechte Spalte) bei Laserleistungen von 199 mW bis 500 mW (von oben nach unten) und der jeweils korrespondierenden, unbehandelten Kontrolle (linke Spalte) dargestellt. Die bestrahlte Fläche ist durch den mit unterbrochener Linie gezeichneten Kreis in der rechten Spalte gekennzeichnet. Zellkerne vitaler Zellen zeigen sich blau, Zellkerne nekrotischer Zellen rot, während die Zellmembran apoptotischer Zellen grün angefärbt wird. Die Maßstabsleiste entspricht einer Länge von 100 µm.

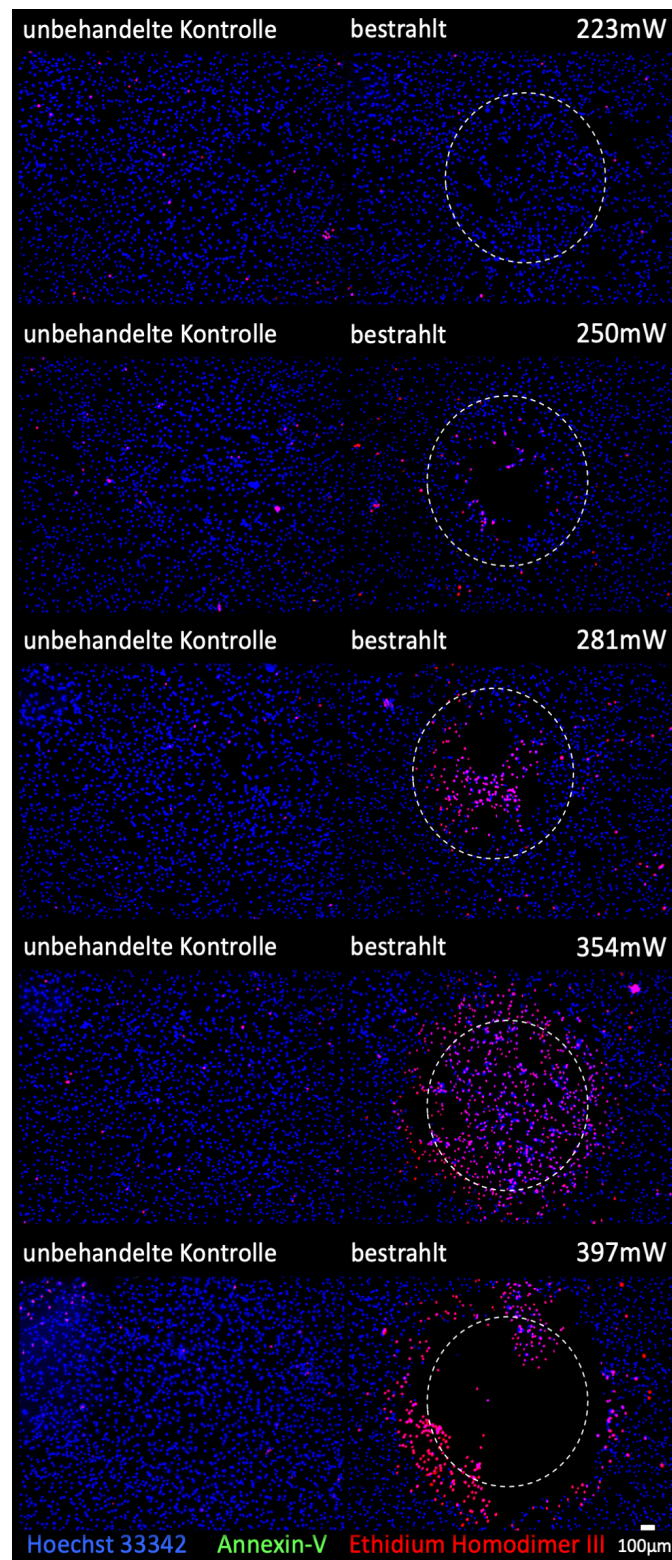


Abbildung 27: Fluoreszenzfärbung der Zelllinie HCH zur Differenzierung zwischen vitalen, nekrotischen und apoptotischen Zellen. Exemplarisch sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der bestrahlten Kultur (rechte Spalte) bei Laserleistungen von 223 mW bis 397 mW (von oben nach unten) und der jeweils korrespondierenden, unbehandelten Kontrolle (linke Spalte) dargestellt. Die bestrahlte Fläche ist durch den mit unterbrochener Linie gezeichneten Kreis in der rechten Spalte gekennzeichnet. Zellkerne vitaler Zellen zeigen sich blau, Zellkerne nekrotischer Zellen rot, während die Zellmembran apoptotischer Zellen grün angefärbt wird. Die Maßstabsleiste entspricht einer Länge von 100 µm.

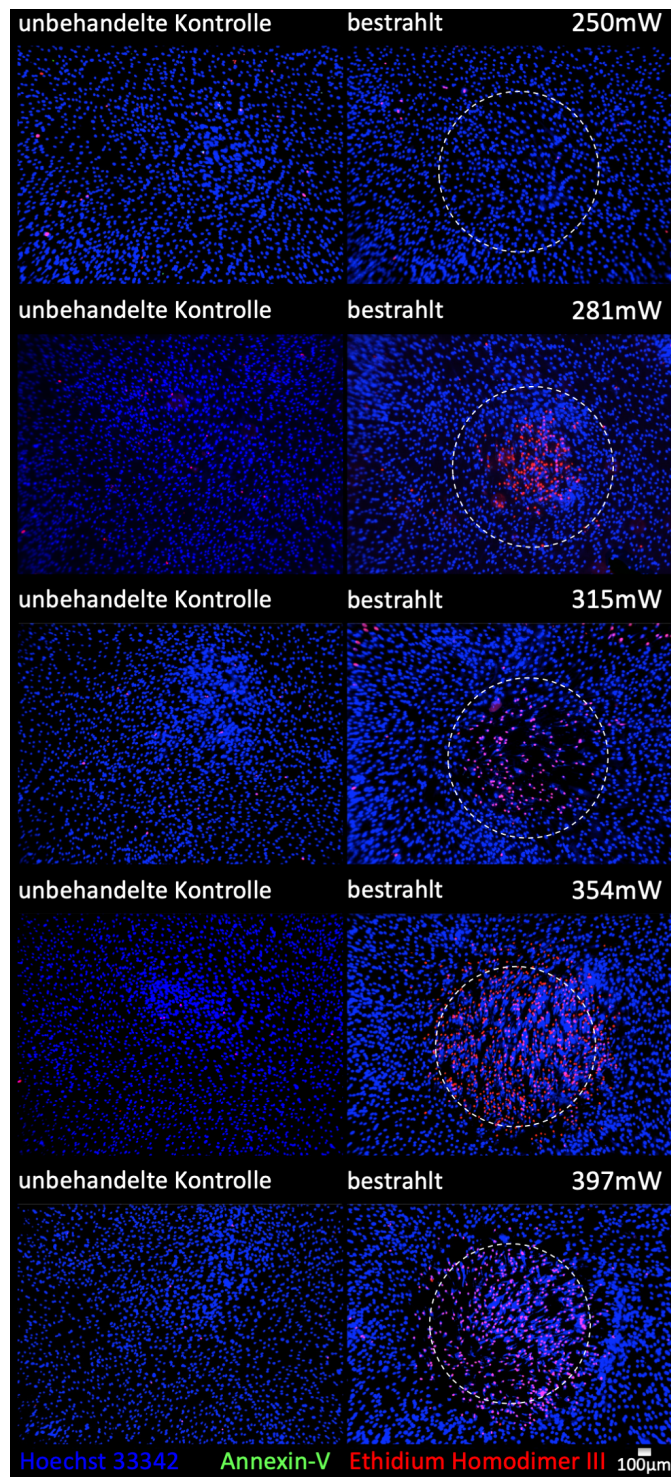


Abbildung 28: Fluoreszenzfärbung der Zelllinie HOB zur Differenzierung zwischen vitalen, nekrotischen und apoptotischen Zellen. Exemplarisch sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der bestrahlten Kultur (rechte Spalte) bei Laserleistungen von 250 mW bis 397 mW (von oben nach unten) und der jeweils korrespondierenden, unbehandelten Kontrolle (linke Spalte) dargestellt. Die bestrahlte Fläche ist durch den mit unterbrochener Linie gezeichneten Kreis in der rechten Spalte gekennzeichnet. Zellkerne vitaler Zellen zeigen sich blau, Zellkerne nekrotischer Zellen rot, während die Zellmembran apoptotischer Zellen grün angefärbt wird. Die Maßstabsleiste entspricht einer Länge von 100 µm.

4.2 LDH-Test

Da die Fluoreszenzfärbung bereits erste Anhaltspunkte über Adhäsion- und Nekroseinduktion nach Bestrahlung mit oben genannten Parametern geliefert hatte, sollten diese Effekte in ihrer Kinetik in weiteren Versuchen und in Anlehnung an klassische *in vitro*-Zytotoxizitätsprüfungen enzymatisch mit Hilfe zellbasierter Tests untersucht werden.

Die Zytotoxizität der Laserbestrahlung wurde im Hinblick auf die Nekroseinduktion 24 h nach Bestrahlung mit Hilfe eines LDH-Tests untersucht.

Nach Bestrahlung der NHDF mit Laserleistungen von 177 mW und 199 mW konnte eine Zytotoxizität von ca. 0,54% bzw. 0,39% gemessen werden, wobei die oben genannten statistischen Tests p-Werte oberhalb des korrigierten Signifikanzniveaus von $\alpha^* = 0,0083$ ergaben.

Nach Bestrahlung mit einer Leistung von 223 mW zeigte sich eine Zytotoxizität von ca. 0,5%. Obwohl sich in der Fluoreszenzfärbung bei dieser Leistung erste zytotoxische Effekte gezeigt hatten, führte der errechnete p-Wert von 0,4082 zur Beibehaltung der Nullhypothese. Nach der Bestrahlung mit 250 mW ließ sich eine Zytotoxizität von 1,78% nachweisen. Wie bereits im Rahmen der Fluoreszenzfärbung beobachtet, war der Trend einer mit steigender Leistung ebenso zunehmende Zytotoxizität von 3,45% bei 315 mW und 10,4% bei 500 mW zu messen. Der statistische Vergleich zwischen bestrahlter und nicht-bestrahlter Kultur ergab ab 250 mW eine signifikant erhöhte LDH-Aktivität in der bestrahlten Gruppe (Abbildung 29).

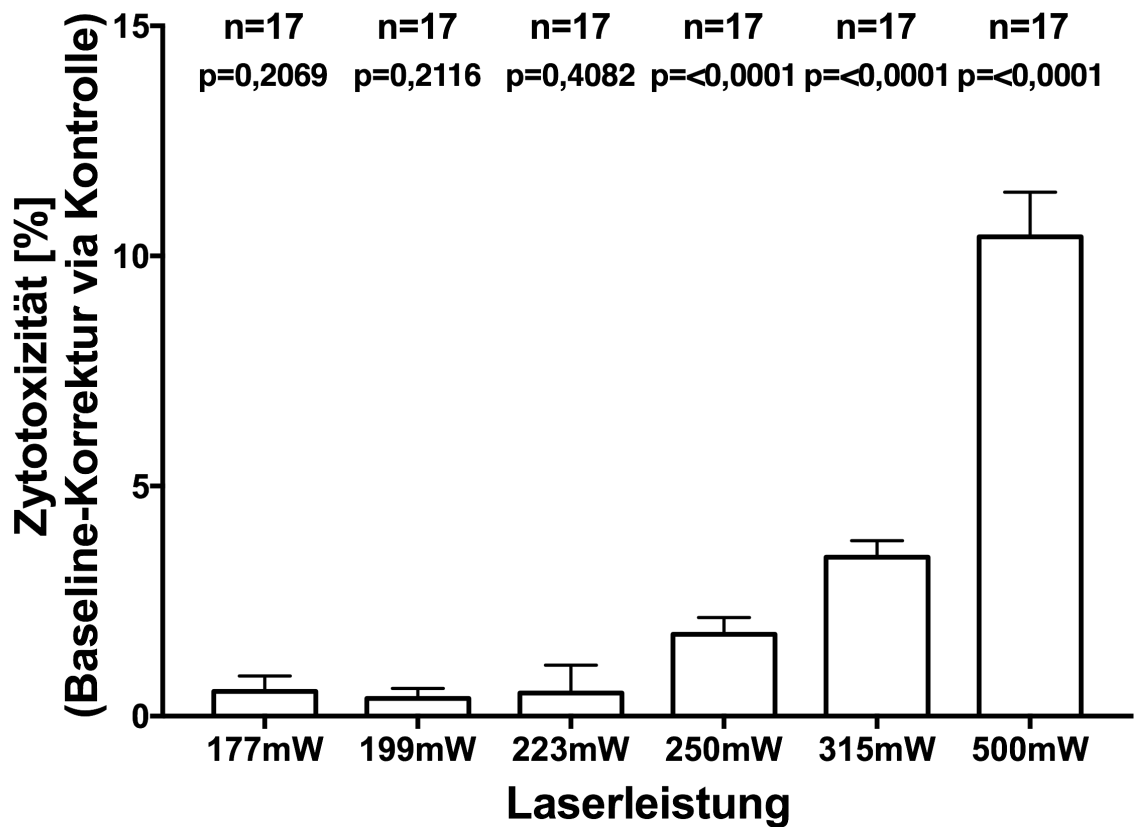


Abbildung 29: Darstellung der Zytotoxizität in Relation zur verwendeten Laserleistung anhand der humanen Fibroblastenlinie NHDF. Je Laserleistung wurden 17 Replikate untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung. Es zeigte sich eine Zunahme der Zytotoxizität mit steigender Laserleistung. Ein signifikanter Unterschied zwischen bestrahlter und unbehandelter Gruppe konnte ab einer Laserleistung von 250 mW festgestellt werden. (Korrigiertes Signifikanzniveau nach Bonferroni: $\alpha^*=0,0083$)

Nach Bestrahlung der HCH mit Laserleistungen von 223 mW und 250 mW zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der LDH-Freisetzung zwischen bestrahlter und nicht-bestrahlter Kultur. Ab einer Leistung von 250 mW hingegen erbrachte der statistische Vergleich der Gruppen bei einer errechneten Zytotoxizität von ca. 2% einen p-Wert $< 0,0001$, sodass die Nullhypothese abgelehnt und die Alternativhypothese angenommen wurde. Auch hier zeigte sich der Trend einer mit steigender Leistung assoziierten Zunahme der LDH-Freisetzung in der bestrahlten Kultur bei p-Werten $< 0,0001$ (Abbildung 30).

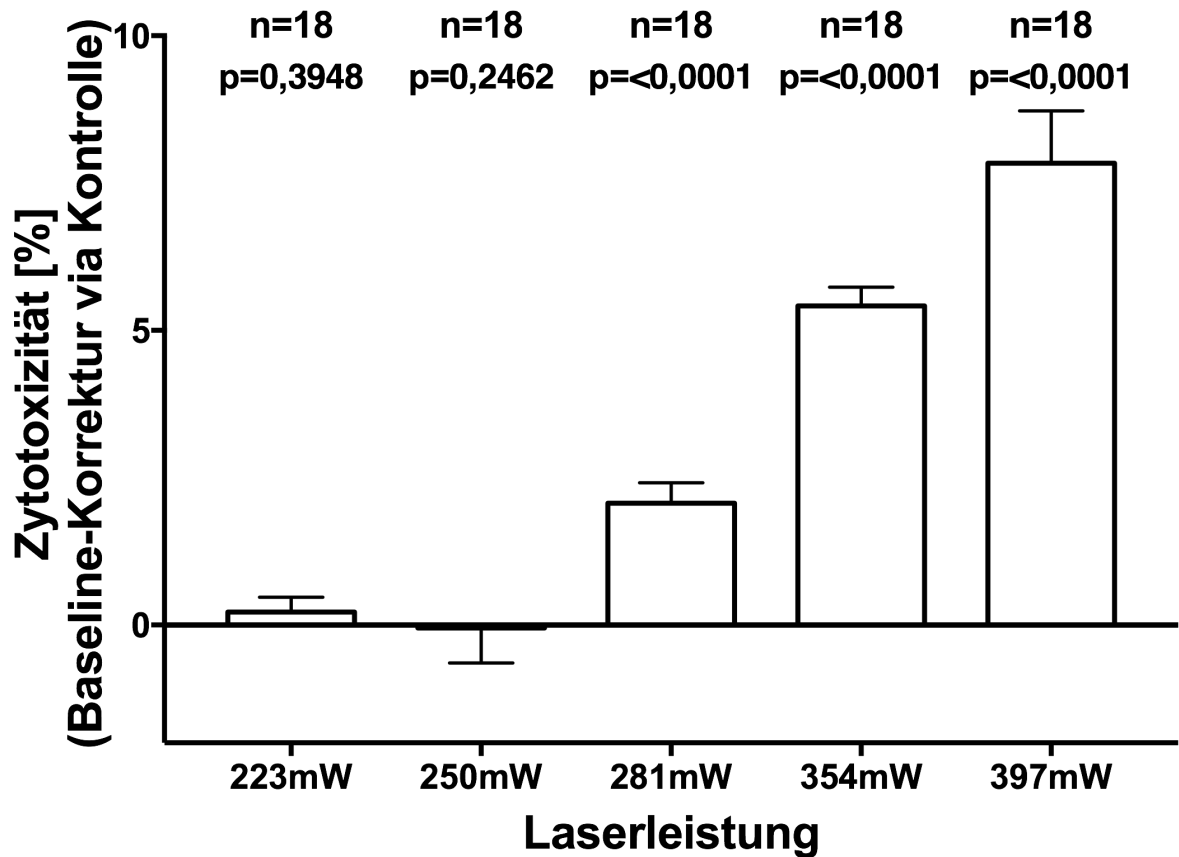


Abbildung 30: Darstellung der Zytotoxizität in Relation zur verwendeten Laserleistung anhand der humanen Chondrozytenlinie HCH. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung. Es zeigte sich eine Zunahme der Zytotoxizität mit steigender Laserleistung. Ein signifikanter Unterschied zwischen bestrahlter und unbehandelter Gruppe konnte ab einer Laserleistung von 281 mW festgestellt werden. (Korrigiertes Signifikanzniveau nach Bonferroni: $\alpha^*=0,01$).

Nach der Bestrahlung der humanen Osteoblasten mit einer Laserleistung von 281 mW zeigte der statistische Vergleich von bestrahlter und unbehandelter Gruppe bei einem errechneten p-Wert von 0,4006 keine signifikant erhöhte Zytotoxizität durch die Laserbehandlung. Erst ab einer Laserleistung von 315 mW zeigte sich eine signifikant erhöhte LDH-Freisetzung in der bestrahlten im Vergleich zur nicht-bestrahlten Kultur mit Nachweis einer mit steigender Laserleistung wachsenden Zytotoxizität.

Nach der Bestrahlung mit einer Laserleistung von 250 mW wurde im Vergleich zur nicht-bestrahlten Kultur eine Zytotoxizität von -1,28% gemessen. Der statistische Vergleich beider Gruppen ergab somit bei einem p-Wert von 0,0004 eine signifikant verringerte LDH-Aktivität in der bestrahlten Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Kultur (Abbildung 31). Auch im Rahmen der Fluoreszenzfärbung hatten sich in dieser Zelllinie nach Bestrahlung mit 250 mW keine Hinweise für signifikante zytotoxische Effekte gezeigt.

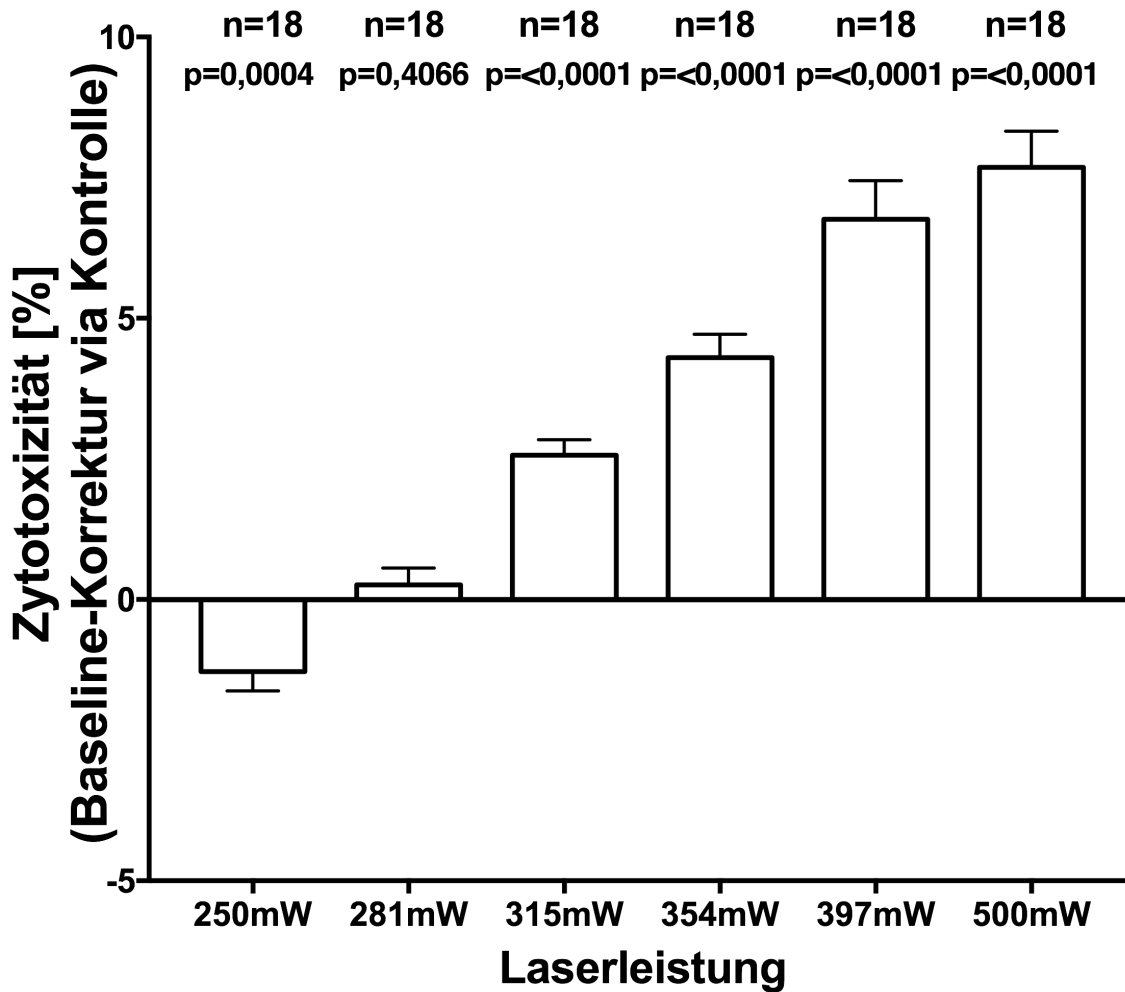


Abbildung 31: Darstellung der Zytotoxizität in Relation zur verwendeten Laserleistung anhand der humanen Osteoblastenlinie HOB. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung. Es zeigte sich eine Zunahme der Zytotoxizität mit steigender Laserleistung. Ein signifikanter Unterschied zwischen bestrahlter und unbehandelter Gruppe konnte ab einer Laserleistung von 315 mW festgestellt werden. (Korrigiertes Signifikanzniveau nach Bonferroni: $\alpha^*=0,0083$).

4.3 WST-1-Test

Um auch zytostatische Effekte der Bestrahlung im Rahmen der Zytotoxizitätsprüfung zu berücksichtigen, wurde die Auswirkung der Laserbestrahlung auf die metabolische Aktivität der Zellen mittels WST-1-Tests untersucht.

Die Ergebnisse der Messung der metabolischen Aktivität unterstützten den bereits in LDH-Test und Fluoreszenzfärbung erkennbaren Trend der mit steigender Laserleistung assoziierten Viabilitätsabnahme. Zwei Stunden nach Bestrahlung der NHDF zeigte sich eine mittlere Reduktion

der bestrahlten gegenüber der unbehandelten Kultur von ca. 2,9% bei 199 mW, 4,2% bei 223 mW, 5,6% bei 250 mW, 8,6% bei 315 mW und 18,5% bei 500 mW, wobei der statistische Vergleich von bestrahlter Kultur und unbehandelter Gruppe ab einer Leistung von 223 mW eine signifikant verringerte Viabilität in der bestrahlten Gruppe ergab (Abbildung 32).

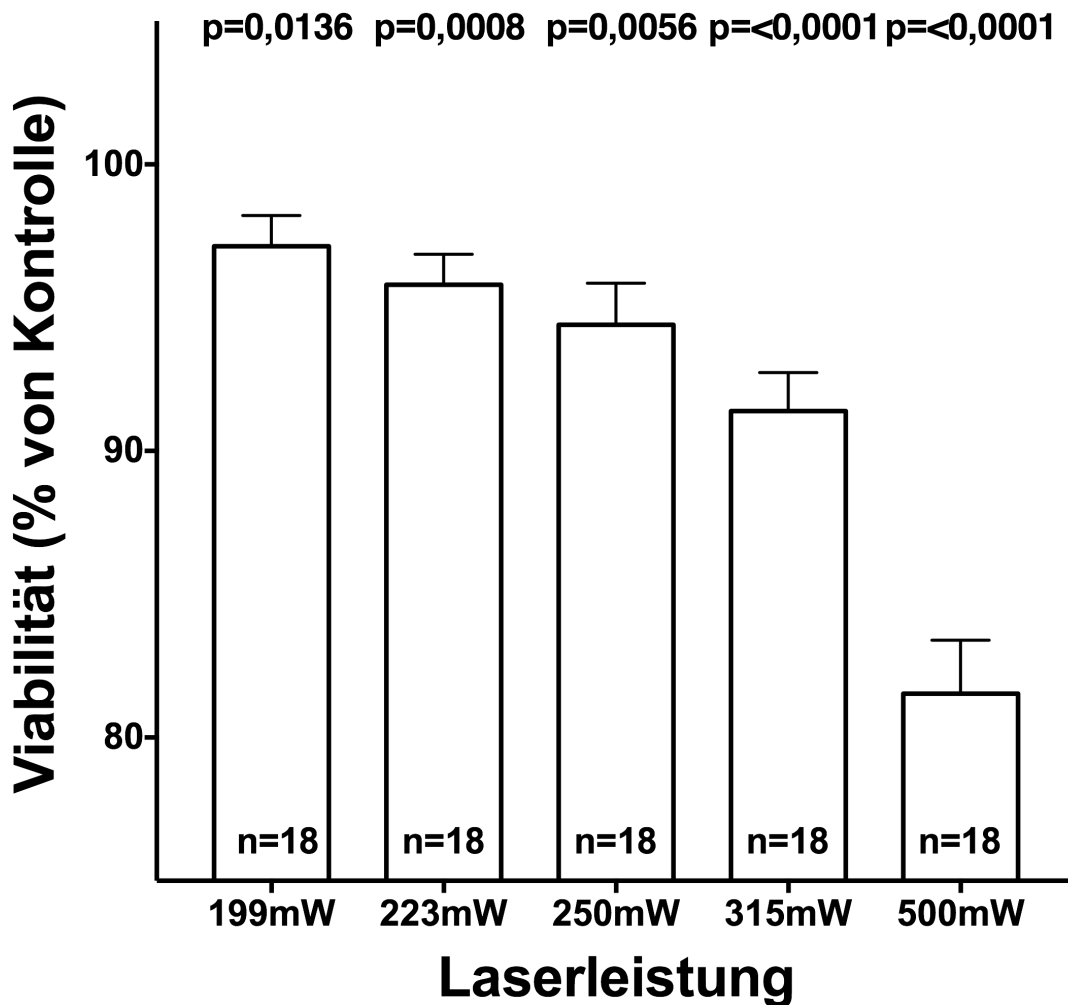


Abbildung 32: Untersuchung zur metabolischen Aktivität der Zelllinie NHDF nach Bestrahlung mittels WST-1-Tests. Je Laserleistung wurden 18 Replikate untersucht. Die Viabilität ist als Mittelwert mit Standardfehler in Form der Balkendiagramme nach Normalisierung auf die unbehandelte Kontrolle abgebildet. Es zeigte sich eine Abnahme der Viabilität mit steigender Laserleistung. Der statistische Vergleich unbehandelter und bestrahlter Gruppe nach Korrektur nach Bonferroni (korrigiertes Signifikanzniveau $\alpha^*=0,01$) zeigte ab 223 mW einen signifikanten Viabilitätsunterschied.

Die Ergebnisse des WST-1-Tests nach Bestrahlung der HCH zeigten ebenfalls den Trend der Viabilitätsabnahme mit steigender Laserleistung. Bei einer Leistung von 223 mW konnte eine mittlere Reduktion der metabolischen Aktivität in der bestrahlten Kultur von 1,06% gemessen

werden. Bei 250 mW entsprach die Reduktion der Viabilität in der bestrahlten Gruppe gegenüber der unbehandelten ca. 1,7%, bei 281 mW 4%, bei 354 mW 10,9% und bei 500 mW 11,2%. Die statistischen Tests zum Vergleich bestrahlter und nicht-bestrahlter Gruppe lieferten bis zu einer Leistung von 281 mW keine ausreichende Evidenz zur Ablehnung der Nullhypothese, während bei 354 mW und 500 mW eine signifikant geringere Viabilität in der bestrahlten Kultur festgestellt wurde (Abbildung 33).

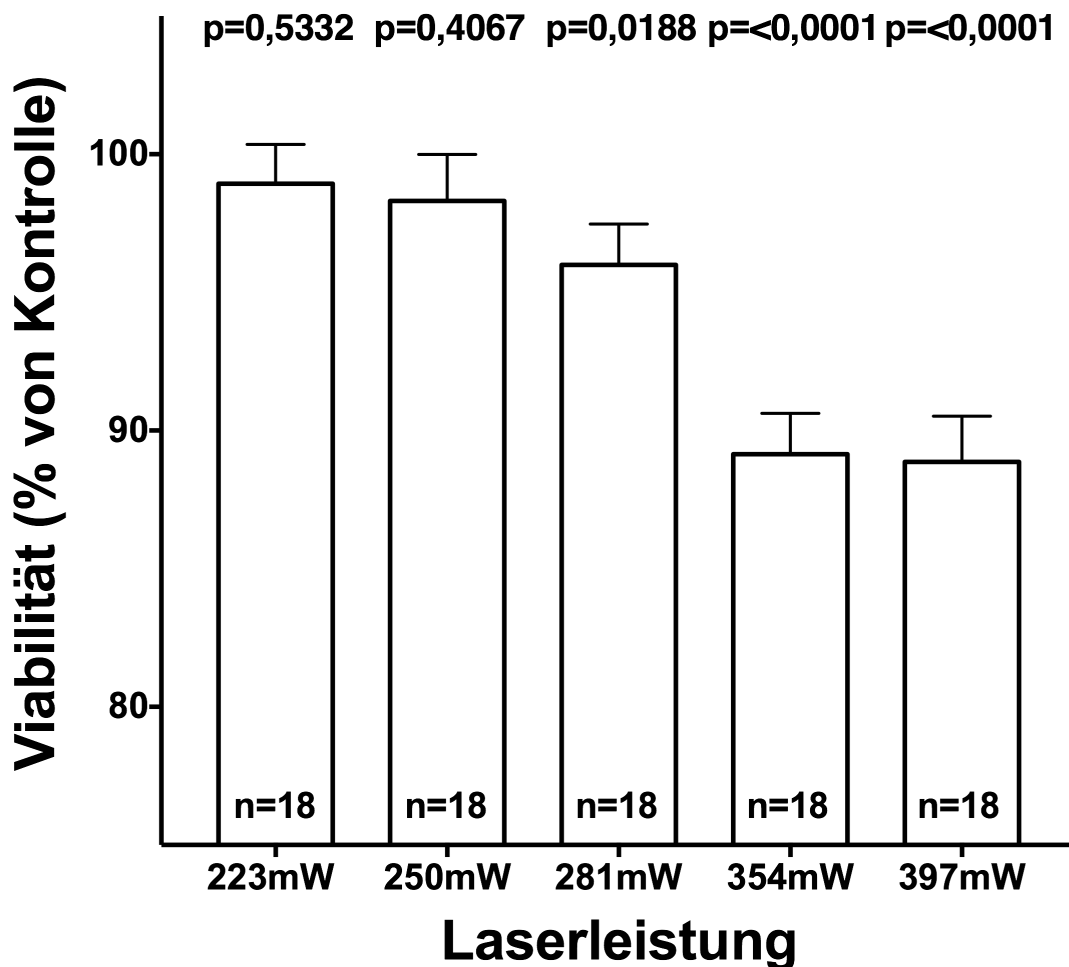


Abbildung 33: Untersuchung zur metabolischen Aktivität der Zelllinie HCH nach Bestrahlung mittels WST-1-Tests. Je Laserleistung wurden 18 Replikate untersucht. Die Viabilität ist als Mittelwert mit Standardfehler in Form der Balkendiagramme nach Normalisierung auf die unbehandelte Kontrolle abgebildet. Es zeigte sich eine Abnahme der Viabilität mit steigender Laserleistung. Der statistische Vergleich unbehandelter und bestrahlter Gruppe nach Korrektur nach Bonferroni (korrigiertes Signifikanzniveau $\alpha^*=0,01$) zeigte ab 354 mW einen signifikanten Viabilitätsunterschied.

Auch in den HOB zeigte sich bei der Analyse der WST-1-Test-Daten der Trend eines Viabilitätsverlusts mit steigender Laserleistung. Während sich nach einer Bestrahlung mit 250 mW eine Zytotoxizität von 3,6% zeigte, ergab die statistische Auswertung einen p-Wert von 0,0171, sodass bei korrigiertem Signifikanzniveau $\alpha^*=0,01$ die Nullhypothese beibehalten wurde. Erst ab einer Laserleistung von 281 mW und einer Zytotoxizität von 4,6% ergab die Analyse bei p-Werten $< 0,01$ eine signifikant verringerte Viabilität nach der Bestrahlung (Abbildung 34).

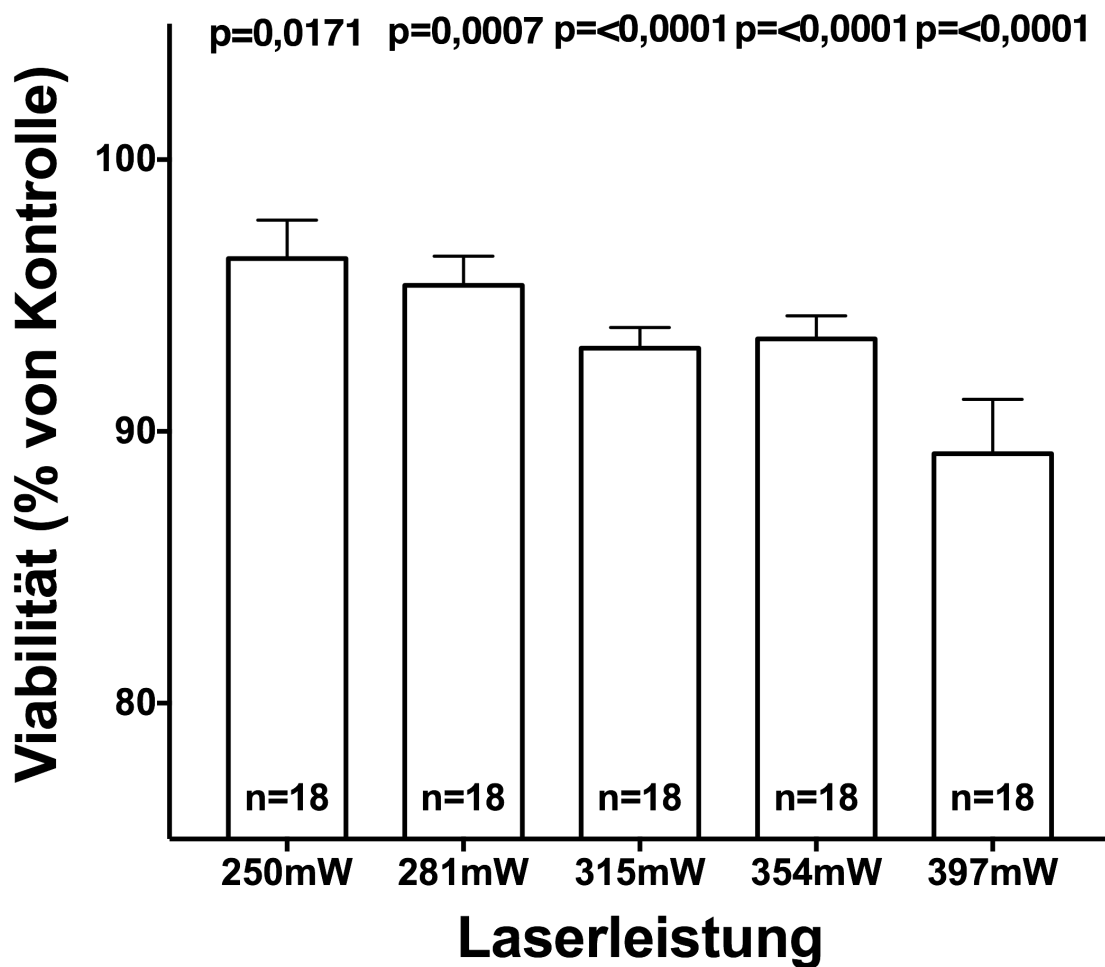


Abbildung 34: Untersuchung zur metabolischen Aktivität der Zelllinie HOB mittels WST-1-Test nach Bestrahlung. Je Laserleistung wurden 18 Replikate untersucht. Die Viabilität ist als Mittelwert mit Standardfehler in Form der Balkendiagramme nach Normalisierung auf die unbehandelte Kontrolle abgebildet. Es zeigte sich eine Abnahme der Viabilität mit steigender Laserleistung. Der statistische Vergleich unbehandelter und bestrahlter Gruppe nach Korrektur nach Bonferroni (korrigiertes Signifikanzniveau $\alpha^*=0,01$) zeigte ab 281 mW einen signifikanten Viabilitätsunterschied.

4.4 Genexpressionsanalysen

Die zellulären Antwortmechanismen auf Stress und toxische Reize sind vielfältig. Je nach Zelltyp und der Art des schädigenden Einflusses kann eine Vielzahl unterschiedlicher Genexpressionswege beschrieben werden, wobei diese oftmals eng miteinander verknüpft sind und kaskadenartig interferieren.

In toxikologischen *in vitro*-Studien bilden Arrays, die eine Auswahl an charakteristischen Genen aus unterschiedlichen Stress- und Toxizitätsreaktionen abbilden, ein wertvolles Instrument, um den Einfluss eines Reizes auf ein Modellsystem zu untersuchen. So können im Sinne eines Screenings Informationen zur Erstellung eines Profils der reizspezifischen Zellantwort gewonnen werden.

Der in dieser Arbeit verwendete Array im 96-Well-Format beinhaltete 84 Gene aus der Stressantwort auf oxidativen Stress, Hypoxie, osmotischen Stress, Zelltod, Entzündungsreaktionen, DNA-Schädigung und Zellzyklus-Arrest sowie Hitzeschock-Proteine bzw. ungefaltete Proteine und sollte somit einen Anhaltspunkt über die Mechanismen der in oben genannten Versuchen beobachteten Effekte liefern.

4.4.1 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse nach Bestrahlung der NHDF mit 500 mW

Da sich die zytotoxischen Effekte in ihrer maximalen Ausprägung bei einer Repetitionsrate von 50 kHz bei einer Leistung von 500 mW gezeigt hatten, wählten wir diese Leistung für die Genexpressionsanalysen. Die Zellen wurden im oben beschriebenen 96-Well-Mikrotiter-plattenmodell (wie in den vorangegangenen Versuchen) ausgesät, für 48 h inkubiert und über eine Dauer von zwei Minuten bestrahlt. Zu jeder bestrahlten Kultur wurde auch hierbei jeweils eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt.

Nach der Bestrahlung der NHDF mit 500 mW zeigten sich in allen auf der Array-Platte abgebildeten Stressantwortkategorien Foldchangewerte, die über dem zuvor festgelegten Grenzwert (für eine biologisch relevante Regulation im Sinne einer erhöhten Genexpression) von 1,5 bei p -Werten $< 0,05$ lagen. Die höchste Regulation zeigte *XPC* (Foldchange: 3,35; $p = 0,023336$), gefolgt von *GADD45A* (Foldchange: 2,34; $p = 0,017828$), *CDKN1A* (Foldchange: 2,26; $p = 0,023494$) und *NBN* (Foldchange: 2,06; $p = 0,047248$) aus der Kategorie „DNA-Schädigung und Zellzyklusarrest“. In dem Kollektiv der Stressantwort auf oxidativen Stress zeigten sich *SQSTM1* (Foldchange: 2,48; $p = 0,024013$), *SLC2A1* (Foldchange: 2,66;

$p = 0,003985$), *TXNRD1* (Foldchange: 2,48; $p = 0,040118$) und *FTH1* (Foldchange: 1,97; $p = 0,015086$) in der bestrahlten Kultur deutlich hochreguliert. Im Hinblick auf die Hitzeschockprotein- und ungefaltete Proteinantwort wurde in der bestrahlten Kultur eine erhöhte Expression von *ATF6B* (Foldchange: 2,21; $p = 0,038214$), *BBC3* (Foldchange: 2,15; $p = 0,046937$), *HSPA5* (Foldchange: 1,88, $p = 0,002986$) und *HSPA4* (Foldchange: 1,92; $p = 0,015796$) beobachtet. Außerdem zeigten nach der Bestrahlung *ULK1* (Foldchange: 2,58 ; $p = 0,012666$), *ATG7* (Foldchange: 2,48; $p = 0,036014$), *FAS* (Foldchange: 2,15; $p = 0,028760$), *ATG5* (Foldchange: 2,13; $p = 0,047450$), und *ATG12* (Foldchange: 1,89; $p = 0,039642$) als Bestandteile der Stressantwortmechanismen bei Zelltod (Autophagie, Nekrose und Apoptose) eine Hochregulation in Relation zur nicht-bestrahlten Kontrolle. Des Weiteren konnte in der Gruppe der bestrahlten NHDF hinsichtlich der Hypoxie-Stressantwort eine erhöhte Expression von *SERPINE1* (Foldchange: 2,26; $p = 0,021832$) und *EPO* (Foldchange: 1,69; $p = 0,035987$) festgestellt werden. Bestrahlte NHDF wiesen ebenfalls erhöhte Expressionswerte von *TXNRD1* (Foldchange: 2,48; $p = 0,040118$) und *HSPA4L* (Foldchange: 2,37; $p = 0,033034$), aus dem Bereich der Antwort auf osmotischen Stress, auf. Aus dem Bereich der Entzündungsreaktionsantwort zeigte sich lediglich *CD40LG* (Foldchange: 2,04; $p = 0,018099$) in der bestrahlten Gruppe im Vergleich zur Kontrolle hochreguliert.

26 der 84 in der Array-Platte enthaltenen Gene wiesen einen Foldchange-Wert $> 1,5$ auf, wobei die statistischen Tests einen p -Wert $> 0,05$ ergaben und somit nicht genügend Evidenz für ein Ablehnen der Nullhypothese vorlag. Hier zeigten nach Bestrahlung *NFAT 5* (Foldchange: 2,22; $p = 0,051889$), *AQP4* (Foldchange: 1,8; $p = 0,195517$) und *AKR1B1* (Foldchange: 1,65; $p = 0,086037$), als Vertreter der Antwort auf osmotischen Stress, eine vermehrte Expression. Aus der Gruppe der Entzündungsreaktion fielen *CCL2* (Foldchange: 2,2; $p = 0,052676$), *IL1B* (Foldchange: 2,0; $p = 0,153315$), *IFNG* (Foldchange: 1,82; $p = 0,199908$) und *IL6* (Foldchange: 1,57; $p = 0,231659$) mit einer Hochregulierung auf. Außerdem zeigten die Hypoxie-Antwort-Gene *SLC5A3* (Foldchange: 2,09; $p = 0,074892$), *VEGFA* (Foldchange: 2,08; $p = 0,140545$), *LDHA* (Foldchange: 1,81; $p = 0,147486$), *CA9* (Foldchange: 1,62; $p = 0,067536$) und *MMP9* (Foldchange: 1,57; $p = 0,214664$) einen Hinweis auf eine bestrahlungsassoziiert vermehrte Expression. *RAD9A* (Foldchange: 2,09; $p = 0,081417$), *MRE11A* (Foldchange: 1,97; $p = 0,077830$) und *GADD45G* (Foldchange: 1,51; $p = 0,239856$) wiesen eine erhöhte Expression als Vertreter des DNA-Schädigungs- und Zellzykluskontrolle-Signalwegs auf. *TXN* (Foldchange: 1,71; $p = 0,098082$) und *HMOX1* (Foldchange: 1,58; $p = 0,065343$), aus der Gruppe der Antwortmechanismen auf oxidativen Stress, zeigten

ebenfalls Foldchange-Werte über 1,5. Des Weiteren konnte eine erhöhte Expression von *HSP90B1* (Foldchange: 1,88; p = 0,076991), *CALR* (Foldchange: 1,58; p = 0,174811), *HSP90AA1* (Foldchange: 1,55; p = 0,157369) und *ATF6* (Foldchange: 1,52 ; p = 0,100673) aus dem Bereich „Hitzeschockproteine und ungefaltete Proteinantwort“ sowie von *CASP1* (Foldchange: 1,69; p = 0,069498), *RIPK1* (Foldchange: 1,64; p = 0,070228), *TNFRSF10A* (Foldchange: 1,56; p = 0,155643), *TXNL4B* (Foldchange: 1,55; p = 0,117766) und *MCL1* (Foldchange: 1,5; p = 0,109797) aus der Signalkaskade der Zelltodinduktion, festgestellt werden.

Foldchange-Werte < -1,5 im Sinne einer laserbedingten, biologisch relevanten Herrunterregulierung eines Gens der Array-Platte, konnten nicht beobachtet werden (Abbildung 35).

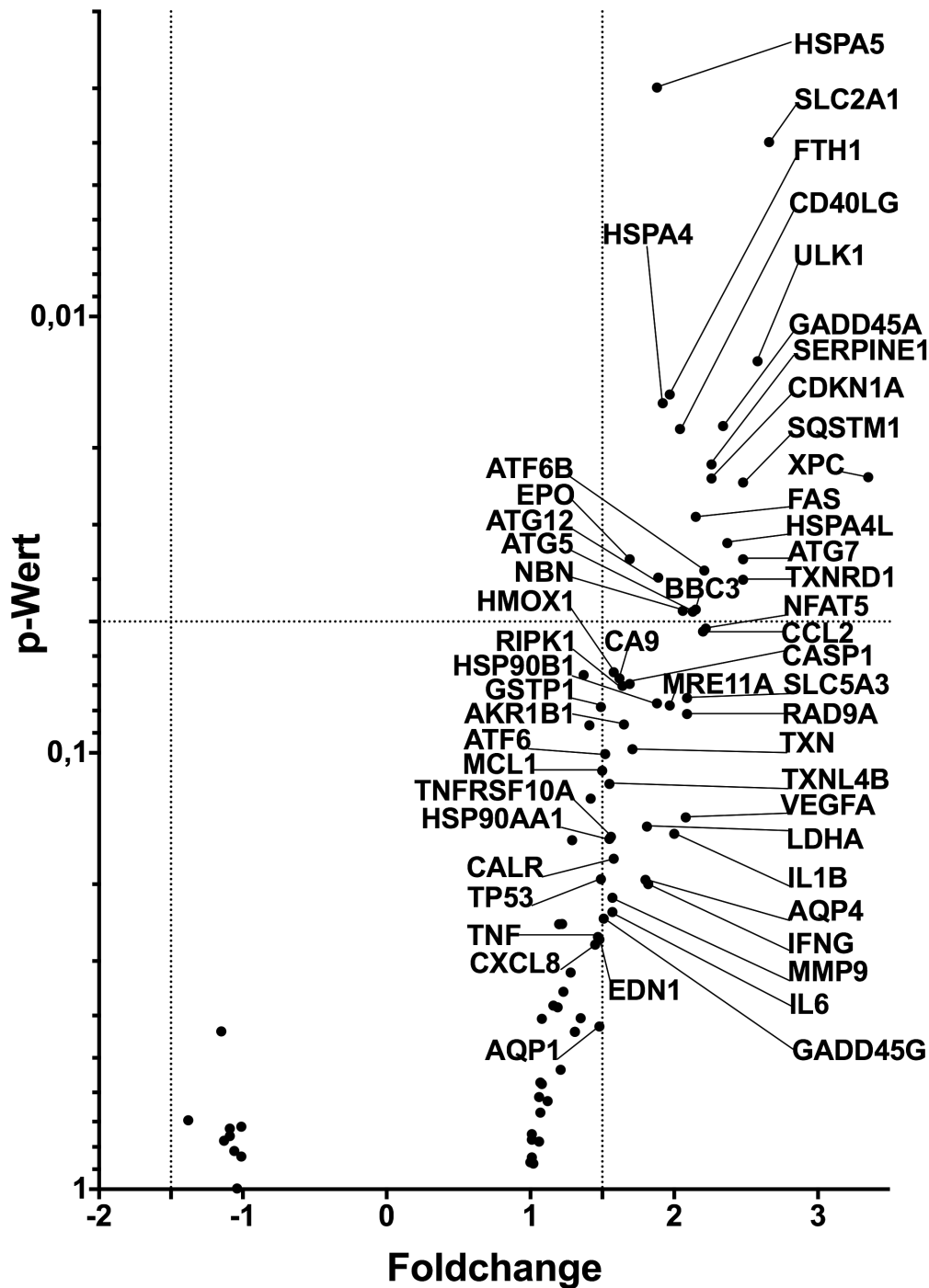


Abbildung 35: Darstellung der qPCR-Array-Daten in Form eines Volcano-Plots nach Bestrahlung der NHDF bei 500 mW. NHDF wurden nach oben genannten Vorversuchen bei einer Leistung von 500 mW bestrahlt. Nach erfolgter Bestrahlung wurden Expressionsanalysen im Hinblick auf 84 Schlüsselgene aus dem Bereich der zellulären Stress- und Zytotoxizitätsantwort durchgeführt. Zu jeder bestrahlten Gruppe wurde eine nicht-bestrahlte Kontrolle mitgeführt. Die Auswertung der Genexpressionsdaten erfolgte anhand der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Die Daten sind in dieser Abbildung als Vielfaches (Foldchange) im Vergleich zur Kontrolle abgebildet, wobei ein Foldchange von $\pm 1,5$ als Cut-Off-Wert für eine biologisch relevante Regulation gewählt wurde. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des t-Tests, wobei das Signifikanzniveau bei $\alpha = 0,05$ festgelegt wurde und ein p-Wert $< 0,05$ zur Ablehnung der Nullhypothese führte.

4.4.2 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse nach Bestrahlung der NHDF mit 199 mW

Zytotoxische Effekte waren, in oben genannten Versuchen, anhand der NHDF bei einer Repe-titionsrate von 50 kHz ab einer Leistung von 223 mW zu beobachten, während sich bei einer Bestrahlung mit 199 mW keine signifikanten Hinweise auf eine laserbedingte Schädigung in der bestrahlten Kultur zeigten. Diese Beobachtung legt nahe, dass eine Grenze, ab der die oben beschriebenen Effekte bei zweiminütiger Bestrahlungsdauer erstmals auftreten, in einem Leis-tungsbereich zwischen 200 mW und 223 mW lokalisiert ist.

Da wir auch den oberen subphototoxischen Grenzbereich auf Genexpressionsebene untersu-chen wollten, um potentielle Genregulationsmechanismen in einem Bereich, in dem die Vor-versuche keine Zellschädigung mehr gezeigt hatten, zu berücksichtigen, führten wir diese Un-tersuchungen ab einer Laserleistung von 199 mW durch.

Die mikroskopische Begutachtung unmittelbar nach der Bestrahlung mit 199 mW ergab, wie in allen Vorversuchen bereits beobachtet, morphologisch keinen Hinweis auf Laser-induzierte Veränderungen der bestrahlten Kultur im Vergleich zur Kontrolle. Dennoch zeigten, bei der Analyse der Expressionsdaten aus insgesamt 150 bestrahlten und 150 nichtbestrahlten Wells, 13 der 84 Gene einen Foldchange $> 1,5$ im Sinne einer erhöhten Expression.

GADD45G zeigte mit einem Foldchange von 1,9 bei einem p-Wert von 0,004 eine deutliche Regulation, sodass die Nullhypothese in diesem Fall verworfen und die Alternativhypothese angenommen wurde. Den größten Foldchange von 1,98 ($p = 0,191069$) wies *ULK1* auf, gefolgt von *BBC3* (Foldchange: 1,65; $p = 0,129064$), *SLC2A1* (Foldchange: 1,64; $p = 0,308837$), *TXNRD1* (Foldchange: 1,63; $p = 0,189084$), *SLC5A3* (Foldchange: 1,62; $p = 0,315331$), *DDIT3* (Foldchange: 1,62; $p = 0,15195$), *SQSTM1* (Foldchange: 1,53; $p = 0,274864$), *HSP90AA1* (Foldchange: 1,53; $p = 0,314053$), *FTH1* (Foldchange: 1,53; $p = 0,275197$), *XPC* (Foldchange: 1,51; $p = 0,377435$) und *GADD45A* (Foldchange: 1,5; $p = 0,317083$), wobei be-züglich dieser Gene bei p-Werten $> 0,05$ keine ausreichende Evidenz zur Ablehnung der Null-hypothese vorlag. Bei einem zuvor festgelegten Foldchange-Cut-Off-Wert von $\pm 1,5$ zeigte sich nach einer Bestrahlung mit 199 mW bei keinem der 84 Gene der Array-Platte eine signifi-kante Herunterregulation (Abbildung 36).

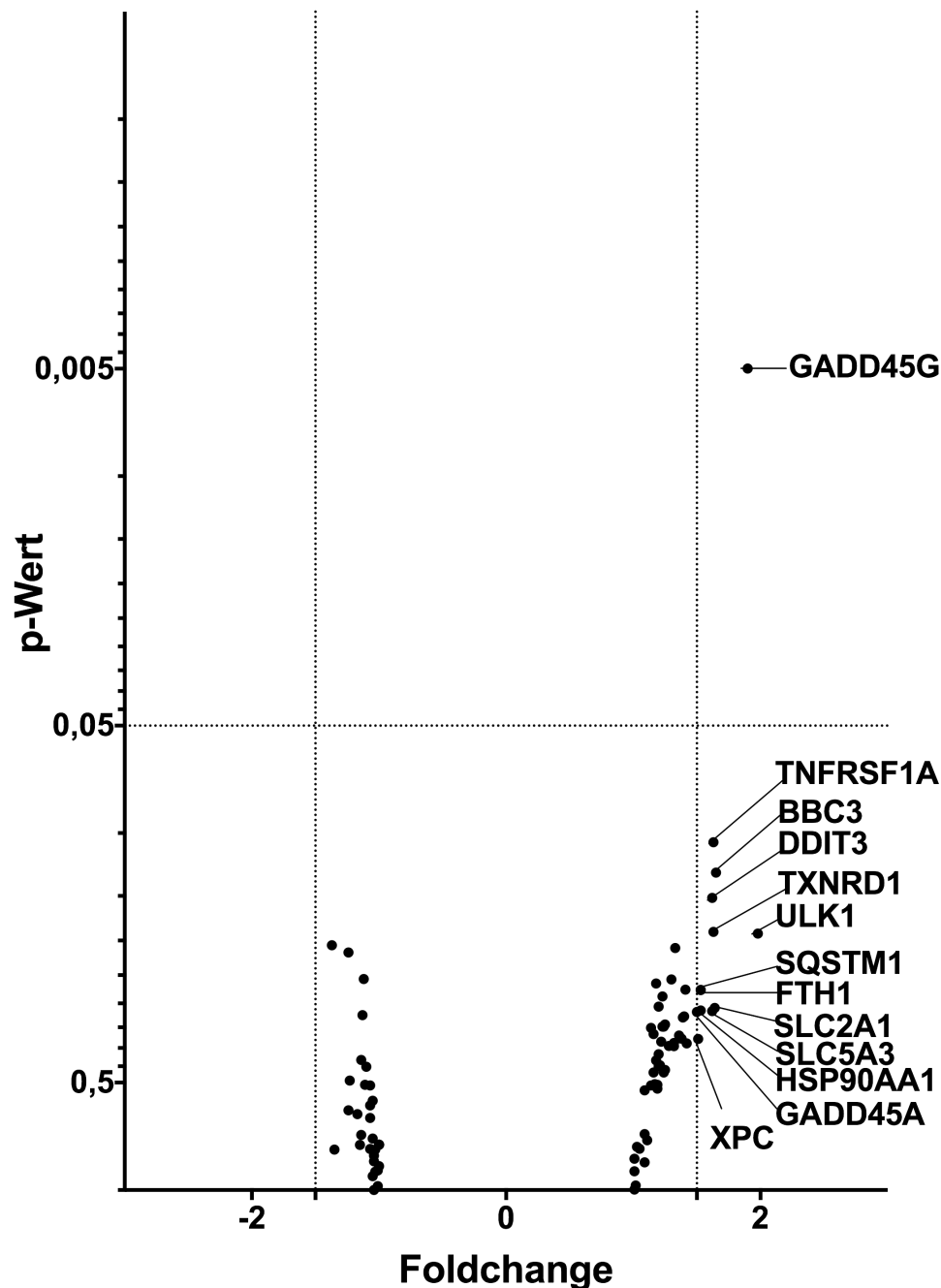


Abbildung 36: Darstellung der qPCR-Array-Daten in Form eines Volcano-Plots nach Bestrahlung der NHDF bei 199 mW. NHDF wurden nach oben genannten Vorversuchen bei einer Leistung von 199 mW bestrahlt. Bei dieser Laserleistung hatten sich in den Vorversuchen keine signifikanten Hinweise auf laserbedingte Zytotoxizität ergeben. Um die Zellen in diesem Leistungsbereich hinsichtlich potentieller Antwortmechanismen auf Genexpressionsebene zu untersuchen, wurde zwei Stunden nach erfolgter Bestrahlung eine Transkriptomanalyse im Hinblick auf 84 Schlüsselgene aus dem Bereich der zellulären Stress- und Zytotoxizitätsantwort durchgeführt. Zu jeder bestrahlten Gruppe wurde eine nicht-bestrahlte Kontrolle mitgeführt. Die Auswertung der Genexpressionsdaten erfolgte anhand der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Die Daten sind in dieser Abbildung als Vielfaches (Foldchange) im Vergleich zur Kontrolle abgebildet, wobei ein Foldchange von $\pm 1,5$ als Cut-Off-Wert für eine biologisch relevante Regulation gewählt wurde. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des t-Tests, wobei das Signifikanzniveau bei $\alpha = 0,05$ festgelegt wurde und ein p-Wert $< 0,05$ zur Ablehnung der Nullhypothese führte.

4.4.3. Ergebnisse der Genexpressionsanalyse nach Bestrahlung der HCH mit 500 mW

Nach der Bestrahlung der humanen Chondrozyten mit 500 mW zeigten sich im Bereich der festgelegten Grenzen für relevante Regulation mit einem Foldchange $> 1,5$ bei einem p-Wert $< 0,05$ drei Gene mit erhöhter Expression. Diese stammten mit *BBC3* (Foldchange: 2,06; $p = 0,004695$) und *VEGFA* (Foldchange: 1,78; $p = 0,025623$) aus den Bereichen Apoptoseregulation und Hypoxie-induzierte Stressantwort und mit *GADD45A* (Foldchange: 1,64; $p = 0,021528$) aus dem Bereich der Antwort auf DNA-Schädigung und Zellzykluskontrollmechanismen.

Aus dem Bereich der Zellantwort auf osmotischen Stress zeigte sich *NFAT5* nach der Bestrahlung mit einem p-Wert von 0,000827 unterhalb des Foldchange-Grenzwertes von 1,5 hochreguliert. Eine signifikante Herunterregulation weiterer Gene konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 37).

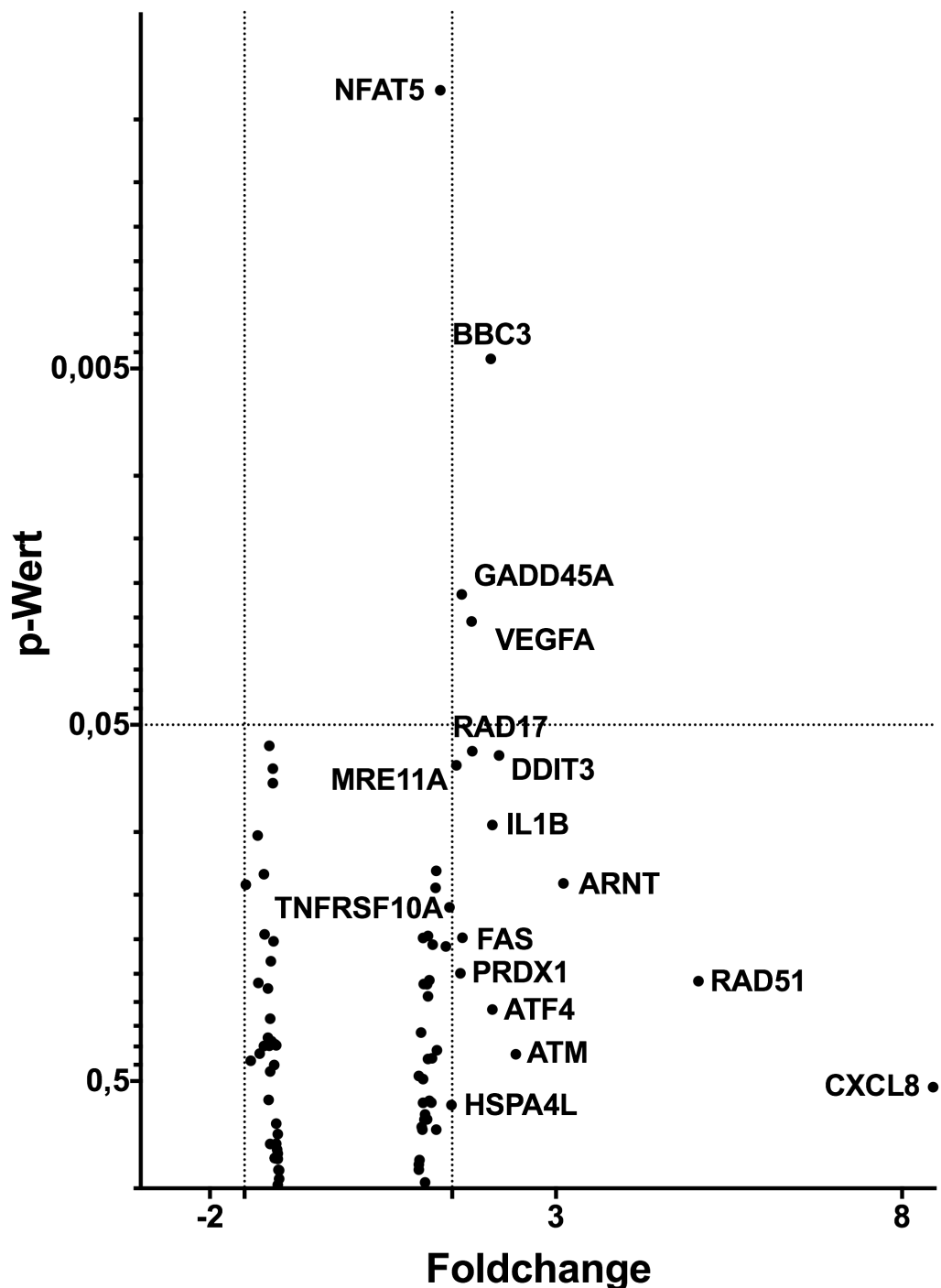


Abbildung 37: Darstellung der qPCR-Array-Daten in Form eines Volcano-Plots nach Bestrahlung der HCH bei 500 mW. HCH wurden nach oben genannten Vorversuchen bei einer Leistung von 500 mW bestrahlt. Nach erfolgter Bestrahlung wurden Expressionsanalysen im Hinblick auf 84 Schlüsselgene aus dem Bereich der zellulären Stress- und Zytotoxizitätsantwort durchgeführt. Zu jeder bestrahlten Gruppe wurde eine nichtbestrahlte Kontrolle mitgeführt. Die Auswertung der Genexpressionsdaten erfolgte anhand der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Die Daten sind in dieser Abbildung als Vielfaches (Foldchange) im Vergleich zur Kontrolle abgebildet, wobei ein Foldchange von $\pm 1,5$ als Cut-Off-Wert für eine biologisch relevante Regulation gewählt wurde. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des t-Tests, wobei das Signifikanzniveau bei $\alpha = 0,05$ festgelegt wurde und ein p-Wert $< 0,05$ zur Ablehnung der Nullhypothese führte.

4.4.4 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse nach Bestrahlung der HCH mit 199 mW

Nach der Bestrahlung mit 199 mW zeigten sich *BBC3* (Foldchange: 1,6) und *ARNT* (Foldchange: 1,74) aus dem Bereich „Hypoxie-assoziierte Stressantwort“ sowie *HSPA4L* (Foldchange: 2,54) aus dem Bereich „Hitzeschock-Protein-Antwort“ oberhalb des Cut-Off-Wertes von 1,5 hochreguliert, im statistischen Vergleich ergab sich jedoch jeweils ein p-Wert $> 0,05$, sodass die Nullhypothese beibehalten wurde. Jenseits des Cut-Off-Wertes $< -1,5$ zeigten sich *XPC* (Foldchange: -1,56) aus dem Bereich „DNA-Reparatur“, *MMP9* (Foldchange: -1,54) aus dem Bereich „Antwort auf oxidativen Stress“ und *CFTR* (Foldchange: -1,51) als Vertreter der „ER-Stressantwort“ im Sinne einer verringerten Expression. Auch hier führte der t-Test jedoch bei p-Werten $> 0,05$ zum Beibehalten der Nullhypothese (Abbildung 38).

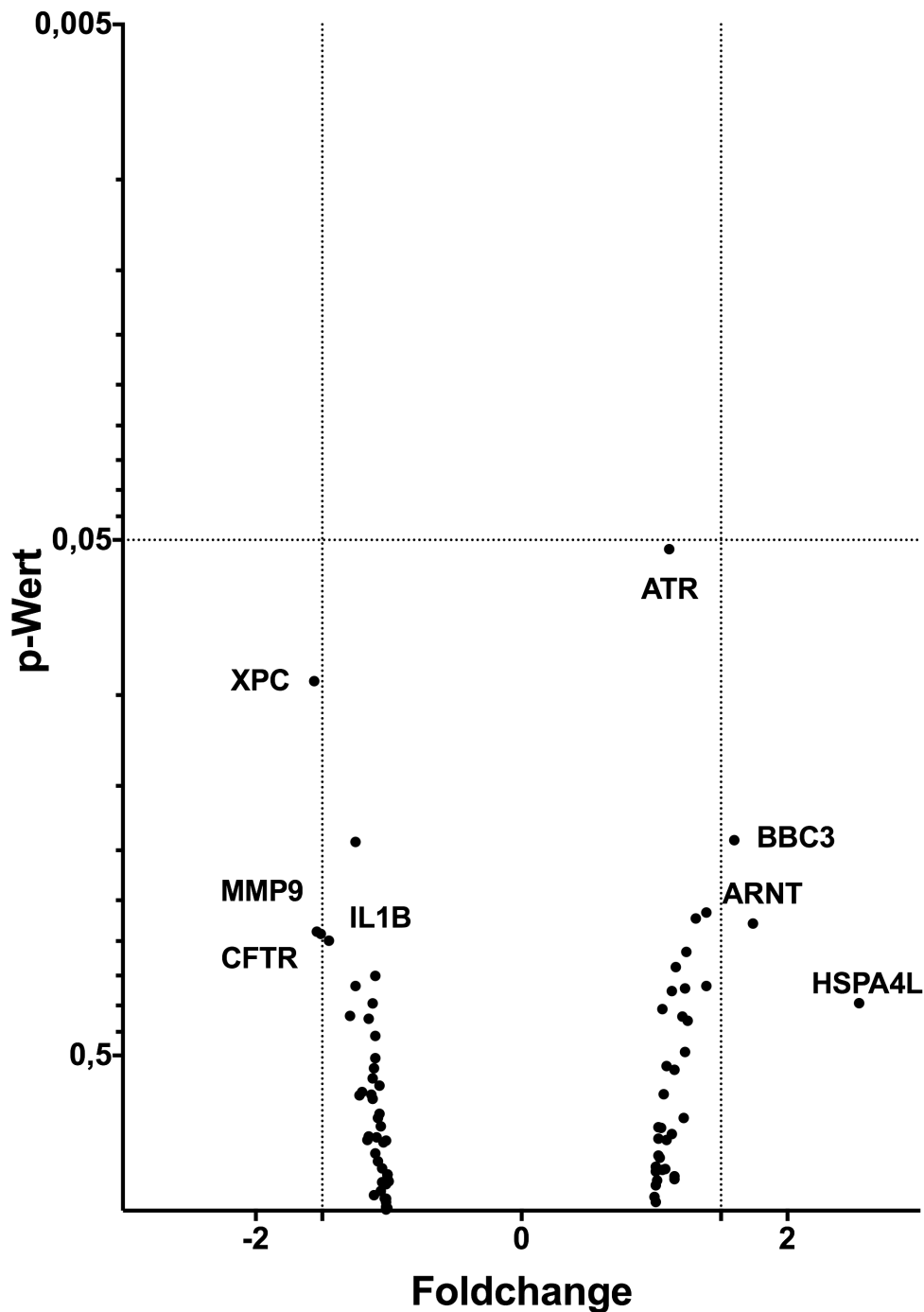


Abbildung 38: Darstellung der qPCR-Array-Daten in Form eines Volcano-Plots nach Bestrahlung der HCH mit einer Laserleistung von 199 mW. HCH wurden nach oben genannten Vorversuchen bei einer Leistung von 199 mW bestrahlt. Bei dieser Laserleistung hatten sich in den Vorversuchen keine signifikanten Hinweise auf laserbedingte Zytotoxizität ergeben. Zwei Stunden nach der Bestrahlung folgten die Expressionsanalysen im Hinblick auf 84 Schlüsselgene aus dem Bereich der zellulären Stress- und Zytotoxizitätsantwort. Zu jeder bestrahlten Gruppe wurde eine nicht-bestrahlte Kontrolle mitgeführt. Die Auswertung der Genexpressionsdaten erfolgte anhand der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Die Daten sind in dieser Abbildung als Vielfaches (Foldchange) im Vergleich zur Kontrolle abgebildet, wobei ein Foldchange von $\pm 1,5$ als Cut-Off-Wert für eine biologisch relevante Regulation gewählt wurde. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des t-Tests, wobei das Signifikanzniveau bei $\alpha = 0,05$ festgelegt wurde und ein p-Wert $< 0,05$ zur Ablehnung der Nullhypothese führte.

4.4.5 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse nach Bestrahlung der HOB mit 500 mW

Die Bestrahlung der humanen Osteoblasten mit einer Leistung von 500 mW führte zu einer erhöhten Expression von Genen aus den Bereichen „Antwort auf osmotischen Stress“ (*AQP1*), „Hitzeschock-/ungefaltete Protein-Anwort“ (*HSPA4*), „Autophagie“ (*ATG5*), „Zellzyklusarrest and DNA-Reparatur Signalwege“ (*CHEK2*).

Lediglich *AQP1* zeigte hierbei einen Foldchange von 1,78, während *HSPA4*, *ATG5* und *CHEK2* Foldchange-Werte $< 1,5$ lieferten. Eine signifikante Herrunterregulation wurde nicht beobachtet (Abbildung 39).

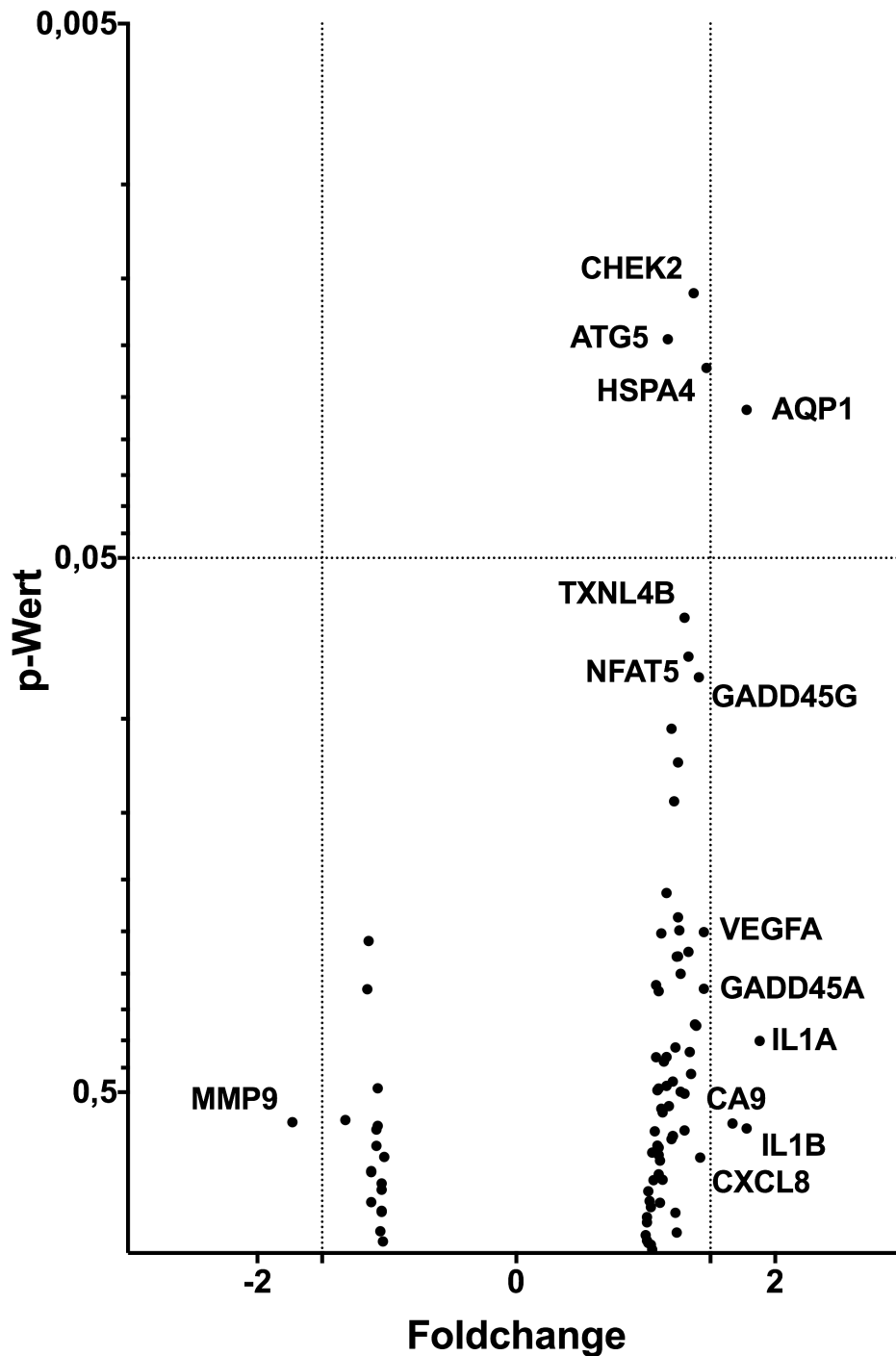


Abbildung 39: Darstellung der qPCR-Array-Daten in Form eines Volcano-Plots nach Bestrahlung der HOB mit einer Laserleistung von 500 mW. HOB wurden nach oben genannten Vorversuchen bei einer Leistung von 500 mW bestrahlt. Nach erfolgter Bestrahlung wurden Expressionsanalysen im Hinblick auf 84 Schlüsselgene aus dem Bereich der zellulären Stress- und Zytotoxizitätsantwort durchgeführt. Zu jeder bestrahlten Gruppe wurde eine nicht-bestrahlte Kontrolle mitgeführt. Die Auswertung der Genexpressionsdaten erfolgte anhand der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Die Daten sind in dieser Abbildung als Vielfaches (Foldchange) im Vergleich zur Kontrolle abgebildet, wobei ein Foldchange von $\pm 1,5$ als Cut-Off-Wert für eine biologisch relevante Regulation gewählt wurde. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des t-Tests, wobei das Signifikanzniveau bei $\alpha = 0,05$ festgelegt wurde und ein p-Wert $< 0,05$ zur Ablehnung der Nullhypothese führte.

4.4.6 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse nach Bestrahlung der HOB mit 199 mW

Im Anschluss an die Bestrahlung der HOB mit einer Laserleistung von 199 mW konnten wir eine verstärkte Expression von *TLR4* mit einem Foldchange von 1,38 sowie eine verminderte Expression von *IFNG* mit einem Foldchange von -1,44 feststellen. Beide Gene spielen eine Rolle im Zusammenhang mit der zellulären Antwort auf Inflammationsprozesse. Eine signifikante Regulation mit einem $p < 0,05$ nach statistischer Auswertung fanden wir jedoch nicht (Abbildung 40).

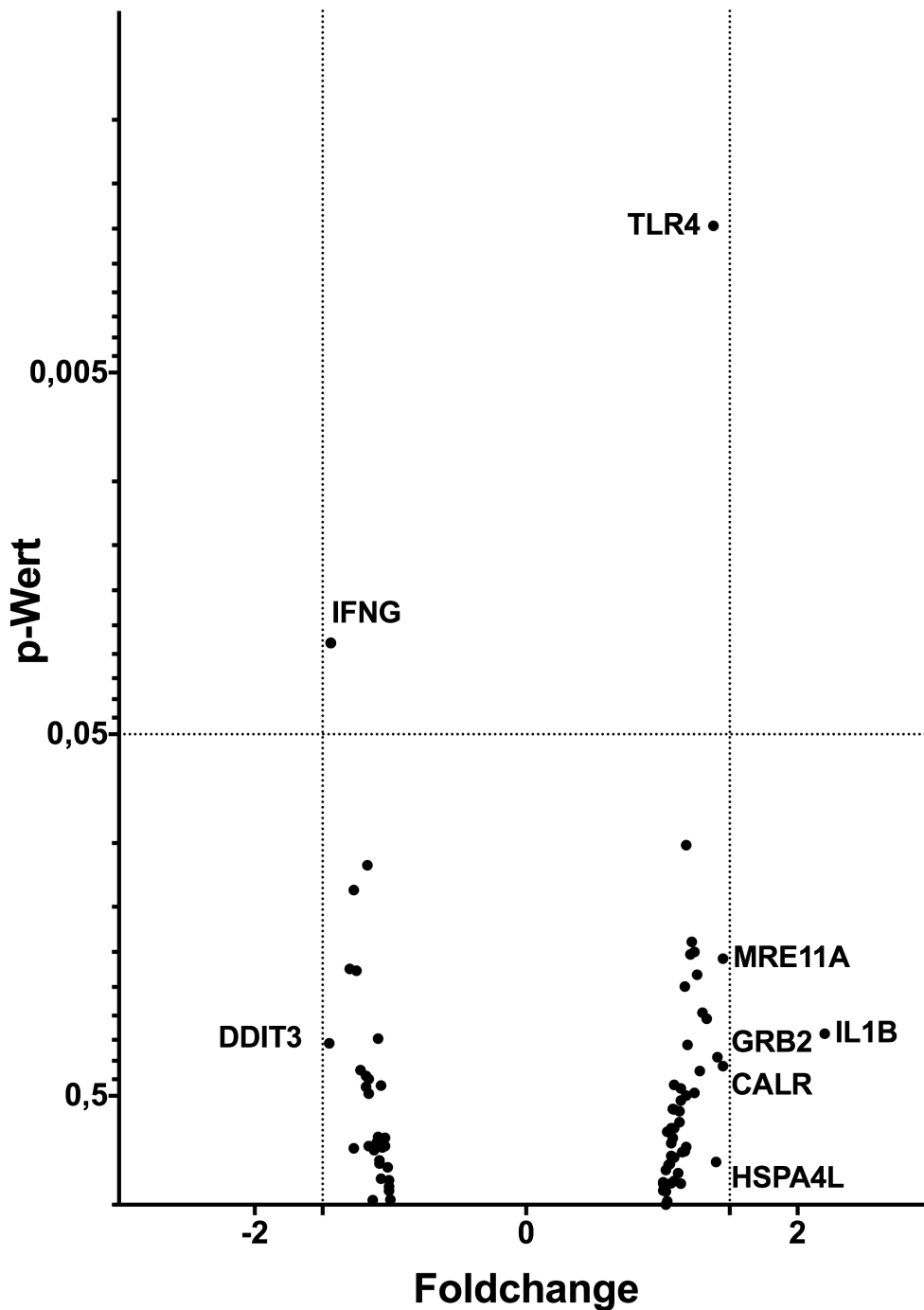


Abbildung 40: Darstellung der qPCR-Array-Daten in Form eines Volcano-Plots nach Bestrahlung der HOB mit einer Laserleistung von 199 mW. HOB wurden nach oben genannten Vorversuchen bei einer Leistung von 199 mW bestrahlt. Bei dieser Laserleistung hatten sich in den Vorversuchen keine signifikanten Hinweise auf laserbedingte Zytotoxizität ergeben. Nach erfolgter Bestrahlung wurden Expressionsanalysen im Hinblick auf 84 Schlüsselgene aus dem Bereich der zellulären Stress- und Zytotoxizitätsantwort durchgeführt. Zu jeder bestrahlten Gruppe wurde eine nicht-bestrahlte Kontrolle mitgeführt. Die Auswertung der Genexpressionsdaten erfolgte anhand der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Die Daten sind in dieser Abbildung als Vielfaches (Foldchange) im Vergleich zur Kontrolle abgebildet, wobei ein Foldchange von $\pm 1,5$ als Cut-Off-Wert für eine biologisch relevante Regulation gewählt wurde. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des t-Tests, wobei das Signifikanzniveau bei $\alpha = 0,05$ festgelegt wurde und ein p-Wert $< 0,05$ zur Ablehnung der Nullhypothese führte.

5 Diskussion

Die Aktivierung des Hörorgans unter Ausnutzung des optoakustischen Effekts bietet eine vielversprechende Grundlage für die Entwicklung einer neuen Hörerätegeneration. Um einen sicheren Einsatz dieser Technologie zu ermöglichen, sind Untersuchungen im Hinblick auf die Biokompatibilität eines solchen Lasersystems essentiell. Die biologische Verträglichkeit bei der Anwendung im Bereich des Trommelfells, in Nachbarschaft zu äußerem Gehörgang und Mittelohr, sollte in dieser Arbeit exemplarisch anhand dreier repräsentativer, im Bestrahlungsgebiet vorkommender Zelltypen überprüft werden: Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoblasten.

5.1 Kritische Bewertung der Arbeit

5.1.1 Nutzen der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen von Laserschutz- und Lasersicherheitsnormen, wie der „American National Standard for Safe Use of Lasers“ (ANSI Z136.1:2014) - bzw. der DIN EN 60825-1 VDE 0837-Norm, werden wellenlängenspezifische Grenzwerte für Haut und Auge definiert (American National Standards Institute 2014); (Deutsches Institut für Normierung 2019). Diese von Fachgesellschaften festgelegten Schwellenwerte werden als maximal zulässige Bestrahlung bezeichnet (MZB). In die Erstellung dieser MZB-Werte finden neben tierexperimentell ermittelten Schwellenwerten außerdem Erkenntnisse von Laser-Gewebe-Wechselwirkungen aus *in vitro*-Versuchen, insbesondere aus dem Bereich der experimentellen Ophthalmologie und der Untersuchungen zu Retinaschäden durch Laserstrahlung, Eingang. In Anlehnung an toxikologische Dosis-Wirkungsbeziehungen ist im Rahmen von *in vitro*-Modellen zur Festlegung von laseranwendungsassoziierten Schädigungsschwellen anhand retinalen Pigmentepithels in einigen Studien die Festlegung von Effektivdosis (ED)-Werten, insbesondere des ED-50-Wertes, gebräuchlich. Dieser ED-50-Wert entspricht der Expositionsdosis mit einer Schädigungswahrscheinlichkeit von 50% und wird häufig als Schwellenwert angegeben, obwohl einige schädigende Effekte bereits unterhalb dieses Grenzwertes beobachtet werden können. Bei der Übertragung solcher ED-50-Werte auf oben genannte maximal zulässige Bestrahlungswerte wird außerdem ein „Sicherheitsfaktor“ ermittelt. Dieser wiederum wird von der zuständigen

Fachgesellschaft zur Festlegung oben genannter Lasersicherheitsnormen festgelegt. Die individuell experimentell ermittelte Dosis-Wirkungsbeziehung ist jedoch nicht nur abhängig vom zugrundeliegenden Schädigungsmechanismus, sondern auch von der Konsistenz und Qualität der zugrundeliegenden Daten. Experimentelle Unsicherheiten führten so häufig zu einer Festlegung eines zu hohen Sicherheitsfaktors und eines somit ebenfalls erhöhten maximal zulässigen Bestrahlungswertes (Sloney *et al.* 2001). Eine Schwierigkeit bei der Festlegung eines solchen Schwellenwertes liegt unter anderem in der biologischen Varianz des zu untersuchenden Gewebes und der Variabilität seiner optischen Eigenschaften mit Unterschieden in der Absorberdichte. Trommelfell und Mittelohr weisen, wie bereits in Kapitel 2.3 beschrieben, aufgrund ihrer komplexen Architektur spezifische Absorptionseigenschaften auf. So erscheint eine reine Übertragung der durch ANSI- und DIN EN 60825-1 VDE 0837-Norm für Haut und Auge festgelegten maximal zulässigen Bestrahlungswerte auf einen Lasereinsatz am Trommelfell sowie an Mittelohrstrukturen nicht ausreichend. Die Untersuchung von Effekten durch Bestrahlung biologischer Gewebe mithilfe von Laserlicht erfordert Modelle, welche die Diversität der Zusammensetzung biologischer Gewebe und die Modalitäten der Laseranwendung stärker berücksichtigen. Ein standardisiertes Verfahren zur Prüfung der Biokompatibilität von Laser-basierten Medizinprodukten anhand von *in vitro*-Zellkultursystemen für Trommelfell- und Mittelohrapplikationen existiert bislang nicht.

Um eine Schwellenleistung für eine sichere Laserapplikation festzulegen, müssen die Methoden zur Untersuchung zytotoxischer Effekte eine hohe Sensitivität aufweisen und das Modell eine möglichst genaue Repräsentation der geplanten Anwendungssituation ermöglichen. Mit dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierten Bestrahlungsmodell und den gewählten Analysemethoden wurde bewusst ein multimodaler, holistischer Ansatz verfolgt.

Mithilfe dieses *in vitro*-Modells konnte die oben beschriebene Laseramplitudenmodulationsstrategie anhand des jeweiligen Zelltyps untersucht und somit individuelle Unterschiede im Absorptionsverhalten berücksichtigt werden. Durch die Kombination aus Fluoreszenzmikroskopie und den sequentiellen funktionellen Untersuchungen, war nicht nur die Festlegung eines zelltypspezifischen Grenzbereichs für das Auftreten zytotoxischer Effekte, sondern auch eine Differenzierung zwischen Zelluntergang und Einschränkungen im Hinblick auf die metabolische Aktivität möglich. Während die fluoreszenzmikroskopische Begutachtung im Anschluss an die Laserbehandlung die sensitive Erkennung einer ersten Schädigungsgrenze erlaubte, stellen die funktionellen Untersuchungen nicht nur Bestätigungstests dar, sondern liefern erste wertvolle Informationen im Hinblick auf Langzeiteffekte durch die Laserbehandlung. LDH-

und WST-1-Test bilden bereits einen wichtigen Bestandteil zahlreicher etablierter Zytotoxizitäts- und Biokompatibilitätstests. Die ISO 10993-Norm zur Beurteilung der Biokompatibilität von Medizinprodukten beinhaltet in Teil 5 (Tests zur *in vitro*-Zytotoxizitätsprüfung) die Bestimmung der Zytotoxizität eines Stoffes durch Messung der Lyserate, des Proliferationsverhaltens oder der Stoffwechselaktivität.

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte *in vitro*-Modell berücksichtigt jedoch nicht nur gängige Kriterien zur Zytotoxizitätsprüfung. Die qPCR-Analysen im zytotoxischen sowie im zuvor festgestellten sublethalen Grenzbereich erlauben zusätzlich einen Erkenntnisgewinn über die Mechanismen der zugrundeliegenden Schädigungsmechanismen und einen tieferen Einblick in zelltypspezifische laserbestrahlungsassoziierte Signalwegaktivierung.

Dieses Modell, welches im Rahmen dieser Dissertation entwickelte wurde, bildet somit die Grundlage für eine sensitive, gewebespezifische Überprüfung zytotoxischer Effekte durch Laseranwendung und kann als Blaupause für weiterführende Experimente dienen.

5.1.2 Kritische Bewertung und Interpretation der Fluoreszenzfärbung

Erste Anhaltspunkte über Adhäsion- und Nekroseinduktion nach Bestrahlung mit oben genannten Parametern lieferte, wie geplant, die Fluoreszenzfärbung. Hierbei zeigten sich für alle drei Zelltypen jeweils unterschiedliche Grenzwerte. Diese lagen bei den humanen Fibroblasten bei einer Laserpulsrate von 50 kHz zwischen 199 mW und 223 mW, bei den humanen Chondrozyten zwischen 223 mW und 250 mW und bei den humanen Osteoblasten zwischen 250 mW und 281 mW, sodass eine unterschiedliche Vulnerabilität gegenüber der Laserbestrahlung angenommen werden kann. Als mögliche Ursache ist eine unterschiedliche Absorption der verschiedenen Zelltypen zu diskutieren, aber auch Unterschiede in der Resistenz gegenüber thermischen Einflüssen. Betrachtet man die in jedem Zelltyp beobachtete, mit steigender Laserleistung zunehmende Nekrosefläche, so fällt auf, dass insbesondere in Leistungsbereichen oberhalb der gefundenen Schädigungsschwelle die reine Bestrahlungsfläche deutlich überschritten wurde. Dies kann ebenfalls als Indiz für eine zentrifugale Schädigungskomponente interpretiert werden.

Die Fluoreszenzfärbung diente somit als erste sensitive Methode, um morphologische Veränderungen nach der Bestrahlung sichtbar zu machen und zugleich zur Hypothesenbildung bezüglich möglicher zugrundeliegender Schädigungsmechanismen.

Diese beobachteten Effekte wurden in ihrer Kinetik in weiteren Versuchen und in Anlehnung an klassische *in vitro*-Zytotoxizitätsprüfungen enzymatisch mit Hilfe zellbasierter Tests untersucht.

5.1.3 Kritische Bewertung der Ergebnisse und Interpretation von WST-1- und LDH-Test

Unterhalb der oben genannten, durch die Fluoreszenzfärbung eruierten Grenzen konnte keine Schädigung der untersuchten Zellpopulationen festgestellt werden. Ab einer Leistung oberhalb dieser Grenze konnte ein mit steigender Laserleistung zunehmendes Schädigungsausmaß beobachtet werden, sodass von einem dosisabhängigen Effekt auszugehen ist. Um diese Beobachtungen auch enzymatisch aus einer weiteren Perspektive zu betrachten und zugleich Informationen über die Kinetik der Effekte zu erhalten, wurden zusätzlich LDH- und WST-1-Tests durchgeführt. Im WST-1-Test zeigten die Fibroblasten bis zu einer Leistung von 199 mW, die Osteoblasten bis 250 mW und die Chondrozyten bis 281 mW keine signifikante Viabilitätseinschränkung. Im LDH-Test zeigten die Fibroblasten beim Vergleich zwischen bestrahlter Kultur und unbehandelter Kontrolle bis zu einer Laserleistung von bis zu 223 mW, die Chondrozyten bis 250 mW und die Osteoblasten bis 281 mW keine signifikanten Unterschiede bezüglich der LDH-Freisetzung. Grundsätzlich konnte auch in den funktionellen Tests der bereits im Rahmen der Fluoreszenzfärbung beobachtete Trend einer mit steigender Laserleistung zunehmende Viabilitätseinschränkung bzw. LDH-Freisetzung festgestellt werden. Im Vergleich der oben beschriebenen Ergebnisse stellte die Fluoreszenzfärbung die sensitivste Methode dar, um eine erste Laserleistungsgrenze festzulegen. Ein Vorteil des LDH-Tests gegenüber der mikroskopischen Bestimmung der Nekroseareale mittels Fluoreszenzfärbung liegt in der Möglichkeit, Rückschlüsse über die Nekroserate adhärenter sowie nicht-adhärenter Zellen in der gesamten Vertiefung der Mikrotiterplatte zu ziehen. Da im Rahmen der Waschschritte der Färbung evtl. nicht-adhärente Zellen verloren gehen, liefert der LDH-Test somit eine Aussage über das Lyseverhalten der gesamten Zellpopulation in einer Vertiefung der Platte. Dasselbe gilt für den WST-1-Test, da auch hier nach der Bestrahlung keine weitere Manipulation notwendig war und Störeinflüsse sowie der Verlust nicht-adhärenter Zellen somit minimiert werden konnten.

Eine Interpretation der Ergebnisse hinsichtlich Zellmorphologie und in Bezug auf die bestrahlte Fläche ist in Anlehnung an oben genannte ISO-Norm 10993-5 aufgrund des Versuchsaufbaus nur bedingt möglich. Bei Bestrahlung der Fibroblasten zeigten sich erste morphologische Hinweise auf Laserbestrahlungs-bedingte Zytotoxizität ab einer Leistung von 223 mW bei einer Laserpulsrate von 50 kHz. Der LDH-Test ergab eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte LDH-

Freisetzung von 0,45%. Dies entspricht einem Anteil von ca. 15% der bestrahlten Fläche, sodass nach ISO 10993-5 das Kriterium für Zytotoxizität noch nicht erfüllt wäre. Vor diesem Hintergrund könnte der jeweilige Bezug der Test-Daten auf die bestrahlte Fläche jedoch ein wichtiges Kriterium zur quantitativen Beurteilung Laser-assoziiertes Zytotoxizität bieten. Auch im Hinblick auf die Kinetik der beobachteten Effekte können somit Rückschlüsse gezogen werden. Ein Vergleich mit den laut ANSI-Norm geltenden Grenzwerten für Haut von 2000 W/m^2 bzw. 200 mW/cm^2 erscheint jedoch schwierig. Der im Rahmen der Versuche beobachtete sublethale Leistungsbereich von 199 mW bzw. $24,9 \text{ W/cm}^2$ (24900 mW/cm^2) liegt um mehr als den Faktor $1,2 \times 10^2$ über dem maximal zulässigen Bestrahlungswert für Haut in diesem Frequenzbereich nach ANSI-Norm.

Beim Vergleich von WST-1- und LDH-Test fällt in den meisten Versuchen eine über die in Zytotoxizitätstest und fluoreszenzmikroskopischer Messung ermittelte Schädigungsrate hinaus auf. Diese Beobachtung stützt die Annahme, dass die Bestrahlung einen Einfluss auf die Stoffwechselaktivität der bestrahlten Zellen hat. Dieser Effekt war zwei Stunden nach der Bestrahlung jedoch größer als die durch die Bestrahlung bedingte Nekroserate 24 Stunden nach der Behandlung. WST-1-Auswertungen 24 Stunden nach der Bestrahlung zeigten in Vorversuchen eine deutlich geringere Beeinträchtigung der Stoffwechselaktivität, sodass eine akute, vorübergehend stärkere Einschränkung der metabolischen Aktivität bzw. des Proliferationsverhaltens zwei Stunden nach Bestrahlung naheliegt. Hierbei könnte beispielsweise ein vorübergehender Zellzyklusarrest insbesondere in der unmittelbaren Peripherie der Nekrosezonen in toxischen Leistungsbereichen und auch im direkten Bestrahlungsfeld bei sublethalen Laserleistungen diskutiert werden.

Da der WST-1-Test auch indirekt Auskunft über die mitochondriale Stoffwechselaktivität zu geben vermag, könnte hier ein Einfluss der Bestrahlung auf dieses Zellkompartiment vermutet werden.

5.2 Interpretation der qPCR-Ergebnisse

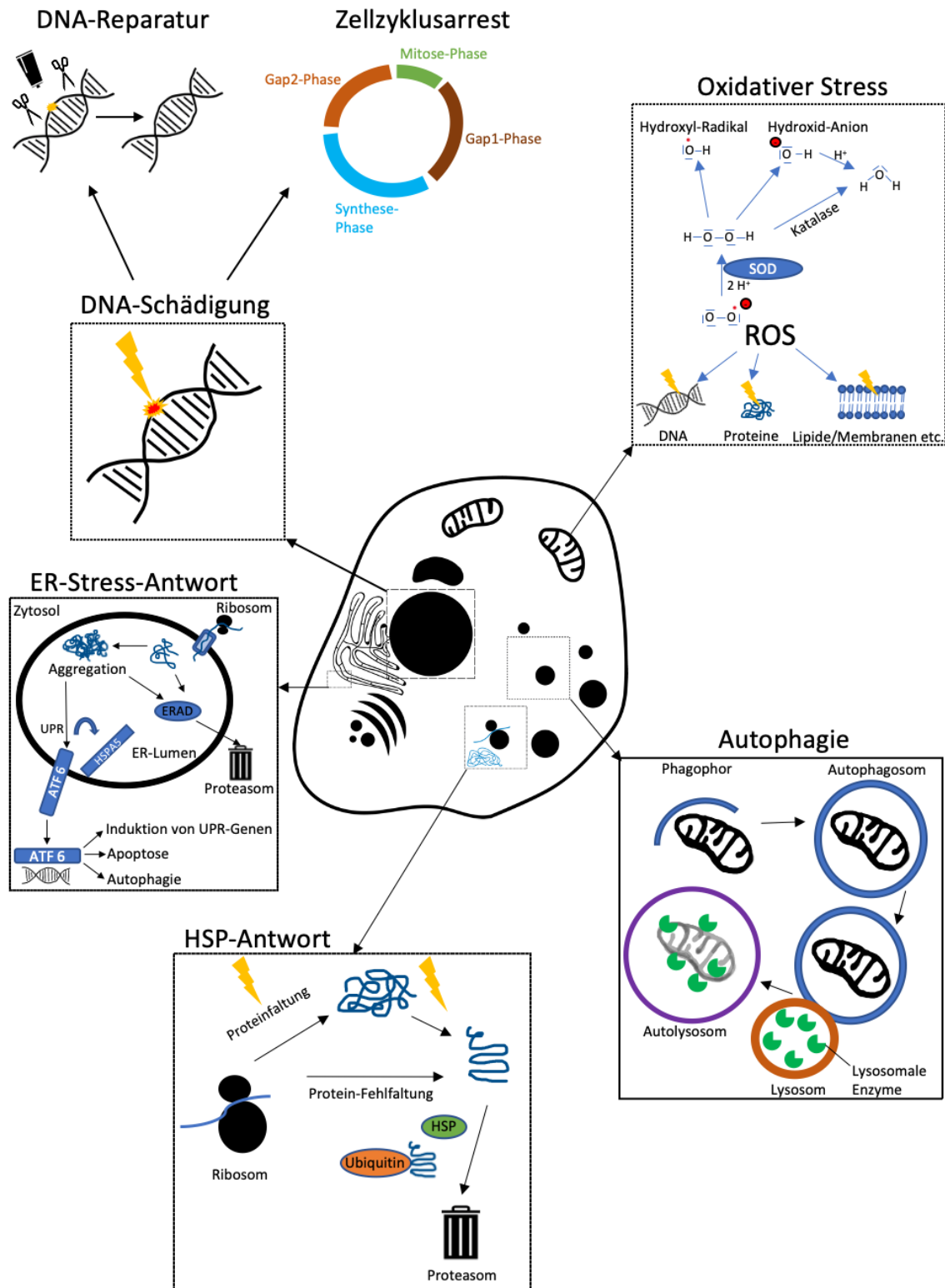


Abbildung 41: Schematische Darstellung der Signalwege, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit relevante Regulationen in den qPCR-Analysen zeigten.

5.2.1 Gesteigerte Genexpression aus dem Bereich DNA-Reparatur und Zellzykluskontrolle

Bei einer Laserleistung von 500 mW und einer Repetitionsrate von 50 kHz zeigte sich in der Genexpressionsanalyse in den bestrahlten NHDF eine im Vergleich zur nichtbestrahlten Kontrolle eine deutlich erhöhte Expression der Gene **XPC** (Foldchange: 3,35; p = 0,023336), **GADD45A** (Foldchange: 2,34; p = 0,017828), **CDKN1A** (Foldchange: 2,26; p = 0,023494) und **NBN** (Foldchange: 2,06; p = 0,047248) aus dem Bereich der DNA-Reparatur und Zellzykluskontrolle. Auch nach Bestrahlung der HOB mit einer Laserleistung von 500 mW war mit einer erhöhten Expression von **CHEK2** (Foldchange: 1,37; p = 0,015969) ein Gen dieses Stressantwortmechanismus vertreten.

Auch nach Bestrahlung der HCH mit einer Laserleistung von 500 mW zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von **GADD45A** (Foldchange: 1,64; p = 0,021528), während wir nach Bestrahlung mit 199 mW eine Herunterregulation von **XPC** (Foldchange: -1,56; p = 0,093882) beobachteten.

XPC (Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group C) spielt im Rahmen der Nukleotidexzisionsreparatur eine wichtige Rolle. Das Gen kodiert für das gleichnamige Protein, welches als Schädigungs- und DNA-bindender Faktor des **XPC**-Komplexes aktiv ist (Hoogstraten *et al.* 2008). **XPC** prüft genomische DNA auf thermodynamisch ungünstige Konfigurationen (Dip *et al.* 2004) und weist dabei die Fähigkeit auf, Einzelstrangkonfigurationen zu detektieren, während die intrinsische Einzelstrangbindungsaktivität zu einer Bindung an den jeweils intakten Strang führt (Buterin *et al.* 2005). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass **XPC**-Defizienz nicht nur zu einer verminderten Reparatur oxidativer DNA-Schäden, sondern auch zu einer gestörten Redoxhomöostase führt (Melis *et al.* 2013).

GADD45A und **GADD45G** gehören zur **GADD45** (Growth Arrest And DNA Damage Inducible Protein)-Familie und spielen eine Rolle in DNA-Reparaturmechanismen und im Zellstress-induzierten Wachstums-/Zellzyklusarrest, insbesondere unter genotoxischen Bedingungen (Tamura *et al.* 2012). **GADD45G** und **GADD45B** agieren hierbei als Cyclin-abhängige Kinase 2/Cyclin B1-Kinase-Inhibitoren (cdc2/CyclinB1-Kinase-Inhibitoren) an Synthesephase (S-Phase)- und Gap 2-Phase (G2/Mitose-Phase (M-Phase) -Kontrollpunkten und werden durch genotoxischen Stress vermehrt exprimiert (Vairapandi *et al.* 2002).

Das Gen **CDKN1A** (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A) codiert für einen gleichnamigen Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen, auch als p21 bezeichnet. Die vermehrte Transkription

wird maßgeblich durch p53-Expression im Rahmen der DNA-Schädigung induziert. Das Protein p21 inhibiert Cyclin-Cyclin-abhängige Kinase 2-Komplexe und agiert somit als Zellzyklusregulator an G₁/S- und G₂/M-Kontrollpunkten.

Gleichzeitig konnte beobachtet werden, dass p21 auch als negativer Regulator die p53-Induktion beeinflusst (Broude *et al.* 2014).

NBN (Nibrin, NBS(1)) ist Bestandteil des MRE11/RAD50-Reparaturkomplexes und spielt somit eine wichtige Rolle in der Doppelstrangreparatur nach DNA-Schädigung.

Auch die humanen Osteoblasten zeigten nach Bestrahlung mit 500 mW, mit einer erhöhten Expression von **CHEK2**, den Hinweis auf einen Zusammenhang mit Mechanismen aus den Bereichen Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur. Aufgrund der erhöhten Expression dieser Gene in der bestrahlten Kultur, stellt sich die Frage, ob diese Beobachtungen einen Hinweis auf Laser-induzierte DNA-Schädigung darstellen.

Hinweise auf eine Induktion von DNA-Schäden durch 532 nm Laserpulse zeigte die Arbeit von Obringer *et al.* (Obringer *et al.* 1999). Diese Arbeitsgruppe untersuchte mit Hilfe eines Genprofil-Tests anhand der humanen Leberzelllinie HepG2 die Effekte der Laserbestrahlung mittels 532 nm-Pikosekundenlaserpulse. Als Bestrahlungsparameter wurde eine Laserpulsrate von 10 Hz bei einer Pulslänge von 37 ps verwendet. Die geringste Expositionsdauer betrug eine Sekunde mit einer Gesamtenergieübertragung von 220 mJ, die maximale Expositionsdauer 60 Sekunden mit einer Gesamtenergieübertragung von 13.200 mJ. Die Genexpressionsanalyse 24 Stunden nach der Bestrahlung ergab eine signifikante Induktion von *NFkBRE*, als Hinweis auf eine inflammatorische Reaktion, sowie eine Induktion von *GADD45* aus der Gruppe der DNA-Reparaturgene. Diese Beobachtungen wurden von Obringer *et al.* als Hinweis auf DNA-Schädigung durch die Laserbestrahlung mit diesen Parametern interpretiert (Obringer *et al.* 1999).

Leavitt *et al.* untersuchten in ihrer Arbeit „Mutagenic Activity of High-Energy 532 nm Ultra-Short Laser Pulses“ 532 nm und 1064 nm Laserpulse auf mutagene Effekte mit Hilfe eines Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Mutations-Tests anhand von Hamsterfibroblasten. Sie verwendeten für die Bestrahlung der Fibroblasten eine Serie von jeweils acht aufeinander folgenden Laserpulsen mit einer Pulslänge von 100 ps und einer mittleren Leistungsdichte von 3,0 GW/cm². Die Ergebnisse zeigten nach Bestrahlung mit 532 nm Laserpulsen eine signifikant erhöhte Mutationsfrequenz, während nach der Bestrahlung mit 1064 nm-Pulsen lediglich spontane Mutationen zu beobachten waren. Leavitt *et al.* interpretierten die Beobachtungen

mit einer potentiellen Multiphotonenabsorption bei 532 nm mit konsekutiver Energiefreisetzung von Photonen einer Wellenlänge im UV-Bereich von 266 nm. Weitere alternative Hypothesen umfassten die potentielle Bildung freier Radikale und die chromosomale Schädigung durch photomechanische/akustische Effekte (Leavitt *et al.* 1997).

Hinsichtlich ihrer Hypothese der Multiphotonenabsorption bezogen sich Leavitt *et al.* auf die Beobachtungen von Cao *et al.* (Cao *et al.* 1993). Hier konnte eine erhöhte Bildung von Cyclobutylpyrimidindimeren und eine Inhibition der RNA-Polymerase nach einer Bestrahlung von DNA in Lösung mit 532 nm Laserpulsen, bei einer Pulsdauer von 9 ns und einer Energie von 20 mJ/Puls festgestellt werden. Da diese Effekte bei einer Leistungsdichte von $>10^8$ W/cm², nicht jedoch unterhalb einer zuvor festgelegten Schwelle für Multiphotonenabsorptionseffekte von 3 W/cm² beobachtet wurden, gingen die Forscher hinsichtlich der Dimerbildung von nicht-linearen Effekten im Sinne einer Zweiphotonenabsorption aus (Cao *et al.* 1993).

Hefetz *et al.* konnten hinsichtlich der Entwicklung von Cyclobutylpyrimidindimeren nach Bestrahlung mit 532 nm Laserpulsen einer Pulsdauer von 28 ps ähnliche Beobachtungen zeigen, wobei sie zusätzlich über einer Schwelle für optischen Durchbruch Doppelstrangbrüche ohne Bildung von Cyclobutylpyrimidindimeren feststellten (Hefetz *et al.* 1990).

Die Tatsache, dass mit Hilfe von 532 nm Lasern DNA-Strangbrüche erzeugt werden können, machten sich unter anderem Kong *et al.* zur genaueren Analyse von DNA-Reparaturmechanismen zu Nutze. Kong *et al.* verglichen unterschiedliche Lasersysteme hinsichtlich der Induktion von DNA-Schäden und ihrer Reparaturmechanismen (Kong *et al.* 2009). Sie verwendeten unter anderem einen 532 nm Laser mit einer Pulslänge von 6 ns, einer Repetitionsrate von 10 Hz, einer Pulsenergie von 0,032 µJ/Puls und einen durch ein Optiksytstem auf eine Größe von 499 nm kollimierten Laserspot. Bei einer Gesamtzahl von 85 Pulsen/Spot wurde eine Gesamtleistung von 38 µJ übertragen. Hinsichtlich der Doppelstrangbruchinduktion mit Hilfe des Lasers nannten Kong *et al.* vier wesentliche Mechanismen, die in Betracht gezogen werden müssten: Temperaturerhöhung durch lineare oder Zwei-Photonen-Absorption, Entstehung von thermoelastischem Stress, verschiedene photochemische Prozesse durch lineare oder Zwei-Photonen-Absorption, wie die Entstehung freier Radikale und reaktiver Sauerstoffspezies, sowie Plasmabildung.

Bezüglich der mit Hilfe des 532 nm Lasers beobachteten Effekte wurden am ehesten thermische und chemische Effekte in Betracht gezogen, wobei thermische Denaturierung der DNA bereits ab Temperaturen über 67 °C auftreten (Kong *et al.* 2009).

Beim Vergleich der oben genannten Arbeiten untereinander und insbesondere zu unserer Arbeit sind die Unterschiede hinsichtlich verwendeter Laserpulsdauer, -leistung, -flussrate sowie -modulation zu ausgeprägt, als dass eine direkte Übertragung ohne Weiteres möglich wäre. So ist in Anbetracht der von Cao *et al.* genannten Leistungsdichte von mehr als $5 \times 10^6 \text{ W/cm}^2$, ab der eine Zwei-Photonen-Absorption in DNA auftritt (Cao *et al.* 1993), ein ähnlicher Effekt bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Parametern und einer Flussdichte von theoretisch maximal ca. $62,5 \text{ W/cm}^2$, eher unwahrscheinlich.

In den Untersuchungen von Obringer *et al.* konnte, wie in unseren qPCR-Analysen, in beiden verwendeten Leistungsbereichen, eine erhöhte Expression von **GADD45** in der bestrahlten Kultur festgestellt werden. Auch in dieser Arbeit wurde die Bestrahlung in einem 96-Well-Mikrotiterplattenmodell durchgeführt. Die Expositionsdauer war mit 60 Sekunden länger als in den übrigen Arbeiten. Im Vergleich zu unserem Modell wurde jedoch ein Pikosekundenlaser verwendet und das Kulturmedium während der Bestrahlung in der zu bestrahlenden Vertiefung nicht entnommen, sodass ein Vergleich schwierig erscheint, zumal der Arbeit keine Informationen über die Zusammensetzung oder Absorptionseigenschaften des Kulturmediums zu entnehmen sind.

So sind bei den im Rahmen dieser Arbeit festgestellten erhöhten Expression oben genannter Gene aus dem funktionellen Bereich der DNA-Reparatur und Zellzykluskontrolle am ehesten durch lineare Absorptionsprozesse bedingte, thermische oder chemische Effekte zu diskutieren. Hierbei ist eine thermische DNA-Schädigung durch einen Einzelpuls, wie in Kong *et al.* geschildert, mit den in dieser Arbeit verwendeten Parametern unwahrscheinlich, sodass kumulative Effekte über die zweiminütige Bestrahlungsdauer durch Modulationsstrategie und erhöhte Repetitionsrate berücksichtigt werden sollten.

Einen Hinweis auf eine thermische Schädigungskomponente bzw. eine Auswirkung auf die zelluläre Proteinbiosynthese und Hypoxie-Stressantwort lieferte die Genexpressionsanalyse nach Bestrahlung bei 500 mW, da sich hier die vermehrte Expression der Gene **HSPA4** (NHDF: Foldchange: 1,92; p = 0,015796; HOB: Foldchange: 1,47; p = 0,022037), **HSPA5** (NHDF: Foldchange: 1,88, p = 0,002986), **ATF6B** (NHDF: Foldchange: 2,21; p = 0,038214), **BBC3** (NHDF: Foldchange: 2,15; p = 0,046937; HCH: Foldchange: 2,06; p = 0,004695) und **VEGFA** (HCH: Foldchange: 1,78; p = 0,025623) zeigte.

5.2.2 Hinweis auf HSP-Antwort durch Laserbestrahlung

Die Faltung der im Rahmen der Proteinsynthese entstehenden Polypeptidketten unterliegt den Gesetzen der Thermodynamik. Eine erhöhte Umgebungstemperatur kann, neben der Denaturierung der Proteine, eine korrekte Faltung verhindern und stellt somit eine Bedrohung für die Integrität der Zelle dar. Um auf solche Bedingungen zu reagieren, verfügt die Zelle über sog. Hitzeschockproteine (engl.: heat-shock proteins, Abk.: HSP). Dabei dienen diese Proteine als sog. Chaperone bei der Faltung von Proteinen und der Aufrechterhaltung ihrer Struktur, bei Reparatur und Transfer sowie der Entsorgung fehlerhafter Proteine im Proteasom (Abbildung 41).

Es werden mehrere Hitzeschockproteinfamilien unterschieden, wobei sich die Namensgebung jeweils nach der Molekülmasse (in kDa) richtet.

HSPA4 ist ein Vertreter dieser Gen-Familie und zeigt durch die in unseren Versuchen beobachtete, verstärkte Expression nach Bestrahlung einen Hinweis auf einen thermischen Einfluss durch die Laserbestrahlung.

Entsprechende Effekte wurden im Hinblick auf Laser-induzierte Hitzeschock-Proteinantwort bereits von Bowman *et al.* beobachtet (Bowman & Schuschereba 2007). Ziel war hierbei, die pathophysiologischen Hintergründe der Laserbestrahlung in einem *in vitro*-Zellkulturmodell anhand humaner Keratinozyten und Retinazellen zu untersuchen. Die Arbeitsgruppe verwendete bei ihren Versuchen einen CO₂-Laser (10.6 µm) bei einer Flussdichte von 2 W/cm². Außerdem wurde mittels Wärmebehandlung mit erwärmtem Medium und unterschiedlichen Expositionszeiten versucht, Parallelen in der zellulären HSP-Antwort zwischen Laser- und Wärmebehandlung zu ziehen. In Genexpressionsanalysen nach gezielter, thermischer Schädigung zeigte sich in der humanen Retina-Zelllinie ARPE-19 eine signifikant erhöhte Expression von Genen aus dem Bereich Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur und Hitzeschockproteine. HSP70 und HSP40 konnten per Western Blot auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Dinh *et al.* 2001). Des Weiteren zeigten Genexpressionsanalysen an einer in vorangegangenen Versuchen austitrierten sublethalen Grenze hinsichtlich Expositionsdauer (3 Sekunden) und Temperatur (55 °C) ebenfalls eine signifikante Regulation von Genen aus dem Bereich HSP-Induktion, Wachstumsregulation und DNA-Reparatur. Da sich in einigen Laserbestrahlungsversuchen in einem sublethalen Bereich bei weiterer Bestrahlung ein verbessertes Zellüberleben gezeigt hatte, vermuteten die Forscher zytoprotektive Effekte hinter der verstärkten HSP-Expression. In weiteren Versuchen wurden daher mit Hilfe des HSP-Induktors Herbimycin A vorbehandelte

humane retinale Pigmentepithelzellen (ARPE-19) erneut oben genannten thermischen Einflüssen ausgesetzt. In der anschließenden Genexpressionsanalyse konnte auch hier nach Hitzebehandlung bei 55 °C eine signifikante Hochregulation in der HSP-Antwort gezeigt werden. In der sich anschließenden Übertragung der Beobachtungen auf die Laserbestrahlung zeigten sich nach dreizehnsekündiger CO₂-Laser-Exposition bei 2 W/cm² morphologische Schäden, die vergleichbar mit Beobachtungen aus Wärmebehandlungsversuchen bei einer Temperatur von 55 °C und einer Expositionszeit von 9 Sekunden waren. Weitere Versuche zeigten sowohl bei dreisekündiger Wärmeverbehandlung als auch nach Herbimycin-Vorbehandlung eine höhere Zellzahl nach Bestrahlung (Bowman & Schuschereba 2007).

Auch wenn oben genannte Arbeiten sich von unserem Versuchsaufbau bezüglich Zellarten, verwendeter Laserparameter und Expositionszeiten unterscheiden, besitzen die Ergebnisse der Studien im Hinblick auf die in unseren Versuchen beobachteten Effekte hohe Relevanz. Wie in dem in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturmodell wurde vor jeder Bestrahlung der Zellen das Kulturmedium entfernt, sodass direkte Wechselwirkungen zwischen Laser und Zellrasen insbesondere im Hinblick auf thermische Einflüsse besser vergleichbar erscheinen. Sowohl die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen nach Wärmebehandlung bei 55 °C, als auch die beobachteten zytoprotektiven Effekte durch Erwärmung und HSP-Induktion mit Hilfe von Herbimycin A könnten wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der Hypothesenbildung im Kontext der im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Effekte darstellen. So zeigte sich nach Hitzebehandlung bei 55 °C eine verstärkte Genexpression in drei der funktionellen Signalwegs-Gruppen, die auch in unseren Versuchen nach Bestrahlung im phototoxischen Leistungsbereich von 500 mW bei einer Repetitionsrate von 50 kHz eine erhöhte Expression aufwiesen. Des Weiteren könnte ein Zusammenhang zwischen den von Bowman *et al.* beobachteten zytoprotektiven Effekten nach HSP-Induktion und unseren Beobachtungen bestehen, dass die Zellen in einem sublethalen Leistungsbereich in einigen Versuchen eine geringere LDH-Freisetzung aufwiesen als in der nicht-bestrahlten Kontrolle. All diese Hypothesen sollten in weiteren Experimenten überprüft werden.

Die Arbeit von Khan *et al.* (Khan *et al.* 2015) unterstützt einige der Hypothesen Bowmans. So zeigte sich in einem Zellkulturmodell (Humane dermale Keratinozyten (HaCaT) und humane normale orale Keratinozyten (NOKSI)) bei Inhibition der HSP70-Antwort eine gesteigerte Sensitivität der Zellen gegenüber der Laserbestrahlung bei einer Wellenlänge von 810 nm. In dieser Studie konnte in einem subphototoxischen Intensitätsbereich neben einer dosisabhängigen HSP70-Aktivität auch eine gesteigerte Induktion von Genen aus der zellulären Autophagie-

Antwort beobachtet werden. Ein weiterer Zusammenhang konnte zwischen HSP70-Aktivität und der zellulären ER-Stress-Antwort festgestellt werden.

5.2.3 Hinweise auf eine Beteiligung des ER-Stress-Signalwegs

Khan *et al.* beobachteten in ihren Genexpressionsanalysen nach Bestrahlung mit Intensitäten im subphototoxischen Leistungsbereich eine Hochregulation der Gene *ATF-4* und *ATF-6* aus der „ER-Stress“-Antwort sowie eine erhöhte Expression von *BIP* und *GADD34* (Khan *et al.* 2015). An dieser Stelle zeigt sich eine Parallele zu unseren Ergebnissen der qPCR-Analysen. Wir konnten nach Bestrahlung der NHDF mit einer Leistung von 500 mW eine erhöhte Expression von *ATF6B* (Foldchange: 2,21; p = 0,038214) und *HSPA5* (Foldchange: 1,88; p = 0,002986) aus dem Bereich der ungefalteten Proteinantwort feststellen.

Ungefaltete Proteinantwort

Ein Kontrollsystem für die Proteinfaltung im Endoplasmatischen Retikulum (ER) stellt das sog. ERAD-System (ER-assoziierte Proteindegeneration) dar.

Wenn es zur Verzögerung der Proteinfaltung im ER kommt, fallen vermehrt demannosylierte Glycoproteine an, welche spezifisch erkannt und somit aus dem ER ins Zytosol „retrotransloziert“, ubiquitiniert und schließlich im Proteasom abgebaut werden. Kommt es zur vermehrten Produktion und Überlastung des ERAD-Systems, spricht man von sog. ER-Stress. Die Gegenregulation mit Steigerung der Aktivität von Chaperonen und ERAD-System wird als ungefaltete Proteinantwort (engl.: unfolded protein response, Abk.: UPR) bezeichnet (Abbildung 41).

ATF6B codiert wiederum für ein Protein welches als Sensor für ER-Stress dient und unter Stressbedingungen als Transkriptionsfaktor für die Induktion der weiteren UPR agiert. *ATF6* interagiert unter ER-Stress-freien Bedingungen mit *HSPA5*. Unter ER-Stress kommt es zur Rekrutierung von *HSPA5* und zur Dissoziation von *ATF6*. In diesem Mechanismus liegt somit ein Teil der Sensoraktivität von *ATF6* zur Detektion des ER-Stresssignals. Nach Modifikation im Golgi-Apparat zur aktiven Form des Transkriptionsfaktors, bindet *ATF6* nukleär an ER-Stress-Antwort-Elemente und induziert die Transkription einiger UPR-Zielgene, wie *HSPA5* und *DDIT3*, und bildet so einen Teil des positiven Feedbackmechanismus der UPR. Überschreitet der ER-Stress in seinem Ausmaß die Kapazitäten der UPR, verfügt die Zelle über die Möglichkeit, Mechanismen wie Autophagie und Apoptose einzuleiten. *ATF6* agiert hierbei sowohl als potentieller Induktor als auch Inhibitor der Autophagiereaktion, wobei die genauen

Mechanismen, die den Übergang von zytoprotektiver zu zytotoxischer Reaktion nicht vollständig verstanden sind (Rashid *et al.* 2015).

Khan *et al.* stellten in ihren Untersuchungen fest, dass eine Vorbehandlung der Zellen mit Autophagie-Inhibitoren zu einer erhöhten Sensitivität, während die Vorbehandlung mittels geringer Konzentrationen an **ER-Stressoren** zu einer Zytoprotektion gegenüber der Laserbestrahlung führten. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass Zellen eine optimale Aktivität durch Aufrechterhaltung einer minimalen basalen Autophagieaktivität erreichen und die Mechanismen zwischen Apoptose- und Autophagieinduktion sehr präzise reguliert sind (Moretti *et al.* 2007; Rutkowski & Kaufman 2007). Die Präkonditionierung mit einem sublethalen Reiz, der eine entsprechende Stressantwort induzierte, rief einen zytoprotektiven Effekt gegenüber der folgenden Laserbestrahlung hervor (Usuki *et al.* 2013). Hier sind Parallelen zu den von Bowman *et al.* beschriebenen Beobachtungen nach HSP-Induktion zu erkennen, da auch in diesen Versuchen eine erhöhte Resistenz gegenüber der Laserbestrahlung auftrat (Bowman & Schuschereba 2007).

In der Arbeit von Khan *et al.* konnte außerdem ein Zusammenhang zwischen UPR und HSP-Antwort beobachtet werden. Ein Knock-Out von *ATF-4* führte zu einer verminderten HSP70-Aktivität und Autophagie-Induktion in bestrahlten Zellen, während Zellklone, in denen *ATF-4* überexprimiert war, eine geringere Empfindlichkeit gegenüber der Laserbestrahlung aufwiesen (Khan *et al.* 2015). Aufgrund der zusätzlich beobachteten, verstärkten Entwicklung reaktiver Sauerstoffspezies in bestrahlten Zellen, schlussfolgerten Khan *et al.*, dass thermische Einflüsse und reaktive Sauerstoffspezies zur ungefalteten Proteinantwort (unfolded protein response; UPR) führten.

Da in oben genannten Arbeiten jeweils Wellenlängen im nahen Infrarotbereich verwendet wurden und Zelllinien sowie das Bestrahlungsmodell von unserem Versuchsaufbau abwichen, ist eine Übertragung der Ergebnisse auf unser Modell nur bedingt möglich. Wenn man jedoch thermische Effekte durch die Bestrahlung bei einer Wellenlänge von 532 nm in Betracht zieht, so sind anhand der von uns erhobenen Expressionsdaten einige der bei Khan und Bowman beschriebenen Mechanismen auch in unserem Zellkulturmodell zu erwarten. Die Beobachtung, dass sich in unseren Genexpressionsanalysen nach Bestrahlung der NHDF mit einer Leistung von 500 mW eine verstärkte Expression von *ATF6B* zeigte, könnte einen Hinweis auf eine Induktion der ungefalteten Proteinantwort bedeuten.

Auch die komplexe Interaktion von ER-Stress-Antwort und Autophagie kann anhand unserer

Expressionsdaten vermutet werden. So zeigte sich nach Bestrahlung der NHDF mit einer Laserleistung von 500 mW eine erhöhte Expression der Gene *ULK1* (Foldchange: 2,58 ; p = 0,012666), *FAS* (Foldchange: 2,15; p = 0,028760), *ATG7* (Foldchange: 2,48; p = 0,036014) , *ATG12* (Foldchange: 1,89; p = 0,039642) und *ATG5* (Foldchange: 2,13; p = 0,047450). Eine diskret erhöhte Expression von *ATG5* konnte auch nach Bestrahlung der HOB mit einer Laserleistung von 500 mW beobachtet werden (Foldchange: 1,17; p = 0,019482). Diese Expressionsdaten zeigen einen Hinweis auf die von Khan *et al.* in einem phototoxischen Leistungsbereich festgestellte, verstärkte Autophagie-Induktion.

Autophagie

Autophagie bezeichnet einen katabolen Stoffwechselweg, der als Recycling-System der Zelle verstanden werden kann und stellt einen notwendigen Zellmechanismus, um auf Zellstress hinsichtlich Nährstoffmangel, fehlgefaltete Proteine, beschädigte Organellen und mikrobielle Infektionen reagieren zu können, dar. Ausbildung und Expansion des sog. Phagophors mit Aufnahme der abzubauenen zytosolischen Moleküle und Entwicklung zum sog. Autophagosom, welches schließlich mit dem Lysosom fusioniert, um die Hydrolyse der Autophagosominhalte und anschließende Freisetzung der Spaltprodukte ins Zytosol einzuleiten (Abbildung 41) (He & Klionsky 2009; Glick *et al.* 2010; Wang & Klionsky 2003). Der molekulare Mechanismus ist komplex und umfasst fünf Schlüsselphasen: Bildung des Phagophors, ATG5-ATG12-Konjugation und Interaktion mit ATG16L, LC3 Prozessierung und Einbau in die Phagophor-Membran, Aufnahme und Selektion der abzubauenen Zielstrukturen, Fusionierung von Autophagosom- und Lysosomenmembran und Proteolyse der enthaltenen Moleküle durch lysosomale Proteasen (Glick *et al.* 2010). Die Initiierung des Autophagiemechanismus erfolgt durch Aktivierung des ULK1/2-Komplexes. Dieser induziert die Ausbildung des Phagophors. In der folgenden Kaskade aktiviert ATG7 die ATG12-ATG5-ATG16L Komplexbildung, welche zur Expansion des Phagophors führt. Im weiteren Verlauf kommt es zur Prozessierung von LC3, welches einen Autophagie-Marker in die Membran des Autophagosoms einsetzt (Rashid *et al.* 2015; Glick *et al.* 2010; Wang & Klionsky 2003).

Krmpot *et al.* untersuchten in einem *in vitro*-Zellkulturmodell anhand der Ratten Gliom-elllinie U251 die Rolle von Autophagie in Laser-induziertem Tumor-Zelltod (Krmpot *et al.* 2010). Wie in unserem Modell wurde die Bestrahlung nach Entnahme des Kulturmediums in einem 96-Well-Mikrotiterplattenmodell durchgeführt. Für die Bestrahlung wurden ein 532 nm-Nd:YVO₄-Laser und Laserleistungen von 0,5-4 W verwendet, wobei zur Ausleuchtung des

Plattenbodens ein Linsensystem benutzt wurde, sodass der Spotdurchmesser 4 mm betrug. An die Bestrahlung schlossen sich Zytotoxizitätstests (MTT und crystal violet), eine „arcidine orange“-Färbung, welche die Autophagosomen anfärbt, sowie eine LC3-Bestimmung mittels Western-Blot an. Die Zytotoxizitätstests zeigten, dass die laserbedingte Zytotoxizität energieabhängig war. So konnte bei einer Leistung von 2 W eine 100%-ige Zytotoxizität beobachtet werden, wobei die Zellen in Durchlicht-mikroskopischen Aufnahmen morphologisch deutliche Ähnlichkeit zu unseren Beobachtungen im zytotoxischen Leistungsbereich zeigten. Desweiteren konnten Krmpot *et al.* feststellen, dass nach Verwendung zytotoxischer Bestrahlungsparameter eine Induktion von Autophagiemechanismen beobachtet werden konnte. So zeigten oben genannte Färbung, Western-Blot-Untersuchungen hinsichtlich LC3 und die Beclin-I-Bestimmung mittels Enzymimmunoassay (engl.: Enzyme-linked Immunosorbent Assay, Abk.: ELISA) Hinweise auf eine Laser-assoziierte Autophagie-Induktion. Da die Forscher nach 30-sekündiger, linearer Temperaturerhöhung bis 47 °C mittels Thermocycler im Gegensatz zu einer über 30-minütigen Erwärmung bei 43 °C, keine Autophagie-Induktion beobachten konnten, schlossen sie, dass die Laserbestrahlungs-assoziierte Induktion der Autophagie-Mechanismen nicht durch die Erwärmung bedingt war. Die Behandlung der Gliom-Zellen mit Autophagie-Inhibitoren im Anschluss an die Laserbestrahlung ergab eine erhöhte Bestrahlungs-assoziierte Zytotoxizität, sodass Krmpot *et al.* von einem protektiven Einfluss der Autophagie-Induktion hinsichtlich des Laser-induzierten Zelltodes ausgingen (Krmpot *et al.* 2010).

Die von Krmpot *et al.* gezeigte Studie ist im Hinblick auf unsere Ergebnisse sehr wertvoll. Beide Studien weisen bezüglich der Wellenlänge der verwendeten Laser, Flussdichte und Bestrahlungsmodell eine gute Vergleichbarkeit auf. In den Untersuchungen von Krmpot *et al.* lag die Flussdichte, ab der eine Zytotoxizität von 100% nach einer zweiminütigen Bestrahlung nachgewiesen werden konnte, bei ca. 16 W/cm². Auch wenn in unseren Experimenten lediglich ein Teil der Wachstumsfläche einer Vertiefung der 96-Well-Mikrotiterplatte effektiv bestrahlt wurde, so konnte ab einer Flussdichte von ca. 27,9 W/cm² in der Fibroblastenkultur eine morphologische Ähnlichkeit zu den in oben genannter Arbeit im zytotoxischen Leistungsbereich beobachteten Veränderungen festgestellt werden. Angesichts der Ähnlichkeiten in Versuchsaufbau, Laserwellenlängen, -Intensitäten, -Flussdichten, Expositionsdauer und vor dem Hintergrund, dass eine Tumorzelllinie eine potentiell höhere Toleranz gegenüber Stress- und Toxizität verfügen kann, ist zumindest die Hypothese aufzustellen, dass den beobachteten Effekten ein gemeinsamer Schädigungsmechanismus zu Grunde liegt. Die Beobachtung, dass eine Autopha-

gie-Induktion in der Gliomzelllinie als protektiver Mechanismus bezüglich der Laserbestrahlung aufzutreten schien, weist Parallelen zur Studie von Khan *et al.* auf. Angesichts der Verwendung einer Tumorzelllinie bei Krmpot *et al.*, ist es schwierig Rückschlüsse auf die von uns verwendeten Zelllinien zu ziehen. Dennoch könnte die Arbeit als wichtiger Hinweis im Zusammenhang mit Laser-induzierter Autophagie dienen. Die im Rahmen unserer Genexpressionsanalysen beobachtete erhöhte Expression oben genannter Gene aus dem Autophagie-Signalweg könnte einen Erklärungsansatz darstellen. In Zusammenschau mit den Ergebnissen aus den Arbeiten von Bowman *et al.* und Khan *et al.* wäre weiter zu erforschen, ob der Autophagieinduktion bei Bestrahlung mit 532 nm Laserpulsen eine ER-Stress-Antwort zu Grunde liegt. Interessant ist auch, ob das Ausbleiben Autophagie-typischer Mechanismen bei einem kurzzeitigen, rapiden Temperaturanstieg, wie bei Krmpot *et al.* untersucht, in der von Khan *et al.* beschriebenen Herunterregulation einiger Schlüsselgene der Autophagieantwort begründet ist.

5.2.4 Oxidativer Stress-Signalweg

Einen Hinweis auf eine mit der Laserbestrahlung assoziierte Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies konnte in der erhöhten Expression der Gene *TXNRD1* (Foldchange: 2,48; $p = 0,040118$), *SQSTM1* (Foldchange: 2,48; $p = 0,024013$), *SLC2A1* (Foldchange: 2,66; $p = 0,003985$) und *FTH1* (Foldchange: 1,97; $p = 0,015086$) nach Bestrahlung der NHDF mit einer Leistung von 500 mW gefunden werden. Oxidativer Stress bezeichnet die Fähigkeit von Sauerstoff und seinen Radikalen mit Biomolekülen zu reagieren und diese in ihrer Struktur und Funktion zu schädigen. Reaktive Sauerstoffspezies (engl.: reactive oxygen species, Abk.: ROS) entstehen z.B. durch Reduktion von molekularem Sauerstoff, wodurch es zur Bildung von sog. Superoxid-Radikalen kommt. Diese können durch Röntgen-, UV- und Gammastrahlung oder durch Autooxidation von Stoffwechselformen (z.B. Semichinone, Flavine, Glutathion, Thiole, Hämoglobin etc.) entstehen. Um der Superoxidbildung entgegenzuwirken, katalysieren sog. Superoxid-Dismutasen (SOD) die Umwandlung der Superoxidradikale zu Sauerstoff und dem weniger aggressiven Wasserstoffperoxid. Dennoch kann dieses in Anwesenheit von Eisensalzen im Rahmen der sog. Fenton-Reaktion in eine reaktive Hydroxyradikal-Form übergehen (Abbildung 41).

Reaktive Sauerstoffspezies können auf viele Arten Schäden hervorrufen. Auf DNA-Ebene können sie zu Strangbrüchen, Basenfehlpaarungen, Mutationen und der Bildung von Thymin-Dimeren und 8-Hydroxydeoxyguanosin führen. In Proteinen weisen v.a. Methionin-, Histidin,

Tryptophanreste und Thiolgruppen der Cysteine eine hohe Sensitivität gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies auf.

In Lipiden kommt es unter dem Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies zur sog. Lipidperoxidation. So können insbesondere an Zell- und Organellenmembranen durch Alkyl-, Alkoxy-, Perhydroxyl- und Peroxylradikale schwere strukturelle und funktionelle Schäden entstehen, die sich teilweise in Kettenreaktionen entlang der Membranen ausbilden.

Weitere Enzyme wie die Cytochrom c-Oxidase und Glutathion-S-Transferasen dienen der Prävention von Nebenreaktionen mit Radikalbildung. Falls bereits reaktive Sauerstoffspezies entstanden sind, können Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase der Zellschädigung durch Radikale enzymatisch entgegenwirken. Ascorbat und α -Tocopherol können als Vitamine und Antioxidantien die entstandenen Radikale abfangen (Heinrich *et al.* 2014).

Das Gen ***FTH1*** (*Ferritin Heavy Chain 1*) codiert für die schwere Untereinheit des Eisenspeicher- und Akute-Phase-Proteins Ferritin. Wie oben bereits beschrieben, kann es im Rahmen der Fenton-Reaktion, bei erhöhten intrazellulären Konzentrationen freien Eisens, zur verstärkten Bildung von Hydroxyl-Radikalen kommen (Orino *et al.* 2001). Neben der Induktion des *FTH1*-Gens im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen (F. M. Torti & S. V. Torti 2002; Kwak *et al.* 1995) konnte eine erhöhte Expression im Sinne eines zytoprotektiven Mechanismus im Rahmen der zellulären Antwort auf oxidativen Stress gezeigt werden (Tsuji 2005); (Epsztejn *et al.* 1999); (Orino *et al.* 2001).

Ein Zusammenhang zwischen der Laserbestrahlung in einem *in vitro*-Zellkulturmodell und der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies konnte z.B. von Saenko *et al.* gezeigt werden (Saenko *et al.* 2016). In dieser Arbeit wurden die Kolorektalkarzinomzelllinie HCT-116 und die Ovarial-epithelzelllinie CHO-K mit einem Laser einer Wellenlänge von 1265 nm mit einer Energie von bis zu 400 J/cm² bestrahlt und anschließend im Hinblick auf Zytotoxizität der Bestrahlung, intrazelluläre Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies, Veränderungen hinsichtlich des mitochondrialen Potentials, der Glutathionkonzentration und DNA-Schädigungen untersucht. Die Forscher stellten eine Dosis-abhängige Zytotoxizität der Laserbestrahlung durch erhöhte intrazelluläre ROS-Konzentrationen sowie eine erhöhte DNA-Schädigung bei vermindertem mitochondrialem Potential und verringerter Glutathionkonzentration fest. Aufgrund dieser Beobachtungen gingen Saenko *et al.* von einer Singulett-Sauerstoff-Bildung im Rahmen der Laserbestrahlung aus. Als Hauptquelle der reaktiven Sauerstoffspezies vermuteten die Forscher

die mitochondriale Atmungskette, wobei sie eine Absorption der Photonen durch die dort lokalisierten Porphyrine, wie die Cytochrome, mit potentieller, konsekutiver Schädigung des Cytochrom aa₃ als Bestandteil von Komplex IV in Betracht zogen (Saenko *et al.* 2016).

Die Hypothese, dass die mitochondriale Funktion durch grünes Laserlicht beeinflusst werden kann, wurde u.a. bereits 1968 aufgestellt (Rounds *et al.* 1968). Rounds *et al.* erklärten ihre Beobachtungen damit, dass Lichtpulse einer Wellenlänge von 5300 Å und einer Leistung von 1 MW/cm² den Sauerstoffverbrauch einer Ratten-Cerebellum-Zelllinie verringerte. Die Beobachtungen erklärten die Forscher mit den spezifischen Absorptionseigenschaften von Cytochrom c+c₁ in diesem Wellenlängenbereich (Rounds *et al.* 1968).

Butt *et al.* hatten bereits 1962 bei Analysen der Absorptionsspektren von Cytochrom c gezeigt, dass einige Cytochrom c-Derivate Absorptionsbanden im grünen Spektralbereich aufwiesen und Cytochrom c somit als Absorber im Bereich der Mitochondrienmembran agieren könnte (Butt & Keilin 1962). 1972 konnten Salet *et al.* eine Steigerung der Herzfrequenz in Ratten-Kardiomyozyten bei einer Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 5300 Å und Nanosekundenpulsen einer Leistung von 10⁸ W/cm² feststellen (Salet 1972). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten morphologische Veränderungen der Mitochondrien der bestrahlten Zellen im Sinne einer Schwellung und einer desorganisiert imponierenden Cristaearchitektur. Diese Beobachtungen begründeten Salet *et al.* mit der Absorptionsfähigkeit der in den Mitochondrien vorkommenden Cytochromen, insbesondere Cytochrom c+c₁, in diesem Wellenlängenbereich. Hinter der Laser-induzierten Steigerung der Kontraktionsfrequenz vermuteten sie eine photochemische Reaktion durch mitochondriale Absorption mit Umwandlung von elektromagnetischer in mechanische Energie (Salet 1972). In vielen der oben genannten Studien wurde eine im Vergleich zu den in unseren Versuchen verwendeten Laserparametern um sehr viel höhere Leistungsdichte verwendet, sodass eine Übertragung dieser Erkenntnisse auf unseren experimentellen Aufbau schwierig erscheint. Insbesondere im Bereich der Photobiologie und „Low-Level-Laser-Therapy“ (LLLT)-Forschung wird eine Interaktion zwischen Photonen aus dem visuellen und infraroten Spektrum und Bestandteilen der mitochondrialen Atmungskette diskutiert (Karu 2010a; Karu *et al.* 2001; Karu *et al.* 2004; Karu *et al.* 2005; Karu 2010b). Hinter den biostimulatorischen Effekten wird unter anderem die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies vermutet (Lubart *et al.* 2005), wobei in diesem Zusammenhang ein sensibles Gleichgewicht zwischen proliferationssteigernden und zytotoxischen Effekten durch reaktive Sauerstoffspezies diskutiert wird (Burdon 1995). Auch anhand der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten können biostimulatorische Effekte diskutiert werden.

5.3 Biostimulation

In einigen LDH-Tests zeigte sich nach einer Bestrahlung mit Laserleistungen unterhalb der jeweiligen Grenze, ab der zytotoxische Effekte auftraten, eine Tendenz der geringeren LDH-Freisetzung im Vergleich zur nicht-bestrahlten Kontrolle. Einen solchen Nebeneffekt konnten wir z.B. nach Bestrahlung der Osteoblasten mit einer Laserleistung von 250 mW (3756 J/cm²) beobachten ($p = 0,0004$), wobei sich erste Hinweise auf laserbedingte Zytotoxizität in dieser Zelllinie erst ab einer Laserleistung von 281 mW gezeigt hatten. Eine Erklärung für diese Beobachtungen könnte auch hier in einem Laser-assoziierten Biostimulationseffekt liegen.

Biostimulationseffekte in Zusammenhang mit Laserbestrahlung sind in zahlreichen *in vitro*-Studien beschrieben, wobei die genauen Mechanismen bislang nicht vollständig geklärt sind. Sowohl für Fibroblasten (Weng *et al.* 2011; Poon *et al.* 2005); (Kreisler *et al.* 2003; Kreisler *et al.* 2002; Pourzarandian *et al.* 2005; Vinck *et al.* 2003; Pereira *et al.* 2002) als auch Osteoblasten (Stein *et al.* 2005; Fujihara *et al.* 2006) sind Laser-assoziierte Biostimulationseffekte beschrieben. Vermutet wird eine Licht-Gewebe-Wechselwirkung aufgrund der Absorption des eingestrahlten Lichts durch intrazelluläre Chromophore wie endogene Porphyrine, mitochondriale Cytochrome sowie Flavoproteine (Lubart *et al.* 2005). Insbesondere die Rolle der Cytochrom c-Oxidase, als Bestandteil der Atmungskette, wird als Schlüsselchromophor diskutiert (Karu 2010b; Karu *et al.* 2001; Karu *et al.* 2004; Y.-Y. Huang *et al.* 2011; Hamblin 2010). Karu *et al.* stellten die Hypothese auf, dass mehrere Signalwege durch die Cytochrom c-Oxidase als Zielmolekül der Laserbehandlung besprochen werden. Sie vermuteten eine NO-Dissoziation vom aktiven Zentrum des Enzyms und die damit verbundene, konsekutive Regulation folgender Stoffwechselprozesse (Lane 2006). Eine gesteigerte ATP-Synthese führe so nicht nur zu mehr ATP als „Energiewährung“ sondern habe auch als Signalmolekül und P2Y-Aktivator (Anders *et al.* 2008) Auswirkungen auf die Kalziumhomöostase der bestrahlten Zelle (Karu 2010a). Lubart *et al.* gingen davon aus, dass die biostimulatorischen Effekte in einer Änderung des zellulären Redoxstatus durch laserbestrahlungsassoziierte Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies bedingt sei (Lubart *et al.* 2005), wobei eine erhöhte Zellproliferation unter dem Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies bereits in anderen Arbeiten gezeigt worden war (Murrell *et al.* 1990; Burdon 1995). Den meisten dieser Studien lagen Bestrahlungsversuche bei Wellenlängen im roten Spektralbereich bis nahen Infrarot-Bereich zu Grunde. Hinweise für die Absorption grünen Laserlichts auf Ebene der Mitochondrien wurden bereits 1972 beschrieben (Berns *et al.* 1972). Sowohl Berns *et al.* als auch Salet *et al.* (Salet 1972) konnten nach Bestrahlung von

Mitochondrien in Ratten-Kardiomyozyten Veränderungen hinsichtlich des Kontraktionsverhaltens sowie die Entstehung von Läsionen feststellen. Als Hauptabsorber wurden insbesondere mitochondriale Cytochrome diskutiert. Berns *et al.* beschrieben einen potentiellen Schädigungsmechanismus durch thermische Effekte mit Ausbreitung vom Ort des mitochondrialen Absorptionszentrums aus. Sie beobachteten eine Schädigung der Zellkernmembran in Abhängigkeit der Distanz des Mitochondriums vom Nucleus. Aus den in der Arbeit aufgeführten Angaben zum Versuchsaufbau lässt sich eine Energiedichte in diesen Versuchen zwischen 1592 J/cm^2 und 25478 J/cm^2 errechnen. Ein direkter Vergleich mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Parametern erscheint aufgrund der Unterschiede im Versuchsaufbau schwierig, jedoch liefern auch die Arbeiten von Berns sowie Salet *et al.* einen Hinweis auf Absorptionseffekte, welche für unsere Beobachtungen verantwortlich sein könnten. Kassák *et al.* konnten nach Bestrahlung der Hamsterzelllinie B-14 sowie von isolierten Mitochondrien aus einer Rattenkardiomyozytenlinie zeigen, dass, auch bei Verwendung der Wellenlänge von 532 nm und einer Leistung von 30 mW, Veränderungen hinsichtlich der mitochondrialen Aktivität auftraten. Sowohl die Proliferationsrate als auch das mitochondriale Membranpotential waren nach Bestrahlung signifikant erhöht (Kassák *et al.* 2005). Die Flussrate lag in diesen Versuchen bei 1146 J/cm^2 und somit deutlich unterhalb der in unseren Versuchen verwendeten Energie pro Fläche. Insbesondere im Zusammenhang mit der Niedrigenergie-Laserbehandlung (Low-power Laser/Low Level Laser Therapie (LLLT)) mit grünem Laserlicht werden zytoproliferative Effekte durch eine Interaktion mit Cytochrom b, c₁ und c als Hauptabsorber beschrieben (Gao & Xing 2009). Die prosthetische Gruppe des Häm-Moleküls in Cytochrom b, c₁ und c bildet, wie in Myoglobin und Hämoglobin, Eisen-Protoporphyrin IX. Die Forscher vermuteten einen Photobleaching-Effekt im Zusammenhang mit Protoporphyrin IX durch Absorption im grünen Wellenlängenbereich (Kassák *et al.* 2005; Gao & Xing 2009). Anwer *et al.* konnten in ihren Bestrahlungsversuchen mit einer Wellenlänge von 532 nm und einer Leistung von 30 mW anhand humaner Stammzellen zeigen, dass die Expositionsdauer einen Effekt auf die Viabilität, die Autofluoreszenz und das mitochondriale Membranpotential hatte. So konnten sie bei Expositionsdauern von 30 und 45 Sekunden eine signifikante Steigerung der Proliferation, der Autofluoreszenz sowie ein erhöhtes mitochondriales Membranpotential feststellen, während sich ab höheren Expositionsdauern bis 300 Sekunden ein inverser Effekt mit deutlicher Abnahme im Bezug auf oben genannte Parameter zeigte. Als potentielle Erklärung für diese Beobachtungen stellten sie die Hypothese auf, dass ab einer längeren Expositionsdauer über 60 Sekunden

schädigende, thermische Effekte eine Rolle spielen könnten (Anwer *et al.* 2012). Die Expositionsdauer in diesen Versuchen überschritt somit die in der vorliegenden Arbeit verwendete, die maximal applizierte Flussdichte lag jedoch bei Anwer *et al.* bei lediglich 45 J/cm².

5.4 Vergleichsuntersuchungen im Tiermodell

Einige im Rahmen dieser Arbeit etablierten Verfahren wurden außerdem von Sorg *et al.* auf ein Mausmodell übertragen. So konnten mit Hilfe der oben genannten Fluoreszenzfärbung nach einer Bestrahlung mit 89 mW auch am Maustrommelfell erste diskrete Nekrosezonen festgestellt werden, während nach einer Bestrahlung mit 50 mW keine schädigenden Effekte nachgewiesen werden konnten. Die Laserparameter entsprachen den im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten. Allerdings wurde die Laserfaser im Gehörgang der Maus mit einem Abstand von ca. 0,3–0,5 mm vom Trommelfell platziert, sodass die Flussdichtewerte eine bessere Vergleichbarkeit mit den in dieser Arbeit verwendeten Ergebnissen erlauben. So entspricht die von Sorg *et al.* beschriebene Leistungsrenze von 50 mW einer Flussdichte von 3000 J/cm². Hierbei ist eine gute Korrelation mit der in der Fibroblastenlinie festgestellten Leistungsgrenze von 199 mW und einer korrespondierenden Flussdichte von 2988 J/cm² erkennbar. Aufgrund des im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Faserabstands konnte eine feinere Titration der Laserleistungsgrenzen erfolgen. Die von Sorg *et al.* beschriebene Laserleistung von 89 mW, ab welcher eine erste Schädigung festgestellt werden konnte, entspricht einer Flussdichte von 5340 J/cm².

Eine annähernd ähnliche Flussdichte wurde in der vorliegenden Arbeit erst oberhalb einer verwendeten mittleren Laserleistung von 354 mW erreicht. Hier hatten alle verwendeten Zelltypen bereits Nekrosezonen bzw. eine signifikant verringerte Viabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gezeigt. Die ersten Schädigungsgrenzen konnten in den *in vitro*-Versuchen bereits bei Flussdichten zwischen 3348 J/cm² und 4212 J/cm² beobachtet werden. Somit kann im Vergleich mit den von Sorg *et al.* beschriebenen Daten nicht nur eine gute Korrelation im Hinblick auf die obere einsetzbare Flussdichte bzw. Laserleistungsdichte hergestellt werden, sondern auch eine genauere Eingrenzung der oberen applizierbaren Leistungsschwelle erfolgen.

Diese beiden Studien bilden eine wichtige Grundlage zur Definition eines biologisch sicheren Leistungsbereichs im Hinblick auf den Einsatz in Form eines Laser-basierten Hörsystems.

5.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit ist es uns gelungen, laserbestrahlungsassoziierte Schäden in einem *in vitro*-Zellkulturmodell sichtbar zu machen und zu quantifizieren. Des Weiteren konnten wir anhand der drei verwendeten Zelllinien jeweils eine Laserleistungsgrenze hinsichtlich zytotoxischer Effekte bestimmen, unterhalb derer keine morphologischen Veränderungen gegenüber der Kontrolle abgrenzbar waren und der statistische Vergleich der Daten aus WST-1- und LDH-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen bestrahlter und nicht-bestrahlter Kultur erbrachte. Aufgrund des verwendeten Modells war es uns möglich, die zytotoxischen Effekte auch hinsichtlich ihrer Kinetik zu beobachten. Außerdem gelang uns eine Übertragung der Fluoreszenzfärbung auf das von Sorg *et al.* verwendete *in vivo*-Mausmodell, sodass Laser-induzierte Schäden nach Bestrahlung auch am Maustrommelfell detektiert, quantifiziert und in Relation zu den Beobachtungen aus dem *in vitro*-Zellkulturmodell gesetzt werden konnten (Sorg *et al.* 2019). Ein Teil dieser Arbeit bildet somit die Grundlage für weitere Erkenntnisse, die aus dem Tiermodell generiert werden können. Erste zytotoxische Effekte konnten anhand der NHDF ab einer Leistung von ca. 223 mW ($\sim 3348 \text{ J/cm}^2$) bei einer Laserpulsrate von 50 kHz festgestellt werden, während sich bei einer Leistung von 199 mW (2988 J/cm^2) keine signifikanten laserbestrahlungsassoziierte Veränderungen mehr zeigten. Die humanen Chondrozyten und Osteoblasten zeigten zytotoxische Effekte bei höheren Leistungen, sodass die anhand der Fibroblasten beobachtete Schwelle zwischen 199 (2988 J/cm^2) und 223 mW (3348 J/cm^2) als erste Leistungsgrenze betrachtet werden kann. In einigen Experimenten zeigten sich Hinweise auf eine geringere Zelllyse in der bestrahlten Gruppe, sodass biostimulatorische Effekte diskutiert und in weiteren Versuchen überprüft werden sollten. In Zusammenschau mit oben genannten Studien, welche eine Absorption im grünen Spektralbereich durch mitochondriale Bestandteile nahelegen, könnten die in unseren Experimenten beobachteten Unterschiede zwischen den untersuchten Zelllinien hinsichtlich der zytotoxischen Schwellenleistung in einer Zelltyp-spezifischen mitochondrialen Absorberdichte begründet sein. Die Genexpressionsanalysen dienen als hilfreiches Screeninginstrument, und der Hypothesenbildung hinsichtlich zellulärer Antwortmechanismen auf die Laserbestrahlung im zytotoxischen und subtoxischen Leistungsreich. So zeigte sich in allen Zelltypen nach Bestrahlung mit zytotoxischen Laserleistungen eine Vielzahl an Genen aus unterschiedlichen Stress- und Zytotoxizitätsantwortmechanismen, welche Auskunft über grundlegende Zusammenhänge zwischen unterschiedlichen Signalwege der zellulären Antwort auf Laser-assoziierte Toxizität liefern können. Die Beobachtung, dass sich

im sublethalen Leistungsbereich nach Bestrahlung der Fibroblastenzelllinie lediglich eine signifikant erhöhte Expression des Gens *GADD45G* gegenüber der nicht-bestrahlten Kontrolle zeigte, könnte in Zusammenschau mit den Ergebnissen des WST-1-Tests die Hypothese einer Zellzyklusarrest-Induktion durch die Laserbestrahlung stärken.

Diese Ergebnisse bilden die Grundlagen für weitere Untersuchungen, um die optimalen Laserstimulationsparameter zur Entwicklung laserbasierter Hörsysteme zu finden. Auf dieser Arbeit aufbauend ist weiterführend eine Überprüfung der Manifestation der in den qPCR-Analysen beobachteten Expressionsveränderungen auf Proteinebene von Interesse. Welche Wellenlängen in Kombination mit der Stimulationsstrategie einen biologisch sicheren und zugleich effektiven Einsatz in Form eines optischen Hörsystems bieten, ist Gegenstand unserer weiteren Versuche.

6 Literaturverzeichnis

- American National Standards Institute, 2014. *ANSI Z136. 1: Safe Use of Lasers (2014)*,
- Anders, J.J. et al., 2008. Light Supports Neurite Outgrowth of Human Neural Progenitor Cells *In Vitro*: The Role of P2Y Receptors. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 14(1), pp.118–125.
- Anwer, A.G. et al., 2012. Visible 532 nm Laser Irradiation of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells: Effect on Proliferation Rates, Mitochondria Membrane Potential and Auto-fluorescence. *Lasers in Surgery and Medicine*, 44(9), pp.769–778.
- Bell, A.G., 1880a. Selenium and the Photophone. *Nature*, 22(569), pp.500–503.
- Bell, A.G., 1880b. Upon the production and reproduction of sound by light. *Journal of the Society of Telegraph Engineers*, 9(34), pp.404–426.
- Bell, A.G. & Tainter, S., 1880. Photophone-Transmitter. *United States Patent Office*.
- Berns, M.W. et al., 1972. Argon laser micro-irradiation of mitochondria in rat myocardial cells in tissue culture II. Correlation of morphology and function in irradiated single cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 4(1), pp.71–78.
- Boenninghaus, H.G. & Lenarz, T., 2007. *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*, Springer.
- Boulnois, J.-L., 1986. Photophysical Processes in Recent Medical Laser Developments: a Review. *Lasers in Medical Science*, 1(1), pp.47–66.
- Bowman, P.D. & Schuschereba, S.T., 2007. *In vitro Models of Laser Induced Injury: Pathophysiology and Cytoprotection*, United States Army Institute of Surgical Research.
- Broude, E.V. et al., 2014. p21 (CDKN1A) is a Negative Regulator of p53 Stability. *Cell Cycle*, 6(12), pp.1467–1470.
- Brzoska, T. et al., 2013. Binding of Thrombin-Activated Platelets to a Fibrin Scaffold through $\alpha_{IIb}\beta_3$, Evokes Phosphatidylserine Exposure on Their Cell Surface. C. Schulz, ed. *PLoS ONE*, 8(2), p.e55466.
- Burdon, R.H., 1995. Superoxide And Hydrogen Peroxide In Relation To Mammalian Cell Proliferation. *Free Radical Biology & Medicine*, 18(4), pp.775–794.
- Buterin, T. et al., 2005. DNA Quality Control by Conformational Readout on the Undamaged Strand of the Double Helix. *Chemistry & Biology*, 12(8), pp.913–922.
- Butt, W.D. & Keilin, D., 1962. Absorption spectra and some other properties of cytochrome *c* and of its compounds with ligands. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 156, pp.429–458.

- Cao, E.-H., Wang, J.-J. & Xin, S.-M., 1993. Nonlinear biological effects of high-intensity visible laser radiation on DNA. In S. L. Jacques & A. Katzir, eds. *Laser-Tissue Interaction IV*. SPIE Proceedings. International Society for Optics and Photonics, pp. 309–313.
- Colletti, V. et al., 2006. Treatment of mixed hearing losses via implantation of a vibratory transducer on the round window. *International Journal of Audiology*, 45(10), pp.600–608.
- Deutsches Institut für Normierung, 2019. *60825-1 (VDE 0837-1): 2008-05: Sicherheit von Laser-Einrichtungen*, Beuth Verlag.
- Dinh, H.K. et al., 2001. Gene expression profiling of the response to thermal injury in human cells. *Physiological genomics*, 7(1), pp.3–13.
- Dip, R., Camenisch, U. & Naegeli, H., 2004. Mechanisms of DNA damage recognition and strand discrimination in human nucleotide excision repair. *DNA Repair*, 3(11), pp.1409–1423.
- Dugué, G.P., Akemann, W. & Knöpfel, T., 2012. A comprehensive concept of optogenetics. *Progress in Brain Research*, 196, pp.1–28.
- Epsztejn, S. et al., 1999. H-Ferritin Subunit Overexpression in Erythroid Cells Reduces the Oxidative Stress Response and Induces Multidrug Resistance Properties. *Blood*, 94(10), pp.3593–3603.
- Fadok, V.A. et al., 1992. Exposure of Phosphatidylserine on the Surface of Apoptotic Lymphocytes Triggers Specific Recognition and Removal by Macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 148(7), pp.2207–2216.
- Fay, J.P. et al., 2013. Preliminary evaluation of a light based Contact Hearing Device for the hearing impaired. *Otology & Neurotology*, 34(5), pp.912–921.
- Fisch, U. et al., 2001. Clinical Experience with the Vibrant Soundbridge Implant Device. *Otology & Neurotology*, 22(6), pp.962–972.
- Fridberger, A. & Ren, T., 2006. Local mechanical stimulation of the hearing organ by laser irradiation. *NeuroReport*, 17(1), pp.33–37.
- Fujihara, N.A., Hiraki, K.R.N. & Marques, M.M., 2006. Irradiation at 780 nm Increases Proliferation Rate of Osteoblasts Independently of Dexamethasone Presence. *Lasers in Surgery and Medicine*, 38(4), pp.332–336.
- Gao, X. & Xing, D., 2009. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *Journal of Biomedical Science*, 16, pp.1–16.
- Glick, D., Barth, S. & Macleod, K.F., 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology*, 221(1), pp.3–12.
- Goll, E. et al., 2013. Concept and evaluation of an endaurally insertable middle-ear implant. *Medical Engineering & Physics*, 35(4), pp.532–536.

- Hamblin, M.R., 2010. Introduction to Experimental and Clinical Studies Using Low-Level Laser (Light) Therapy (LLLT). *Lasers in Surgery and Medicine*, 42(6), pp.447–449.
- Håkansson, B. et al., 2008. Percutaneous Versus Transcutaneous Bone Conduction Implant System: A Feasibility Study on a Cadaver Head. *Otology & Neurotology*, 29(8), pp.1132–1139.
- He, C. & Klionsky, D.J., 2009. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annual Review of Genetics*, 43, pp.67–93.
- Hefetz, Y. et al., 1990. Laser Photochemistry of DNA: Two-Photon Absorption and Optical Breakdown Using High-Intensity, 532-nm Radiation. *Journal of the American Chemical Society*, 112(23), pp.8528–8532.
- Heinrich, P.C., Müller, M. & Graeve, L., 2014. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* P. C. Heinrich, M. Müller, & L. Graeve, eds., Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Hernandez, V.H. et al., 2014. Optogenetic Stimulation of the Auditory Nerve. *Journal of Visualized Experiments*, (92), p.e52069.
- Holzappel, B. & Wickert, L., 2007. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit*, 37(2), pp.120–126.
- Hoogstraten, D. et al., 2008. Versatile DNA damage detection by the global genome nucleotide excision repair protein XPC. *Journal of Cell Science*, 121(23), pp.3991–3991.
- Huang, L., Wu, S. & Xing, D., 2010. High fluence low-power laser irradiation induces apoptosis via inactivation of Akt/GSK3 β signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 226(3), pp.588–601.
- Huang, Y.-Y. et al., 2011. Biphasic Dose Response in Low Level Light Therapy - an Update. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*, 9(4), pp.602–618.
- Huber, A.M. et al., 2013. The Bonebridge: Preclinical evaluation of a new transcutaneously-activated bone anchored hearing device. *Hearing Research*, 301, pp.93–99.
- ISO 10993-5:2009, 2009. *Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity (ISO 10993-5:2009)*,
- Jacques, S.L., 1993. Role of tissue optics and pulse duration on tissue effects during high-power laser irradiation. *Applied Optics*, 32(13), pp.2447–2454.
- Kallweit, N. et al., 2016. Optoacoustic effect is responsible for laser-induced cochlear responses. *Scientific Reports*, 6(1), p.28141.
- Karu, T., 2010a. Mitochondrial Mechanisms of Photobiomodulation in Context of New Data About Multiple Roles of ATP. *Photomedicine and Laser Surgery*, 28(2), pp.159–160.
- Karu, T.I., 1991. Effects of Visible Laser Radiation on Cultured Cells. In *Laser Systems for Photobiology and Photomedicine*. NATO ASI Series. Boston, MA: Springer US, pp. 89–113.

- Karu, T.I., 2010b. Multiple Roles of Cytochrome *c* Oxidase in Mammalian Cells Under Action of Red and IR-A Radiation. *IUBMB Life*, 62(8), pp.607–610.
- Karu, T.I. et al., 2001. Changes in Absorbance of Monolayer of Living Cells Induced by Laser Radiation at 633, 670, and 820 nm. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 7(6), pp.982–988.
- Karu, T.I., Pyatibrat, L.V. & Afanasyeva, N.I., 2004. A novel mitochondrial signaling pathway activated by visible-to-near infrared radiation. *Photochemistry and Photobiology*, 80(2), pp.366–372.
- Kassák, P. et al., 2005. Mitochondrial Alterations Induced by 532 nm Laser Irradiation. *General Physiology and Biophysics*, 24(2), pp.209–220.
- Khan, I., Tang, E. & Arany, P., 2015. Molecular pathway of near-infrared laser phototoxicity involves ATF-4 orchestrated ER stress. *Scientific Reports*, 5(1), p.10581.
- Klein, K., Nardelli, A. & Stafinski, T., 2012. A Systematic Review of the Safety and Effectiveness of Fully Implantable Middle Ear Hearing Devices: the Carina and Esteem Systems. *Otology & Neurotology*, 33(6), pp.916–921.
- Klinke, R. & Hartmann, R., 1979. Physiologische Grundlagen einer Hörprothese. *Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 223(1), pp.77–137.
- Klinke, R., Pape, H.-C. & Silbernagl, S., 2005. *Physiologie*, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Kong, X. et al., 2009. Comparative analysis of different laser systems to study cellular responses to DNA damage in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 37(9), pp.e68–e68.
- Kreisler, M. et al., 2003. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *Journal of Clinical Periodontology*, 30(4), pp.353–358.
- Kreisler, M. et al., 2002. Low Level 809-nm Diode Laser-Induced In Vitro Stimulation of the Proliferation of Human Gingival Fibroblasts. *Lasers in Surgery and Medicine*, 30(5), pp.365–369.
- Krmpot, A.J. et al., 2010. Protective effect of autophagy in laser-induced glioma cell death in vitro. *Lasers in Surgery and Medicine*, 42(4), pp.338–347.
- Kwak, E.L. et al., 1995. Role for NF- κ B in the Regulation of Ferritin H by Tumor Necrosis Factor- α . *Journal of Biological Chemistry*, 270(25), pp.15285–15293.
- Lalande, M.E., Ling, V. & Miller, R.G., 1981. Hoechst 33342 dye uptake as a probe of membrane permeability changes in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(1), pp.363–367.
- Lane, N., 2006. Cell Biology: Power Games. *Nature*, 443(7114), pp.901–903.

- Latt, S.A. & Stetten, G., 1976. Spectral Studies on 33258 Hoechst and Related Bisbenzimidazole Dyes Useful for Fluorescent Detection of Deoxyribonucleic Acid Synthesis. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 24(1), pp.24–33.
- Leavitt, J. et al., 1997. Mutagenic Activity of High-Energy 532 nm Ultra-Short Laser Pulses. *Radiation Research*, 147(4), pp.490–494.
- Liljemalm, R., Nyberg, T. & Holst, von, H., 2013. Heating During Infrared Neural Stimulation. *Lasers in Surgery and Medicine*, 45(7), pp.469–481.
- Lubart, R. et al., 2005. Low-Energy Laser Irradiation Promotes Cellular Redox Activity. *www.liebertpub.com*, 23(1), pp.3–9.
- Martin, S.J. et al., 1995. Early Redistribution of Plasma Membrane Phosphatidylserine Is a General Feature of Apoptosis Regardless of the Initiating Stimulus: Inhibition by Overexpression of Bcl-2 and Abl. *The Journal of Experimental Medicine*, 182(5), pp.1545–1556.
- McCormack, A. & Fortnum, H., 2013. Why do people fitted with hearing aids not wear them? *International Journal of Audiology*, 52(5), pp.360–368.
- Melis, J.P.M., van Steeg, H. & Luijten, M., 2013. Oxidative DNA Damage and Nucleotide Excision Repair. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(18), pp.2409–2419.
- Moretti, L. et al., 2007. Switch between apoptosis and autophagy: radiation-induced endoplasmic reticulum stress? *Cell Cycle*, 6(7), pp.793–798.
- Mulla, O., Agada, F. & Reilly, P.G., 2012. Introducing the Sophono Alpha 1 abutment free bone conduction hearing system. *Clinical Otolaryngology : official journal of ENT-UK ; official journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery*, 37(2), pp.168–169.
- Murrell, G.A.C., Francis, M.J. & Bromley, L., 1990. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *The Biochemical Journal*, 265(3), pp.659–665.
- Nelissen, R.C. et al., 2014. Long-term stability, survival, and tolerability of a novel osseointegrated implant for bone conduction hearing: 3-year data from a multicenter, randomized, controlled, clinical investigation. *Otology & Neurotology*, 35(8), pp.1486–1491.
- Obringer, J.W., Phipps, S. & Johnson, M.D., 1999. *High Energy, Ultrashort Pulse Green Laser-Light Exposure of Cultured Human Cells Yields Evidence of DNA Damage*, Colorado, USA: Defense Technical Information Center.
- OECD, 2004. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Section 4: Health Effects Test No. 432*., OECD Publishing.
- Okamoto, T. & Okabe, S., 2000. Ultraviolet absorbance at 260 and 280 nm in RNA measurement is dependent on measurement solution. *International Journal of Molecular Medicine*, 5(6), pp.657–659.
- Op den Kamp, J.A.F., 1979. Lipid Asymmetry in Membranes. *Annual Review of Biochemistry*, 48, pp.47–71.

- Orino, K. et al., 2001. Ferritin and the response to oxidative stress. *The Biochemical Journal*, 357(Pt 1), pp.241–247.
- Pereira, A.N. et al., 2002. Effect of Low-Power Laser Irradiation on Cell Growth and Procollagen Synthesis of Cultured Fibroblasts. *Lasers in Surgery and Medicine*, 31(4), pp.263–267.
- Peters, B. & Holzhütter, H.-G., 2002. *In Vitro* Phototoxicity Testing: Development and Validation of a New Concentration Response Analysis Software and Biostatistical Analyses Related to the Use of Various Prediction Models. *Alternatives to Laboratory Animals : ATLA*, 30(4), pp.415–432.
- Pfaffl, M.W., 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*, pp.92–95.
- Pillong, L. et al., 2020. Cytotoxicity studies of an optoacoustic stimulation strategy for the development of laser-based hearing aids. *Journal of Biomedical Optics*, 25(6), pp.1–15.
- Poon, V.K.M., Huang, L. & Burd, A., 2005. Biostimulation of dermal fibroblast by sublethal Q-switched Nd:YAG 532 nm laser: collagen remodeling and pigmentation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 81(1), pp.1–8.
- Pourzarandian, A. et al., 2005. Effect of Low-Level Er:YAG Laser Irradiation on Cultured Human Gingival Fibroblasts. *Journal of Periodontology*, 76(2), pp.187–193.
- Puria, S., Maria, P.L.S. & Perkins, R., 2016. Temporal-Bone Measurements of the Maximum Equivalent Pressure Output and Maximum Stable Gain of a Light-Driven Hearing System That Mechanically Stimulates the Umbo. *Otology & Neurotology*, 37(2), pp.160–166.
- Rashid, H.-O. et al., 2015. ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection. *Autophagy*, 11(11), pp.1956–1977.
- Raulin, C., Karsai, S. & Steiner, R., 2012. *Lasertherapie der Haut*, Springer-Verlag.
- Reiß, M., 2009. *Facharztwissen HNO-Heilkunde* M. Reiß, ed., Heidelberg: Springer.
- Rettenmaier, A., Lenarz, T. & Reuter, G., 2014. Nanosecond laser pulse stimulation of spiral ganglion neurons and model cells. *Biomedical Optics Express*, 5(4), p.1014.
- Rounds, D.E., Olson, R.S. & Johnson, F.M., 1968. The Effect of the Laser on Cellular Respiration. *Zeitschrift für Zellforschung*, 87, pp.193–198.
- Rutkowski, D.T. & Kaufman, R.J., 2007. That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(10), pp.469–476.
- Saenko, Y.V. et al., 2016. Mitochondrial dependent oxidative stress in cell culture induced by laser radiation at 1265 nm. *Lasers in Medical Science*, 31(3), pp.405–413.
- Salet, C., 1972. A Study of Beating Frequency of a Single Myocardial Cell. *Experimental Cell Research*, 73(2), pp.360–366.

- Schultz, M. et al., 2012. Nanosecond laser pulse stimulation of the inner ear—a wavelength study. *Biomedical Optics Express*, 3(12), pp.3332–3345.
- Schünke, M., Schulte, E. & Schumacher, U., 2018. *PROMETHEUS LernAtlas der Anatomie*, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Shapiro, M.G. et al., 2012. Infrared light excites cells by changing their electrical capacitance. *Nature Communications*, 3, p.736.
- Sliney, D.H., Mellerio, J. & Schulmeister, K., 2001. Implications of using ED-50 and probit analysis in comparing retinal injury threshold data. In B. E. Stuck & M. Belkin, eds. *BiOS 2001 The International Symposium on Biomedical Optics*. SPIE, pp. 128–11.
- Sorg, K. et al., 2019. First biocompatibility margins for optical stimulation at the eardrum via 532-nm laser pulses in a mouse model. *Journal of Biomedical Optics*, 24(08), pp.1–11.
- Stahn, P. et al., 2019. Frequency-specific activation of the peripheral auditory system using optoacoustic laser stimulation. *Scientific Reports*, 9(1), pp.4171–13.
- Stein, A. et al., 2005. Low-Level Laser Irradiation Promotes Proliferation and Differentiation of Human Osteoblasts *in Vitro*. *Photomedicine and Laser Surgery*, 23(2), pp.161–166.
- Tamura, R.E. et al., 2012. GADD45 proteins: central players in tumorigenesis. *Current Molecular Medicine*, 12(5), pp.634–651.
- Teh, B.M. et al., 2013. Tissue Engineering of the Tympanic Membrane. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19(2), pp.116–132.
- Teudt, I.U. et al., 2011. Acoustic Events and “Optophonic” Cochlear Responses Induced by Pulsed Near-Infrared LASER. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 58(6), pp.1648–1655.
- The Alexander Graham Bell Family Papers, M.D.L.O.C., 2014. Letter from Alexander Graham Bell to Alexander Melville Bell, February 26, 1880, with transcript: a machine-readable transcription. *Library of Congress*, pp.1–3.
- Thomsen, S., 1991. Pathologic Analysis of Photothermal and Photomechanical Effects of Laser-Tissue Interactions. *Photochemistry and Photobiology*, 53(6), pp.825–835.
- Torti, F.M. & Torti, S.V., 2002. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*, 99(10), pp.3505–3516.
- Tsuji, Y., 2005. JunD activates transcription of the human ferritin H gene through an antioxidant response element during oxidative stress. *Oncogene*, 24(51), pp.7567–7578.
- Usuki, F., Fujimura, M. & Yamashita, A., 2013. Endoplasmic reticulum stress preconditioning attenuates methylmercury-induced cellular damage by inducing favorable stress responses. *Scientific Reports*, 3, p.2346.
- Vairapandi, M. et al., 2002. GADD45b and GADD45g Are cdc2/CyclinB1 Kinase Inhibitors With a Role in S and G2/M Cell Cycle Checkpoints Induced by Genotoxic Stress. *Journal of Cellular Physiology*, 192(3), pp.327–338.

- Verma, R.U. et al., 2014. Auditory responses to electric and infrared neural stimulation of the rat cochlear nucleus. *Hearing Research*, 310, pp.69–75.
- Vinck, E.M. et al., 2003. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers in Medical Science*, 18(2), pp.95–99.
- Wang, C.-W. & Klionsky, D.J., 2003. The Molecular Mechanism of Autophagy. *Molecular Medicine*, 9(3-4), pp.65–76.
- Wells, J. et al., 2007. Biophysical Mechanisms of Transient Optical Stimulation of Peripheral Nerve. *Biophysical Journal*, 93(7), pp.2567–2580.
- Weng, Y. et al., 2011. Investigation of irradiation by different nonablative lasers on primary cultured skin fibroblasts. *Clinical and Experimental Dermatology*, 36(6), pp.655–660.
- Wenzel, G.I. et al., 2010. Effects of green light application at ear drum and middle ear level. In ARO Midwinter Meeting.
- Wenzel, G.I. et al., 2009. Green laser light activates the inner ear. *Journal of Biomedical Optics*, 14(4), pp.044007–1–044007–6.
- Wenzel, G.I. et al., 2004. Laser irradiation of the guinea pig basilar membrane. *Lasers in Surgery and Medicine*, 35(3), pp.174–180.
- World Health Organization, 2020. "Deafness and hearing loss". Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/deafness-and-hearing-loss> [Accessed March 1, 2020].
- Zhang, K.Y. et al., 2009. Optoacoustic induced vibrations within the inner ear. *Optics Express*, 17(25), pp.23037–23043.
- Zheng, J. et al., 2000. Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature*, 405(6783), pp.149–155.

7 Publikation / Danksagung

7.1 Publikationen

Lukas Pillong, Patricia Stahn, Marius Hinsberger, Katharina Sorg, Bernhard Schick, and Gentiana I Wenzel. 2020. “Cytotoxicity Studies of an Optoacoustic Stimulation Strategy for the Development of Laser-Based Hearing Aids.” *Journal of Biomedical Optics* 25 (6): 1–15. doi:10.1117/1.JBO.25.6.068002.

Sorg, Katharina, Patricia Stahn, **Lukas Pillong**, Marius P Hinsberger, Larissa Heimann, Hans-Jochen Foth, Bernhard Schick, and Gentiana I Wenzel. 2019. “First Biocompatibility Margins for Optical Stimulation at the Eardrum via 532-nm Laser Pulses in a Mouse Model.” *Journal of Biomedical Optics* 24 (08): 1–11. doi:10.1117/1.JBO.24.8.085003.

Stahn, Patricia, Hubert H Lim, Marius P Hinsberger, Katharina Sorg, **Lukas Pillong**, Marc Kannengießer, Cathleen Schreiter, *et al.* 2019. “Frequency-Specific Activation of the Peripheral Auditory System Using Optoacoustic Laser Stimulation.” *Scientific Reports* 9 (1): 4171.

A Bozzato, L Pillong, B Schick, and M M Lell. 2020. “Aktuelle Bildgebung bei Diagnostik und Therapieplanung des Larynxkarzinoms.” *Der Radiologe* 60 (11): 1026–37. doi:10.1007/s00117-020-00757-4.

Linxweiler, Maximilian, **Lukas Pillong**, Dragan Kopanja, Jan P Kühn, Stefan Wagenpfeil, Julia C Radosa, Jingming Wang, *et al.* 2020. “Augmented Reality-Enhanced Navigation in Endoscopic Sinus Surgery: a Prospective, Randomized, Controlled Clinical Trial.” *Laryngoscope Investigative Otolaryngology* 5 (4): 621–29. doi:10.1002/lio2.436.

7.2 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre ohne die Unterstützung vieler Personen nicht möglich gewesen.

Die Forschungsarbeiten, die zu den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnissen geführt haben, wurden gemäß der Finanzhilfevereinbarung Nr. 311469 im Zuge des siebten Rahmenprogramms der Europäischen Union (RP7/2007-2013) / ERC grant agreement gefördert. Ich bedanke mich für die finanzielle Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Gentiana Wenzel für die hervorragende Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und die konstruktive Begleitung sowie Herrn Prof. Dr. Bernhard Schick für die Unterstützung und die herzliche Aufnahme in die Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde.

Insbesondere Herrn M. Sc. Florian Bochen (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes), der mich während der vorliegenden Arbeit außerordentlich unterstützt hat, immer für konstruktive Diskussionen und Hilfestellung bei der Etablierung oben genannter Tests zur Verfügung stand und der es immer wieder verstand, mich zu motivieren, gebührt ein ganz besonderer Dank.

Frau M. Sc. Katharina Sorg danke ich ganz herzlich für die stets freundliche Hilfe und Unterstützung sowie für das sorgfältige Korrekturlesen.

Außerdem gilt mein Dank Frau Monika Hoffmann, Frau Carolin Bick und Frau Ulrike Bechtel (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) für die tatkräftige Unterstützung im Laboralltag. Zudem danke ich allen weiteren Kollegen des HNO- und Urologieforschungslabors (Universitätsklinikum des Saarlandes) für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den Freunden des Universitätsklinikums des Saarlandes e.V. für die finanzielle Unterstützung durch die Verleihung des Forschungspreises 2019.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meiner Familie. Ihr ist diese Arbeit gewidmet.

8 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

9 Anhang

Materialliste:

Verwendete Zelltypen

Zelltypen	
Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF)	Promocell, Heidelberg, Deutschland
Human Chondrocytes (HCH)	Promocell, Heidelberg, Deutschland
Human Osteoblasts (HOB)	Promocell, Heidelberg, Deutschland

Verwendete Kulturmedien und Mediumzusätze

Medien:	
Fibroblast Basal Medium 2 (phenol red-free)	Promocell, Heidelberg, Deutschland
Supplement Mix / Fibroblast Growth Medium 2	Promocell, Heidelberg, Deutschland
Chondrocyte Basal Medium (phenol red-free)	Promocell, Heidelberg, Deutschland
Supplement Mix / Chondrocyte Growth Medium 2	Promocell, Heidelberg, Deutschland
Osteoblast Basal Medium (phenol red-free)	Promocell, Heidelberg, Deutschland
Supplement Mix / Osteoblast Growth Medium	Promocell, Heidelberg, Deutschland

Verwendete Reagenzien, Chemikalien und Kits mit Herstellerangabe

Reagenzien, Chemikalien, Kits	
Detach-Kit bestehend aus:	Promocell, Heidelberg, Deutschland
Hepes BSS	Promocell, Heidelberg, Deutschland
Trypsin/EDTA	Promocell, Heidelberg, Deutschland
TNS	Promocell, Heidelberg, Deutschland

Anhang

Cryo-SFM	Promocell, Heidelberg, Deutschland
Apoptotic/Necrotic/Healthy Cells Detection Kit	Promokine, Heidelberg, Deutschland
Cell Proliferation Reagent WST-1	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Pierce LDH Cytotoxicity Test Kit	Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania, USA
2-β-Mercaptoethanol	Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania, USA
RNase-freies Wasser	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
PBS (Phosphatgepufferte Standardsalzlösung)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
RNase ZAP	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
RT2-Profiler PCR Arrays Stress&Toxicity Pathway Finder	QIAGEN, Hilden, Deutschland
RT2-First Strand Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
RT2-SYBR® Green ROX qPCR Mastermix	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Rneasy Micro Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
QIAshredder Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Trypanblau	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 99% vergällt	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 100% p.a.	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Staurosporin	Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland

Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangabe

Verbrauchsmaterialien:	
Glass Bottom Viewplate 96-F	PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA
96-well Tissue Culture Plate, BD Falcon	Coring, New York, USA

Anhang

Pipettenspitzen:	
Safe Seal Sur Phob Sp. 100 µl steril	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
5 ml Serological Pipettes	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
10 ml Serological Pipettes	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
25 ml Serological Pipettes	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Axon "One Toch" 10µl steril	Axon Labortechnik, Kaiserslautern, Deutschland
Cell Counting Slides für Luna	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Kultur-Flaschen:	
TC-Flasche T25	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
TC-Flasche T75	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
TC-Flasche T175	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflasche 300cm ²	TPP, Trasadingen, Schweiz

Verwendete Pipetten

Pipetten:	
Einkanalpipetten (10µl, 100µl, 1000µl)	Brand, Wertheim, Deutschland
Multikanalpipette (100µl, 200µl)	Brand, Wertheim, Deutschland

Verwendete Geräte und Software

Geräte:	
Brutschrank HeraCell 159i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Zentrifuge "Centrifuge 5804R"	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Durchlichtmikroskop Axiovert 135	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

Anhang

Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Olympus BX61	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Software ISIS	MetaSystems GmbH, Altlußheim, Deutsch- land
Real-Time PCR-System StepOnePlus	Applied Biosystems, Waltham, Massachu- setts, USA
StepOne Software v2.3	Applied Biosystems, Waltham, Massachu- setts, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zellzählgerät Luna	Logos Biosystems, Anyang-si, Südkorea
Vortexer "Vortex-Genie 2"	Scientific Industries Inc., New York, USA
Spektrometer "NanoDrop ND-1000"	NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, DE, USA
ND-1000 Software V3.8.1	NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, Delaware, USA
Tischzentrifuge "Biofuge pico"	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Photometer "Tecan Infinite 200 Pro"	Tecan, Männedorf, Schweiz
PC	Hewlett-Packard Company /HP Inc., Palo Alto, CA, USA
Mikromanipulator MN-151	Narishige International Limited, London, Großbritannien

Laser:	
532 nm YVO2-Laser "INCA-532-Q"	Xiton Photonics GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
365 nm Multimode-Laserfaser „FG365 LEC“	ThorLabs, München, Deutschland

Anhang

AOM	Gooch&Housego, Ilminster, Großbritannien
Powermeter "UNO"	Gentec Electro-Optics Inc., Quebec City, QC, Kanada
Power-Detektor "XLP12-3S-H2-D0"	Gentec Electro-Optics Inc., Quebec City, QC, Kanada
Software "Matlab" Version "R2014a"	The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, USA
33500b Arbitrary Waveform Generator	Agilent Technologies, Santa Clara, USA