

**Wirkung von Nah-Infrarotstrahlung (NIR) eines gepulsten
Titan-Saphir-Lasers (Femtosekunden-Laser)
auf Gewebe und Zellen *in vitro***

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Jörg Bornemann

geboren am 30. März 1969 in Delmenhorst

2006

Referent: PD Dr. H. Lubatschowski
(Institut für Quantenoptik & Laserzentrum Hannover)

Korreferent: Prof. Dr. H.-A. Kolb
(Institut für Biophysik)

Korreferent: Prof. Dr. R. Heermann
(Klinik für HNO-Heilkunde)

Tag der Promotion: 31.01.2006

Spare deine guten Lehren
Für den eigenen Genuß.
Kaum auch wirst du wen bekehren,
Zeigst du, wie man's machen muß.

Laß ihn im Galoppe tollern,
Reite ruhig deinen Trab.
Ein zu ungestümes Wollen
Wirft von selbst den Reiter ab.

(Wilhelm Busch, 1909)

Zusammenfassung

Seit Anfang der 80er Jahre erweitern Lasersysteme das operative Spektrum im Bereich des Bohrens und Schneidens von Geweben. Etablierte Lasersysteme wie Er:YAG-Laser und CO₂-Laser können jedoch zur thermischen oder photoakustischen Schädigung des an den Ablationsort angrenzenden Gewebes führen. Durch die Entwicklung der Femtosekudentechnologie (FST), deren Materialabtrag auf Photodisruption basiert, könnten neue Anwendungsbereiche für die Chirurgie erschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Effekte auf Gewebe und Zellen durch die Bestrahlung mit einem gepulsten und verstärkten Titan-Saphir-Laser (Femtosekunden-Laser) lichtmikroskopisch, rasterelektronenmikroskopisch und toxikologisch untersucht.

Es konnte gezeigt werden, daß die applizierten Femtosekundenpulse (Pulslänge 150fs, Pulsenergie 30µJ-100µJ, Repetitionsrate 5kHz) bei Knochengewebe von Meerschweinchen keine mikroskopisch nachweisbaren thermischen Schäden erzeugen. Bei Weichgeweben (Nervengewebe, Fettgewebe, Muskelgewebe) von Meerschweinchen und Hausschwein konnten keine Karbonisierungs- oder Koagulationszonen bei Pulsenergien zwischen 33µJ-130µJ (Pulslänge 150fs, Repetitionsrate 5kHz) gefunden werden.

Photoakustische Schäden wurden an Nervengewebe und freipräparierten Kochleae von Meerschweinchen untersucht. Bei Pulsenergien von 100µJ (Pulslänge 150fs, Repetitionsrate 5kHz) zeigten sich Strukturauflockerungen in den Nervengeweben und zwischen Hensenschen Zellen und Phalangenzellen der Kochleae, sowie Scherungen der Zilien der Haarzellen. Bei Pulsenergien von 50µJ und 80µJ konnten derartige Schäden nicht erkannt werden. In photoakustisch sensiblen, wabenförmigen Bestrahlungsmustern zur Oberflächenvergrößerung zum Ankleben eines Pistons wurden die Pulsenergien 50µJ und 80µJ an einem Incus vom Meerschweinchen erprobt. Die Ergebnisse zeigten, daß eine durchschnittliche Pulsenergie von 50µJ (Pulslänge 150fs, Repetitionsrate 5kHz) einen Kompromiß zwischen maximalem Abtrag und thermischem, bzw. photoakustischem Schaden darstellt.

Die Abtragsraten von Geweben (Knochengewebe, Nervengewebe, Muskelgewebe und Knorpelgewebe vom Hausschwein) wurden in Abhängigkeit von der eingestrahlten Pulsenergie eines Femtosekunden-Lasers zwischen 30µJ und 160µJ (Pulslänge 150fs, Repetitionsrate 5kHz) an definierten Semidünnschnitten gemessen. Dabei wurde der Wasseranteil der Gewebeproben zwischen physiologischem Gehalt und wasserfreien Gewebeproben variiert. Besonders bei der Knochenablation konnte ein direkter Einfluß des Gewebefeuchtigkeitsgehalts auf die Abtragsraten ermittelt werden; die Abtragsraten lagen bei physiologischen Wasseranteilen und einer Pulsenergie von 80µJ bis 110µJ um den Faktor 100 über denen der wasserfreien Proben.

Auf zellulärer Ebene konnten an humanen Fibroblasten energiedosisabhängige zyto- und genotoxische Strahlungseffekte beim Femtosekunden-Laser zwischen 0,77J/cm² und 7,75J/cm² (Nachweisgrenze für den Kometen-Assay) gemessen werden. Durch den Einsatz des Radikalfängers DMSO wurde indirekt die Beteiligung von Hydroxylradikalen an den DNA-Schäden nachgewiesen.

Zusammenfassend stellt der Femtosekunden-Laser gegenüber Er:YAG- und CO₂-Laser, im Hinblick auf die thermischen und photoakustischen Schäden, eine Verbesserung der bisherigen Laser-OP-Methoden (Bohren und Schneiden) dar. Die bei allen Pulsenergien des Femtosekunden-Lasers entstehenden strahlungsinduzierten DNA-Schäden könnten jedoch ein Risiko für die klinische Anwendung darstellen.

Schlagnworte: Femtosekunden-Laser, Chirurgie, Toxizität

Abstract

Ever since the early 1980s, various laser systems have been implemented in numerous operative spectrums dealing primarily with the drilling and slicing of tissue. Experimentally established laser systems such as the Er:YAG laser and the CO₂ laser have been known to thermally or photoacoustically damage tissue at the sight of ablation. Due to the development of femtosecond technology (FST), in which material ablation is based upon photodisruption, it may soon be possible to employ this technology for newly developed surgical procedures.

The results established in the present thesis were gathered by studying the effects of treated tissue and cell samples, which were irradiated with a pulsed and intensified Ti:sapphire laser (femtosecond laser). The samples were examined using toxicological screening methods as well as both light and electron microscopy.

It could be demonstrated microscopically that the applied femtosecond pulses (pulse length 150fs, pulse energy 30μJ-100μJ, repetition rate 5kHz) did not generate any thermal damage upon application (guinea pig bone samples). Carbonisation and coagulation zones were also absent upon applying pulse energies between 33μJ-130μJ (pulse length 150fs, repetition rate 5kHz) to soft tissue samples (nerve, fat, muscle) of guinea and domestic pigs.

In addition, photoacoustic damage of nerve tissue and freely dissected cochleae belonging to the guinea pigs were examined as well. Structural instability was seen in the nerve tissue between the Hensen's cells and the phalangeal cells of the cochlea upon using a pulse energy of 100μJ (pulse length 150fs, repetition rate 5kHz). Tearing of the hair cells was also noted upon applying the given pulse energy. These injuries could not be detected upon using pulse energies between 50μJ and 80μJ. In order to experimentally attach a piston to the incus of a guinea pig, photoacoustic sensitive comb-like irradiation patterns (50μJ and 80μJ) were produced for the purpose of surface area enlargement. The results demonstrated that an average pulse energy of 50μJ (pulse length 150fs, repetition rate 5kHz) represents a compromise between maximal ablation and thermal/photoacoustic damage.

The tissue (bone, nerve, muscle and cartilage) ablation rates were measured using a femtosecond laser pulse energy between 30μJ and 160μJ (pulse length 150fs, repetition rate 5kHz) and compared to defined semithin section standards. In addition the water content of the tissue samples was varied in the experiments ranging between a physiological and completely dehydrated level. The direct influence that tissue hydration levels have on ablation rates could especially be established in the bone ablation samples; the ablation rates of the samples containing a physiological water content were 100 times that of the dehydrated samples upon being irradiated with a pulse energy of 80μJ-110μJ.

On a cellular level, energy dose dependent cyto- and genotoxic radiation effects of the femtosecond laser were measured between 0.77J/cm² and 7.75J/cm² (detectable threshold for the comet assay) using human fibroblasts. By implementing the free radical binder DMSO, the participation of hydroxyl radicals in DNA damage could indirectly be proven.

In summary, it can be stated that when compared to the Er:YAG laser and CO₂ laser, in relation to thermal and photoacoustic damage, the femtosecond laser provides an improvement to the previous operative laser methods (drilling and slicing). Risks could however be involved when considering clinical application of the femtosecond laser. These were demonstrated by the radiation induced DNA damage that occurred regardless of the utilized pulse energy.

Key words: femtosecond laser, surgery, toxicity

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
1. Einleitung	16
<i>1.1 Grundlagen der Lasertechnologie</i>	<i>17</i>
<i>1.2 Laser-Gewebe-Wechselwirkungen</i>	<i>22</i>
2. Material und Methoden	35
<i>2.1 Material</i>	<i>35</i>
2.1.1 Gepulster Ti:Saphir-Laser (Femtosekunden-Laser) zur Erzeugung ultrakurzer Pulse	 35
2.1.1.1 Überblick	35
2.1.1.2 Resonator-/Oszillatorsystem	36
2.1.1.3 Ultrakurzpuls-Verstärker-System	38
2.1.2 Zelllinien und Gewebe	40
2.1.3 Chemikalien	24
2.1.4 Puffer und Lösungen	25
2.1.5 Geräte und Software	29
<i>2.2 Methoden</i>	<i>41</i>
2.2.1 Paraffineinbettung, Schneiden und HE-Färbung von Weichgeweben	 41
2.2.2 Haarzellpräparation	42
2.2.3 Vorbereitung für die Rasterelektronenmikroskopie (REM)	44
2.2.4 Temperaturmessung/-effekte	44
2.2.5 Druckmessung/-effekte	46
2.2.6 Bestimmung gewebespezifischer Abtragsraten	47
2.2.7 Zellkultivierung	49

2.2.8	Bestimmung der akuten Zytotoxizität mit dem MTT-Test	50
2.2.9	Bestimmung energiedosisabhängiger DNA-Strangbruchinduktion mit dem Kometen-Assay	53
3.	Ergebnisse	58
3.1	<i>Temperaturmessung/-effekte</i>	58
3.2	<i>Druckmessung/-effekte</i>	64
3.3	<i>Bestimmung gewebespezifischer Abtragsraten</i>	71
3.4	<i>Bestimmung der akuten Zytotoxizität mit dem MTT-Test</i>	72
3.5	<i>Bestimmung energiedosisabhängiger DNA-Strangbruchinduktion (Gentoxizität) mit dem Kometen-Assay</i>	73
4.	Diskussion	84
4.1	<i>Temperaturmessung/-effekte</i>	84
4.2	<i>Druckmessung/-effekte</i>	88
4.3	<i>Gewebespezifische Abtragsraten</i>	93
4.4	<i>Akute Zytotoxizität (MTT-Test)</i>	95
4.5	<i>Gentoxizität (Kometen-Assay)</i>	97
4.6	<i>Schlußfolgerung</i>	104
5.	Literaturverzeichnis	106
Anhang		117
A.	<i>Chemikalien</i>	117
B.	<i>Puffer und Lösungen</i>	119
C.	<i>Geräte und Software</i>	123

Danksagung

Lebenslauf

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1: Stimulierte Emission durch ein Photon gleicher Energie	18
Abb. 2: Hornhautkorrektur mittels fs-LASIK	21
Abb. 3: Prozeßbereiche der Laser-Gewebe-Wechselwirkungen in Abhängigkeit von Laserintensität und Wirkungsdauer	22
Abb. 4: Chromosomen-Strukturveränderungen als Folge von Bestrahlungen	27
Abb. 5: Strahlenschäden an der DNA	28
Abb. 6: Reparatur von Strahlenschäden an der DNA: molekulare Mechanismen zur Heilung von Strangbrüchen oder Basenschäden	31
Abb. 7: Zusammenfassung von DNA-Schädigung und -Reparatur nach ionisierender Strahlung	33
Abb. 8: Ti:Saphir-Femtosekunden-System der Firma THALES	35
Abb. 9: Erzeugung kurzer Pulse	37
Abb. 10: Optischer Kerr-Effekt	38
Abb. 11: Prinzip der CPA (chirped pulse amplification)	39
Abb. 12: Funktionsprinzip von Strecker und Kompressor zur zeitlichen Pulsveränderung	39
Abb. 13: Plexiglas [®] -Kammer (PMMA) für die Temperaturmessung mit PVDF-Zylinder und Temperatursensor	45
Abb. 14: Schematischer Versuchsaufbau zur Messung der Druckent- wicklung <i>in vitro</i>	46
Abb. 15: Meßtool für Gewebedickenbestimmung mit digitalem Pulszähler	48
Abb. 16: Fs-Laser abladiert nach erfolgter Dickenmessung porcines Muskelgewebe auf einem graphitbeschichteten Objektträger	48
Abb. 17: Reaktionsschema und molekulare Struktur von MTT und Formazan	50
Abb. 18: Ungeschädigte und geschädigte DNA nach Elektrophorese	53
Abb. 19: Angeheftete Fibroblasten in Petrischalen	54
Abb. 20: Temperaturänderung von Wasser bei Bestrahlung mit einem gepulsten Ti:Saphir-Laser	58

Abb. 21: Temperaturänderung von Wasser bei Bestrahlung mit einem freilaufenden Er:YAG-Laser	59
Abb. 22: Temperaturänderung von Wasser bei Bestrahlung mit einem gepulsten CO ₂ -Laser	59
Abb. 23: Temperaturerhöhung [°C] in Abhängigkeit von der mittleren eingestrahlten Leistung [mW] verschiedener Lasertypen	60
Abb. 24: Oberfläche bestrahlter Kochleae (Meerschweinchen)	61
Abb. 25: Oberfläche eines abgetrennten Amboß-Fortsatzes (Meerschweinchen)	62
Abb. 26: Nervengewebe vom Hausschwein nach Bestrahlung	62
Abb. 27: Nervengewebe vom Meerschweinchen nach Bestrahlung	63
Abb. 28: Fett- und Muskelgewebe vom Hausschwein nach Bestrahlung	63
Abb. 29: Nervengewebe vom Hausschwein nach Bestrahlung (Er:YAG)	64
Abb. 30: Spitzendruckentwicklung (peak to peak) in Abhängigkeit vom Abstand zwischen Laserfokus und Drucksensor	64
Abb. 31: Ermittlung des minimal möglichen Linienabstandes bei Hartgewebe	65
Abb. 32: Wabenförmig bestrahlter Amboß (Meerschweinchen)	66
Abb. 33: Unbestrahltes Nervengewebe mit sternförmigen Zerreißen als Entwässerungs-/Schneideartefakt	66
Abb. 34: Bestrahltes Nervengewebe vom Meerschweinchen	67
Abb. 35: Bestrahltes Nervengewebe vom Meerschweinchen (Nervus facialis)	67
Abb. 36: Ungeschädigte Zilien eines Innenohres (Meerschweinchen)	68
Abb. 37: Intakte Zilien einer Kochlea (Meerschweinchen) direkt neben einem Ablationskrater (mittlere Pulsenergie 50µJ)	68
Abb. 38: Intakte Zilien einer Kochlea (Meerschweinchen) direkt neben einem Ablationskrater (mittlere Pulsenergie 80µJ)	69
Abb. 39: Zilien einer Kochlea (Meerschweinchen) mit deutlichen Strukturauflockerungen zwischen Hensenschen Zellen und Phalangenzellen (mittlere Pulsenergie 100µJ)	69
Abb. 40: Zilien einer Kochlea (Meerschweinchen) mit Verformungen (nach Beschuß mit Er:YAG-Laser)	70

Abb. 41: Zilien einer Kochlea (Meerschweinchen) mit Verformungen und Scherungen (nach Beschuß mit Er:YAG-Laser)	70
Abb. 42: Abtragsraten für verschiedene Gewebe	71
Abb. 43: Vitalitätsveränderung bei Fibroblasten in Abhängigkeit von der eingestrahlten Energiedosis [J/cm^2]	72
Abb. 44: Vermessung von Ablationskratern in Agarose	74
Abb. 45: Lineares Verhältnis zwischen eingestrahlter Pulsenergie und Fokusdurchmesser (Ablationsdurchmesser)	74
Abb. 46: Scan-Raster des Ti:Saphir-Lasers in Agarose (0,5%)	75
Abb. 47: Einfluß des LMP-Agarosegehaltes als Einbettmedium auf das „tail moment“ bestrahlter Zellen (0,5% und 0,35%)	75
Abb. 48: Verhältnis zwischen Einzelstrangbrüchen (SSBs) und Doppelstrangbrüchen (DSBs) bei NHDF-Zellen nach erfolgter Bestrahlung mit einem Ti:Saphir-Laser	76
Abb. 49: Einzelstrangbrüche (SSBs) bei NHDF-Zellen und N57-Zellen nach erfolgter Bestrahlung mit einem Ti:Saphir-Laser (Pulslänge 150fs)	77
Abb. 50: Einzelstrangbrüche (SSBs) bei NHDF-Zellen und N57-Zellen nach erfolgter Bestrahlung mit einem Ti:Saphir-Laser (Pulslänge 400fs)	77
Abb. 51: Einzelstrangbrüche (SSBs) bei NHDF-Zellen nach erfolgter Bestrahlung mit einem Ti:Saphir-Laser (Pulslänge 150fs und 400fs)	78
Abb. 52: Einzelstrangbrüche (SSBs) bei NHDF-Zellen nach erfolgter Bestrahlung mit einem Ti:Saphir-Laser in Ab- und Anwesenheit von DMSO (8%)	79
Abb. 53: Einzelstrangbrüche (SSBs) bei N57-Zellen nach erfolgter Bestrahlung mit einem Ti:Saphir-Laser in Ab- und Anwesenheit von DMSO (8%)	79
Abb. 54: Individuelle DNA-Schadensverteilung bei N57-Zellen nach erfolgter Bestrahlung mit einem Ti:Saphir-Laser in Abhängigkeit der jeweiligen Energiedosis	80

Abb. 55: Individuelle DNA-Schadensverteilung bei N57-Zellen mit DMSO nach erfolgter Bestrahlung mit einem Ti:Saphir-Laser in Abhängigkeit der jeweiligen Energiedosis	81
Abb. 56: Individuelle DNA-Schadensverteilung bei N57-Zellen nach erfolgter Bestrahlung mit einem Ti:Saphir-Laser in Ab- und Anwesenheit von DMSO (8%) bei einem durchschnittlichen „tail moment“ von etwa 12000	82
Abb. 57: Individuelle DNA-Schadensverteilung bei NHDF-Zellen und N57-Zellen nach erfolgter Bestrahlung mit einem Ti:Saphir-Laser bei einem durchschnittlichen „tail moment“ von etwa 3300	83

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Geschätzte DNA-Schädigungen in Humanzellen pro Tag	30
Tab. 2: Bestrahlungsplan für den MTT-Test	51
Tab. 3: Bestrahlungsplan für den Kometen-Assay	55
Tab. 4: Starttemperatur und die Modell-Parameter zur Lage und Steigung der Temperaturmessung bei Er:YAG-Laser, CO ₂ -Laser und Ti:Saphir-Laser	58
Tab. 5: Verhältnis von eingebrachter Leistung pro Temperaturerhöhung um einen Grad Celsius bei CO ₂ -Laser, Er:YAG-Laser und Ti:Saphir-Laser	60
Tab. 6: Modell-Parameter [V] zur Lage und Steigung des jeweiligen Gewebeabtragsmodells der verschiedenen Gewebe	72

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
τ	Pulslänge
μg	Mikrogramm
$\mu\text{g/ml}$	Mikrogramm pro Milliliter
μJ	Mikrojoule
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μs	Mikrosekunde
μS	Mikrosiemens
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ALS	Alkali-labile Sites
Ar^+	Argon
ArF	Argon-Fluor
ATP	Adenosintriphosphat
bar	Bar
BTS	Bow Tie Scanning
C	Cytosin
Ca^{2+}	Calcium-Ion
CCD	Charge Coupled Device
CI	Konfidenzintervall
cm	Zentimeter
CO_2	Kohlendioxid
CPA	Chirped Pulse Amplification
CPD	Critical-Point-Drying
$\text{Cr}^{3+}:\text{Al}_2\text{O}_3$	Chrom:Aluminiumoxid
Cu^+	Kupfer-Ion
cw	Continuous Wave
DFM	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid

DSB	Double Strand Break
EC ₃₀	Effect Concentration 30%
EC ₅₀	Effect Concentration 50%
EC ₇₀	Effect Concentration 70%
ELAN	Extraluminal Laser Angioplasty
Er:YAG	Erbium:Yttrium-Aluminium-Granat
<i>et al.</i>	et alii
exp	Exponent
f	Brennweite
f	Frequenz
Fe ²⁺	Eisen-Ion
Fe ³⁺	Eisen-Ion
FKS	Fötale Kälberserum
fs	Femtosekunde
FST	Femtosekundentechnologie
g	Gramm
G	Guanin
Geschw.	Geschwindigkeit
h	Plancksches Wirkungsquantum
H ⁺	Wasserstoffproton
HCl	Chlorwasserstoff
HE	Hämalaun / Eosin
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hz	Hertz
J	Joule
J/cm ²	Joule pro Quadratcentimeter
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kHz	Kilohertz
KLM	Kerr-Lens Modelocking
KrF	Krypton-Fluor
l	Liter

LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LASIK	Laser in situ Keratomileusis
LCD	Liquid Crystal Display
LIB	Laser Induced Breakdown
LMP	Low Melting Point
LZH	Laserzentrum Hannover
M	Molar
mA	Milliampere
mbar	Millibar
MEM	Minimum Essential Medium
Mg ²⁺	Magnesium-Ion
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
min.	Minuten
mJ	Millijoule
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mm/s	Millimeter pro Sekunde
mol	Mol
MPI	Multi-Photonen-Ionisation
m/s	Meter pro Sekunde
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mV	Millivolt
mW	Milliwatt
mW/°C	Milliwatt pro Grad Celsius
n	Stichprobenanzahl
N57 (GM 05757)	Primäre humane dermale Fibroblasten
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphatmonohydrat

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat
NaOH	Natriumhydroxid
Nd	Neodymium
Nd:YAG	Neodymium: Yttrium-Aluminium-Granat
Nd:YLF	Neodymium: Yttrium-Lithium-Fluor
NHDF	Normale humane dermale Fibroblasten
NIR	Near Infrared Radiation
nm	Nanometer
N_2O	Distickstoffoxid
NO^\bullet	Stickstoffmonoxidradikal
ns	Nanosekunde
O_2	Sauerstoff
$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Superoxidradikalanion
O_3	Ozon
OH^\bullet	Hydroxylradikal
OH^-	Hydroxid-Ion
P	Wahrscheinlichkeit für Signifikanz
PB	Phosphate Buffer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCD	Programmed Cell Death
PDT	Photodynamische Therapie
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prüfgröße
PMMA	Polymethylmethacrylat
ps	Pikosekunden
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R^2	korrigiertes Bestimmtheitsmaß
Redox	Reduktion-Oxidation
REM	Rasterelektronenmikroskop
RO^\bullet	Sauerstoffradikal mit einem unbestimmten Anhang
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	Rounds per minute
s	Sekunde

SCGE	Single Cell Gel Electrophoresis
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFM	Serumfreies Medium
SIS	Synchronised Image Scanning
SOD	Superoxid-Dismutase
SSB	Single Strand Break
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Temp.	Temperatur
Ti	Titan
TIF	Tagged Image File
tm	Tail Moment
Tris	Tris-[hydroxymethyl]aminomethan
U	Units
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

Der Einsatz von Lasern in der Medizin eröffnet seit mehr als 20 Jahren verfeinerte Techniken der minimal-invasiven Therapie. In der Mikrochirurgie sind durch das "optische Skalpell" viele neuartige Operationen erst möglich geworden. Veränderungen einzelner Behandlungskonzepte haben sich bereits in den letzten Jahren fest etabliert. Problematisch ist jedoch weiterhin die thermische Schädigung des angrenzenden Gewebes, die differenzierte intraoperative Entfernung von Gewebe und die unterschiedliche und somit nicht genau vorhersehbare Laserwirkung an den verschiedenen Gewebearten.

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, welche Effekte an Geweben durch die Bestrahlung mit einem gepulsten und verstärkten Titan-Saphir-Laser auftreten. Dazu werden licht- und rasterelektronenmikroskopische Präparate angefertigt. Neben den Rahmenparametern Temperatur- und Druckentwicklung sollen Abtragsraten für verschiedene Gewebe ermittelt werden.

Aufgrund der ionisierenden Wirkung der ultrakurzen Laserpulse soll weiterhin untersucht werden, ob es zu einer Bildung von Radikalen kommt und ob diese die Kern-DNA von Zellen schädigen. In Zellkulturversuchen sollen mögliche gen- und zytotoxische Effekte aufgezeigt werden.

Die Arbeiten wurden in den Forschungslaboren der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) und im Laserzentrum Hannover (LZH) durchgeführt.

In Kapitel 1 werden die Grundlagen der Lasertechnologie, das Wirkungsprinzip und die Entwicklung der Festkörperlaser bis zur Femtosekundentechnologie (FST) behandelt. Neben einer exemplarischen Übersicht auf die zur Zeit praktizierten Anwendungsbereiche der FST in Industrie und „Life Sciences“ wird auf Laser-Gewebe-Wechselwirkungen in Abhängigkeit von Laserintensität und Wirkungsdauer eingegangen. Dabei werden strahlungsinduzierte genetische Veränderungen, deren Reparatur und die möglichen Folgen auf zellulärer Ebene betrachtet. Ein Überblick der bisher durchgeführten Untersuchungen auf die DNA-schädigende Wirkung bei Lasersystemen mit unterschiedlichen Wellenlängen bildet den Abschluß des ersten Kapitels.

Das zweite Kapitel behandelt den Aufbau und das Funktionsprinzip des verwendeten Titan-Saphir-Lasers. Das Resonator-/Oszillatorsystem zur Erzeugung ultrakurzer Pulse und das Ultrakurzpuls-Verstärker-System werden beschrieben. Es folgt eine kurze Auflistung der verwendeten Zelllinien und Gewebe, deren versuchsbezogene Aufarbeitung im nachfolgenden Methodenteil beschrieben wird. Dort werden auch die einzelnen Meßverfahren (thermisch, photoakustisch, gewebespezifischer Abtrag, toxikologisch) erklärt.

Im dritten Kapitel werden die Ergebnisse zu den Messungen in Form von Tabellen, graphischen Abbildungen und mikroskopischen Aufnahmen dargestellt.

In Kapitel 4 werden die Ergebnisse kritisch diskutiert. Es werden Stärken und Schwächen der Versuchsaufbauten und -durchführungen herausgestellt und Vorschläge zu weiterführenden Messungen benannt.

Das fünfte Kapitel beinhaltet die nach Erstautor in alphabetischer Reihenfolge sortierte Auflistung der für diese Arbeit verwendeten Literatur.

Im Anhang befinden sich Auflistungen der Chemikalien, die Zusammensetzungen von Puffer und Lösungen sowie die verwendeten Geräte und Software.

1.1 Grundlagen der Lasertechnologie

Wirkungsprinzip Laser

Der Begriff LASER (**L**ight **a**mplification by **s**timulated **e**mission of **r**adiation) steht für eine artifizielle Emission von Photonen mit gleicher Energie und gleicher Richtung. Außerdem sind die Photonen zueinander in Phase, ihre Maxima und Minima der transversalen Wellenbewegung sind zeitgleich (kohärent).

Nach dem Bohrschen Atommodell, bei dem Elektronen auf Bahnen mit einem bestimmten Radius und bestimmter Energie um den Atomkern kreisen, steigt das Energieniveau eines Elektrons mit zunehmender Entfernung vom Kern. Wird elektromagnetische Strahlung mit ausreichender Energie von einem Atom absorbiert, so können die Elektronen auf eine Bahn mit größerem Radius übergehen (das Atom wird angeregt). Die gleiche Energie wird wieder in Form von Strahlung emittiert, wenn die Elektronen auf ihre Ausgangsbahnen zurückkehren (Quantensprung). Trifft ein Photon mit ausreichender Energie auf ein Atom im bereits angeregten Zustand, so geht das Elektron nicht auf eine weitere Bahn über, sondern kehrt auf eine energiearme Bahn zurück und gibt seine Energie in Form eines weiteren Photons ab, des-

sen Energie gleich der des stimulierenden Photons ist. Die Intensität des Lichts ist verstärkt (Abb. 1).

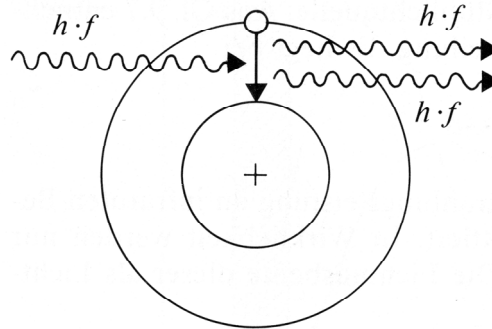


Abb. 1: Stimulierte Emission durch ein Photon gleicher Energie ($E=h\cdot f$; h =Plancksches Wirkungsquantum, f =Frequenz der elektromagnetischen Strahlung; aus Gonsior, 1984).

Das Prinzip der stimulierten Photonenemission wurde von Albert Einstein postuliert (Einstein, 1917) und bildet die theoretische Grundlage der Lasertechnologie. Als Medium für Atome dienen bei Festkörperlasern meistens Kristalle mit Metallanteilen, die viele dicht in einem Valenzband liegende Anregungsenergien aufweisen und durch Lichtenergie auf ein höheres Energieniveau gebracht werden (optisches Pumpen). Dabei liegt der effektive Wirkungsgrad vieler Laser (zum Beispiel Ar^+ -Laser), definiert als Quotient zwischen abgegebener Strahlungsleistung und aufgewendeter elektrischer Leistung, meist unter 0,1% (Kneubühl & Sigrist, 1999). Bei der Betrachtung des differentiellen Wirkungsgrades, definiert als Quotient von Laserausgangsleistung zu Pumpstromleistung, erreichen Dioden-Laser etwa 50% (Kneubühl & Sigrist, 1999).

Entwicklung der Festkörperlaser

Die Realisierung des ersten Lasers gelang Maiman in der Mitte des 20. Jahrhunderts (Maiman, 1960). Es handelte sich dabei um einen Rubin-Laser ($\text{Cr}^{3+}:\text{Al}_2\text{O}_3$) mit einer Ausgangsleistung von etwa einem Watt. Bereits im folgenden Jahr wurde die Idee der aktiven Güteschaltung (engl.: Q-switch) entwickelt (Hellwarth, 1961), mit deren Hilfe der zu verstärkende Lichtstrahl erst dann am Kristall ankommt, wenn die Elektronen ihre maximal mögliche Anregung besitzen. Die nach diesem Prinzip konstruierten Laser werden auch als Riesenpulslaser bezeichnet.

In Form einer rotierenden Blende kam die aktive Güteschaltung ein Jahr später zum Einsatz (Collins & Kisliuk, 1962). Die so erreichbaren Laserpulsdauern liegen bei 50 – 100ns mit Spitzenleistungen im Megawatt-Bereich (Kneubühl & Sigrist, 1999).

Um eine noch kürzere Pulsdauer und höhere Spitzenleistungen zu bekommen, bedurfte es einer weiteren Technik: der Modenkopplung oder Modensynchronisation (engl.: mode-locking). Als Moden werden die elektromagnetischen Eigenschwingungen in einem Hohlraum (hier: im Laser-Resonator) bezeichnet, unter Kopplung versteht man die Einstellung einer festen Phasendifferenz/-beziehung (Voraussetzung: zwischen die Spiegel des Resonators dürfen nur ganzzahlige Vielfache der Wellenlängen passen). Als Resultat der Phasenkopplung interferieren die Moden im Resonator konstruktiv und die Laserstrahlung wird in Form kurzer Pulse emittiert (Beschreibung Modenkopplung siehe Kap. 2.1.1.2).

Daraus folgt, daß die Pulse umso kürzer werden, je größer die Modenanzahl mit Phasendifferenz wird. Limitierend wirkt dabei das Lasermedium, das nur eine begrenzte spektrale Linienbreite zur Anregung toleriert. So können Gaslaser keine Pulsdauern unter ca. 0,1ns erzeugen, während bei Festkörperlaser mit den entsprechend großen Linienbreiten Pulsdauern im fs-Bereich (Kneubühl & Sigrist, 1999) möglich sind.

Die ersten aktiven Modenkopplungen konnten von Hargrove, Fork und Pollack (1964) und Harris und Targ (1964) demonstriert werden. Aktiv bedeutet, daß durch einen extern gesteuerten Modulator die optische Wellenlänge im Resonator so verändert wird, daß es zur einer Modenmodulation kommt.

Passive Modenkopplung in einem Rubin-Laser gelang Mocker und Collins (1965) mit Hilfe eines sättigbaren Absorbers. Ein sättigbarer Absorber (zum Beispiel ein Kristall, der bei der Laserwellenlänge absorbiert) wird als passiver Schalter eingesetzt, bei dem der Schaltzeitpunkt nicht von außen vorgegeben, sondern durch die Strahlungsintensität selbst bestimmt wird. Ein derartiges Schaltelement stellt die einfachste Methode für die Güteschaltung (engl.: Q-switch) dar (Koechner, 1996). Pulse im ps-Bereich durch passive Modenkopplung erzielten DeMaria, Stetser und Heynau (1966) bei einem Nd-Glas-Laser.

Obwohl es bei Farbstoff-Lasern bereits 1974 gelang, Pulse unter einer Pikosekunde zu erzeugen (Shank & Ippen, 1974), dauerte die Entwicklung bei Festkörper-Lasern an. Erst die Kombination aus dem 1982 entwickelten Ti:Saphir-Laser (Moulton, 1982) und der Chirped-Pulse-Verstärkung (engl.: chirped-pulse-amplification, CPA; Strickland & Mourou, 1985) ergab ultrakurze Pulse ($\tau < 1\text{ps}$) mit einer Pulsenergie, die eine Materialbearbeitung ermöglichten.

Die Technik der CPA erlaubt eine Verstärkung um den Faktor 10000 oder mehr (Bloembergen, 1999). Sie beruht auf einer zeitlichen Dehnung der vom Femtosekun-

den-Oszillator erzeugten Pulse mittels optischer Gitter, die nach Verstärkung an einem weiteren Gitter wieder komprimiert werden (Beschreibung CPA siehe Kap. 2.1.1.3).

Die kürzesten Pulsdauern betragen für Festkörper-Laser etwa 6,5fs bei ca. 800nm Wellenlänge (Jung *et al.*, 1997; Keller *et al.*, 1996). Dabei handelt es sich um einen Ti:Saphir-Laser, welcher mit einer Kerr-Linsen-Modenkopplung (KLM; engl.: Kerr-lens modelocking; siehe Kap. 2.1.1.2) ausgerüstet ist. Die aller kürzesten erzeugten Laserpulse mit einer Dauer von 4,5fs wurden durch die Kompression von 20fs-Pulsen eines Ti:Saphir-Lasers in einer gasgefüllten hohlen Silikatfaser erzeugt (Nisoli *et al.*, 1997).

Die Pulsspitzenleistung reicht bei Hochleistungsgeräten von Tera- bis zu Petawatt (Perry & Mourou, 1994; Mourou *et al.*, 1998).

Anwendungsbereiche der Femtosekudentechnologie

Die Anwendungsbereiche der Femtosekudentechnologie (FST) sind vielfältig; sie reichen von der industriellen Nutzung bis zum Einsatz in Kliniken und den sogenannten „Life Sciences“.

Industrielle Fertigungstechniken und –verfahren

- Herstellung und Bearbeitung von technischen Oberflächen zur Erstellung von Mikro- und Nanotexturen (zum Beispiel in der Autoindustrie und im Flugzeugbau; Kulik, 2003)
- Produktion von Leiterbahnen nach dem Maskenabbildungsverfahren (Kulik, 2003)
- Kristallisationsverfahren zur Produktion von LCD Displays (Pippert, 2003)
- Bow Tie Scanning (BTS; Anwendung bei der Solarzellenproduktion; Booth, 2003)
- Synchronised Image Scanning (SIS; Anwendung bei der Produktion von Tintenstrahl-druckerdüsen; Booth, 2003).

Einsatz in Klinik und „Life Sciences“

In der Ophthalmologie eröffnet die Femtosekudentechnologie die Möglichkeit der Hornhautkorrektur (Kurtz *et al.*, 1998) ohne den Einsatz von mechanischen Schneidewerkzeugen (Mikrokeratomen), welche als fs-LASIK (engl.: Laser in situ kerato-

mileusis; Abb. 2) bezeichnet wird. Histologische Untersuchungen zeigen den schonenden und sehr präzisen Gewebeabtrag mittels ultrakurzer Laserpulse (Lubatschowski *et al.*, 2000; Heisterkamp *et al.*, 2001, Heisterkamp, 2002).

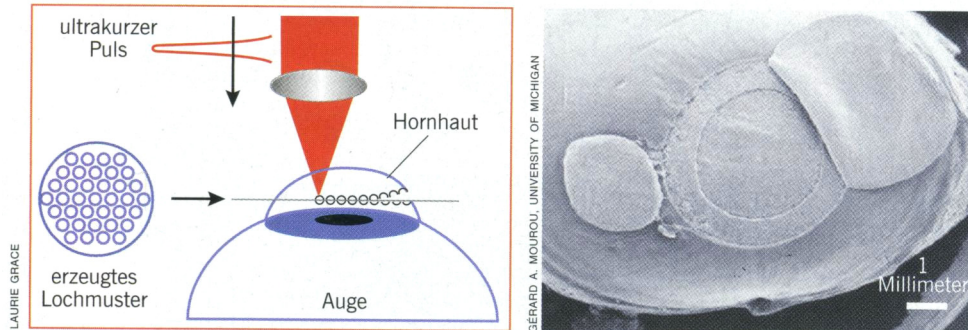


Abb. 2: Hornhautkorrektur mittels fs-LASIK (aus Hopkins & Sibbett, 2000).

Im Bereich der Zahnmedizin sind minimal-invasive Behandlungen von Karies von zunehmender Bedeutung: Wie Untersuchungen zeigen, können bei den etablierten Verfahren wie Mikrobohrer (Xu *et al.*, 1997) und Er:YAG-Laser (Frentzen und Hamrol, 2000) durch mechanische und thermische Belastungen Mikrorisse im Zahnschmelz entstehen. Diese Risse stellen mögliche Bereiche neuer Kariesbildung dar. Die FST ermöglicht hier durch ihre Arbeitsweise eine schonende Materialbearbeitung: Mikrorisse und Schmelzzonen konnten nicht nachgewiesen werden (Lubatschowski *et al.*, 2003).

Für Anwendungen in der Mittelohrchirurgie, zum Beispiel der Stapedektomie (Shea, 1958), konnten sehr exakte Kavitäten (Präzision in lateraler Richtung im Mikrometerbereich) in humanen Ossikeln erzeugt werden. Thermische Wechselwirkungen wurden nicht gefunden (Schwab *et al.*, 2004).

Eine weitere mögliche Anwendung der FST findet sich im Bereich kardiovaskulärer Erkrankungen: Bei Atherosklerose (Verengung von Blutgefäßen durch Ablagerungen) besteht durch reduzierten Blutdurchfluß die Gefahr von Herzinfarkt oder Schlaganfall. Etablierte Techniken wie Bypass oder Ballon-Angioplastie sollen eine weitere Blutversorgung sicherstellen. Mittels Lasertechnik soll nun in einem neuen Verfahren (ELAN; engl.: Extraluminal laser angioplasty) versucht werden, Oberflächengewebe im Bereich des Gefäßverschlusses zu entfernen. Durch den Blutdruck führt die Reduzierung der Gefäßwanddicke zu einer Weitung der Ader, der Blutfluß erhöht sich (Lubatschowski *et al.*, 2003).

In den „Life Sciences“ findet die FST weniger Anwendung im Entfernen von Material, als vielmehr in der Verfeinerung von Meß- und Darstellungsverfahren. Als „Optische Pinzette“ (engl.: laser tweezers, optical traps) wird sie für Mikromanipulationen an Zellen und zur Zellsortierung benutzt (König, 2000). Im Bereich der bildgebenden Verfahren findet sie Anwendung als Strahlenquelle für Fluoreszenzdarstellungen bei Multiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskopen (König, 2000).

1.2 Laser-Gewebe-Wechselwirkungen

Prozeßbereiche

Betrachtet man die Laser-Gewebe-Wechselwirkungen in Abhängigkeit von Intensität und Wechselwirkungsdauer der Strahlung, so lassen sich fünf verschiedene Prozeßbereiche einteilen (Abb. 3).

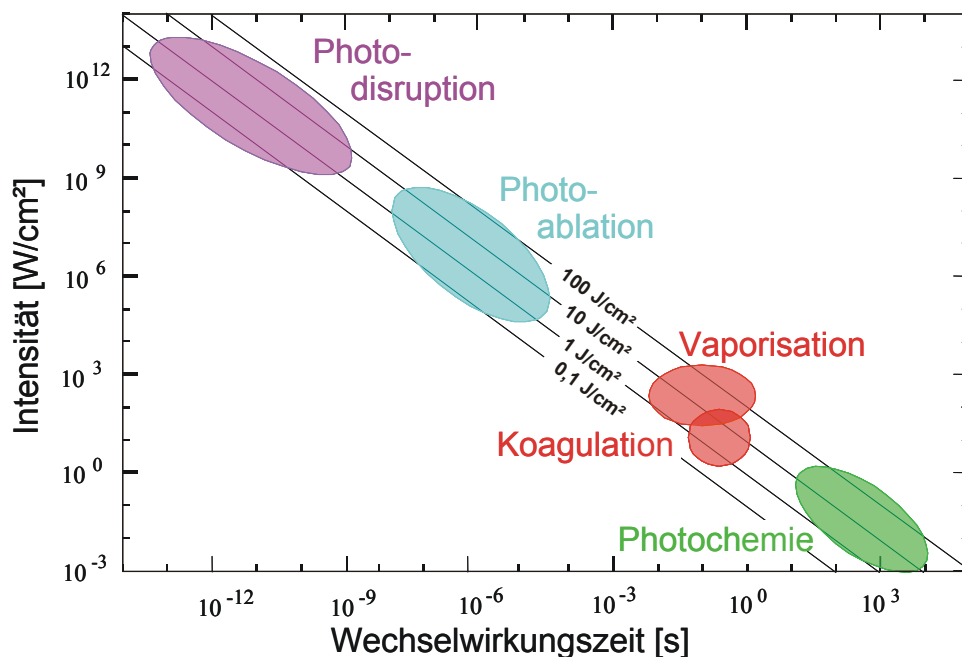


Abb. 3: Prozeßbereiche der Laser-Gewebe-Wechselwirkungen in Abhängigkeit von Laserintensität und Wirkungsdauer (nach Lubatschowski, 1994 und Boulnois, 1986).

Photochemie

Bei niedrigen Laserintensitäten und langer Einstrahlungsdauer steht die sogenannte Photochemie im Vordergrund. Reaktionen auf makromolekularer Ebene finden statt: Ein Beispiel ist die Photodynamische Therapie (PDT), bei der durch den strahlungsbedingten Zerfall von zuvor eingebrachten Farbstoffmolekülen (Photosensitizer) Tumoren durch toxische Reaktionen bekämpft werden. Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden die ersten Photosensitizer erprobt (Tappeiner & Jesionek,

1903). Ein weiteres Gebiet ist die Biostimulation von Stoffwechselprozessen: So kann zum Beispiel durch Übertragung der Photonenenergie auf die Redox-Zentren der Enzymkomplexe der Atmungskette die ATP-Synthese an der Mitochondrienmembran gesteigert werden (Karu, 1989a; Karu, 1989b).

Vaporisation und Koagulation

Erhöht sich die Laserintensität (von $1\text{W}/\text{cm}^2$ bis $1\text{KW}/\text{cm}^2$), und die Einstrahlungsdauer liegt im Bereich von Millisekunden bis zu einigen Sekunden, so werden thermische Effekte sichtbar: Koagulation (Gerinnung) und, bei höheren Intensitäten, Vaporisation (Verdampfung). Neben einer Temperaturabhängigkeit besteht bei Laser-Gewebe-Wechselwirkungen auch eine zeitliche Abhängigkeit, die mathematisch durch die Arrhenius-Gleichung beschrieben wird.

In der Medizin kommen Laser mit thermischem Wirkungsbereich (zum Beispiel CO_2 -Laser) beim gewünschten Gewebeschnitt ohne Einblutung zum Einsatz: Durchtrennte Blutgefäße werden durch Koagulation sofort wieder verschlossen.

Photoablation

Bei der Photoablation (Srinivasan & Mayne-Banton, 1982) steht nicht ein bestimmter Wechselwirkungsmechanismus im Vordergrund, vielmehr steht der Begriff für einen extrem schonenden und präzisen Abtrag, wobei der zugrundeliegende Mechanismus bei unterschiedlichen Strahlungsquellen differieren kann. Bei der Photoablation durch UV-Strahlung (Excimer-Laser) werden direkt Molekülbindungen gespalten (Photolyse), während bei Strahlungen im Nah-Infrarotbereich (Nd:YAG-Laser) das im Gewebe befindliche Wasser zur Verdampfung gebracht wird. Die Definition des Begriffes Ablation vollzieht sich daher über die Phänomenologie des erzielten Ergebnisses und die dafür benötigten Laserparameter (Lubatschowski, 1994). Die Wechselwirkungszeiten zum Erreichen der Photoablation liegen im Nano- bis Mikrosekunden-Bereich verbunden mit Laserintensitäten von $10^6 - 10^8\text{W}/\text{cm}^2$.

Um große thermische Schädigungszonen in benachbarten Geweben zu verhindern, sollte die Dauer des Laserpulses kürzer als die thermische Relaxationszeit sein (Lubatschowski, 1994). Die thermische Relaxationszeit eines bestrahlten Körpers gibt an, wie schnell eine lokal absorbierte Energiedosis in benachbarte Bereiche unter Abkühlung abgegeben wird. Energie, die innerhalb der thermischen Relaxationszeit einem Körper zugeführt wird, bleibt auf diesen konzentriert und entfaltet nur

eine geringe Wirkung auf angrenzende Bereiche. Daraus ergibt sich eine Pulsdauer, je nach Gewebe, von etwa $1\mu\text{s}$ bis $100\mu\text{s}$.

Ein weiterer möglicher thermischer Effekt ist die Ausbildung von Kavitationsblasen in wässrigen Medien. Da Weichgewebe meistens aus über 70% Wasser bestehen (Duck, 1990), kann folgender Effekt eintreten: Durch den Temperaturanstieg um den Fokus herum dehnt sich das Gewebe aus und reißt. Es entsteht ein wasserdampfgefüllter Hohlraum, eine Kavitationsblase. Die Größe dieser Blasen kann bis zu einigen Millimetern betragen und die angestrebte Präzision beim Abtrag verhindern (Lubatschowski, 1994). Besonders in der Nähe von Grenzflächen biologischer Gewebe kann der Effekt der Kavitation durch die sogenannte Jetbildung noch zu einer verstärkten Gewebeschädigung führen (Vogel *et al.*, 1996).

Kavitation ist jedoch nicht nur auf den Bereich der Photoablation beschränkt, sie kann auch bei der Photodisruption auftreten.

Alle bisher angesprochenen Laser-Gewebe-Wechselwirkungen (Photochemie, Koagulation, Vaporisation, Photoablation) basieren auf linearer Absorption, das heißt die Absorptionseigenschaften des Materials und die eingetragene Energie bestimmen den Ort der strahlungsinduzierten Effekte.

Photodisruption

Bei der Photodisruption (ab einer Laserintensität von $1\text{GW}/\text{cm}^2$ und Wechselwirkungszeiten im ns-Bereich oder kürzer) dominiert nicht-lineare Absorption den Abtrag, während die lineare Absorption im Pikosekunden- und Femtosekundenbereich eine vernachlässigbare Rolle spielt (Heisterkamp, 2002). Das bedeutet, daß ein Effekt fast nur noch von der eingetragenen Energie abhängig ist, Absorptionseigenschaften von Materialien verlieren ihren Einfluß. Daraus resultiert, daß sich fast alle Materialien bearbeiten lassen.

Die gleichzeitige Absorption mehrerer Photonen durch ein Atom oder Molekül führt zu einer Energiesummation, die die zur Ionisation notwendige Energie überschreitet und zur Plasmazündung führt (Multi-Photonen-Ionisation (MPI); Stuart *et al.*, 1995). Die Temperaturentwicklung im Plasma kann bis zu 15000°C betragen (Birngruber *et al.*, 1977), jedoch wird diese Energie innerhalb einiger Pikosekunden an die Ionen und Atome abgegeben (Nolte, 1999).

Ein additiver Effekt zur Multi-Photonen-Ionisation ist die Kaskaden-Ionisation. Sind bereits freie Elektronen vorhanden (zum Beispiel durch MPI oder lineare Absorpti-

on), so können diese freien Elektronen (engl.: lucky electrons, seed-electrons) durch die Strahlung beschleunigt werden und mit anderen Atomen kollidieren. Eine Ionisation dieser Atome ist die Folge, wobei pro Atom ein weiteres Elektron freigesetzt wird. Eine Kaskade der Ionisation läuft ab.

Bei einem 100fs-Puls greift zu Pulsbeginn die Multi-Photonen-Ionisation und führt über die Pulslaufzeit zur Kaskaden-Ionisation. Am Ende des Pulses sind etwa 99% aller freien Elektronen durch Kaskaden-Ionisation erzeugt worden. Erst ab Pulsdauern von weniger als 40fs wird die MPI der dominante Effekt zur Plasmabildung (Feng *et al.*, 1997).

Die Plasmabildung wird als laser-induzierter optischer Durchbruch (LIB; engl.: laser induced breakdown) bezeichnet und erlaubt über explosionsartige Verdampfung (Photodisruption) einen Materialabtrag. Im Falle langer Pulse ($\tau > 10\text{ps}$) absorbiert das entstandene Plasma teilweise die Laserstrahlung (Nolte, 1999). Bedingt durch diese Plasmaabschirmung (engl.: plasma-shielding) bewirkt nicht die gesamte Pulsenergie einen Materialabtrag, sondern sie induziert vielmehr thermische Schädigungszonen im Randbereich des Fokus. Im Gegensatz dazu kann dieser Effekt bei ultrakurzen Pulsen in der Form nicht auftreten, da sich, wenn der Puls endet, das Plasma noch nicht voll entwickelt hat (Nolte, 1999).

Die Bildung von Kavitationsblasen (wasserdampfgefüllte Hohlräume) kann auch bei der Photodisruption eintreten. Da jedoch die Größe der Kavitationsblase in Abhängigkeit zur eingebrachten Energie steht, und bei ultrakurzen Pulsen für einen optischen Durchbruch deutlich geringere Energien notwendig sind, ist die Blasengröße bei Femtosekunden-Lasern stark reduziert. Bei Pulsen im Nanosekundenbereich ($10\text{J}/\text{cm}^2$ bis $100\text{J}/\text{cm}^2$) wurden Blasendurchmesser von $700\mu\text{m}$ bis $2500\mu\text{m}$ gemessen (Vogel *et al.*, 1993), bei Pulsen im Femtosekundenbereich ($1\text{J}/\text{cm}^2$ bis $3\text{J}/\text{cm}^2$) Blasendurchmesser von weniger als $80\mu\text{m}$ (Heisterkamp, 2002). Damit ist bei der Photodisruption, gegenüber der Photoablation, eine deutlich höhere Präzision bei der Gewebebearbeitung möglich.

Mutationen durch ionisierende Strahlung

Schon seit den 20er Jahren ist bekannt, daß ionisierende Strahlen in der Lage sind, Mutationen auszulösen (Muller, 1925; Muller, 1927). Im medizinischen Zusammenhang ist diese Tatsache bedeutsam, weil sie, wenn Mutationen in der Keimbahn auftreten, zu Folgen für die Nachkommenschaft führen und auf somatischer Ebene Aus-

gang für Tumorentstehung sein können. Strahleninduzierte Mutationen sind grundsätzlich ungerichtet, das heißt ihre Lokalisation innerhalb des Genoms folgt ausschließlich statistischen Gesetzen (Jaschke *et al.*, 2001).

Man unterscheidet Genom- und Chromosomenmutationen von sogenannten intragenomischen Gen- oder Punktmutationen: Unter Genommutationen versteht man Veränderungen des gesamten Genoms, zum Beispiel eine Vervielfachung der Zahl der Chromosomen (bei Trisomien). Bei der Chromosomenmutation liegen Veränderungen in der Form und der Struktur von Chromosomen vor (Translokation, Deletion, Insertion und Inversion; Knippers *et al.*, 1990), während bei Gen- oder Punktmutationen es zu Variationen auf Ebene der organischen Basen kommt.

Chromosomenmutation

Ionisierende Strahlen führen in der Regel nicht zu numerischen Chromosomenaberrationen, das heißt zu Abweichungen in der Chromosomenzahl, wohl aber zu Veränderungen ihrer Struktur (Chromosomenmutationen). Bei einem Doppelstrangbruch (DSB; engl.: double strand break) kann zum Beispiel ein azentrisches (das heißt zentromerloses) Fragment abgetrennt werden. Durch anschließende Zellteilungen kann das Fragment verlorengehen, was in den meisten Fällen zum Zelltod führt. Von größerer Bedeutung sind Veränderungen, an denen zwei latente Brüche beteiligt sind: Dazu gehören Inversion (Verdrehung eines Chromosomenabschnitts um 180°) und Translokation (Verlagerung eines Chromosomenstücks von seinem ursprünglichen Ort auf ein anderes Chromosom oder an eine andere Stelle des gleichen Chromosoms), bei denen kein genetisches Material verlorengeht, sondern nur umgelagert wird (Abb. 4).

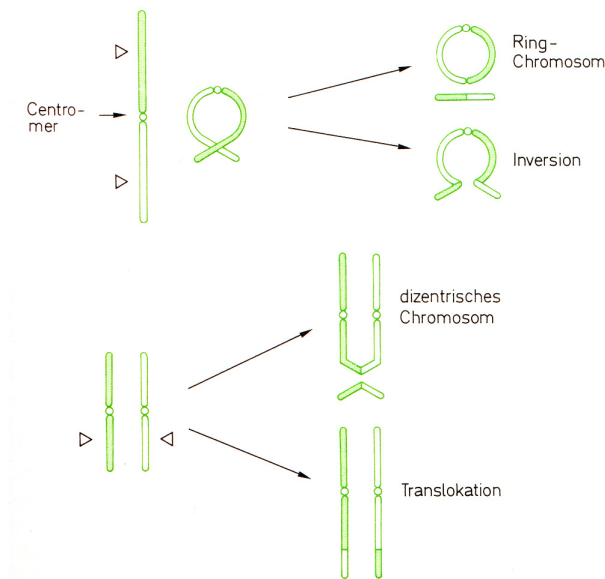


Abb. 4: Chromosomen-Strukturveränderungen als Folge von Bestrahlungen. Die Dreiecke kennzeichnen Orte mit Doppelstrangbrüchen (aus Knippers, 1990).

Mit Veränderungen in der Chromosomenstruktur können schwerwiegende genetische Effekte verbunden sein, da es dabei zur Expression normalerweise supprimierter Gene und unter Umständen zur neoplastischen Transformation kommen kann. Das bekannteste Beispiel ist das sogenannte „Philadelphia-Chromosom“ aus einer Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22, das bei Leukämie gefunden wird.

Gen- oder Punktmutation

Intragenische Punktmutationen entstehen durch Veränderungen in der Basenfolge (Purine: Adenin (A), Guanin (G); Pyrimidine: Cytosin (C), Thymin (T)): Durch Deletion oder Insertion einer Base kann das für eine bestimmte Aminosäure kodierende Basentriplett innerhalb eines Exons so verändert werden, daß es für eine andere Aminosäure kodiert (Leseraster-Wechsel; engl.: frame-shift). Diese Falschinformation wird dann durch mRNA zur Proteinsynthese weitergegeben.

Bei einem Nucleotidaustausch (Transition: $AT \leftrightarrow GC$; Transversion: Purin \leftrightarrow Pyrimidin) kommt es ebenfalls zu einem anderen Basentriplett. Dabei muß es aber nicht zwangsläufig zu einer Veränderung des Gen-Produktes führen: Er kann folgenlos bleiben, wenn ein Codon in ein synonymes Codon mutiert. Die Aminosäureabfolge im Protein bleibt dann unverändert. Wird jedoch für eine andere Aminosäure kodiert („missense“ Mutation), so können die Folgen sehr unterschiedlich sein, je nach Art der ausgetauschten Aminosäure (sauer, basisch, neutral) und deren Lage im Protein (aktives Zentrum, terminale Bereiche). Unter Umständen kann es auch zur Bildung

von Stop-Codons kommen („nonsense“ Mutation), die dann den vorzeitigen Proteinsyntheseabbruch bewirken. Diese Peptidfragmente bedeuten in der Regel den Funktionsverlust des Proteins.

Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS; engl.: reactive oxygen species)

Mutationen, DNA-Schäden allgemein und Membranschäden können bei ionisierender Strahlung direkt und indirekt erfolgen. Trifft die Strahlung unmittelbar auf ein Makromolekül, so können direkt Elektronen des Moleküls freigesetzt werden. Freie Elektronen können direkt zu Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen in der DNA führen (Boudaiffa *et al.*, 2000). Treffen die Photonen zuerst auf Moleküle des Zellinneren, gewöhnlich Wasser-Moleküle, so werden erst deren Elektronen freigesetzt, die ihrerseits dann auf andere Moleküle einwirken (Abb. 5). Es entsteht ein indirekter Strahlungsschaden.

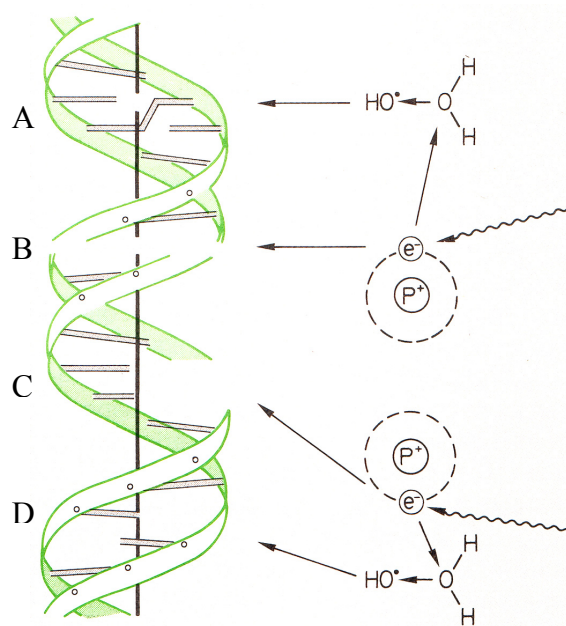


Abb. 5: Strahlenschäden an der DNA. Ionisierende Strahlung setzt Elektronen frei oder führt bei Wassermolekülen zur Bildung von Hydroxylradikalen. A) Kovalente Verknüpfung zwischen gegenüberliegenden Nucleotiden (engl.: cross links); B) Doppelstrangbruch (DSB); C) Einzelstrangbruch (SSB); D) Zerstörung oder Strukturveränderungen von DNA-Basen (aus Ward, 1988).

Da Zellen zu ca. 70% aus Wasser bestehen (Duck, 1990), sind strahleninduzierte Veränderungen dieses Moleküls von besonderer Bedeutung: Bei Ionisationen, die zur Ablösung von Elektronen führen, kann es zu einer homolytischen Spaltung in die neutralen Radikalbruchstücke H^\bullet und OH^\bullet (Hydroxylradikal) kommen (Sonntag, 1989). Diese Radikale dürfen nicht mit den bei der normalen Dissoziation auftretenden H^+ - und OH^- -Ionen verwechselt werden. Aufgrund ihrer Elektronenkonfiguration

sind Radikale, besonders das Hydroxylradikal, außerordentlich aggressiv und reagieren äußerst schnell mit Molekülen in ihrer Umgebung (Reaktionszeit Hydroxylradikal: $\sim 10^{-9}$ Sekunden; Timberlake *et al.*, 1997).

DNA-Schäden oder -Veränderungen innerhalb einer Zelle entstehen aber nicht nur durch extrazelluläre Einflüsse wie Strahlung oder chemische Substanzen (oder deren Kombinationswirkungen), sondern teilweise auch bei intrazellulären Reaktionsabläufen, zum Beispiel bei der mitochondrialen Atmungskette (Adenosintriphosphatbildung). Molekularer Sauerstoff dient dabei als terminaler Akzeptor und wird zu Wasser reduziert. Bei der durch die Cytochrom-Reduktase katalysierten Elektronenübertragung kann es allerdings zu Fehlern kommen, die eine Bildung von reduzierten Sauerstoffformen zur Folge haben können (Joenje, 1989; Turrens *et al.*, 1991). Diese Formen werden als reaktive Sauerstoffspezies (ROS; engl.: reactive oxygen species) bezeichnet (Williams, 1995). Zu den ROS gehören verschiedene Sauerstoffformen, die sich folgendermaßen einteilen lassen:

- radikalische Formen: Hydroxylradikal (OH^\bullet), Superoxidradikalanion ($\text{O}_2^{\bullet-}$), RO^\bullet allgemein (zum Beispiel Stickstoffmonoxidradikal (NO^\bullet)), etc.
- nicht radikalische Formen: Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Ozon (O_3), Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), etc.

Bei der Immunantwort kommt es ebenfalls zur Bildung von $\text{O}_2^{\bullet-}$ durch Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Mikroglia im ZNS. Das Superoxidradikalanion dient dabei unter anderem der Bakterienabwehr (Curnette & Babior, 1987). Doch auch in immunpassiven Zelltypen (Fibroblasten, Endothelzellen) konnte eine $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Produktion in kleinen Menge nachgewiesen werden (Maly, 1990; Meier *et al.*, 1990; Murell *et al.*, 1990). Eine intrazelluläre Signaltransduktionsfunktion wird daher vermutet (Halliwell & Gutteridge, 1992; Remacle *et al.*, 1995; Finkel & Holbrook, 2000; Chandel & Schumacker, 2000). Superoxidradikale sind milde Oxidantien mit limitierter Reaktivität (Imlay & Linn, 1988; Wiseman & Halliwell, 1996) und unter physiologischen Bedingungen nicht in der Lage direkte DNA-Schäden zu induzieren (Brawn & Fridovich, 1981; Halliwell & Gutteridge, 1989). Ihre Gefährlichkeit besteht zum einen in den Abbau- und Folgeprodukten, zum anderen in der Fähigkeit Enzyme zu inaktivieren (Halliwell, 1992), zum Beispiel innerhalb der mitochondrialen Elektronentransportkette (Zhang *et al.*, 1990). Mit Wasserstoffprotonen kann das Superoxidradikalanion zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff dismutieren (Henderson & Chappell, 1993).



Diese Reaktion läuft sehr langsam ab (Fridovich, 1986), kann aber durch die katalytische Wirkung der Superoxid-Dismutase (SOD) beschleunigt werden (Jaeschke, 1995). Durch Katalase kann Wasserstoffperoxid in Wasser und molekularen Sauerstoff reduziert werden, allerdings arbeitet das Enzym nur bei hohen H_2O_2 -Konzentrationen (Phillis, 1994; Bains & Shaw, 1997).



Liegt Wasserstoffperoxid in der Zelle vor, so kann es mit reduzierten Metallionen, vorrangig mit Übergangsmetallen wie Eisen, Kupfer und Chrom (Stohs & Bagchi, 1995), reagieren. Diese Metallionen sind in biologischen Systemen komplex gebunden (Eisen-Schwefel-Proteine, Cytochrom-c-Oxidase, usw.). Die Reduktion des Wasserstoffperoxids erfolgt mit Fe^{2+} -Ionen (Fenton, 1894) oder Cu^+ -Ionen und führt zur Bildung des Hydroxylradikals.



Somit können auch intrazelluläre Prozesse zu DNA-Schäden führen, was sich in einer Vielzahl von Modifikationen ausdrückt (Tab. 1).

Tab.1: Geschätzte DNA-Schädigungen in Humanzellen pro Tag (nach Saul & Ames, 1986; Bernstein & Bernstein, 1991).

Schaden	Häufigkeit/Zelle/Tag	Ursache
Basenverlust Purine (A,G)	14000	spontan
Basenverlust Pyrimidine (C, T)	1000	spontan
Basendimerisierung	50000	UV
Basenoxidation	3000	oxidativer Metabolismus
Doppelstrangbrüche	9	spontan
Einzelstrangbrüche	55000	spontan

DNA-Reparatursysteme

Die Zellen verfügen jedoch über DNA-Reparatursysteme, mit denen sie ein Gleichgewicht zwischen den zum Beispiel durch ROS entstehenden Schäden und deren Beseitigung herstellen. Diese Systeme können fehlgepaarte, veränderte oder fehlende Basen in der DNA sowie strukturelle Verzerrungen der Doppelhelix erkennen. Excisionsreparatursysteme spalten die DNA nahe einer Schadensstelle, entfernen einen Strang und synthetisieren eine neue Sequenz, um das ausgeschnittene Material zu ersetzen (Abb. 6). Dabei ist bei Säugerzellen die DNA-Menge, die an jeder Schadensstelle neusynthetisiert wird, heterogen – bei Schäden aufgrund ionisierender Strahlung werden nur drei bis vier Reparaturbasen eingefügt (Lewin, 1998).

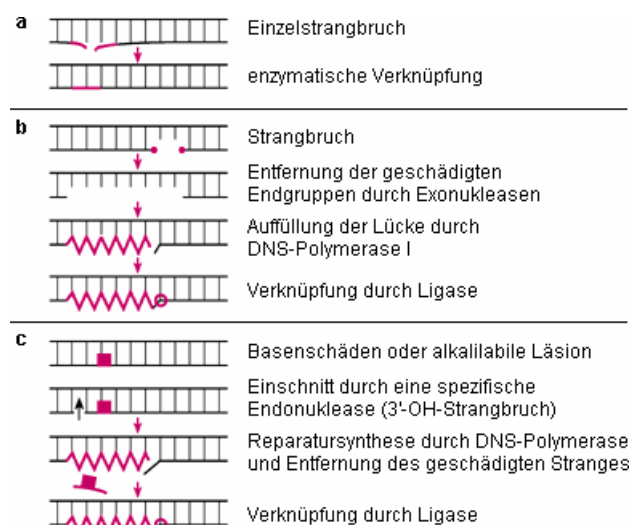


Abb. 6: Reparatur von Strahlenschäden an der DNA: molekulare Mechanismen zur Heilung von Strangbrüchen oder Basenschäden. a) Heilung eines Einzelstrangbruchs durch direkte enzymatische Verknüpfung; b) Heilung eines Einzelstrangbruchs mit geschädigten Endgruppen (Excisionsreparatur); c) Heilung von Basenschäden oder alkalilabilen Läsionen (aus Kauffmann *et al.*, 1996).

Desweiteren schützen nicht-enzymatische Antioxidantien, die reaktive Radikale in stabile Formen überführen können (Jaeschke, 1995). Als natürliche Antioxidantien gelten Vitamin C (Ascorbinsäure), Vitamin E (α -Tocopherol), Vitamin A (Retinol) (Williams, 1995), sowie Harnsäure, Bilirubin (Jesberger & Richardson, 1991), Homocystein, Ubichinon und Glutathion (Bains & Shaw, 1997).

Oxidativer Streß

Kommt es zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen ROS-induzierten Schäden und deren Beseitigung, so wird ein verstärktes Auftreten der verschiedenen Sauerstoffformen als oxidativer Streß bezeichnet (Halliwell, 1994). Neben der Schädigung von DNA und Proteinen können auch Schäden an Lipidmembranen entstehen, be-

sonders im Bereich ungesättigter Bindungen (Porter, 1986). Dieser als Lipidperoxidation bezeichnete Vorgang kann zu strukturellen und funktionellen Veränderungen in den Membranen führen (Jesberger & Richardson, 1991; Esterbauer *et al.*, 1992; Bongarzone *et al.*, 1995) und wird unter anderem für Alterungsprozesse verantwortlich gemacht (Ames & Shigenaga, 1993; Ames *et al.*, 1993; Halliwell, 1994). Produkte der Lipidperoxidation können ihrerseits die DNA schädigen (Joenje, 1989; Esterbauer *et al.*, 1990) und stehen als Promotoren der Kanzerogenese in der Diskussion (Cerruti, 1985; Cheeseman, 1993), ebenso wie die oxidativen DNA-Schäden durch ROS (Trush & Kensler, 1991; Janssen *et al.*, 1993; Wiseman & Halliwell, 1996; Loft & Poulsen, 1996).

Apoptose und Nekrose

Oxidativer Streß kann zum Zelltod durch Apoptose (PCD; engl.: programmed cell death) oder Nekrose führen (Kerr *et al.*, 1972; Thompson, 1995).

Die Apoptose ist durch eine Vielzahl von geregelten aktiven Prozessen biochemischer und morphologischer Veränderungen im Zellkern, im Zytoplasma und in verschiedenen Zellorganellen definiert (Wyllie *et al.*, 1984; Wyllie 1992; Green & Kroemer, 1998), die zur Zellschrumpfung führen (Vaux, 1993), wobei die Zellmembran intakt bleibt. Durch Veränderungen in der Zytoskelettstruktur der Zelle kommt es zur Abschnürung einzelner Membrankompartimente (Cohen, 1993), den sogenannten apoptotischen Körperchen (engl.: apoptotic bodies). Diese Körperchen und die eigentliche apoptotische Zelle werden anschließend von Makrophagen und den umgebenden Zellen phagozytiert (Savill *et al.*, 1993). Dadurch bleiben lokale Entzündungsreaktionen aus.

Anders bei der Nekrose, die durch eine Lyse der Organellen und eine frühzeitige Zerstörung der Zellmembran gekennzeichnet ist (Majno & Joris, 1995). Durch die Freisetzung von denaturierten Proteinen und DNA-Fragmenten in den interzellulären Raum können entzündliche Reaktionen hervorgerufen werden, die ihrerseits eine massive Lyse von Zellen auslösen können (Bredesen, 1995).

Nekrose wird beispielsweise durch lytische Infektion oder extreme Streßsituationen (Hitzeschock, mangelnde Sauerstoffversorgung nach Schlaganfall, Entzündungsprozesse, hohe Dosen chemischer Stressoren wie Ethanol) ausgelöst (Hetts, 1998).

Es gibt jedoch Hinweise darauf, daß beide Formen des Zelltodes nicht strikt voneinander getrennt ablaufen, sondern eher Extreme eines ineinander verlaufenden Spek-

trums von Möglichkeiten darstellen (Leist & Nicotera, 1997). So führt zum Beispiel eine Behandlung von HL-60 Zellen (Leukämiezelllinie) mit einer geringen Konzentration Wasserstoffperoxid zu Apoptose, während bei höheren Konzentrationen Nekrose induziert wird (Slater *et al.*, 1995a; Slater *et al.*, 1995b).

Der Begriff Oxytose wurde für den durch oxidativen Streß induzierten Zelltod eingeführt, der sowohl Charakteristika von Apoptose als auch von Nekrose aufweist (Tan *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 2001).

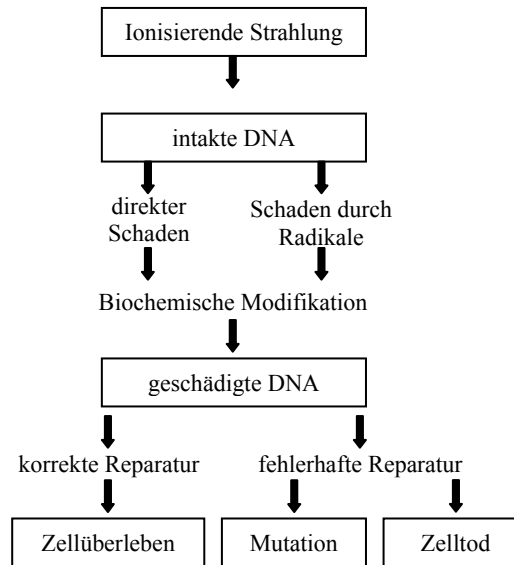


Abb. 7: Zusammenfassung von DNA-Schädigung und -Reparatur nach ionisierender Strahlung (nach Powell & McMillan, 1990).

DNA-Schäden bei Lasersystemen mit unterschiedlichen Wellenlängen

Mit energiereicher Strahlung verschiedener Wellenlängen wurden bereits Untersuchungen auf ihre DNA-schädigende Wirkung durchgeführt. Innerhalb der Gruppe der Excimer-Laser konnte gezeigt werden, dass es bei differierenden Wellenlängen zu unterschiedlich stark ausgeprägten Sekundäreffekten kommen kann: Beim KrF-Excimer-Laser führte die Strahlung bei 248nm zu einer erhöhten Mutagenität und Zytotoxizität, während der ArF-Excimer-Laser bei 193nm keine Sekundäreffekte aufwies (Green *et al.*, 1987). Grund dafür ist die sogenannte Zell-Abschirmung (engl.: cell-shielding) durch Zellmembran und Zytoplasma. Das Material absorbiert die Strahlung so stark, daß keine nachweisbaren Schäden in der Nucleus-DNA entstehen (Green *et al.*, 1987).

Bei den Nd:YAG-Lasern zeigten sich ebenfalls Sekundäreffekte, sowohl bei 532nm Wellenlänge (Hefetz *et al.*, 1990), als auch bei 1060nm (Timberlake *et al.*, 1997; Mohanty *et al.*, 2002).

Bei den langwelligen CO₂-Lasern ($\lambda = 10600\text{nm}$) konnten nach der Bestrahlung von Gewebeprouben gentoxische und mutagene Effekte nachgewiesen werden (Stocker *et al.*, 1998).

Die Ti:Saphir-Laser, gemessen von 750-850nm im ungelulsten Modus (cw; engl.: continuous wave), erzeugten ebenfalls gentoxische und mutagene Effekte mit einer signifikanten Maximalschädigung bei 760nm (Mohanty *et al.*, 2002). Strangbrüche in der DNA (Shafirovich *et al.*, 1999; Tirlapur & König, 2001) und Zelltod konnten gezeigt werden (Tirlapur *et al.*, 2001).

Benutzt wurden für die Messungen am Ti:Saphir-Laser unverstärkte Oszillatoren (seed-Laser). Untersuchungen mit verstärkten Ti:Saphir-Lasern, die sich aufgrund ihrer höheren Leistung gegenüber unverstärkten Systemen für klinische Anwendungen eignen, sind bisher nicht erfolgt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Gepulster Ti:Saphir-Laser (Femtosekunden-Laser) zur Erzeugung ultrakurzer Pulse

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete „BRIGHT Multi-KiloHertz Hochenergie Ti:Saphir-Femtosekunden-System“ (Abb. 8) stammte von der französischen Firma THALES Laser und besaß folgende Leistungsdaten:

- Zentralwellenlänge: $780\text{nm} \pm 5\text{nm}$
- Pulsdauer: $\geq 130\text{fs}$
- Repetitionsrate: bis 5kHz
- Pulsenergie: bis $300\mu\text{J}$
- Durchschnittsleistung: bis 1,5W

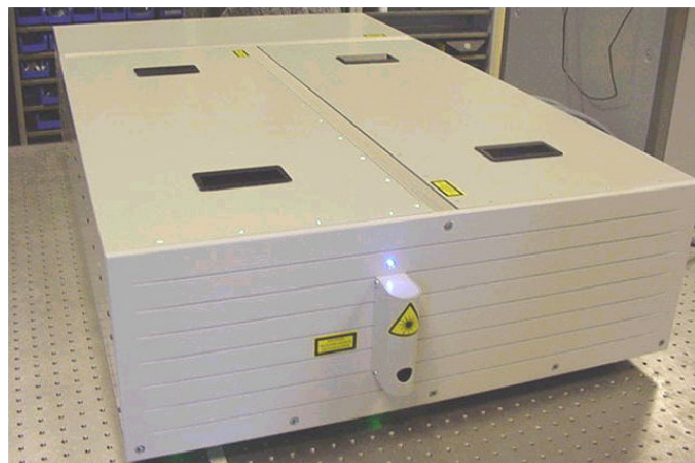


Abb. 8: Ti:Saphir-Femtosekunden-System der Firma THALES

2.1.1.1 Überblick

Ultrakurzpuls-Laser setzen sich aus zwei Komponenten zusammen: Einem Oszillator-System (seed-Laser) zur Erzeugung von ultrakurzen Pulsen nach dem Prinzip der passiven Modenkopplung (siehe Kap. 2.1.1.2) und einem verstärkenden System, welches bei dem verwendeten Gerät nach dem CPA-Verfahren (engl.: chirped pulse amplification) arbeitete (siehe Kap. 2.1.1.3).

Ti:Saphir-Laser können auf verschiedene Arten optisch gepumpt (verstärkt) werden: Gepulste Ti:Saphir-Laser werden mit frequenzverdoppelten Nd:YAG oder Nd:YLF-

Lasern gepumpt. Kontinuierlicher Betrieb (cw; engl.: continuous wave) wird zum Beispiel durch Pumpen mit einem Ar⁺-Ionenlaser bei 514nm erreicht.

Als Scanner für Laserbewegungen zur Bestrahlung von Flächen wurde ein Gerät der Firma Scanlab AG mit einer Linse der Brennweite $f=250\text{mm}$ benutzt. Der daraus resultierende Fokusbereich des Lasers lag bei ca. $40\mu\text{m}$ (Herstellerangabe). Bei der verwendeten Linse handelte es sich um keine F- θ -Optik. Um mögliche Fehler durch Fokusbereichänderungen aufgrund von Winkelvergrößerungen bei lateralen Bestrahlungen großer Flächen zu verhindern, durfte jeweils nur ein kleiner Scanbereich gewählt werden. Größere Scanflächen, wie zum Beispiel bei der Bestrahlung der Objektträger für den Kometen-Assay ($24 \times 32\text{mm}$), wurden unterteilt. Die bestrahlte einzelne Fläche betrug dann $24 \times 16\text{mm}$ (siehe Kap. 2.2.9).

Eine Überschneidung der einzelnen Laserpulse wurde bei den Toxizitätsuntersuchungen vermieden, da sonst die Gefahr eines zusätzlichen Meßfehlers aufgrund einer Verdopplung der Energiedosis für einige Zellen bestanden hätte. Bei den Untersuchungen zu thermischen und photoakustischen Effekten an Weich- und Hartgeweben betrug der Überschneidungsbereich der einzelnen Pulse etwa 35%. Zur Ermittlung der Abtragsraten wurde keine bewegte Strahlführung durch den Scanner benötigt, der Überschneidungsbereich der Pulse lag damit bei 100%.

2.1.1.2 Resonator-/Oszillatorsystem

Um sehr kurze Pulse zu erhalten, wurde die sogenannte Modenkopplung entwickelt: In einem Resonator schwingen verschiedene Wellenlängen (Moden), sie stehen zueinander in fester Phasenbeziehung. Durch konstruktive Interferenz kann es zu einer Pulsbildung mit Intensitätssteigerung kommen (Abb. 9).

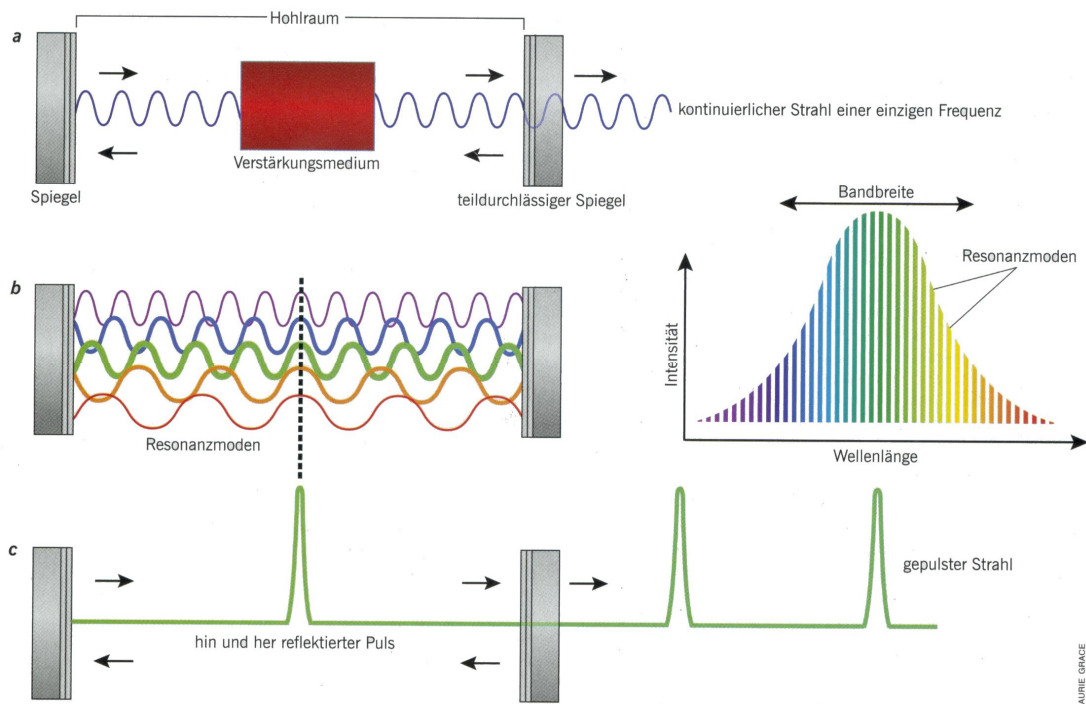


Abb. 9: Erzeugung kurzer Pulse. a) Zwischen zwei Spiegeln in einem Hohlraum (Resonator) hin und zurück reflektiertes Licht wird jedesmal verstärkt, wenn es das angeregte Verstärkungsmedium passiert. b) Viele verschiedene Wellenlängen, sogenannte Moden, oszillieren im Resonanzhohlraum synchron. c) Durch konstruktive Interferenz bildet sich ein kurzer Puls, der durch einen Shutter (zum Beispiel ein teildurchlässiger Spiegel) austritt (aus Hopkins & Sibbett, 2000).

Um eine feste Phasenbeziehung zu erhalten (Modenkopplung), gibt es verschiedene Verfahren. Der verwendete Femtosekunden-Oszillator arbeitete mit der Technik eines modengekoppelten Erbium-Faserlasers. Dabei wird der Strahl in eine mit Erbium³⁺-Ionen dotierte Faser eingekoppelt. Innerhalb der Faser kommt es dann durch nichtlineare Effekte (zum Beispiel dem optischen Kerr-Effekt) zu Intensitätssteigerungen. Dieser verstärkte Puls wird dann auf einen Polarisationsstrahlteiler geführt und dort ausgekoppelt. Da die Polarisation des Pulses intensitätsabhängig ist, besitzt das Pulsmaximum eine andere Polarisationsrichtung als die intensitätsschwächeren Pulsflanken. Wird die Auskopplung am Strahlteiler der Polarisationsrichtung des Pulsmaximums angepaßt, so werden die Pulsflanken abgeschnitten (Verlustmodulation) und der Puls verkürzt.

Desweiteren gibt es das Prinzip der passiven Modenkopplung durch einen Kerr-Festkörperkristall (zum Beispiel ein Titan-Saphir-Kristall). Die Kerr-Linsen-Modenkopplung (KLM; engl.: Kerr-lens modelocking) beruht auf der Selbstfokussierung eines Laserstrahls durch Laufzeitunterschiede (in Abhängigkeit von der Strahlungsintensität) in einem nicht-linearen Kerr-Medium. Das Kerr-Medium bewirkt, daß der Laserstrahl bei hoher Intensität im Strahlzentrum eine Lochblende passiert

(Abb. 10), während die intensitätsniederen Flanken des Strahls durch die Blende abgeschnitten werden, er somit verkürzt wird (Spence *et al.*, 1991; Keller, 1994).

Da die so erzeugten Pulsenergien für einen effektiven Abtrag mittels optischem Durchbruch aber nicht ausreichen, müssen sie noch verstärkt werden (siehe Kap. 2.1.1.3).

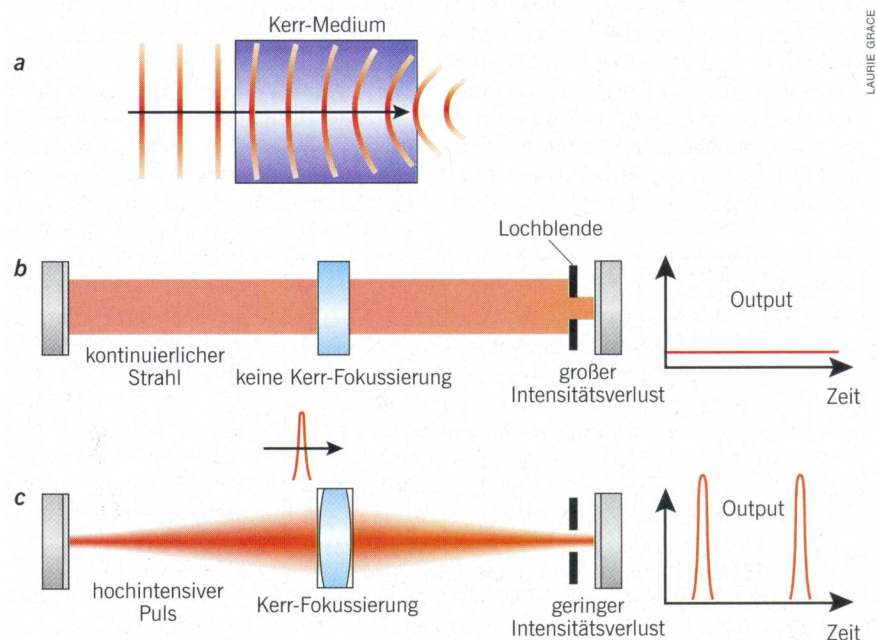


Abb. 10: Aufgrund des optischen Kerr-Effektes bewegt sich Licht genügend hoher Intensität langsamer fort als weniger intensives. a) Auf einen Lichtstrahl, dessen Intensität im Zentrum sehr hoch ist, wirkt ein Kerr-Medium (zum Beispiel der Ti:Saphir-Kristall) wie eine fokussierende Linse. b) Eine Lochblende unterdrückt den kontinuierlichen Laserstrahl; er wird nicht intensiv genug, um den Kerr-Effekt auszulösen. c) Das Kerr-Medium fokussiert einen hochintensiven Puls; er passiert die Blende ungehindert (aus Hopkins & Sibbett, 2000).

2.1.1.3 Ultrakurzpuls-Verstärker-System

Eine direkte Verstärkung der vom Femtosekunden-Oszillator erzeugten ultrakurzen Pulse ($\tau \approx 100\text{fs}$; Herstellerangabe) gestaltet sich aufgrund der hohen Pulsspitzenintensitäten als schwierig. Um mögliche Beschädigungen oder Zerstörungen von Verstärkerkomponenten zu verhindern, werden mittels optischer Gitter im „Strecker“ diese Pulse zeitlich gedehnt (Prinzip der CPA; engl.: chirped pulse amplification): Durch Beugung kommt es am Gitter zu wellenlängenabhängigen Laufzeitunterschieden zwischen den verschiedenen Anteilen des Pulses (Abb. 12). Langwelligere Anteile (rot) laufen kürzer als die kurzwelligeren Anteile (blau). Bei diesem „positiven chirp“ laufen somit die langwelligeren roten Anteile den kurzwelligeren blauen Anteilen voraus (Frequenzzunahme über den Pulsverlauf). Als Effekt, neben der zeitlichen Komponente ($\tau \approx 100\text{-}500\text{ps}$; Herstellerangabe), nimmt die Spitzenintensität

des Pulses deutlich ab, eine Verstärkung ist nun ohne Materialbeschädigungen möglich (Abb. 11). Die Verstärkung erfolgte mittels eines frequenzverdoppelten Nd:YLF-Lasers (1053nm \rightarrow 527nm Wellenlänge) mit 1kHz bis 5kHz Repetitionsrate auf einen Ti:Saphir-Kristall im Zentrum eines Resonators, der den sogenannten regenerativen Verstärker bildete. Beim regenerativen Verstärker wird ein Oszillatordurschlag in den Resonator eingekoppelt, durch mehrere Umläufe in dem gepumpten Ti:Saphir-Kristall verstärkt, und dann wieder ausgekoppelt. Aufgrund der begrenzten Pumpleistung des Nd:YLF-Lasers und der limitierenden thermischen Belastbarkeit des Verstärkers kann nur eine geringe Anzahl der Oszillatordurschläge für den regenerativen Verstärker genutzt werden.

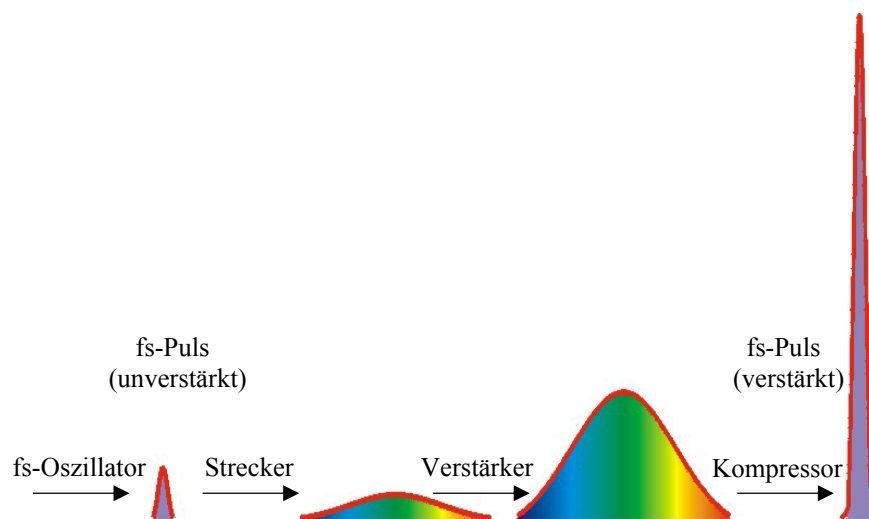


Abb. 11: Prinzip der CPA (engl.: chirped pulse amplification): Durch räumliche und zeitliche Dehnung des Pulses mittels optischer Gitter wird eine Beschädigung von optischen Verstärkerkomponenten verhindert. Die hohe Pulsspitzenleistung wird erst anschließend durch Pulskompression erzielt.

Nach erfolgter Verstärkung werden die Pulse in einem dem „Strecker“ ähnlichen Aufbau, dem „Kompressor“, wieder zeitlich gestaucht (Abb. 12).

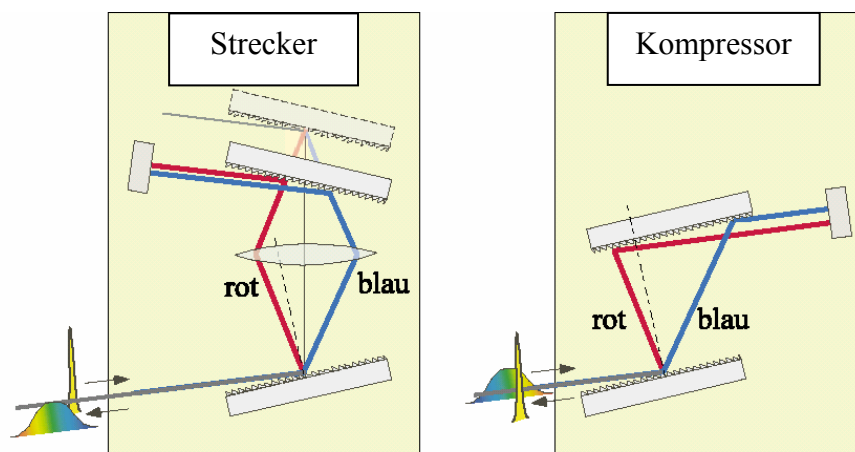


Abb. 12: Funktionsprinzip von Strecker und Kompressor zur zeitlichen Pulsveränderung (aus Meschede, 1999).

2.1.2 Zelllinien und Gewebe

Folgende Zelllinien wurden für die MTT-Tests und die Kometen-Assays benutzt:

NHDF: Normale humane dermale Fibroblasten; PromoCell GmbH, Heidelberg.

GM 05757: Primäre humane dermale Fibroblasten (Abkürzung N57); NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository, Camden, NJ, USA.

Die Zellen beider Zelllinien wuchsen asynchron, das heißt alle Stadien des Zellzyklus lagen in den Kulturen vor. Die Proliferationsrate war, unter gleichen Kulturbedingungen (MEM 12%, 37°C), bei der NHDF-Kultur etwa doppelt so hoch gegenüber der N57-Kultur.

Die Zellen wurden, entsprechend den Vorschriften von Hessling *et al.* (1980), auf Mykoplasmenkontaminationen untersucht.

Für die Ermittlung der Abtragsraten, und von thermischen und photoakustischen Effekten, wurden folgende Weich- und Hartgewebe benutzt:

Hausschwein (*sus scrofa domesticus*): Nerv, Muskulatur, Fett, Knochen

Meerschweinchen (*Cavia aperea*): Nerv, Amboß, Cochlea

Die Gewebe wurden vom Zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.

Die verwendeten Chemikalien, die Zusammensetzungen der Puffer und Lösungen und die Geräte und Software sind im Anhang aufgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 Paraffineinbettung, Schneiden und HE-Färbung von Weichgeweben

Vor der Laserbestrahlung wurde das Gewebe (Nerv und Muskulatur vom Hauschwein, *Sus scrofa domesticus*; Nerv vom Meerschweinchen, *Cavia aperea*) mit Feinnadeln (Durchmesser 100µm) auf Silikonplättchen fixiert, dann bestrahlt und anschließend in Paraformaldehyd überführt, wo es über Nacht lagerte.

Am nächsten Tag wurde die Probe für zwei Stunden in PBS-Puffer (0,1M) gespült und danach in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert (2x 2 Stunden in 50%, 2x 2 Stunden in 70% Ethanol). Die Lagerung über Nacht erfolgte in 70% Ethanol.

Am darauffolgenden Morgen wurde die Entwässerung fortgesetzt (2x 2 Stunden in 90%, 2x 2 Stunden in 100% Ethanol). Danach Überführung in Methylbenzoat und Lagerung über Nacht.

Nach etwa 17 Stunden wurde das Gewebe nochmals für 2x 2 Stunden in jeweils frischem Methylbenzoat gespült. Zum Auswaschen des Methylbenzoats erfolgte abschließend eine Überführung in Benzol für 10 Minuten. Danach wurden die Silikonplättchen entfernt und die Probe über Nacht in flüssigem Paraffin bei 68°C im Wärmeschrank gelagert.

Am nächsten Tag konnte das Gewebe dann in eine geeignete Gußform überführt und diese mit frischem Paraffin befüllt werden. Die Aushärtung erfolgte bei Raumtemperatur.

Vor dem Schneiden des Weichgewebes wurde zuerst der Paraffinblock auf einen Sockel (Holz, Kunststoff) aufgebracht, um eine mechanische Beschädigung der Probe zu vermeiden. Dann wurde überschüssiges Paraffin um das eingebettete Gewebe entfernt („Trimmung“), um die Gefahr eines Aufrollens der Schnitte zu minimieren. Das Schneiden am Mikrotom erfolgte in konsekutiven Serien mit einer Schnittdicke von 10-15µm, je nach Art und Elastizität der fixierten Gewebe. Die Schnitte wurden zur Entspannung in ein Wasserbad überführt und mit zuvor beschichteten Objektträgern (Beschichtung: Poly-L-Lysin 0,1% in Reinstwasser) aufgenommen. Die Trocknung erfolgte auf einer Heizplatte bei 37°C.

Um eine lichtmikroskopische Betrachtung von eventuell thermisch oder photoakustisch geschädigten Weichgeweben zu ermöglichen, mußten diese zur Kontrastierung

angefärbt werden. Dies wurde mit Hämalaun/Eosin (Hämalaun färbt Zellkerne, Eosin zytoplasmatische Bestandteile) durchgeführt.

Da beide Farbstoffe nur im wässrigen Milieu binden, mußte vor einer Färbung das Paraffin aus den Schnitten entfernt werden. Dazu erfolgte eine Waschung in Xylol (2x 5 Minuten). Das Xylol wurde durch Karbolxylol entfernt (1x 5 Sekunden). Anschließend wurde in einer absteigenden Ethanolreihe langsam der Wasseranteil erhöht (100%, 90%, 70% Ethanol, 100% entmineralisiertes Wasser; für jeweils 5 Minuten). Es folgten die Hämalaun – Färbung (Hämalaunlösung nach Mayer, 100%) für 4 Minuten und die Eosin G – Färbung (0,1%) für 1,5 Minuten mit jeweils nachfolgender Wasserspülung (je 5 Minuten mit Wasserwechsel).

Um eine dauerhafte Lagerung von histologischen Schnittpräparaten zu erzielen, wurden diese in Entellan oder Corbit-Balsam auf den Objektträgern fixiert und mit einem Deckgläschen verschlossen. Da beide oben genannten Fixierungsmittel jedoch nicht im wässrigen Milieu wirksam sind, mußte zuvor das Wasser wieder entzogen werden. Dazu wurde in einer aufsteigenden Alkoholreihe der Wasseranteil durch Ethanol verdrängt (70%, 90%, 100% Ethanol für jeweils 5 Minuten). Das Ethanol wurde mit Karbolxylol ausgewaschen (1x 5 Sekunden) und anschließend die Probe mit Xylol gespült (2x 5 Minuten). Danach erfolgte die eigentliche Fixierung.

Nach einer Trocknungszeit von 48-72 Stunden konnten die Schnitte lichtmikroskopisch ausgewertet werden. Dokumentiert wurden die histologischen Präparate mit einer CCD-Farbkamera (ColorView 12) bei unterschiedlichen Vergrößerungen.

2.2.2 Haarzellpräparation

Sollen durch Auswertung von Lage und Formung der Zilien mögliche Schädigungen in den Kochleae nachgewiesen werden, so müssen die Hörschnecken den Tieren (Meerschweinchen) möglichst frisch entnommen werden. Bereits eine Stunde nach Eintritt des Todes können die Zilien massive Beschädigungen zeigen.

Das Tier wurde unmittelbar nach dem Tod dekapitiert, der Schädel geöffnet und die beiden Felsenbeine entnommen. Die Bulla wurde mittels Knochenzange weiträumig aufpräpariert. Es folgte der Laserbeschuß, wobei durch die knöcherne Kapsel in die Lymphe der Kochlea gestrahlt wurde. Nach Abschluß der Bestrahlung wurde die Schnecke in Glutaraldehyd (2%) mit einer Feinpinzette apikal geöffnet. Zur Fixierung des Cortischen Organs wurde dann mit einer Spritze mehrfach Glutaraldehyd durch das eröffnete runde und das ovale Fenster der Kochlea gespült. Die sich im

Inneren der Cochlea befindliche Lymphe trat durch die Öffnung im apikalen Bereich aus. Die Nachfixierung erfolgte über Nacht in Glutaraldehyd (2%).

Am nächsten Morgen wurde durch Spülen für eine Stunde in physiologischer Kochsalzlösung das Glutaraldehyd entfernt. Es folgte die Dehydratation: Mittels einer aufsteigenden Aceton-Reihe (30%, 50%, 70%, 90% für jeweils 2x 10 Minuten; 100% für 30 Minuten) wurde der Probe der größte Wasseranteil entzogen. Um letzte Feuchtigkeitsreste zu entfernen, wurde das Verfahren der Kritisch-Punkt-Trocknung (CPD; engl.: Critical-Point-Drying) angewandt. Bei der CPD wird das Flüssigmedium (zum Beispiel Ethanol, Aceton, etc.) unter Druck durch ein flüssiges Gas (zum Beispiel CO₂, Freon 13, N₂O, etc.) ersetzt und durch Temperaturerhöhung der kritische Punkt dieses Gases überschritten. Der kritische Punkt bezeichnet den Druck-/Temperaturbereich, an dem die Phasengrenze flüssig/gasförmig aufgehoben wird und das Flüssiggas bei gleichbleibender Dichte direkt in die Gasform übergeht. Spannungsartefakte der Proben werden somit vermieden. Bei Wasser liegt dieser Punkt bei 374°C und 217,7bar. Biologische Proben können aufgrund der hohen Temperatur nicht mit Wasser als Medium aufgearbeitet werden.

Durch mehrmaliges Spülen mit Kohlendioxid wurde das Aceton entfernt und anschließend langsam die Temperatur in der Probenkammer erhöht. Bei 31,1°C und einem Druck von 72,8bar war der kritische Punkt für CO₂ erreicht, die Phasengrenze wurde überschritten und die Probe war trocken. Beim Ablassen des Kohlendioxids mußte jedoch beachtet werden, daß es durch Abkühlung des Gases, aufgrund der Expansion bei der Druckreduzierung (Joule-Thompson-Effekt), zu einer Rekondensation kommen kann. Daher wurde die Temperatur auf etwa 40°C erhöht und der Druck sehr langsam verringert. Die Proben wurden zur Lagerung über Nacht in einem Exsikkator unter leichtem Vakuum aufbewahrt, um eine Aufnahme von Luftfeuchtigkeit zu verhindern.

Vor der Mikrodissektion wurde die Cochlea mit Kohleleitfilm auf einem REM-Tellerchen aufgeklebt. Es erfolgte anschließend die Öffnung der Cochlea mittels Feinpinzette von basal nach apikal durch Entfernung der knöchernen Kapsel. Das Cortische Organ lag damit frei und wurde für die Rasterelektronenmikroskopie mit Gold-Palladium überzogen (siehe Kap. 2.2.3).

2.2.3 Vorbereitung für die Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Bei der Rasterelektronenmikroskopie werden im Vakuum mittels beschleunigter (Primär-) Elektronen aus einem mit einem elektrisch leitfähigen Material (zum Beispiel Gold-Palladium) überzogenen Präparat (Sekundär-) Elektronen erzeugt. Diese (Sekundär-) Elektronen werden von einer Elektronenfänger/-detektoreinheit aufgenommen und zur Erzeugung der Mikrographien benutzt.

Um ein explosionsartiges Verdampfen der Restfeuchtigkeit aus einem elektronenmikroskopischen Präparat im Vakuum zu vermeiden, und um es mit Gold-Palladium leitend machen zu können, muß es zuvor getrocknet werden. Eine Trocknung an der Luft ist ungeeignet, da dreidimensionale Strukturen durch die Oberflächenspannung an der Grenzfläche Flüssigkeit-Luft zerstört werden könnten.

Mittels einer aufsteigenden Aceton-Reihe und anschließender Kritisch-Punkt-Trocknung wurde alles Wasser der Probe entzogen (siehe Kap. 2.2.2). Die Lagerung erfolgte über Nacht in einem Exsikkator.

Das Beschichten des Präparates („besputtern“) mit Gold-Palladium wurde in einer evakuierten Probenkammer unter Argon-Atmosphäre bei reduziertem Druck ($< 0,1$ mbar) durchgeführt. Dabei wird zwischen einer Anode (Probenstisch) und der Kathode (sogenanntes Target, hier: Gold-Palladium) eine Glimmentladung gezündet. Die dabei entstehenden positiv geladenen Argonionen werden zur Kathode beschleunigt und schlagen dort Metallatome aus dem Target. Es entsteht eine Atomwolke, die sich homogen auf der Probe niederschlägt und später beim Mikroskopieren der Erzeugung von (Sekundär-) Elektronen und der Vermeidung von elektromagnetischen Aufladungen dient.

Die Aufnahme der Mikrographien erfolgte bei unterschiedlichen Vergrößerungen. Als Probenmaterial dienten Kochleae und Ambosse vom Meerschweinchen (*Cavia aperea*) und Nervengewebe vom Hausschwein (*Sus scrofa domesticus*).

2.2.4 Temperaturmessung/-effekte

Die Messung der Temperaturveränderungen von Wasser bei Bestrahlung mit einem Ti:Saphir-Laser (780nm; 130fs; 30mW, 60mW und 120mW (mittlere Leistung) bei je 3kHz), einem gepulsten CO₂-Laser (10640nm; 50mW und 100mW bei je 4Hz) und einem freilaufenden (nicht gütegeschalteten) Er:YAG-Laser (2940nm; 33mW

bei 3,7Hz; 57mW bei 3,7Hz; 63mW bei 3Hz) erfolgte in einer Plexiglas[®]-Kammer (PMMA; Polymethylmethacrylat), die mittig eine Bohrung besaß. Der Temperatursensor (Heißleiter NTC Siemens M104-J) wurde für die Messung durch einen PVDF-Hohlzylinder (Polyvinylidenfluorid) geführt, der Zylinder wiederum dann in die Plexiglas[®]-Kammer gesteckt (Abb. 13) und unterwärts abgedichtet.

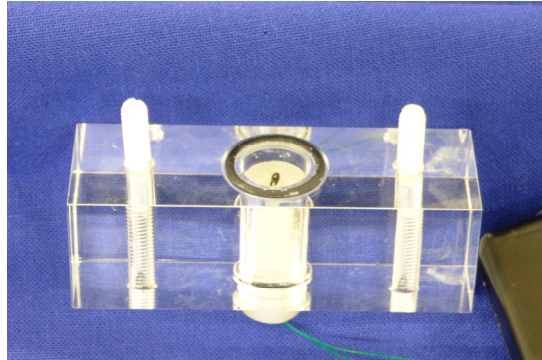


Abb. 13: Plexiglas[®]-Kammer (PMMA) für die Temperaturmessung mit PVDF-Zylinder und Temperatursensor

Die Kalibrierung des Sensors (ein temperaturabhängiger Widerstand; je höher die Temperatur, desto geringer der Widerstand) erfolgte am Oszilloskop. Um ein lineares Verhältnis zwischen der Spannungsanzeige und der Temperatur zu erzielen (je höher die Temperatur, desto größer die Spannung), mußte mittels Kompensationschaltung korrigiert werden (Eigenbau D. Hagner).

Als Füllvolumen für die Meßkammer wurden 300µl gewählt, anschließend die Kammer mit einem Deckgläschen verschlossen (außer beim CO₂-Laser; die Energieverluste durch das Glas waren zu groß).

Der jeweilige Laser wurde in die Flüssigkeit seitlich neben den Temperatursensor fokussiert, um eine direkte Bestrahlung des Sensors zu verhindern. Eine künstliche Durchmischung des Wasserkörpers wurde nicht durchgeführt.

Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 6,5 Minuten bis 21 Minuten. Es wurde nicht der Temperaturverlauf während eines Pulses gemessen, sondern der für eine Summe mehrerer Pulse.

Um die maximal erreichbare Temperatur berechnen zu können, wurde nach einem mathematischen Modell gesucht, daß sowohl den Zustand in der Meßkammer zu Strahlungsbeginn (keine Konvektion, keine Wärmeabgabe an die PMMA-Kammer), als auch zu einem späteren Zeitpunkt, beschreibt.

Folgendes Temperaturmodell wurde zur Berechnung der erreichbaren Maximaltemperatur verwendet:

$$\text{Temperatur } [^{\circ}\text{C}] = y_0 + a \cdot (1 - \exp(-b \cdot x)) + c \cdot (1 - \exp(-d \cdot x)) \quad [\text{IV}]$$

Dabei gibt y_0 die Ausgangstemperatur und die Parameter a - d die Lage und die Steigung an. Die vier Parameter wurden aus den Meßdaten mit dem Modell geschätzt. Die Qualität der Anpassungen wurde durch das korrigierte Bestimmtheitsmaß (R^2) beurteilt.

2.2.5 Druckmessung/-effekte

Für die Druckmessungen wurde der fs-Laser (130fs und 700fs; 10Hz) in einen mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) befüllten Behälter fokussiert (Brennweite der Linse: $f=40\text{mm}$). An dessen Boden befand sich ein zuvor geeichter Drucksensor aus PVDF-Folie (Eigenbau D. Hagner), der nach dem piezoelektrischen Effekt arbeitete. Der piezoelektrische Effekt beschreibt eine Ladungsverschiebung innerhalb eines Ionengitters aufgrund einer Formveränderung durch nichtelektrische Kräfte (Lindner, 1999). Diese Ladungsverschiebung kann als ein Spannungssignal detektiert werden. Die aktive Fläche des Sensors betrug 1mm^2 mit einer Ansprechzeit von 5ns, welche ausreichend wäre, wenn die zeitliche Länge der Druckwelle über der Ansprechzeit des Sensors läge. Die Halbwertsbreite der Druckwelle betrug etwa 100ns.

Mittels einer Photodiode wurde das Oszilloskop auf den ankommenden Laserpuls getriggert (Abb. 14) und in Abhängigkeit von der Pulsenergie die maximale Druckamplitude eines Einzelpulses gemessen.

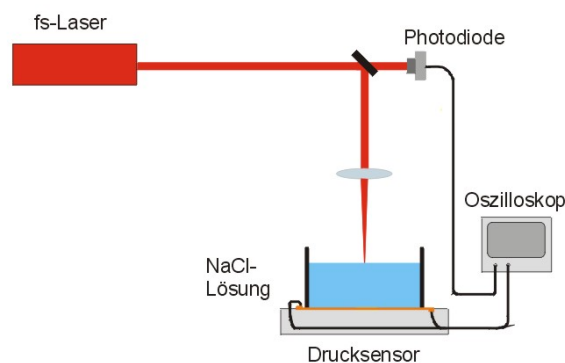


Abb. 14: Schematischer Versuchsaufbau zur Messung der Druckentwicklung *in vitro* (Versuchsdurchführung W. Müller).

Der Abstand zwischen Fokus (Durchmesser etwa 40 μ m) und Drucksensor wurde aus der gemessenen Zeitdifferenz zwischen Triggersignal und der detektierten Druckschwankung über die Laufzeit von Schall in Wasser (1480m/s bei 20°C) berechnet. Eine Spannungsänderung von 8,3mV am Oszilloskop entsprach einer dynamischen Druckänderung von einem Bar.

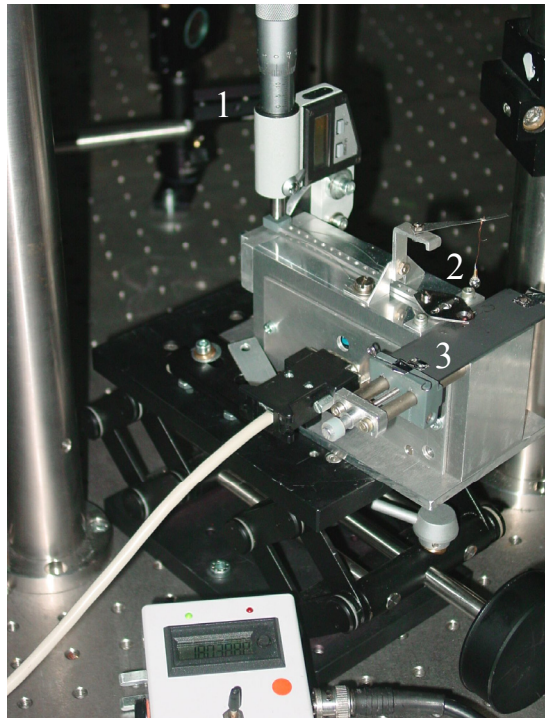
2.2.6 Bestimmung gewebespezifischer Abtragsraten

Mit einem Vibratom (Leica VT1000S) wurden Semidünnschnitte (etwa 500 μ m) porciner Weichgewebe (Nerv, Muskel und Knorpel vom Hausschwein; *Sus scrofa domestica*) erzeugt. Dazu wurde das jeweilige Gewebe grob vorgeschnitten, in eine vorgewärmte Aluminiumform (42°C) überführt und diese mit Agaroselösung (7%, 45°C) befüllt. Bei Raumtemperatur erfolgte die Aushärtung.

Nachdem die Agarose erstarrt war, wurde der Gewebe-Agarose-Block aus der Form genommen und in der Schnittkammer des Vibratoms fixiert. Die Kammer wurde anschließend mit Wasser befüllt und das Gewebe bei langsamen Messervorschub schichtweise geschnitten. Die Gewebe-Agarose-Schnitte wurden in physiologischer Kochsalzlösung kurzzeitig gelagert.

Unmittelbar vor Versuchsdurchführung wurden die Gewebeschnitte auf graphitbeschichtete Objektträger aufgebracht. Die Beschichtung sollte verhindern, daß bei dem eigentlichen Beschuß der Laser durch eine vorzeitige Strahlungsregistrierung eines Photodetektors gestoppt wird.

Anschließend erfolgte die Dickenmessung des Gewebeschnittes direkt über der zukünftigen Ablationsstelle. Dazu wurde über eine Mikrometerschraube mit Digitalanzeige eine Metallkugel langsam auf das feuchte Gewebe abgesenkt, bis der erste elektrische Kontakt der Kugel mit dem Gewebe ein akustisches Signal auslöste (Abb. 15). Der hierbei gemessene Abstand zwischen Objektträger und Gewebeoberfläche wurde als Wert für die Gewebedicke übernommen. Bei Hartgewebe (Knochen, feucht), das vor der Benutzung plangeschliffen wurde, erfolgte die Dickenmessung ebenfalls mittels Kontakttaster.

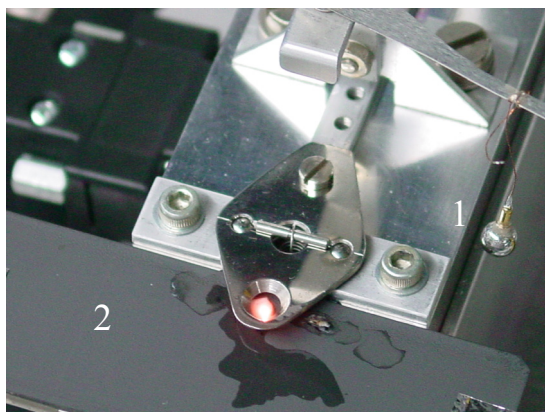


- 1) Mikrometerschraube
- 2) Metallkugel
- 3) graphitbeschichteter Objektträger

Abb. 15: Meßtool für Gewebedickenbestimmung (Entwicklung D. Hagner) mit digitalem Pulszähler (unten).

Anschließend wurde das Gewebe mit unterschiedlichen Laserleistungen bei 5kHz und 150fs Pulslänge solange bestrahlt, bis die ersten Lichtpulse das Gewebe und die Graphitschicht durchdrungen hatten (Abb. 16). Ein Photodetektor (Centronix AEPX 65) regelte die Abschaltung des Lasers, ein digitaler Pulszähler (Trumeter 7110 DIN AS) gab die benötigte Pulszahl aus.

Bei Knochen im trockenen Zustand wurde der Abtrag lichtmikroskopisch ermittelt.



- 1) Metallkugel
- 2) graphitbeschichteter Objektträger

Abb. 16: Fs-Laser abladiert nach erfolgter Dickenmessung porcines Muskelgewebe auf einem graphitbeschichteten Objektträger.

Um Vorhersagen über die Abtragsraten nichtgetesteter Laserleistungen treffen zu können, wurde nach einem Modell gesucht, das die Messungen möglichst genau beschreibt. Ein lineares Modell wurde nicht gewählt, da folgende These aufgestellt wurde: Bei einer Erhöhung der Pulsenergie wird die optische Eindringtiefe des Lasers in das jeweilige Material zur abtragslimitierenden Größe. Daher darf ein Gesamtmodell nicht linear sein.

Folgendes sigmoide Modell wurde für den Gewebeabtrag benutzt:

$$\text{Abtrag } [\mu\text{m/Puls}] = a \cdot (1 - \exp(-b \cdot x))^c \quad [\text{V}]$$

Dabei geben die Parameter a-c die Lage und die Steigung an. Die drei Parameter wurden aus den Meßdaten mit dem Modell geschätzt. Die Qualität der Anpassungen wurde durch das korrigierte Bestimmtheitsmaß (R^2) beurteilt. Das Konfidenzintervall (CI 95%) gibt die prozentuale Aufenthaltswahrscheinlichkeit des wahren Wertes innerhalb des Vertrauensbereiches an. Die ermittelten Parallelwerte wurden, zur Eliminierung von Meßwertausreißern, zuvor dem Grubbs-Test [VI] unterzogen (Dinkloh *et al.*, 1980; nach Grubbs, 1972).

2.2.7 Zellkultivierung

Die Kultivierung der primären humanen Fibroblasten der Zelllinien NHDF und N57 erfolgte getrennt im Brutschrank bei 37°C in 5%iger CO₂-Atmosphäre (pH-Regulation) und 95% relativer Luftfeuchtigkeit (Verminderung der Evaporation des Mediums). Als Kultivierungsbehältnisse dienten beschichtete Kunststoff-Petrischalen vom Typ Nunclon Surface (Nunc; 5ml) und unbeschichtete Kunststoff-Petrischalen vom Typ Tissue Culture Dish (Falcon; 15ml).

Das Wachstum beider Zelllinien erfolgte in MEM (*minimum essential medium*) mit EARLE's Salzen und L-Glutamin. Der Anteil an fötalem Kälberserum (FKS) betrug 12%.

Zur Weiterkultivierung wurde das serumhaltige Medium abgesogen und die Zellen mit Trypsinlösung (0,124%) bei 37°C für 10-20 Sekunden gespült. Der Überstand wurde anschließend mittels Pipette entfernt („Trockentrypsinierung“).

Nach 3-5 Minuten nahmen die Zellen eine kugelförmige Gestalt an, lösten sich von den Petrischalen und konnten mit serumhaltigem Medium oder PBS (siehe Kap. 2.2.8) aufgenommen werden.

Die erhaltenen Zellsuspensionen im MEM wurden, je nach Bedarf, weiterkultiviert (passagiert; im Verhältnis 1:2 oder 1:3) oder in Gefrier Röhrchen mit Flüssigstickstoff kryokonserviert (mit 10% DMSO im MEM).

Da das Alter der Zellen (Bayreuther *et al.*, 1988), die verschiedenen Stadien ihrer Wachstumsphase (Goldenberg *et al.*, 1971) und die Teilungsrate (Aujard & Trincal, 1985) in Bezug auf ihre Sensitivität in toxikologischen Untersuchungen von entscheidender Bedeutung sind, wurden folgende Standardbedingungen festgelegt:

- Die für die Experimente verwendeten primären Zellen befanden sich in der 4.-15. Passage (NHDF), bzw. 13.-20. Passage (N57)
- Das Passagieren erfolgte nur aus Petrischalen heraus, in denen die Zellen maximal 3-4 Tage (NHDF), bzw. 7 Tage (N57) nach der letzten Passage subkonfluent bis konfluent gewachsen waren.

2.2.8 Bestimmung der akuten Zytotoxizität mit dem MTT-Test

Dieses Testsystem, entwickelt von Mosmann (1983) und modifiziert durch Hansen *et al.* (1989), gibt Aufschluß über die Zytotoxizität von Testsubstanzen oder Strahlungsquellen. Der MTT-Test nutzt die Succinat-Dehydrogenaseaktivität der Mitochondrien als Kennzeichen der Vitalität der Zellen. Tetrazoliumbromid (MTT) diffundiert in die Zellen, die Succinat-Dehydrogenase öffnet den Tetrazoliumring und durch Reduktion mittels Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADPH) oder Nicotinamidadenindinucleotid (NADH) bildet sich das alkohollösliche, dunkelblaue Formazan (Slater *et al.*, 1963). Die Hemmung des Enzyms gilt als direktes Maß für akut toxische Wirkungen (Borenfreund *et al.*, 1988; Husøy *et al.*, 1993) und wird als Vitalitätsverlust bezeichnet.

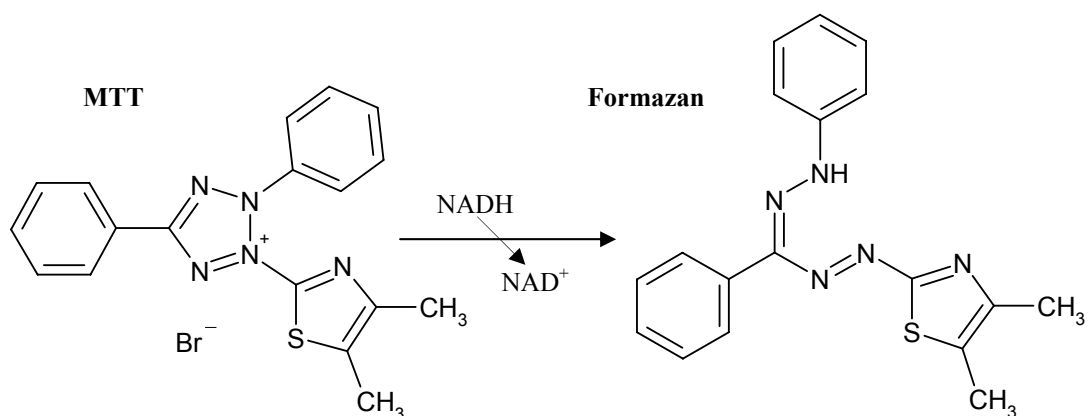


Abb. 17: Reaktionsschema und molekulare Struktur von MTT und Formazan.

Je nach Zelllinie wurden 96 Stunden (NHDF) oder 120 Stunden (N57) vor Durchführung der Experimente etwa 1000 Zellen pro Kammer auf den Chamber slides ausgesät (außer für den Blindwert) und bei 37°C, 5% CO₂ und etwa 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Vor dem weiteren Versuchsablauf fand eine Überprüfung der Zellanheftung und auf konfluentes Wachstum in den Chamber slides statt, um einheitliche Versuchsbedingungen zu gewährleisten.

Am Versuchstag wurde das Medium abgesaugt, zweimal pro Kammer mit einem Milliliter temperierten serumfreien Medium (SFM) gespült und jede Kammer mit 1,5ml SFM befüllt. Es erfolgte der Transport zum Laser in einer vorgewärmten Thermotasche. Dort wurde das SFM abgezogen und die einzelnen Chamber slides (je 4 Kammern) bestrahlt (Bestrahlungsplan: siehe Tab. 2). Die Zeit zwischen Befüllung der Kammern und der Bestrahlung betrug etwa eine Stunde (Fahrt zum Laser).

Tab. 2: Bestrahlungsplan für den MTT-Test (150fs, 5kHz, Scanner: Zeilenabstand 0,03mm, Geschw. 150mm/s).

Chamber Slide-Nummer (je 4 Kammern)	Energiedosis [J/cm ²]	Anmerkung
1	0	Blindwert, keine Zellen, nur 750µl MTT-Gebrauchslösung + 750µl Lysepuffer
2	0	Maximalwert (Nullprobe), 750µl MTT-Gebrauchslösung + 750µl Lysepuffer
3	0,31	750µl MTT-Gebrauchslösung + 750µl Lysepuffer
4	0,77	750µl MTT-Gebrauchslösung + 750µl Lysepuffer
5	1,55	750µl MTT-Gebrauchslösung + 750µl Lysepuffer
6	3,10	750µl MTT-Gebrauchslösung + 750µl Lysepuffer
7	4,65	750µl MTT-Gebrauchslösung + 750µl Lysepuffer
8	6,20	750µl MTT-Gebrauchslösung + 750µl Lysepuffer
9	7,75	750µl MTT-Gebrauchslösung + 750µl Lysepuffer
10	9,30	750µl MTT-Gebrauchslösung + 750µl Lysepuffer
11	10,85	750µl MTT-Gebrauchslösung + 750µl Lysepuffer
12	12,40	750µl MTT-Gebrauchslösung + 750µl Lysepuffer

Nach dem Laserbeschuss erfolgte die Zugabe von 750µl MTT-Arbeitslösung pro Kammer. Da das MTT-Molekül photoempfindlich ist, wurden die Zugabe der Lösung und alle folgenden Abläufe unter Verdunkelung der Proben durchgeführt.

Der Rücktransport zum Brutschrank erfolgte ebenfalls wieder in der vorgewärmten Thermotasche (Dauer etwa 45-60 Minuten).

Nach dreistündiger Inkubation im Brutschrank (37°C) wurden, um die Zellen zu lysieren, je Kammer 750µl SDS-Lysepuffer zugesetzt und mittels Pipette die Lösungen durchmischt. Die vollständige Lyse und das Lösen der Formazankristalle erfolgte im Dunkeln über Nacht bei 30°C auf einem Schüttler (~100rpm).

Am folgenden Tag wurden aus jeder Kammer jeweils 150µl Lösung in zwei Wells einer Mikrotiterplatte (96-Wells, glatter Boden) überführt, so daß nach der letzten Kammer alle Wells befüllt waren.

Die Absorption des Formazans wurde photometrisch bei 570nm Wellenlänge (Referenzwellenlänge: 650nm) im Microplate-Reader gemessen. Die ermittelten Parallelwerte wurden, zur Eliminierung von Meßwertausreißern, dem Grubbs-Test unterzogen (Dinkloh *et al.*, 1980; nach Grubbs, 1972). Dazu wurde aus den gemessenen Analysenwerten eine Prüfgröße (PG) ermittelt [VI] und mit den Grubbs-Tabellenwerten, die in Abhängigkeit zur Anzahl der Analysenwerte stehen, verglichen. War die Prüfgröße (PG) größer als der Grubbs-Tabellenwert, so wurde der untersuchte Analysenwert aus dem Datensatz entfernt.

Die Schätzfunktion des Grubbs-Test für einzelne laborinterne Ausreißerwerte (statistische Sicherheit P=90% (zweiseitig), bzw. P=95% (einseitig)) lautet:

$$PG = \frac{|X_{lk}^* - \bar{X}_l^*|}{S_l^*} \quad [VI]$$

Mit:

PG :	Prüfgröße (PG); wird mit dem Grubbs-Tabellenwert ($\alpha=0,1$; Dinkloh <i>et al.</i> , 1980; nach Grubbs, 1972) verglichen
X_{lk}^* :	gemessener Laborwert
\bar{X}_l^* :	Labormittelwert
S_l^* :	Laborstandardabweichung

Nach Eliminierung von Meßwertausreißern wurden in jeder Gruppe Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Auf eine statistische Auswertung wurde verzichtet, da die Stichprobenanzahl pro Gruppe (n=4; vier Kammern pro Chamber slide) sehr klein war.

2.2.9 Bestimmung energiedosisabhängiger DNA-Strangbruch-induktion mit dem Kometen-Assay

Der Kometen-Assay (Einzelzellgelelektrophorese; SCGE; engl.: single cell gel electrophoresis) ist eine sensitive Methode zur Erfassung von DNA-Schäden in einzelnen Zellen (Östling und Johanson, 1984; Singh *et al.*, 1988). Im pH-neutralen Milieu eignet er sich zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB; engl.: double strand breaks), im alkalischen Milieu ($\text{pH} \geq 13$) zum Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen (SSB; engl.: single strand breaks) und alkalilabilen Stellen (ALS; engl.: alkali-labile sites). Diese ALS (Apyrimidin-/Apurin-Stellen und Schäden im Zuckerphosphatgerüst) werden durch die Eliminierung von Wasserstoffbrücken zwischen den DNA-Strängen in Einzelstrangbrüche überführt.

Beim alkalischen Kometen-Assay wurden die zu untersuchenden Zellen in Agarose eingebettet, bestrahlt und anschließend lysiert. Die freigesetzte DNA wurde dann durch ein alkalisches Milieu in relaxierte Einzelstränge überführt (beim neutralen Assay wurde darauf verzichtet), elektrophoresiert und mit einem Fluoreszenzfarbstoff (hier: Ethidiumbromid) angefärbt. Die DNA-Schäden wurden dann mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Singh *et al.*, 1988).

Aufgrund der negativen Ladungen am Zuckerphosphatgerüst wandern DNA-Fragmente, in Abhängigkeit von ihrer Größe, aus dem Bereich der Zelle zur Anode, während ungeschädigte DNA im Zellbereich verbleibt. Je größer die Anzahl der Strangbrüche, desto kleiner werden die Fragmente, die dann weiter im elektrischen Feld wandern. Es entsteht der charakteristische „Komet“ (Abb. 18).

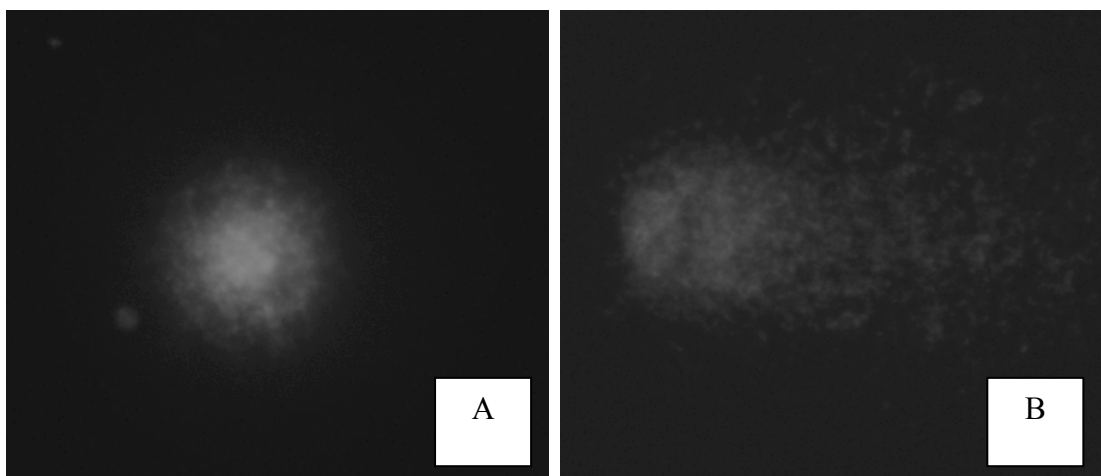


Abb. 18: Ungeschädigte DNA mit Verbleib im Zellbereich (A). Geschädigte DNA wurde im elektrischen Feld bewegt und bildet einen Kometen (B).

Einen Tag vor Versuchsdurchführung wurden Objektträger mit Ethanol (70%) gereinigt und mit einer Agarosebasalschicht (1,5%ige Standardagaroselösung) versehen. Die Agarose wurde in PBS-Puffer angesetzt, zweimal aufgeköcht und die Objektträger kurz darin eingetaucht. Die Agarose auf der Glasunterseite wurde entfernt und die Träger über Nacht horizontal liegend an der Luft getrocknet.

Am Versuchstag wurde das Wachstum der zu benutzenden Zellen überprüft. Sie sollten, um einheitliche Versuchsbedingungen zu gewährleisten, subkonfluent bis konfluent gewachsen sein (Abb. 19). Dazu wurden sie 4-5 Tage (NHDF), beziehungsweise 5-8 Tage (N57), vor Versuchsdurchführung ausgesät.

Um vorzeitige DNA-Schäden zu unterbinden, wurden alle nachfolgenden Schritte unter größtmöglichem Lichtausschluß durchgeführt.

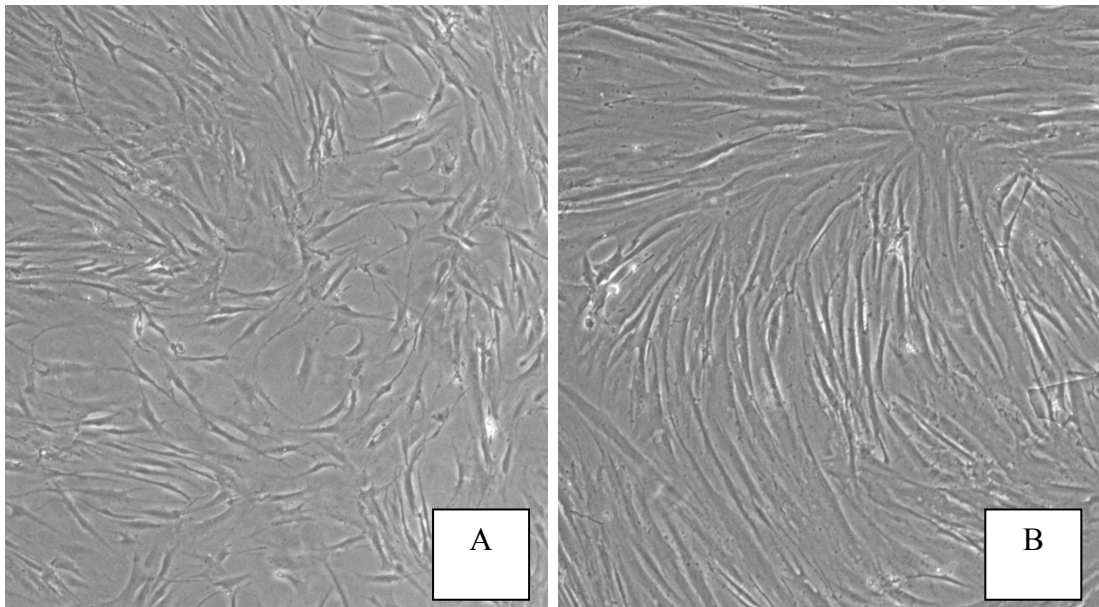


Abb. 19: Angeheftete Fibroblasten in Petrischalen. A) Subkonfluent gewachsen (NHDF, 40x). B) Konfluent gewachsen (N57, 40x).

Entsprach das Wachstum den Anforderungen, so wurde das Medium abgezogen und die Zellen zweimal mit warmen PBS-Puffer (37°C; je 4ml) gespült. Die Zellablösung von den Petrischalen erfolgte durch Spülung mit 3ml Trypsinlösung (0,124%) bei 37°C für 10-20 Sekunden. Der Überstand wurde anschließend mittels Pipette entfernt („Trockentrypsinierung“).

Nach 3-5 Minuten nahmen die Zellen eine kugelige Gestalt an, lösten sich von der Petrischale und wurden mit 150µl PBS-Puffer aufgenommen. Um eine homogene Zellsuspension zu bekommen, wurde mittels Pipette mehrfach durchgemischt. Anschließend wurden je 10µl Zellsuspension mit 90µl 37°C warmer LMP-Agarose

(0,5%) gemischt, auf einen beschichteten Objektträger pipettiert und mit einem Deckgläschen (24 x 32mm) versehen. Zum Aushärten der Agarose wurden die Objektträger etwa 3-5 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Der Transport zum Laser erfolgte in einer Thermotasche.

Bei den Versuchen mit DMSO (Dimethylsulfoxid) als Fänger für Hydroxylradikale wurde eine Stunde vor dem Ablösen der Zellen mit Trypsin das Medium mit der Chemikalie versetzt. Der LMP-Agarose wurde ebenfalls DMSO zugegeben. Die Konzentration betrug im Medium und in der Agarose 8%. Der weitere Versuchsaufbau erfolgte wie oben beschrieben.

Vor der Laserbestrahlung wurde das Deckgläschen abgezogen und der jeweilige Objektträger unter dem Scanner ausgerichtet. Da aufgrund des Arbeitsabstandes zwischen Scanner und Objektträger (~250mm) eine einheitliche Bestrahlung der gesamten zellenthaltenden Agarosefläche (24 x 32mm) auf einmal nicht möglich war (Fehler durch größer werdenden Winkel bei lateralen Bestrahlungen), wurde das Strahlungsfeld in zwei Bereiche mit je 24 x 16mm geteilt. Der Objektträger wurde mit dem ersten Feld unter dem Scanner zentriert und bestrahlt. Anschließend wurde durch Verschieben des Objektträgers das zweite Feld zentriert und unter denselben Parametern beschossen (Tab. 3). Fremdstrahlung durch Lichtquellen wurde vermieden.

Tab. 3: Bestrahlungsplan für den Kometen-Assay (Variationen: NHDF oder N57; mit DMSO (8%) oder ohne; 150fs oder 400fs). Repetitionsrate 5kHz, Scanner: Zeilenabstand 0,03mm, Geschw. 150mm/s. Ausnahmen: Versuch NHDF bei 150fs auf SSB ist aus drei separaten Versuchen zusammengesetzt; Versuch NHDF bei 150fs auf DSB ist aus zwei separaten Versuchen zusammengesetzt.

Objektträger-Nummer	Energiedosis [J/cm^2]	Anmerkung
1 + 2	0	Blindwert (Nullprobe)
3 + 4	0,77	
5 + 6	1,55	
7 + 8	3,10	
9 + 10	4,65	
11 + 12	6,20	
13 + 14	7,75	

Um eine Reparatur durch die Zellen zu verhindern, wurden die Objektträger direkt nach der Bestrahlung des zweiten Feldes in eiskalten Lysepuffer überführt. Dort blieben sie für 3-3,5 Stunden.

Nach erfolgter Lyse von Zell- und Kernmembranen wurden die Objektträger in eine mit Eis gekühlte und mit Elektrophoresepuffer ($\text{pH} \geq 13$) befüllte horizontale Elektrophoresekammer überführt. Dort erfolgte innerhalb von 40 Minuten, aufgrund des alkalischen Milieus, die Auftrennung des DNA-Doppelstranges in die relaxierte Einzelstrangform (engl.: alkaline unwinding) und die Überführung von ALS in Strangbrüche. Anschließend wurde eine 20-minütige Elektrophorese bei 25V und 300mA durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Objektträger aus der Kammer genommen, horizontal auf ein Abtropfgestell gelegt, dreimal für insgesamt 5 Minuten mit Neutralisationspuffer überschichtet und abschließend in Reinstwasser gespült. Die Trocknung erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

Für die Fluoreszenzauswertung wurde auf den zellenthaltenden Bereich der trockenen Objektträger je 60 μl Ethidiumbromidlösung (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) pipettiert und mit einem Deckglaschen (24 x 32mm) versehen. Nach etwa 15 Minuten wurde die durch Ethidiumbromid angefärbte DNA (LePecq & Paoletti, 1967) am Fluoreszenzmikroskop mit einer CCD-Kamera (ColorView 12) als Bilder (Vergrößerung 400x, Belichtungszeit eine Sekunde) im TIF-Format (engl.: tagged image file) aufgenommen (Bildaufnahmesoftware: analySIS[®] Pro 3.2). Pro Objektträger wurden etwa 50 zufällig detektierte Kometen aufgenommen, bei den hohen Energiedosen des Lasers etwas weniger. Da für jede Energiedosis zwei Objektträger unabhängig bestrahlt und fotografiert wurden, betrug die zur Auswertung benutzte Kometenanzahl pro Energiedosis im Durchschnitt 100 Aufnahmen.

Der Fluoreszenzfiltersatz hatte folgende spektrale Daten: der Anregungsfilter lag bei 546nm und der Barrierefilter bei 590nm. Die Auswertung der Bilder erfolgte durch die Software „Scion Image for Windows“ in Verbindung mit dem Kometen-Makro „Scion comet 1.3“ (Helma & Uhl, 2000). Mittels dieser Software wurde das sogenannte „tail moment“ bestimmt, das als das Produkt aus der Länge des Kometenschweifes und dem prozentualen Anteil der DNA im Kometenschweif definiert ist (Ashby *et al.*, 1995). Die Höhe des „tail moments“ nimmt mit der Anzahl der DNA-Schädigungen (Strangbrüche) zu. Das maximale „tail moment“ lag bei der verwendeten Konfiguration und Aufnahmetechnik bei 57000 (relative Einheit). Zellen, deren DNA so stark geschädigt war, daß diese nicht mehr korrekt mit der Software detektierbar war, wurden in die Auswertung mit einbezogen, indem ihr „tail moment“ gleich dem maximal möglichen „tail moment“ gesetzt wurde. Konnten mehr als 50%

aller Zellen einer Gruppe nicht korrekt ausgewertet werden, so wurde das „tail moment“ der Gruppe als größer 57000 eingestuft.

Aufnahmen, die durch technische Faktoren nicht auswertbar waren (Unter- oder Überbelichtung, ungenaue Zuordnung der Kopfregion des Kometen durch die Software, usw.), wurden nicht für die Auswertung verwendet.

Nachdem die „tail momente“ innerhalb einer Versuchsgruppe ermittelt waren, wurden mögliche Meßwertausreißer durch den Grubbs-Test eliminiert (Beschreibung Grubbs-Test siehe Kap. 2.2.7) und das Konfidenzintervall (CI 95%) für die prozentuale Aufenthaltswahrscheinlichkeit des wahren Wertes innerhalb des Vertrauensbereiches berechnet. Es folgte die deskriptive Statistik. Dazu wurden die Werte einer Gruppe in 3000er Schritten zusammengefaßt und anschließend auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Waren die Werte zweier zu vergleichender Gruppen normalverteilt (und die Varianzen gleich), so wurde die Überprüfung auf Signifikanz zwischen den Gruppen mittels t-Test durchgeführt. War eine Normalverteilung nicht gegeben, so wurde der Mann-Whitney-Test (oder auch U-Test genannt) benutzt.

3. Ergebnisse

3.1 Temperaturmessung/-effekte

Temperaturmessungen:

Thermische Veränderungen von Wasser (300µl) wurden direkt mittels Thermosensor bei der Bestrahlung mit einem Ti:Saphir-Laser detektiert (Abb. 20). Vergleichende Messungen wurden an einem freilaufenden Er:YAG-Laser (Abb. 21) und einem gepulsten CO₂-Laser (Abb. 22) durchgeführt. Anhand der gemessenen Temperaturen wurde ein Modell erstellt [IV], mit dem sich die Maximaltemperatur je Laser und Leistung berechnen lassen. In Tabelle 4 werden die jeweiligen Parameter des verwendeten Temperaturmodells angegeben.

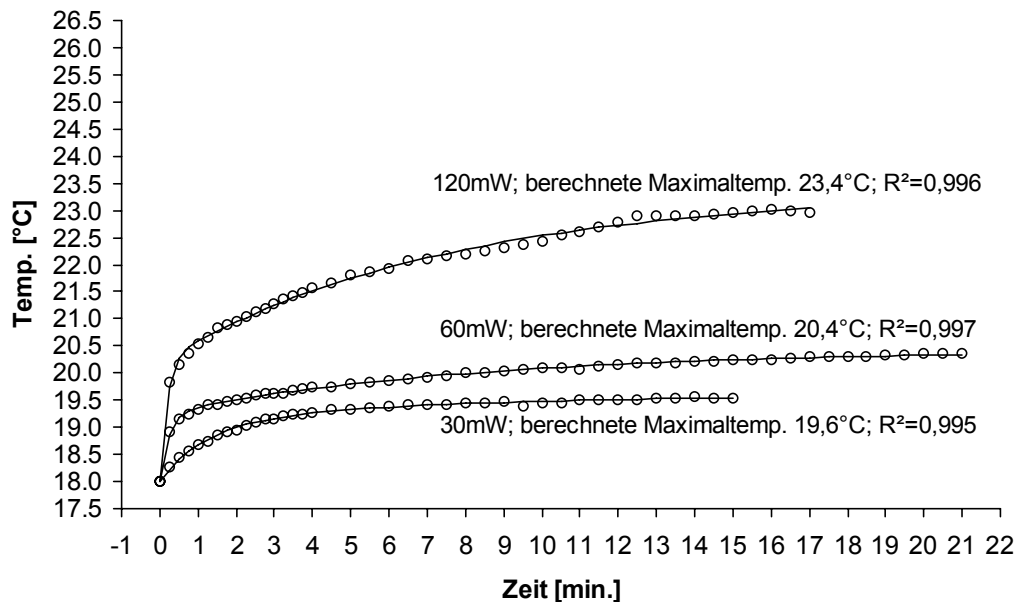


Abb. 20: Temperaturänderung von Wasser bei Bestrahlung mit einem gepulsten Ti:Saphir-Laser (30mW, 60mW und 120mW bei 3kHz; Fokusbereich: 40µm; Pulslänge: 130fs). Berechnete Maximaltemperatur und korrigiertes Bestimmtheitsmaß sind mit angegeben. Temperaturmodelle [IV] sind als schwarze Linien und Meßwerte als Kreise dargestellt. Weitere Modellparameter sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Tab. 4: Starttemperatur und die Modell-Parameter zur Lage und Steigung der Temperaturmessung bei Er:YAG-Laser, CO₂-Laser und Ti:Saphir-Laser.

\Lasertyp Parameter\	Er:YAG 33mW	Er:YAG 57mW	Er:YAG 64mW	CO ₂ 50mW	CO ₂ 100mW	Ti:Saphir 30mW	Ti:Saphir 60mW	Ti:Saphir 120mW
Starttemp. [°C]	20	20	20	20	20	18	18	18
a	1,4157	1,8344	1,8395	2,5429	5,4842	1,0641	1,2436	2,1971
b	0,5846	0,6398	0,7695	0,3051	0,2868	0,8376	4,4059	5,5720
c	0,4021	2,6492	4,8651	2,8097	5,5333	0,5526	1,1799	3,1554
d	0,1817	0,1687	0,1176	0,3052	0,2868	0,1398	0,1260	0,1347

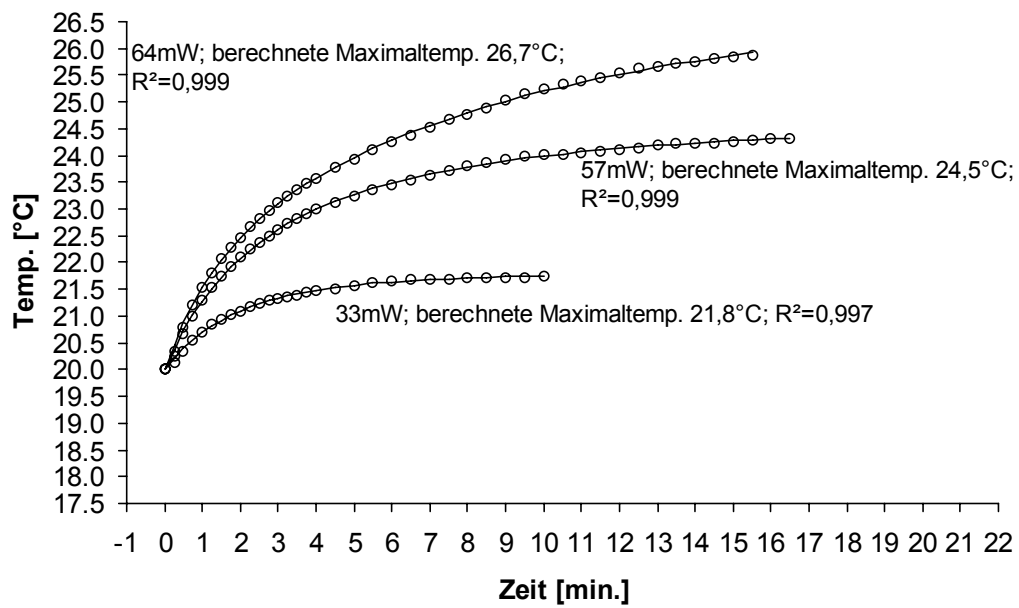


Abb. 21: Temperaturänderung von Wasser bei Bestrahlung mit einem freilaufenden Er:YAG-Laser (33mW bei 3,7Hz; 57mW bei 3,7Hz; 64mW bei 3Hz; Fokusbereich: 200µm). Berechnete Maximaltemperatur und korrigiertes Bestimmtheitsmaß sind mit angegeben. Temperaturmodelle [IV] sind als schwarze Linien und Meßwerte als Kreise dargestellt. Weitere Modellparameter sind Tabelle 4 zu entnehmen.

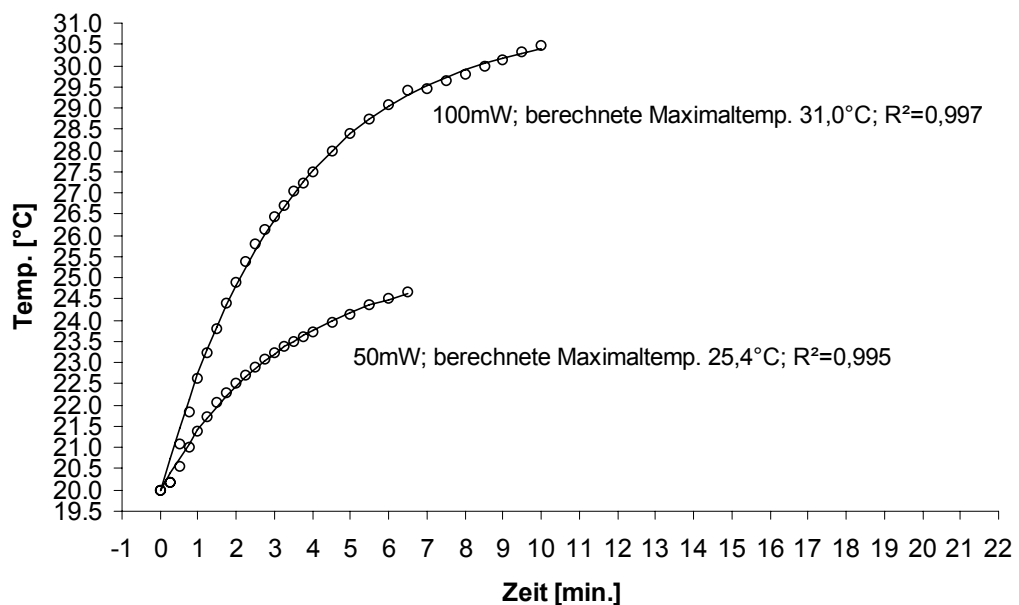


Abb. 22: Temperaturänderung von Wasser bei Bestrahlung mit einem gepulsten CO₂-Laser (50mW und 100mW bei 4Hz; Fokusbereich: 300µm). Berechnete Maximaltemperatur und korrigiertes Bestimmtheitsmaß sind mit angegeben. Temperaturmodelle [IV] sind als schwarze Linie und Meßwerte als Kreise dargestellt. Weitere Modellparameter sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Das Verhältnis zwischen der mittleren eingestrahlenen Leistung und der relativen Temperaturerhöhung ist in Abb. 23 dargestellt.

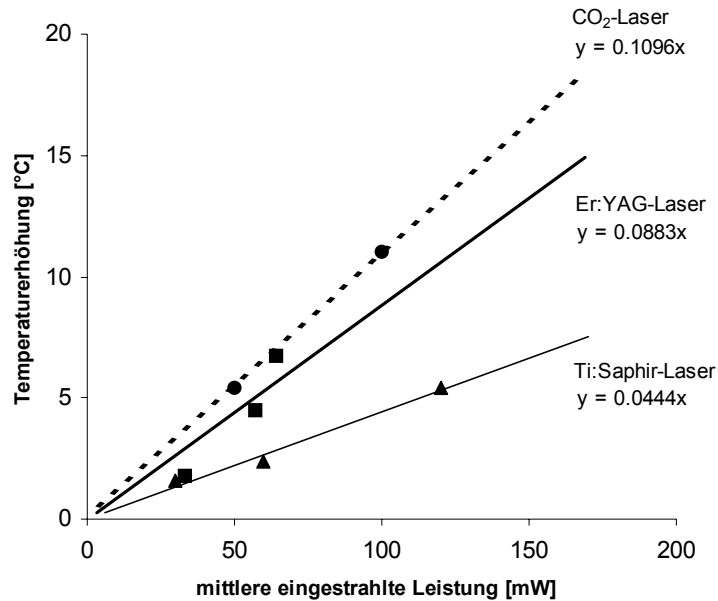


Abb. 23: Temperaturerhöhung [°C] in Abhängigkeit von der mittleren eingestrahlenen Leistung [mW] verschiedener Lasertypen. Die Steigung der Modellgeraden ist jeweils angegeben. Kreise: CO₂-Laser. Quadrate: Er:YAG-Laser. Dreiecke: Ti:Saphir-Laser.

Von den drei verwendeten Lasern zeigte der CO₂-Laser in diesem Versuch die größte relative Temperaturänderung pro eingestrahelter Leistung, der Ti:Saphir-Laser die geringste relative Temperaturänderung. Um einen Anstieg um einen Grad Celsius zu erzielen, beträgt der Faktor der aufzuwendenden Leistung zwischen Ti:Saphir-Laser und CO₂-Laser etwa 2,5, zwischen Ti:Saphir-Laser und Er:YAG-Laser etwa 1,5 (siehe Tab. 5).

Tab. 5: Verhältnis von eingebrachter Leistung pro Temperaturerhöhung um einen Grad Celsius bei CO₂-Laser, Er:YAG-Laser und Ti:Saphir-Laser.

Lasertyp/ Fokusbereich	mittlere eingestrahlte Leistung [mW]	maximale Temperaturerhöhung [°C]	mW/°C	durchschnittl. mW/°C
CO ₂ /300µm	50	5,4	9,259	9,2
	100	11	9,091	
Er:YAG/200µm	33	1,8	18,333	13,5
	57	4,5	12,667	
	64	6,7	9,552	
Ti:Saphir/40µm	30	1,6	18,750	22,0
	60	2,4	25,000	
	120	5,4	22,222	

Thermische Veränderungen von Hart- und Weichgeweben nach Laserablation:

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Hartgeweben (Kochlea und Amboß (Incus) des Meerschweinchens), sowie histomorphologische Schnitte von Weichgeweben (Nervengewebe vom Meerschweinchen; Fett- und Muskelgewebe vom Hausschwein), sollten mögliche Gewebeeränderungen durch Temperaturerhöhung aufzeigen.

Veränderungen in der Oberflächenstruktur von Kochleae nach Laserbestrahlung sind in Abb. 24 dargestellt.

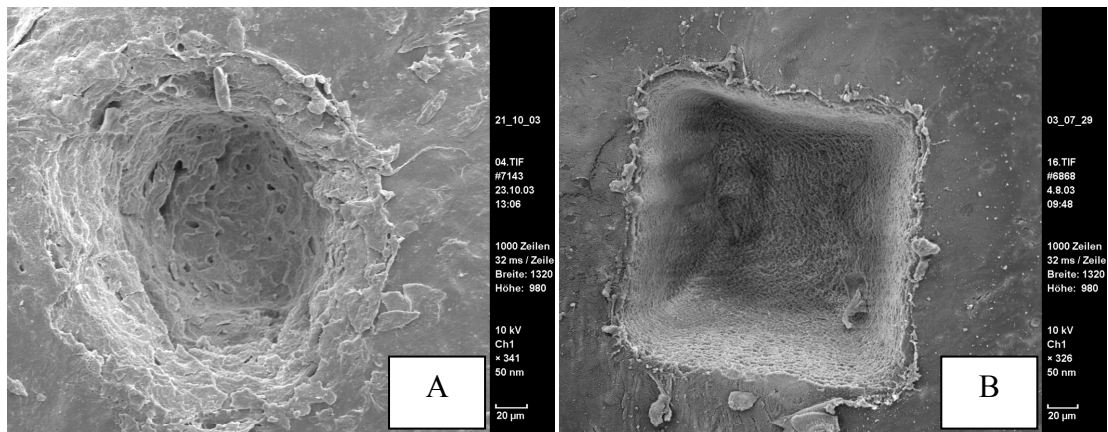


Abb. 24: Oberfläche bestrahlter Kochleae (Meerschweinchen), Durchmesser 200µm. A) Er:YAG-Laser, Fokusbereich 200µm, 4 x 3mJ mit Verschmelzung der Knochenoberfläche im Ablationsbereich. B) Ti:Saphir-Laser, Fokusbereich 40µm, Pulsüberlappung etwa 35%, 30 Scans x 60µJ, 5kHz, ohne Verschmelzungen. Die feinporöse Knochenstruktur ist erhalten geblieben.

Beim Er:YAG-Laser konnte eine deutliche Verschmelzung der Knochenoberfläche gezeigt werden (Abb. 24A), während beim Ti:Saphir-Laser die feinporöse Struktur des Knochens erhalten blieb (Abb. 24B).

Um Aussagen über mögliche thermische Schäden in lateraler Richtung zur Ablationsachse treffen zu können, wurde der auf den Steigbügel (Stapes) einwirkende Fortsatz eines Ambosses (Incus) mit einem Ti:Saphir-Laser abgetrennt (Abb. 25).

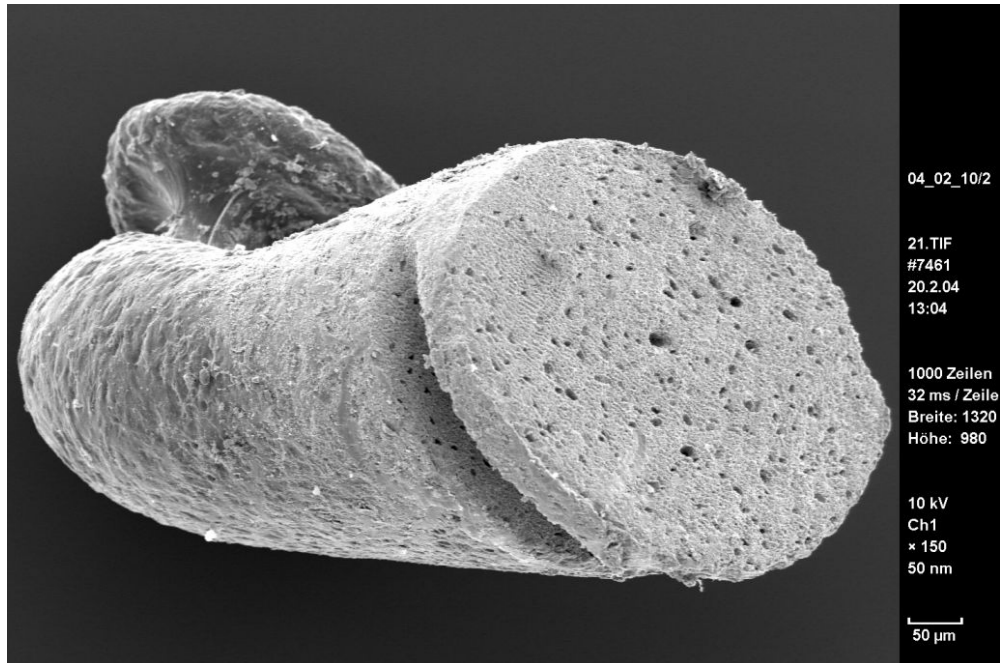


Abb. 25: Oberfläche eines abgetrennten Amboß-Fortsatzes (Meerschweinchen), lateral zur Ablationsachse. Ti:Saphir-Laser, 6000 Scans x 50µJ, 5kHz. Keine Schmelzzonen erkennbar.

In keinem Fall, unabhängig von der gewählten Pulsenergie (20-100µJ, 5kHz), konnten Schmelzzonen an Hartgeweben nach Ti:Saphir-Laserbestrahlung gefunden werden.

In histomorphologischen Schnitten sollten mögliche Veränderungen an Weichgeweben gezeigt werden. Dazu wurde Nervengewebe (Nervus infraorbitalis, Hausschwein, Abb. 26; Nervus facialis, Meerschweinchen, Abb. 27), Muskelgewebe und Fettgewebe (Masseter, Hausschwein, Abb. 28) bestrahlt.

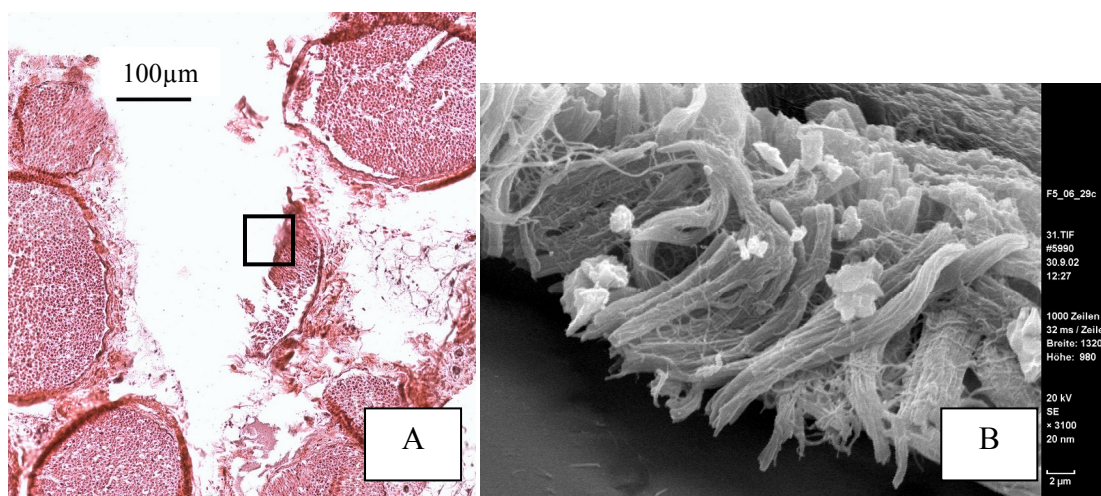


Abb. 26: Nervengewebe vom Hausschwein nach Bestrahlung. Ablationskrater lateral zur Strahlachse. Ti:Saphir-Laser, 33µJ, 3kHz. Keine thermischen Schädigungszonen erkennbar. A) Histologischer Schnitt, HE-Färbung. B) Korrelierende REM-Aufnahme.

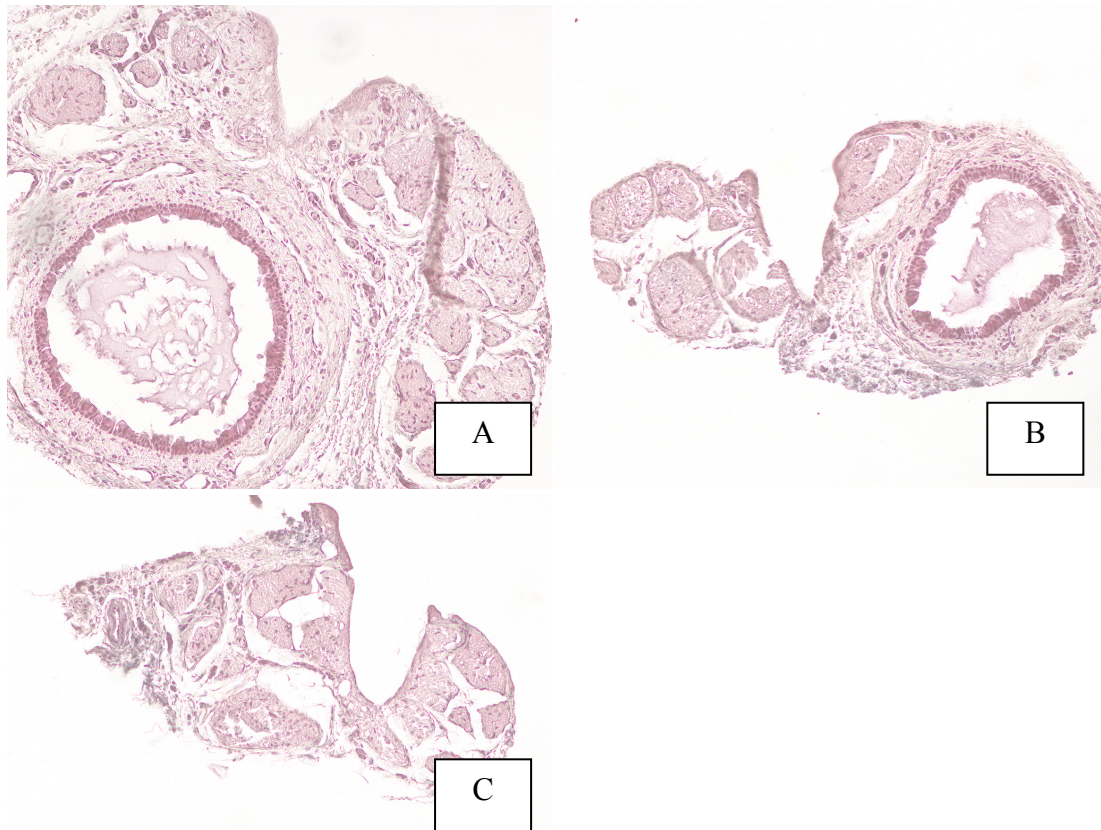


Abb. 27: Nervengewebe vom Meerschweinchen nach Bestrahlung. Ablationskrater lateral zur Strahlachse. Ti:Saphir-Laser, 5kHz. A) 15 Scans x 50µJ. B) 9 Scans x 80µJ. C) 5 Scans x 100µJ. Mögliche thermische Schädigungszonen im subzellulären Bereich. Thionin-Färbung. Vergrößerung 100x.

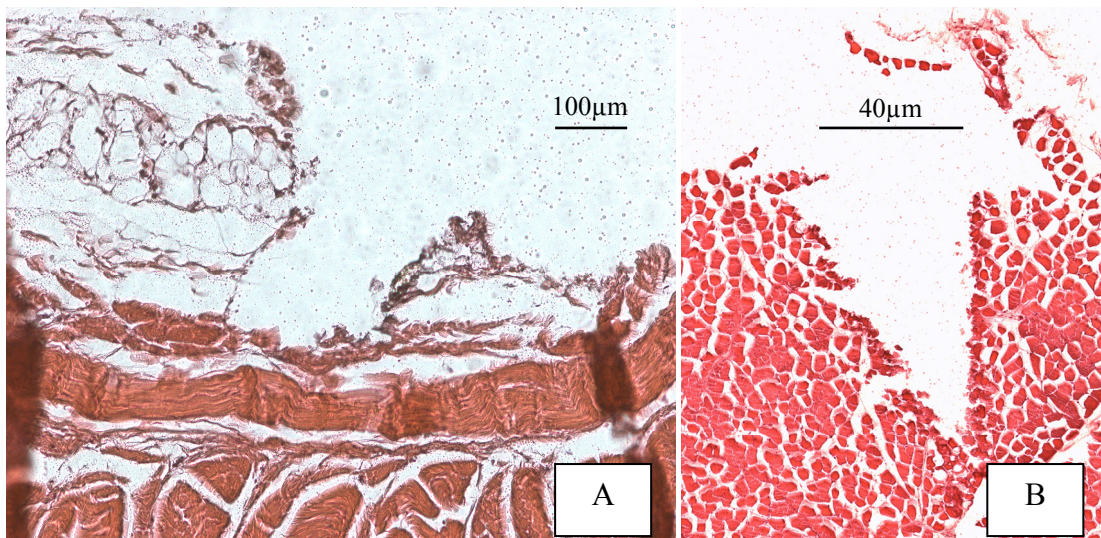


Abb. 28: Fett- und Muskelgewebe vom Hausschwein nach Bestrahlung. Ablationskrater lateral zur Strahlachse. Ti:Saphir-Laser, 3kHz. A) Übergang Fett-/Muskelgewebe, 130µJ. B) Muskelgewebe, 33µJ. Mögliche thermische Schädigungszonen liegen im subzellulären Bereich. HE-Färbung.

Die thermischen Schäden bewegten sich bei allen Geweben im subzellulären Größenbereich. Es konnten keine ausgeprägten Karbonisierungs- oder Koagulationszonen gefunden werden.

Im Vergleich zu den Ablationskratern eines Ti:Saphir-Lasers ist in Abb. 29 ein typischer Krater nach Er:YAG-Laserbestrahlung mit deutlichem thermischen Schaden zu sehen.

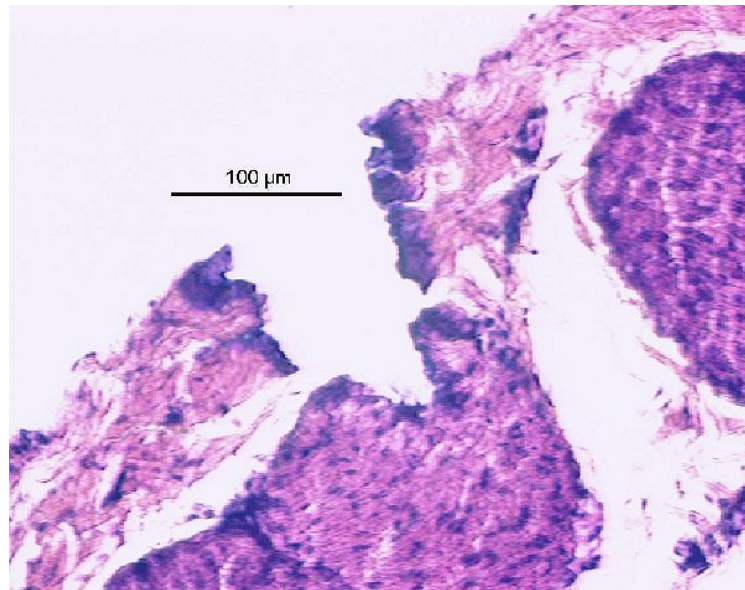


Abb. 29: Nervengewebe vom Hausschwein nach Bestrahlung. Ablationskrater lateral zur Strahlachse. Er:YAG-Laser, freilaufend. Einzelpuls, 15mJ. Thermische Schädigungszonen reichen etwa 20-30µm ins Gewebe. HE-Färbung.

3.2 Druckmessung/-effekte

Druckmessungen:

Die Druckmessungen erfolgten in einem mit physiologischer Kochsalzlösung befüllten Behälter, an dessen Boden sich ein Drucksensor befand. Die Druckentwicklung jeweils eines Einzelpulses wurde beim Ti:Saphir-Laser gemessen und mit der Druckentwicklung beim freilaufenden Er:YAG-Laser verglichen (Abb. 30).

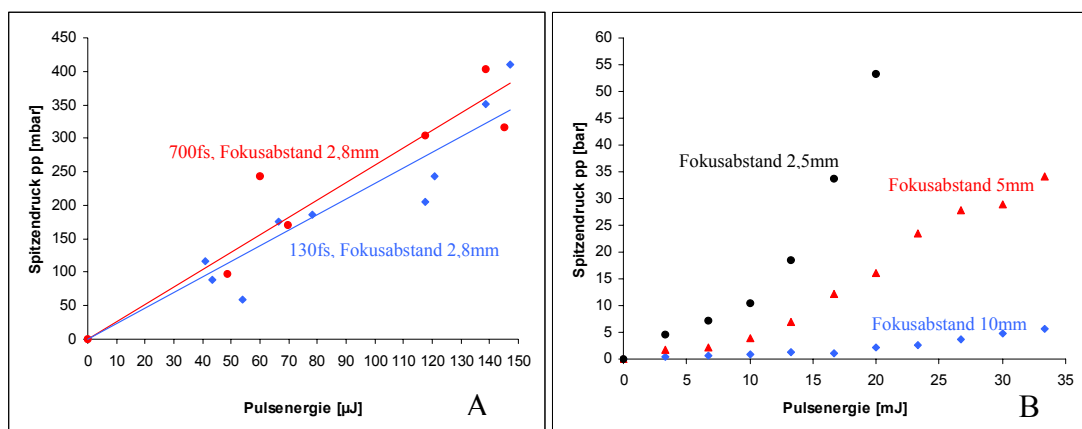


Abb. 30: Spitzendruckentwicklung (peak to peak) in Abhängigkeit vom Abstand zwischen Laserfokus und Drucksensor. A) Ti:Saphir-Laser, kurze Pulse (blaue Rauten) und lange Pulse (rote Kreise), Druckangaben in Millibar. B) Er:YAG-Laser (freilaufend), Abstand 2,5mm (schwarze Kreise), Abstand 5mm (rote Dreiecke) und Abstand 10mm (blaue Rauten), Druckangaben in Bar.

Wie die Messungen zeigten, bewegt sich der Spitzendruck beim Ti:Saphir-Laser, bei einem Fokusabstand von etwa 2,8mm, im Millibar-Bereich. Die Pulslänge von 130fs zu 700fs übt kaum einen Einfluß aus (Abb. 30A). Beim Er:YAG-Laser liegt der Spitzendruck deutlich höher im Bar-Bereich (Fokusabstand 2,5mm, Abb. 30B). Mit zunehmendem Fokusabstand nimmt er deutlich ab.

Photoakustische Veränderungen von Hart- und Weichgeweben nach Laserablation:

Sowohl rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Hartgeweben, als auch histomorphologische Schnitte von Weichgeweben, sollten mögliche Gewebeeränderungen durch photoakustische Effekte aufzeigen.

Dazu wurde die oberflächennahe Struktur von Hartgewebe (Amboß des Meerschweinchens) nach Laserbestrahlung untersucht. Als Maß für photoakustische Effekte wurde der minimal mögliche Linienabstand zwischen zwei Geraden ermittelt (Abb. 31). Jede Gerade war 500µm lang und der Abstand zwischen ihnen wurde von 100µm auf 40µm reduziert.

Der kritische Abstand lag bei einer Pulsenergie von 80µJ bei 40-45µm (siehe unterer Steg bei Abb. 31A + B).

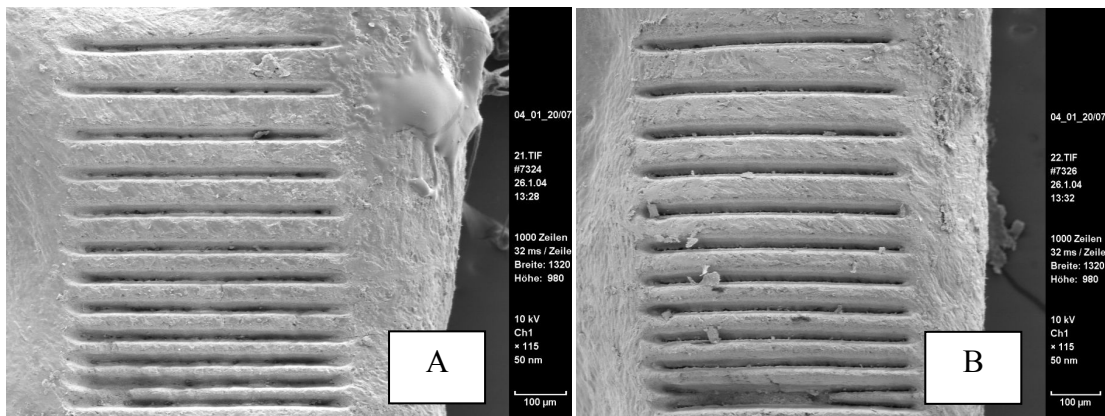


Abb. 31: Ermittlung des minimal möglichen Linienabstandes bei Hartgewebe (Amboß Meerschweinchen). Abstand zwischen den Linien (von oben nach unten): 100, 90, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40µm. Ti:Saphir-Laser, 5kHz. A) 38 Scans x 80µJ. B) 76 Scans x 80µJ.

Um den ermittelten minimalen Linienabstand in einem mechanisch sensibleren Modell zu bestätigen, wurde ein Wabenmuster mit schmalen Verbindungsstegen (etwa 40µm) gewählt (Abb. 32). Die Pulsenergie wurde für die Bestrahlung auf 50µJ reduziert.

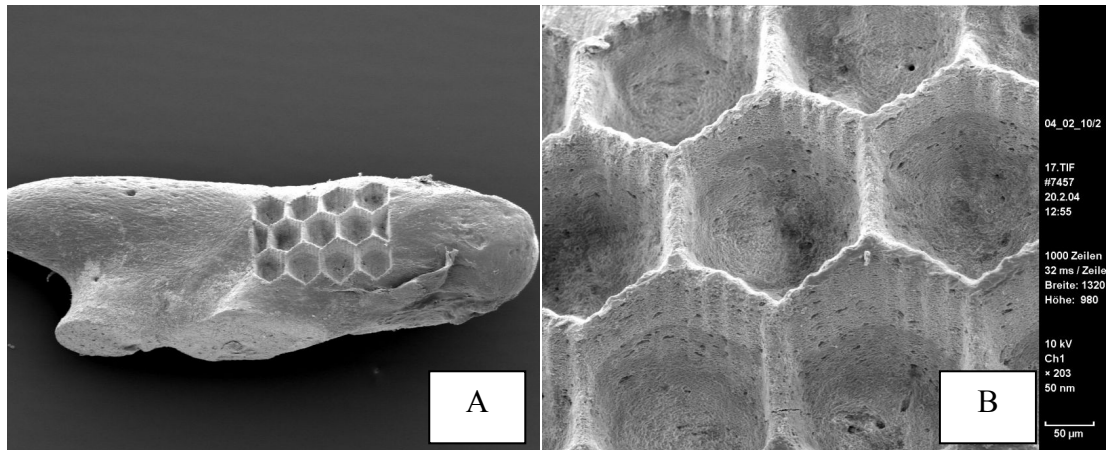


Abb. 32: Wabenförmig bestrahlter Amboß (Meerschweinchen), Stegbreite zwischen den Waben etwa $40\mu\text{m}$. Ti:Saphir-Laser, 40 Scans \times $50\mu\text{J}$, 5kHz. A) Übersichtsaufnahme. B) Vergrößerung. Es sind kaum Schäden durch photoakustische Effekte sichtbar.

Wie in Abb. 32B gut zu erkennen, sind die Stege zwischen den Waben kaum beschädigt. Auch im direkten Oberflächenbereich sind sie größtenteils unbeschädigt. Die Riffelungen an den Wabenrändern resultieren aus dem gewählten Scanzeilenabstand von $25\mu\text{m}$ innerhalb der Wabenfläche und stellen keine Schadensform dar.

An Weichgewebe sollte ebenfalls das Auftreten möglicher photoakustischer Effekte untersucht werden. Dazu wurde Nervengewebe (vom Hausschwein) benutzt, um eine Aussage über eventuelle Reizleitungsschäden bei Laserfokusannäherung treffen zu können.

Bei allen Versuchen und den anschließenden Aufarbeitungsschritten wurde unbestrahltes Gewebe als Nullprobe mitgeführt (Abb. 33).

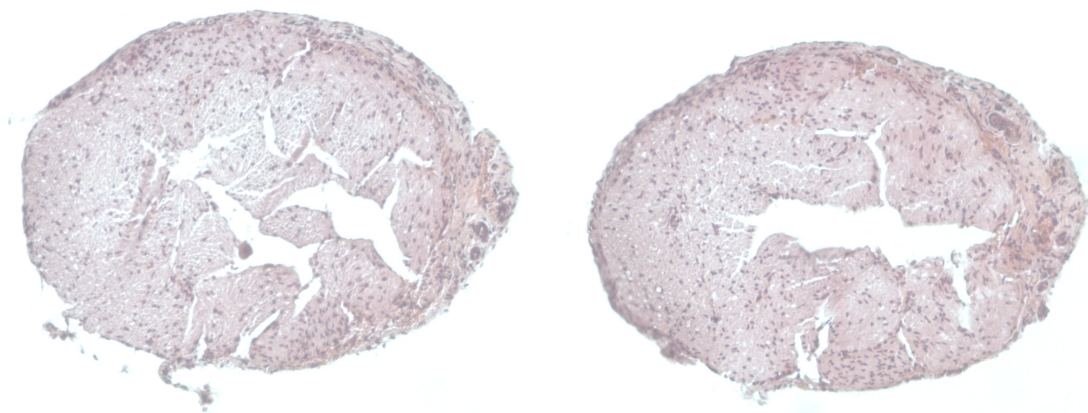


Abb. 33: Unbestrahltes Nervengewebe (Nervus cochlearis; Meerschweinchen) mit sternförmigen Zerreißen im mittleren Bereich als Entwässerungs-/Schneideartefakt. Thionin-Färbung. Vergrößerung 100x.

Bei einer Pulsenergie von $50\mu\text{J}$ konnten keine photoakustischen Schäden am Nervengewebe gefunden werden (Abb. 34). Bei den zu erkennenden Zerreißungen handelte es sich um Artefakte der Entwässerung/des Schneidens (Abb. 33).

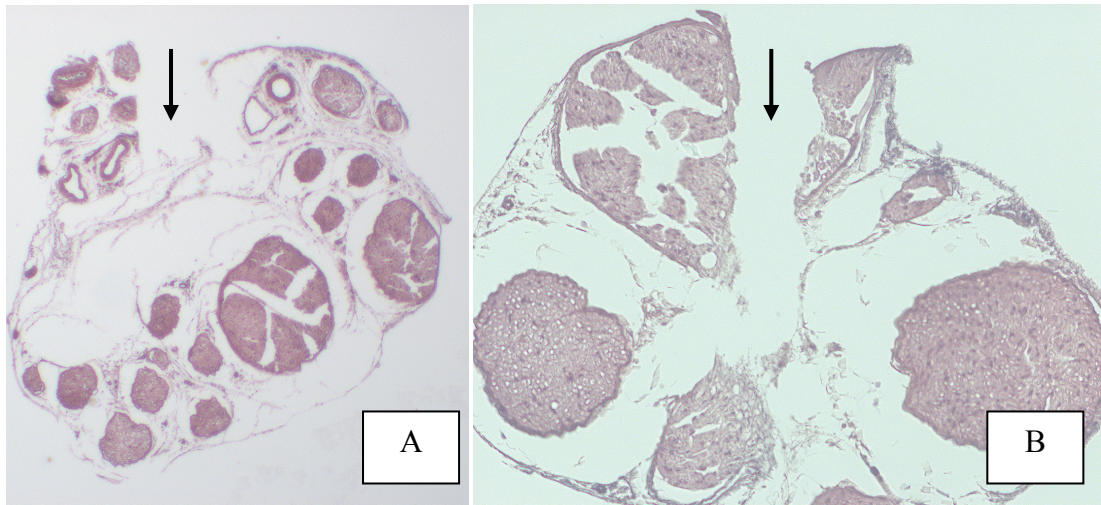


Abb. 34: Bestrahltes Nervengewebe vom Meerschweinchen. Ablationskrater liegt lateral zur Strahlachse (Pfeil). Ti:Saphir-Laser, 25 Scans x $50\mu\text{J}$, 5kHz. A) Nervus ischiadicus (Vergrößerung 40x). B) Nervus facialis (Vergrößerung 100x). Thionin-Färbung.

Wurde die Pulsenergie auf $100\mu\text{J}$ erhöhet, so konnten bei einigen Proben deutliche Gewebeauflockerungen entlang der Strahlachse gefunden werden (Abb. 35), die sich in ihrem Aussehen (Verlauf langsb zur Strahlachse) deutlich von den beschriebenen Artefakten unterschieden.

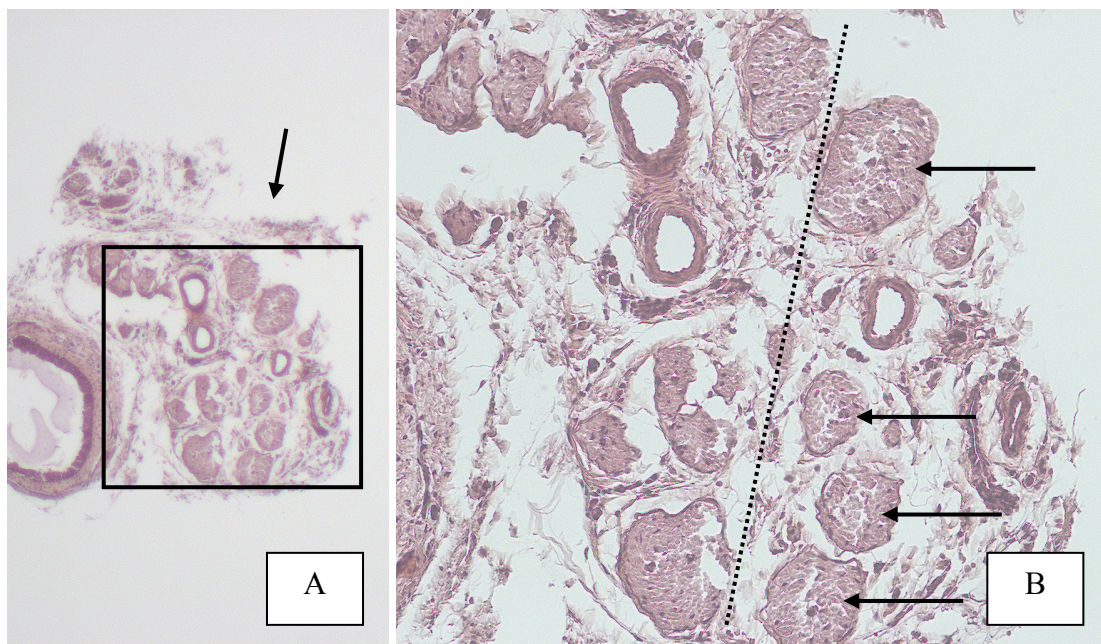


Abb. 35: Bestrahltes Nervengewebe vom Meerschweinchen (Nervus facialis). Ablationskrater liegt lateral zur Strahlachse (Pfeil in Abb. A). Ti:Saphir-Laser, 15 Scans x $100\mu\text{J}$, 5kHz. A) Übersichtsaufnahme (Vergrößerung 40x). B) Vergrößerung (100x) mit deutlichen Gewebeauflockerungen (Pfeile) entlang der Strahlachse (gestrichelte Linie). Thionin-Färbung.

Besonders geeignet für photoakustische Untersuchungen sind die Zilien der Haarzellen des Innenohres (Abb. 36). Sie reagieren, aufgrund ihrer sehr feinen Struktur, ausgesprochen sensibel auf Druckwellen. Diese Druckwellen können Effekte von Verformung bis Abscherung der Zilien bewirken.

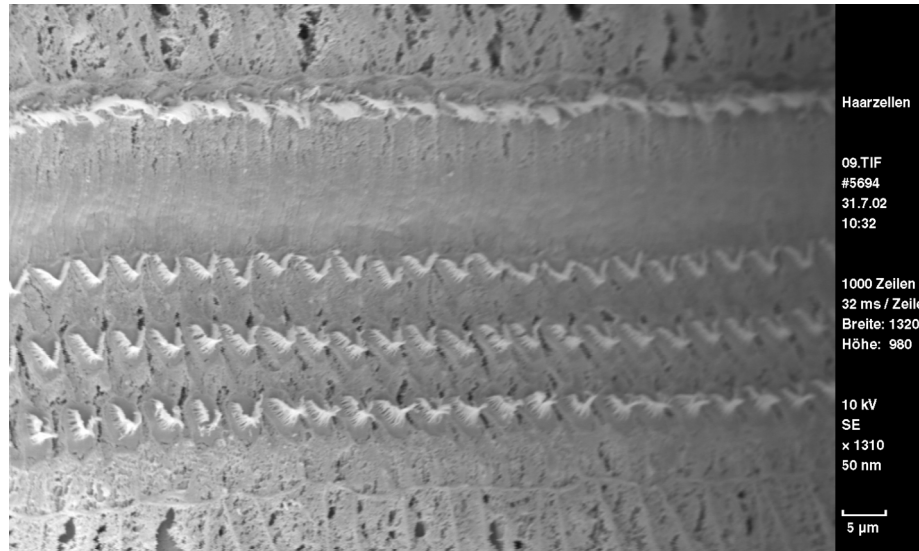


Abb. 36: Ungeschädigte Zilien eines Innenohres (Meerschweinchen), bestehend aus drei Reihen äußerer Zilien (v-förmig) und einer Reihe innerer Zilien (linienförmig).

Nach Bestrahlungen mit verschiedenen Pulsenergien eines Ti:Saphir-Lasers wurden die Zilien der Haarzellen auf mögliche photoakustische Schäden untersucht (Abb. 37-39) und mit den Zilien nach Er:YAG-Laserbeschuss (Abb. 40, 41) verglichen.

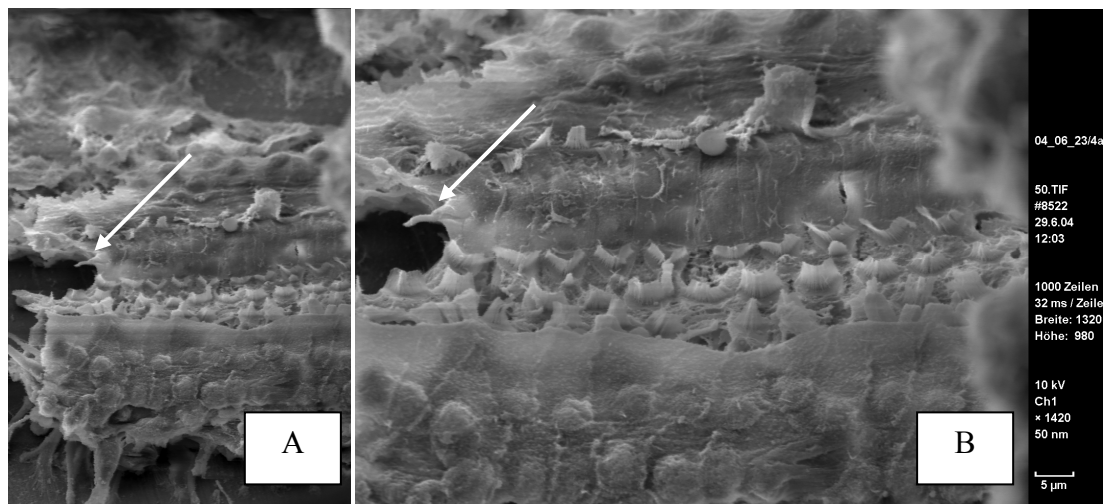


Abb. 37: Intakte Zilien einer Kochlea (Meerschweinchen) direkt neben einem Ablationskrater (Pfeil). Ti:Saphir-Laser, 50µJ, Gesamtscananzahl 600, 5kHz. A) Übersichtsaufnahme. B) Vergrößerung.

Bei einer Pulsenergie von $50\mu\text{J}$ konnte keine mechanische Beschädigung der Zilien gefunden werden (Abb. 37B). Direkt neben der Ablationsstelle waren weder Scheuerungen noch Verformungen der Zilien zu erkennen.

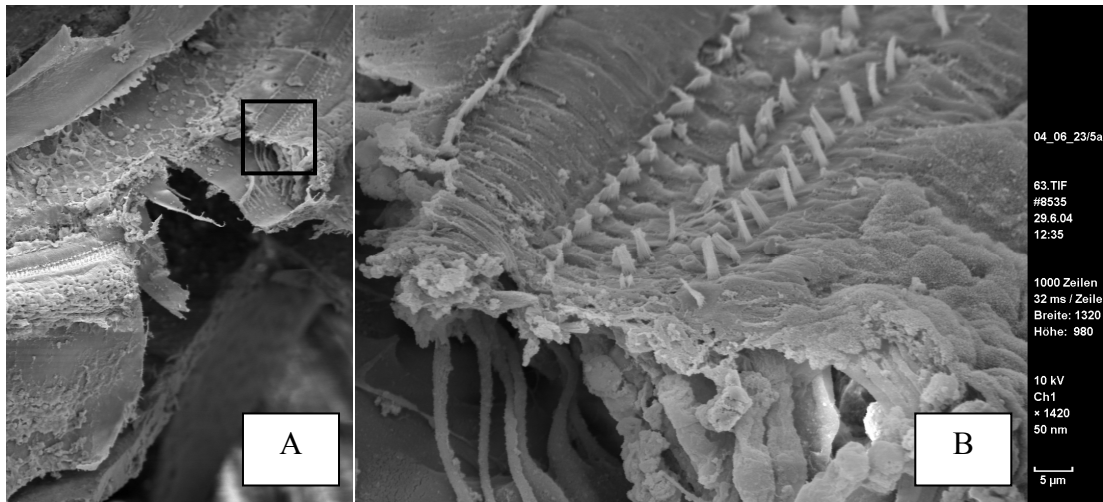


Abb. 38: Intakte Zilien einer Kochlea (Meerschweinchen) direkt neben einem Ablationskrater. Ti:Saphir-Laser, $80\mu\text{J}$, Gesamtscananzahl 200, 5kHz. A) Übersichtsaufnahme. B) Vergrößerung.

Auch bei einer Pulsenergie von $80\mu\text{J}$ konnten in unmittelbarer Nähe zum Ablationskrater keine deformierten Zilienareale gefunden werden (Abb. 38B).

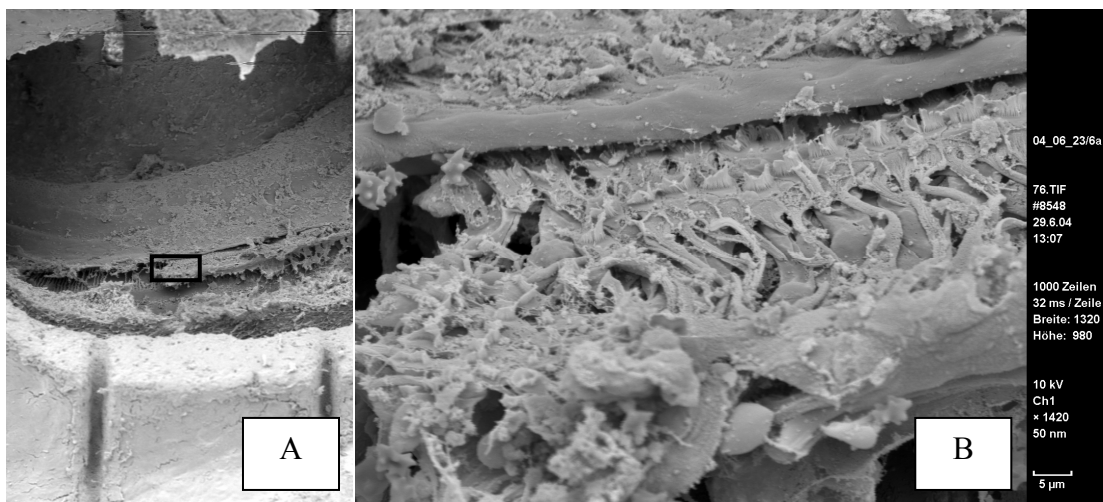


Abb. 39: Zilien einer Kochlea (Meerschweinchen) neben einem Ablationskrater. Sie sind zum Teil noch erhalten, aber es zeigen sich deutliche Strukturauflockerungen zwischen Hensen'schen Zellen und Phalangenzellen. Ti:Saphir-Laser, $100\mu\text{J}$, Gesamtscananzahl 300, 5kHz. A) Übersichtsaufnahme. B) Vergrößerung.

Bei einer Pulsenergie von $100\mu\text{J}$ waren einige äußere Zilien mechanisch beschädigt, sie lagen zum Teil und zeigten nicht mehr ihre charakteristische V-Form. Das die äußeren Haarzellen umgebende Gewebe, bestehend aus Hensen'schen Zellen und Phalangenzellen, zeigte deutliche strukturelle Auflockerungen, zum Teil Zerrei-

lungen der Gewebe (Abb. 39B). Höhere Pulsenergien wurden aufgrund dieser Erkenntnis nicht getestet.

Um die Ergebnisse des Ti:Saphir-Lasers einordnen zu können, wurden die Versuche mit einem freilaufenden Er:YAG-Laser wiederholt (Abb. 40 + 41).

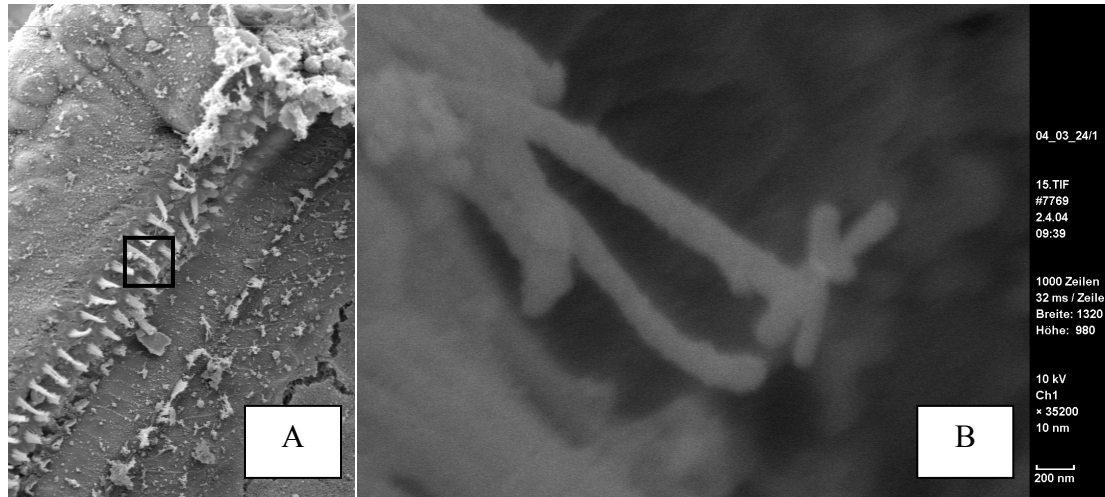


Abb. 40: Zilien einer Kochlea (Meerschweinchen) mit Verformungen. Er:YAG-Laser, 6,7mJ, Gesamtpulsanzahl 6. A) Übersichtsaufnahme. B) Vergrößerung.

Bei einer Pulsenergie von 6,7mJ lagen einige wenige Zilien, beziehungsweise zeigten eine untypische Formung. Einzelne Zilien zeigten auffällige Deformationen im apikalen Bereich (Abb. 40B).

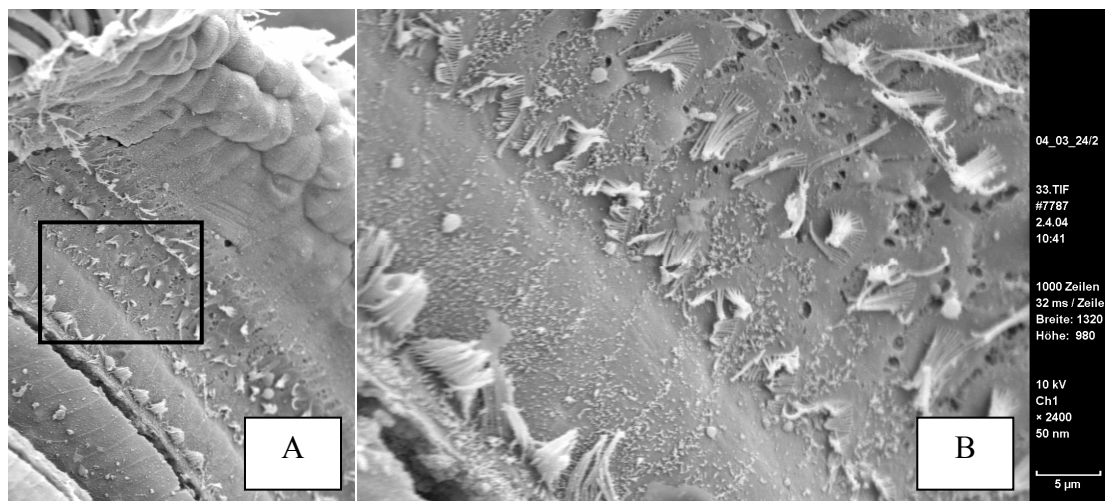


Abb. 41: Zilien einer Kochlea (Meerschweinchen) mit Verformungen und Scherungen. Er:YAG-Laser, 13,3mJ, Gesamtpulsanzahl 9. A) Übersichtsaufnahme. B) Vergrößerung.

Wurde die Pulsenergie auf 13,3mJ erhöht, so waren auch in größeren Abständen vom Ablationskrater die Zilien niedergedrückt (Abb. 41B). In unmittelbarer Kraternähe waren sie zum Teil durch Scherkräfte ganz entfernt. Auf eine weitere Erhöhung der Pulsenergie wurde verzichtet.

3.3 Bestimmung gewebespezifischer Abtragsraten

Die Abtragsraten eines Ti:Saphir-Lasers sollten gewebespezifisch bestimmt werden. Dazu wurden verschiedene Weichgewebe (Nerv, Muskel, Knorpel) und Hartgewebe (Knochen) vom Hausschwein mit unterschiedlichen Pulsenergien bestrahlt und die Abtragsrate pro Puls berechnet (Abb. 42). Der Wassergehalt der Gewebeprobe wurde dabei durch künstliche Befeuchtung variiert. Die Bezeichnung „trocken“ steht für wasserfreie Gewebeschnitte, während „feucht“ den Erhalt des physiologischen Wasseranteils beschreibt.

Die Abb. 42 beinhaltet das Konfidenzintervall (Aufenthaltswahrscheinlichkeit des wahren Wertes innerhalb des Vertrauensbereiches) und das korrigierte Bestimmtheitsmaß (Qualität der Modellanpassung) der jeweiligen Meßwerte. Die Parameter für das benutzte Gewebeabtragsmodell [V] sind in Tabelle 6 aufgeführt.

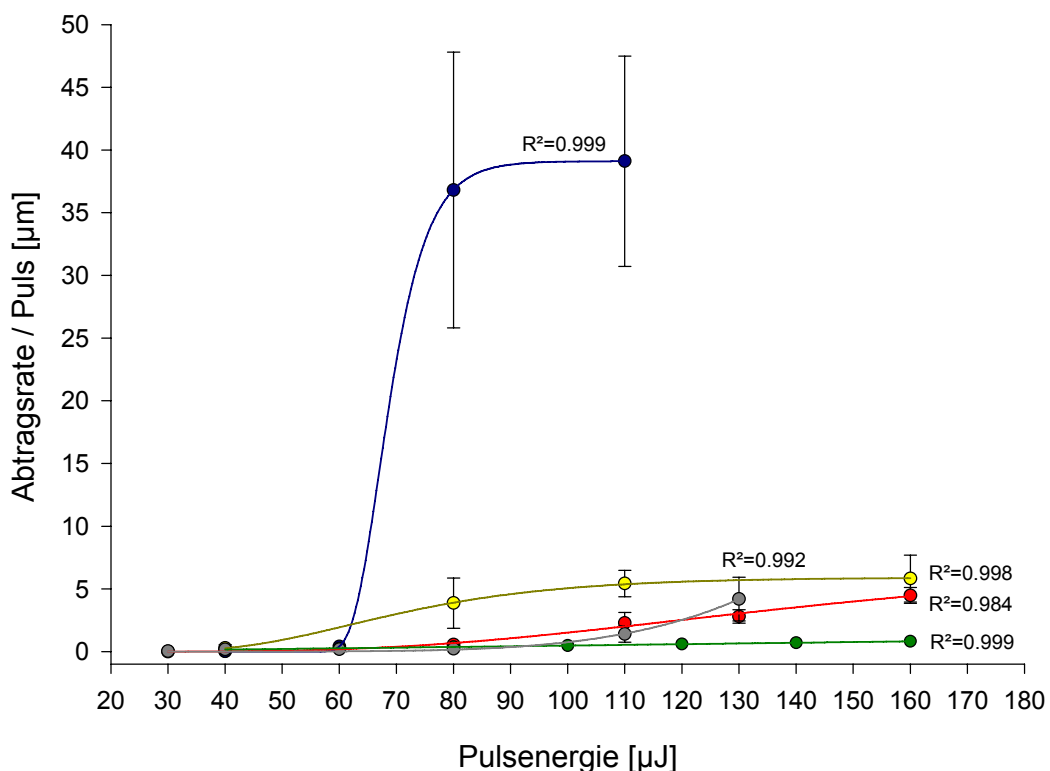


Abb. 42: Abtragsraten für Knochen feucht (blau), Knochen trocken (grün), Nerv feucht (gelb), Muskel feucht (rot) und Knorpel feucht (grau) in Abhängigkeit der gewählten Pulsenergie. Alle Gewebe stammen vom Hausschwein. Korrigiertes Bestimmtheitsmaß der Modellanpassung pro Gewebe ist mit angegeben. Gewebeabtragsmodelle [V] sind jeweils als Linie, Mittelwerte als Kreise und CI 95% als Balken dargestellt. Weitere Modellparameter sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Bei niedrigeren Energien (80µJ und 110µJ) wurde aus der Gruppe der Weichgewebe das Nervengewebe besonders gut abgeladert (Abb. 42).

Anhand der Ergebnisse läßt sich eine deutliche Abhängigkeit zwischen Wassergehalt des Gewebes und Abtragsrate erkennen: Für Knochengewebe mit unterschiedlichem Wassergehalt konnte eine Differenz in der Abtragseffizienz bis Faktor 100 für Pulsenergien von 60-160 μ J (entsprechend 300-800mW Leistung) nachgewiesen werden. Bei den Weichgeweben war die Abhängigkeit zwischen Wassergehalt und Abtragsrate eingeschränkt. Erst bei starker Gewebeaustrocknung konnte eine Zunahme der zur Gewebedurchdringung benötigten Pulszahlen beobachtet werden (nicht dargestellt).

Tab. 6: Modell-Parameter [V] zur Lage und Steigung des jeweiligen Gewebeabtragsmodells der verschiedenen Gewebe.

\Gewebe Parameter\	Knochen, feucht	Knochen, trocken	Nerv, feucht	Muskel, feucht	Knorpel, feucht
a	39,1066	7,0567	5,9073	7,0968	949,3068
b	0,2161	0,0012	0,0486	0,0188	0,0065
c	1949376,6488	1,2288	20,0927	9,2948	9,6899

3.4 Bestimmung der akuten Zytotoxizität mit dem MTT-Test

Mit Hilfe der Succinat-Dehydrogenaseaktivität der Mitochondrien kann die Zytotoxizität von Strahlungsquellen gemessen werden. Als toxische Größen können sowohl photoakustische und thermische Effekte, als auch Radikalbildungen und freie Elektronen, wirken.

Für die Untersuchungen am Ti:Saphir-Laser wurden zwei nicht transformierte humane Fibroblastenzelllinien benutzt, eine schnell proliferierende Zelllinie (NHDF) und eine langsam proliferierende Zelllinie (N57). Zellen beider Linien wurden mit unterschiedlichen Energiedosen bestrahlt, danach für drei Stunden inkubiert und dann die Vitalität (Aktivität) mittels Farbstoffreduktion photometrisch gemessen (Abb. 43).

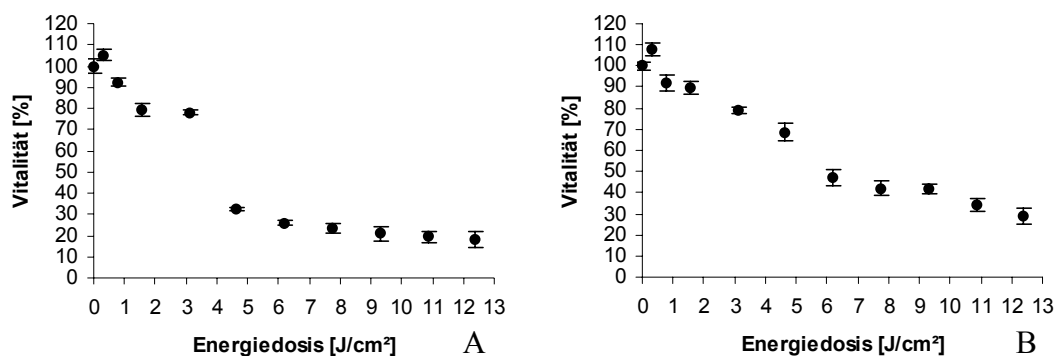


Abb. 43: Vitalitätsveränderung der Fibroblasten in Abhängigkeit von der eingestrahltten Energiedosis [J/cm²]. Pulslänge 150fs. Mittelwerte sind als Kreise und Standardabweichungen als Balken angegeben. A) NHDF. B) N57.

Bei beiden Zelllinien war bei einer Energiedosis von $0,31\text{J}/\text{cm}^2$ eine Erhöhung der Zellvitalität gegenüber der unbestrahlten Nullprobe zu erkennen. Ab einer Energiedosis von $0,77\text{J}/\text{cm}^2$ fiel die Vitalität beider Zelllinien unter die der jeweiligen Nullprobe. Während bei der schnellproliferierenden NHDF-Kultur die Vitalität mit steigender Energiedosis deutlich exponentiell abnahm, war eine exponentielle Verringerung der Vitalität bei der langsamproliferierenden N57-Kultur nicht deutlich zu erkennen. Die Vitalitätsabnahme vollzog sich bei N57 wesentlich langsamer: Während der EC_{30} -Wert (engl.: effect concentration 30%; der Wert der Energiedosis, bei dem ein zu messender Effekt von 30% vorliegt; hier: Verlust der Vitalität) bei NHDF um etwa $2,5\text{J}/\text{cm}^2$ lag, wurde bei N57 der EC_{30} erst bei fast $5\text{J}/\text{cm}^2$ erreicht. Beim EC_{50} (EC_{70}) verhielt es sich ganz ähnlich: Er war bei NHDF mit $3,4\text{J}/\text{cm}^2$ ($5,2\text{J}/\text{cm}^2$) etwa halb so hoch wie bei N57 mit $6,2\text{J}/\text{cm}^2$ ($11,4\text{J}/\text{cm}^2$).

Bei beiden Zellkulturen konnte keine Vitalität von $< 15\%$ erreicht werden.

3.5 Bestimmung energiedosisabhängiger DNA-Strangbruch-induktion (Gentoxizität) mit dem Kometen-Assay

Aufgrund des Wirkungsprinzips beim Abtrag durch den verwendeten Ti:Saphir-Laser (Materialionisation durch Multi-Photonen- und Kaskaden-Ionisation) kommt es zur Ausbildung einer großen Anzahl freier Elektronen. Diese Elektronen können direkt oder indirekt (Bildung von ROS) zu Schäden an zellulären Strukturen (Membranen, DNA, Zellorganellen, usw.) führen.

Mit Hilfe der Einzelzellgelelektrophorese (Kometen-Assay) sollte untersucht werden, ob es bei einem für den klinischen Einsatz verstärkten Lasersystem zu einer Erhöhung der DNA-Strangbruchanzahl kommt.

Dazu wurden mehrere Parameter variiert und getestet:

- schnell und langsam proliferierende Zelllinie (NHDF, N57)
- Länge der Laserpulse (150fs, 400fs)
- mit/ohne DMSO als Radikalfänger

Um Mehrfachbestrahlungen von Zellen durch überschneidende Laserfokusse im Scan-Raster zu verhindern, wurde zuerst der sich für die höchste benutzte Pulsenergie ergebende Ablationsdurchmesser in Agarose vermessen (Abb. 44).

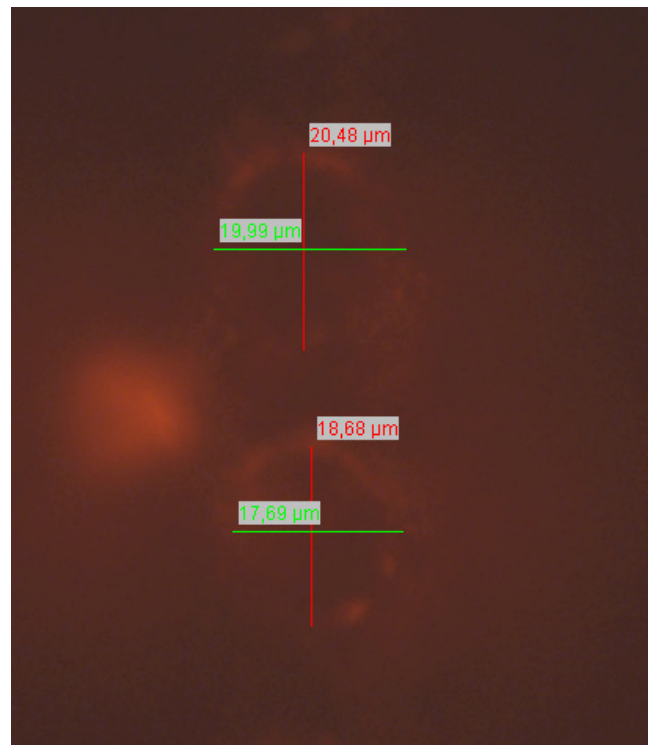


Abb. 44: Vermessung der Ablationskrater in Agarose (0,5%) des Ti:Saphir-Lasers bei einer Pulsenergie von $40\mu\text{J}$.

Aus der Vermessung der Ablationskrater wurde ersichtlich, daß der Fokusbereich (Ablationsdurchmesser) linear mit der gewählten Pulsenergie korreliert (Abb. 45).

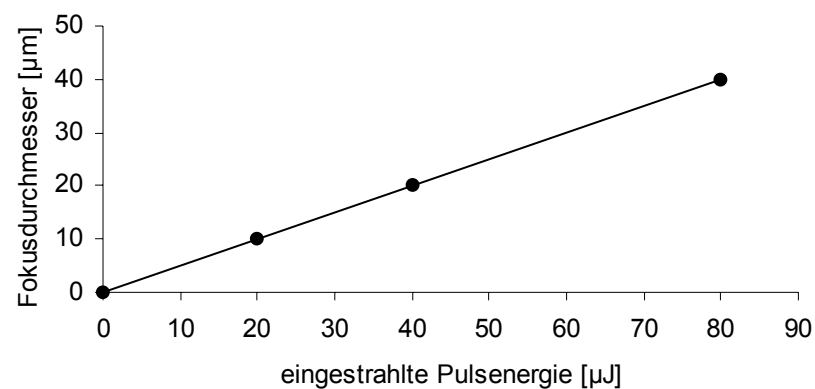


Abb. 45: Lineares Verhältnis zwischen eingestrahelter Pulsenergie und Fokusbereich (Ablationsdurchmesser), getestet in Agarose (0,5%). Meßwerte sind als Kreise dargestellt.

Aufgrund der linearen Abhängigkeit zwischen Pulsenergie und Ablationsdurchmesser wurde ein Scan-Raster gewählt, das keine Überschneidungen der Laserfokusse zuließ (Abb. 46).

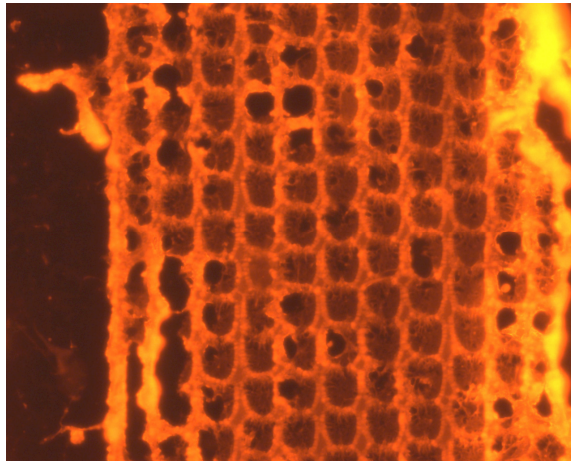


Abb. 46: Scan-Raster des Ti:Saphir-Lasers in Agarose (0,5%). Pulsenergie 50 μ J, 5kHz, Zeilenabstand 30 μ m. Vergrößerung 200x.

Alle Objektträger im Rahmen der Kometen-Assays wurden mit einem Zeilenabstand von 30 μ m und einem Vorlauf von 150mm/s im Scan bestrahlt.

Im Verlauf der Kometen-Assays wurden die DNA-Fragmente mittels Elektrophorese durch die sie umgebende Agarose zur Anode gezogen. Vor den eigentlichen Versuchen wurde getestet, wie groß der Einfluß der Agarosekonzentration auf das Schadensergebnis („tail moment“) ist. Dazu wurde die in der Literatur beschriebene Standardkonzentration von 0,5% Agarose auf 0,35% reduziert (Abb. 47).

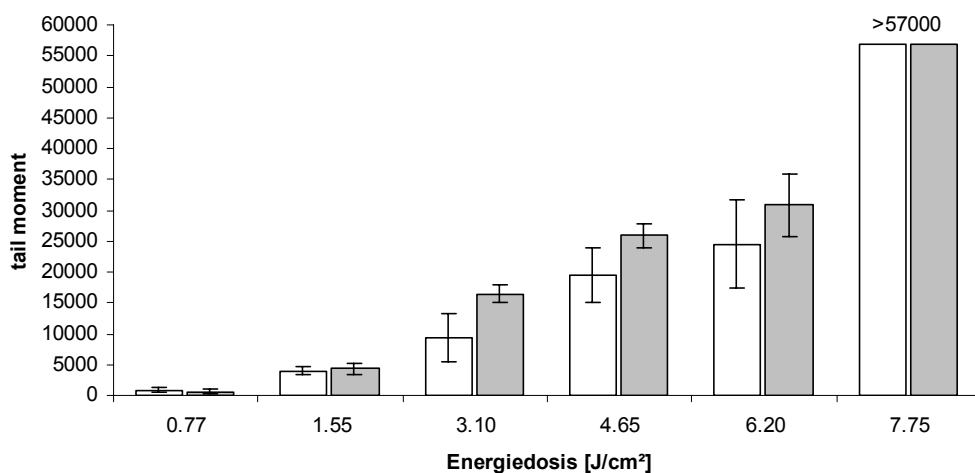


Abb. 47: Einfluß des LMP-Agarosegehaltes als Einbettmedium auf das „tail moment“ bestrahlter Zellen. Mittelwerte sind als Säulen und CI 95% als Balken dargestellt. Blindwerte sind bereits abgezogen. Weiß: Agarosegehalt 0,5%. Grau: Agarosegehalt 0,35%. Bei einer Energiedosis von 7,75J/cm² wurde die Nachweisgrenze überschritten.

Der zu detektierende Schaden war bei einer Agarosekonzentration von 0,35% größer als bei einer Konzentration von 0,5%. Allerdings befand sich die Agarose bei 0,35%

am Rande der Aushärtungsgrenze (bei einer Konzentration von 0,25% blieb die Agarose flüssig). Aus diesem Grunde wurden alle folgenden Versuche mit 0,5% Agarose durchgeführt.

Um einen Vergleich zwischen der Sensitivität und dem Verhältnis zwischen Einzelstrangbrüchen (SSBs) und Doppelstrangbrüchen (DSBs) ziehen zu können, wurde die DNA von NHDF-Zellen nach erfolgter Bestrahlung sowohl im alkalischen als auch im neutralen Milieu der Elektrophorese unterzogen (Abb. 48).

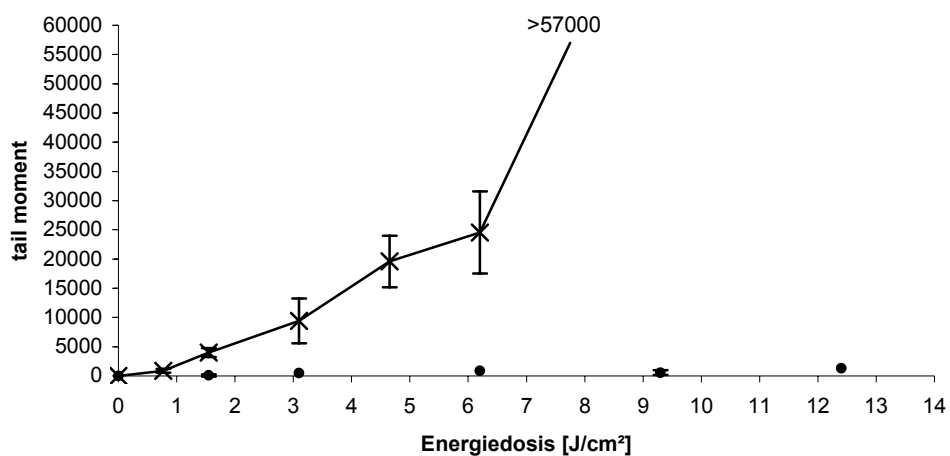


Abb. 48: Verhältnis zwischen Einzelstrangbrüchen (SSBs) und Doppelstrangbrüchen (DSBs) bei NHDF-Zellen nach erfolgter Bestrahlung mit einem Ti:Saphir-Laser. Pulslänge 150fs. Mittelwerte sind als geometrische Figuren und CI 95% als Balken dargestellt. Blindwerte sind bereits abgezogen. Kreuze: SSBs. Punkte: DSBs; aus zwei separaten Versuchen zusammengesetzt. Bei einer Energiedosis von 7,75J/cm² wurde die Nachweisgrenze für SSBs überschritten.

Beim alkalischen Kometen-Assay wurden deutlich höhere „tail momente“ erreicht, das heißt die Anzahl der detektierten DNA-Strangbrüche war nach Abzug der Nullprobe deutlich von Null verschieden. Beim neutralen Kometen-Assay hingegen lag das „tail moment“, selbst bei einer Energiedosis von 12,4J/cm², nur bei 1337.

Die Detektion von SSBs zeigte sich im Energiedosis-Bereich bis 7,75J/cm² als sehr sensitiv und wurde daher für alle weiteren Kometen-Assays benutzt.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob es Unterschiede in den Strahlenschäden bei verschiedenen Fibroblastenkulturen gibt. Dazu wurden bei einer Pulslänge von 150fs die schnellproliferierenden NHDF und die langsamproliferierenden N57 bestrahlt (Abb. 49).

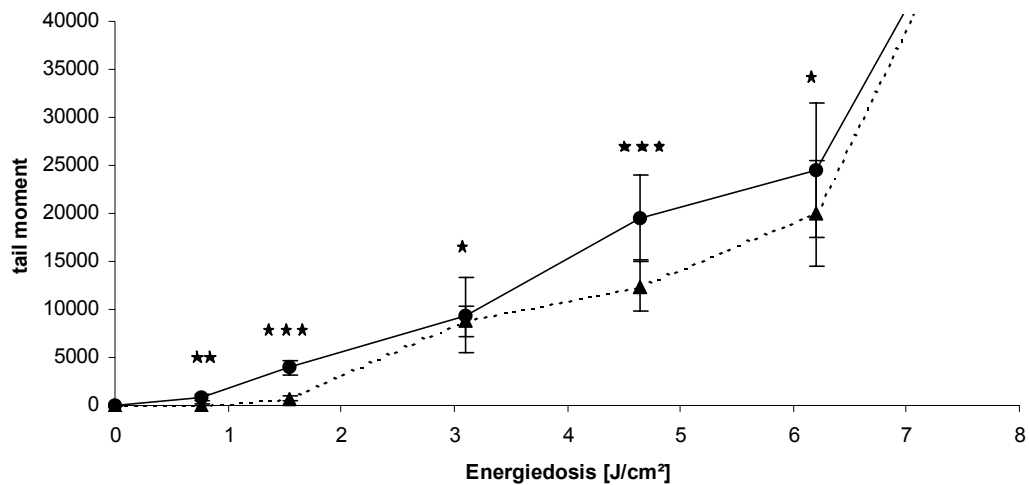


Abb. 49: Einzelstrangbrüche (SSBs) bei NHDF-Zellen und N57-Zellen nach erfolgter Bestrahlung mit einem Ti:Saphir-Laser. Pulslänge 150fs. Mittelwerte sind als geometrische Figuren und CI 95% als Balken dargestellt. Blindwerte sind bereits abgezogen. Kreise: NHDF; aus drei separaten Versuchen zusammengesetzt. Dreiecke: N57. Bei einer Energiedosis von 7,75J/cm² wurde die Nachweisgrenze überschritten. Signifikanz: P<0,05 (ein Stern); P<0,01 (zwei Sterne); P<0,001 (drei Sterne).

Die NHDF zeigten bei allen Energiedosen (bei 7,75J/cm² keine Aussage möglich, da Nachweisgrenze überschritten) eine signifikant größere Schädigung.

Danach wurde die Pulslänge auf 400fs erhöht und der Versuch mit den schnellproliferierenden NHDF und den langsamproliferierenden N57 wiederholt, um einen möglichen Einfluß der Pulslänge zu erkennen (Abb. 50).

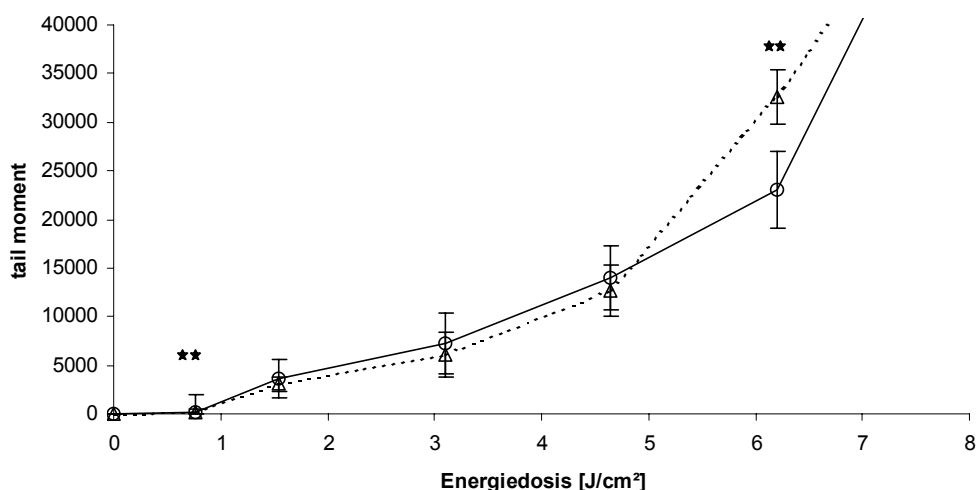


Abb. 50: Einzelstrangbrüche (SSBs) bei NHDF-Zellen und N57-Zellen nach erfolgter Bestrahlung mit einem Ti:Saphir-Laser. Pulslänge 400fs. Mittelwerte sind als geometrische Figuren und CI 95% als Balken dargestellt. Blindwerte sind bereits abgezogen. Kreise: NHDF. Dreiecke: N57. Bei einer Energiedosis von 7,75J/cm² wurde die Nachweisgrenze überschritten. Signifikanz: P<0,05 (ein Stern); P<0,01 (zwei Sterne); P<0,001 (drei Sterne).

Die Anzahl der Schäden ist bei beiden Zelllinien sehr ausgeglichen, lediglich bei $0,77\text{J}/\text{cm}^2$ und bei $6,20\text{J}/\text{cm}^2$ treten signifikante Unterschiede auf. Das „tail moment“ ist bei $0,77\text{J}/\text{cm}^2$ für NHDF signifikant größer, bei $6,20\text{J}/\text{cm}^2$ ist es für N57 signifikant größer.

Um einen möglichen Einfluß der Pulslänge innerhalb einer Zelllinie zu verdeutlichen, wurden bei NHDF die Schäden direkt verglichen (Abb. 51).

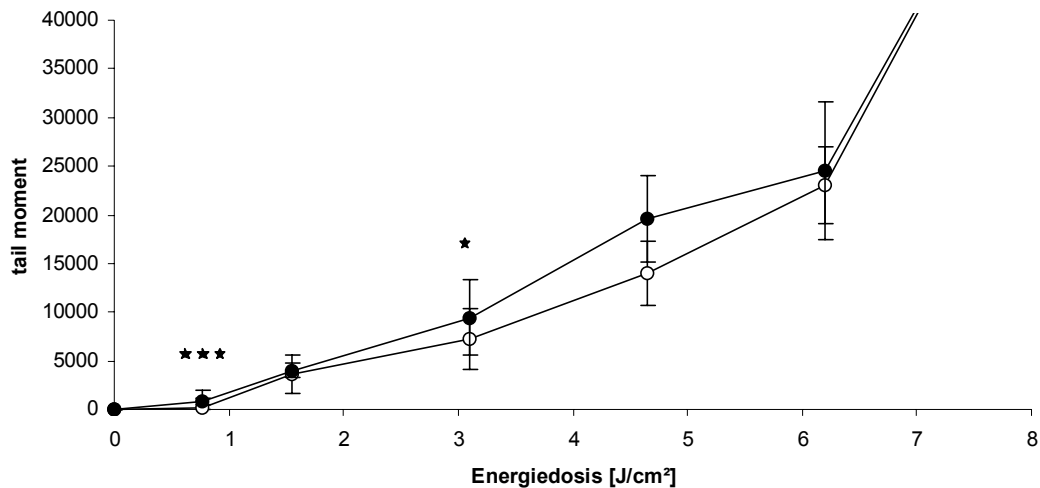


Abb. 51: Einzelstrangbrüche (SSBs) bei NHDF-Zellen nach erfolgter Bestrahlung mit einem Ti:Saphir-Laser. Pulslänge 150fs und 400fs. Mittelwerte sind als geometrische Figuren und CI 95% als Balken dargestellt. Blindwerte sind bereits abgezogen. Schwarze Kreise: 150fs. Weiße Kreise: 400fs. Bei einer Energiedosis von $7,75\text{J}/\text{cm}^2$ wurde die Nachweisgrenze überschritten. Signifikanz: $P < 0,05$ (ein Stern); $P < 0,01$ (zwei Sterne); $P < 0,001$ (drei Sterne).

Beim direkten Vergleich der Auswirkungen der Pulslänge innerhalb einer Zelllinie zeigten sich nur bei $0,77\text{J}/\text{cm}^2$ und $3,10\text{J}/\text{cm}^2$ signifikante Unterschiede. Bei beiden Energiedosen war der Schaden bei einer Pulslänge von 150fs gegenüber 400fs signifikant erhöht.

Um einen indirekten Nachweis zur Entstehung und Reaktion von Radikalen zu führen, wurde den Zelllinien (NHDF, Abb. 52; N57, Abb. 53) DMSO als Fänger für Hydroxylradikale sowohl im Medium als auch in der Agarose zugesetzt.

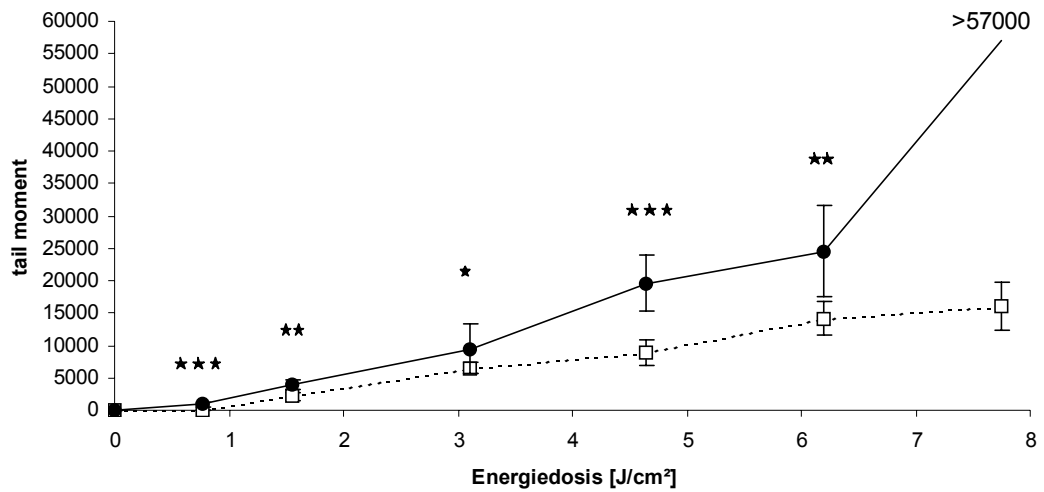


Abb. 52: Einzelstrangbrüche (SSBs) bei NHDF-Zellen nach erfolgter Bestrahlung mit einem Ti:Saphir-Laser in Ab- und Anwesenheit von DMSO (8%). Pulslänge 150fs. Mittelwerte sind als geometrische Figuren und CI 95% als Balken dargestellt. Blindwerte sind bereits abgezogen. Schwarze Kreise: ohne DMSO. Weiße Quadrate: mit DMSO. Bei einer Energiedosis von 7,75J/cm² wurde die Nachweisgrenze für die Versuchsreihe ohne DMSO überschritten. Signifikanz: P<0,05 (ein Stern); P<0,01 (zwei Sterne); P<0,001 (drei Sterne).

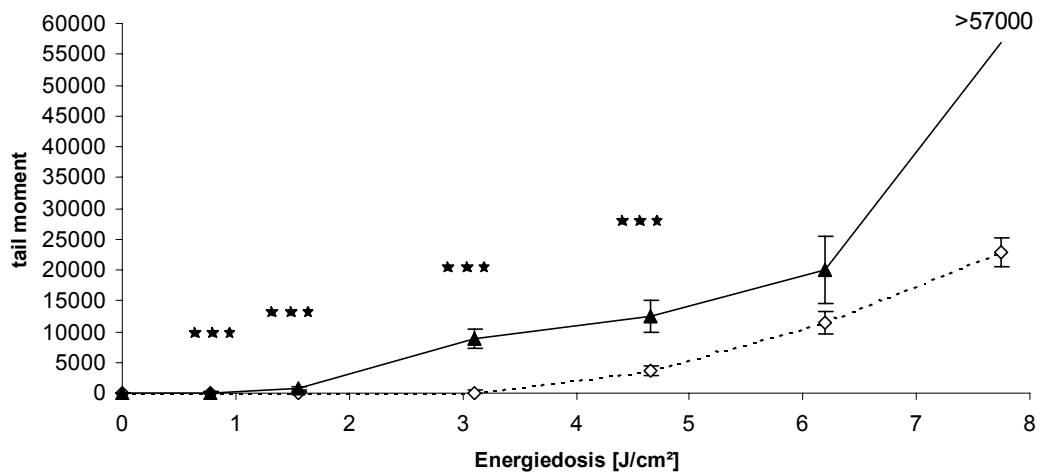


Abb. 53: Einzelstrangbrüche (SSBs) bei N57-Zellen nach erfolgter Bestrahlung mit einem Ti:Saphir-Laser in Ab- und Anwesenheit von DMSO (8%). Pulslänge 150fs. Mittelwerte sind als geometrische Figuren und CI 95% als Balken dargestellt. Blindwerte sind bereits abgezogen. Schwarze Dreiecke: ohne DMSO. Weiße Rauten: mit DMSO. Bei einer Energiedosis von 7,75J/cm² wurde die Nachweisgrenze für die Versuchsreihe ohne DMSO überschritten. Signifikanz: P<0,05 (ein Stern); P<0,01 (zwei Sterne); P<0,001 (drei Sterne).

Bei beiden Zelllinien ist eine signifikante Schadensreduzierung festzustellen. Bei NHDF sind für alle Energiedosen signifikante Unterschiede vorhanden, der Signifikanzbereich schwankt jedoch zwischen den einzelnen Meßgrößen. Über die Meßwerte der Energiedosis $7,75\text{J}/\text{cm}^2$ kann keine Aussage bezüglich der Signifikanz gemacht werden, da das „tail moment“ ohne DMSO jenseits der Nachweisgrenze lag. Bei N57 sind bei allen Energiedosen die Unterschiede zwischen Schaden mit und ohne DMSO höchst signifikant, jedoch konnte bei einer Energiedosis von $6,20\text{J}/\text{cm}^2$ kein signifikanter Unterschied im „tail moment“ gemessen werden. Über das Schadensverhältnis bei $7,75\text{J}/\text{cm}^2$ ist auch hier keine Aussage bezüglich der Signifikanz möglich, da auch hier die Meßwerte für das „tail moment“ ohne DMSO über der Nachweisgrenze lagen.

Das „tail moment“ wird als Maß für den Schädigungsgrad der DNA benutzt, jedoch kann die Streuung der Einzelmeßwerte pro Energiedosis Informationen über charakteristische Verteilungsmuster, zum Beispiel aufgrund ungerichteter Radikalreaktionen, liefern. Die Verteilung der „tail momente“ der Einzelmeßwerte für N57 ohne DMSO (Abb. 54) und mit DMSO (Abb. 55) wurden in 3000er Schritten zusammengefaßt. Die Pulslänge betrug 150fs.

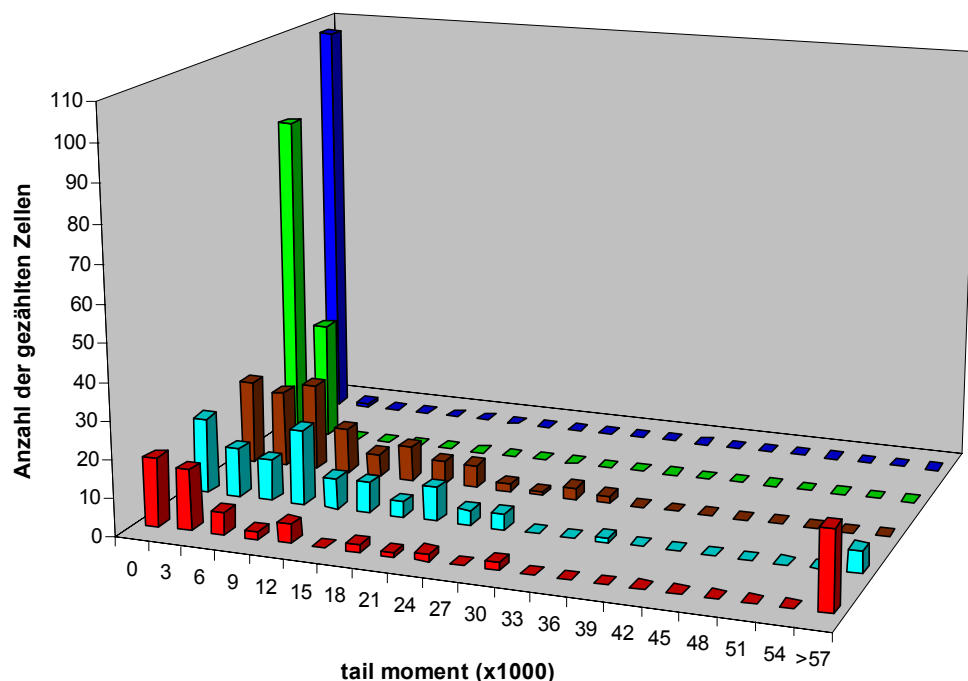


Abb. 54: Individuelle DNA-Schadensverteilung bei N57-Zellen nach erfolgter Bestrahlung mit einem Ti:Saphir-Laser in Abhängigkeit von der jeweiligen Energiedosis. Blindwerte sind bereits abgezogen. Pulslänge 150fs. Blau: $0,77\text{J}/\text{cm}^2$. Grün: $1,55\text{J}/\text{cm}^2$. Braun: $3,10\text{J}/\text{cm}^2$. Zyan: $4,65\text{J}/\text{cm}^2$. Rot: $6,20\text{J}/\text{cm}^2$. Bei einer Energiedosis von $7,75\text{J}/\text{cm}^2$ wurde die Nachweisgrenze überschritten, daher hier nicht dargestellt.

Wie in Abb. 54 zu erkennen ist, lagen bei einer Energiedosis von $0,77\text{J}/\text{cm}^2$ (blaue Balken) kaum Schäden über einem „tail moment“ von 3000 vor. Mit zunehmender Energiedosis sank die Anzahl der geringst geschädigten Zellen rasch ab und es ergab sich eine Wertestreuung bis zu einem „tail moment“ von etwa 30000 bei $3,10\text{J}/\text{cm}^2$ (braune Balken) und 36000 bei $4,65\text{J}/\text{cm}^2$ (zyane Balken), die keiner Normalverteilung entsprach. Bei einer Energiedosis von $4,65\text{J}/\text{cm}^2$ traten die ersten, aufgrund einer zu großen Schädigung, nicht mehr auswertbaren Kometen auf. Bei einer Energiedosis von $6,20\text{J}/\text{cm}^2$ (rote Balken) waren kaum noch Zellen im mittleren Schädigungsbereich ($t_m = 15000$ bis 36000) zu finden, dafür erhöhte sich der Anteil der nicht mehr auswertbaren Zellen auf etwa ein Drittel der Gesamtzellzahl. Im untersten Schadensbereich (bis $t_m = 3000$) waren immer noch Zellen zu finden. Wurde die Energiedosis auf $7,75\text{J}/\text{cm}^2$ erhöht, lagen über 50% aller Zellen im nicht mehr auswertbaren Bereich (nicht dargestellt).

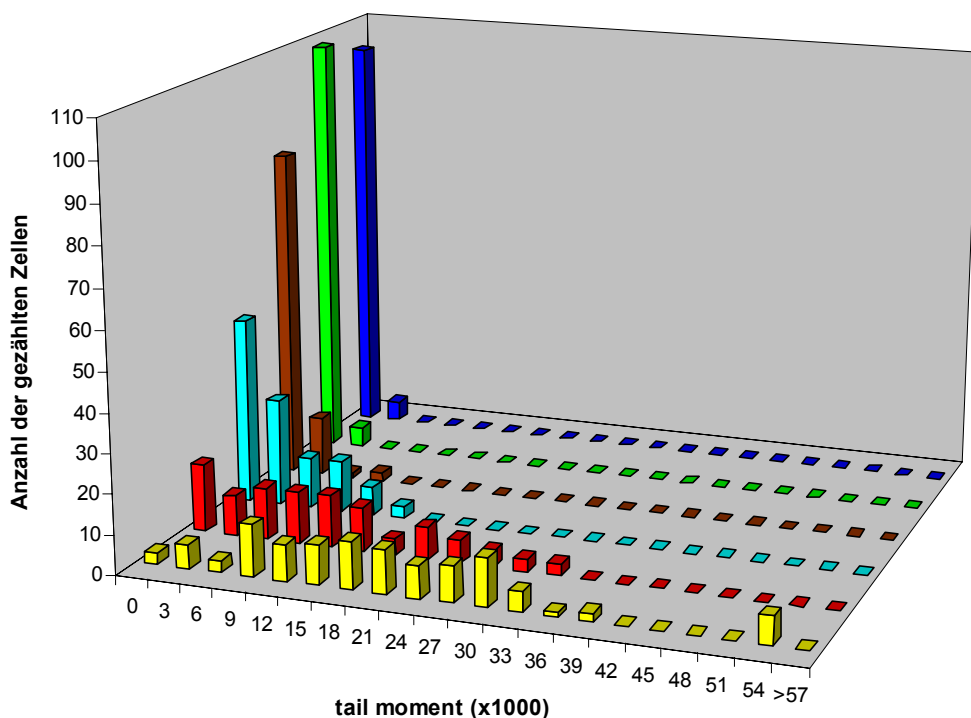


Abb. 55: Individuelle DNA-Schadensverteilung bei N57-Zellen mit DMSO nach erfolgter Bestrahlung mit einem Ti:Saphir-Laser in Abhängigkeit von der jeweiligen Energiedosis. Blindwerte sind bereits abgezogen. Pulslänge 150fs. Blau: $0,77\text{J}/\text{cm}^2$. Grün: $1,55\text{J}/\text{cm}^2$. Braun: $3,10\text{J}/\text{cm}^2$. Zyan: $4,65\text{J}/\text{cm}^2$. Rot: $6,20\text{J}/\text{cm}^2$. Gelb: $7,75\text{J}/\text{cm}^2$.

In Gegenwart von DMSO (Abb. 55) lag die Verteilung der Schäden bei einer Energiedosis von $0,77\text{J}/\text{cm}^2$ (blaue Balken) und $1,55\text{J}/\text{cm}^2$ (grüne Balken) sehr ähnlich. Auch bei $3,10\text{J}/\text{cm}^2$ (braune Balken) waren keine Schäden über einem „tail moment“ von 12000 zu erkennen, jedoch nahm der Anteil an geringstgeschädigten Zellen (t_m

bis 3000) gegenüber den beiden niedrigeren Energiedosen ab. Die Verteilung zeigte eine exponentielle Abnahme der Zellzahl bei zunehmender Schädigung. Erst bei einer Energiedosis von $4,65\text{J}/\text{cm}^2$ (zyaner Balken) wurde das mittlere Schadensmaß ($t_m = 15000$ bis 36000) erreicht. Eine langgestreckte Meßwertstreuung, wie bei $3,10\text{J}/\text{cm}^2$ (braune Balken) in Abb. 54, ergab sich in Anwesenheit von DMSO bei einer Energiedosis von $6,20\text{J}/\text{cm}^2$ (rote Balken), die eine Normalverteilung zeigte. Wurde die eingebrachte Energie auf $7,75\text{J}/\text{cm}^2$ erhöht, so wurde die Streuung der Meßwerte noch größer und es traten die ersten hochgeschädigten Zellen ($t_m = 54000$ bis 57000) auf. Zellen, die aufgrund des Schadens nicht mehr zu messen wären, wurden aber nicht gefunden.

Als nächstes sollte überprüft werden, ob die Einzelmeßwertverteilung zweier unterschiedlicher Meßreihen beim selben „tail moment“ gleich war. Dazu wurden N57-Zellen mit und ohne DMSO bei einer Pulslänge von 150fs bei einem durchschnittlichen „tail moment“ von etwa 12000 miteinander verglichen (Abb. 56).

Die Überprüfung der Einzelmeßwertverteilung wurde ebenfalls mit Zellen der Linien NHDF und N57 bei einer Pulslänge von 400fs und einem durchschnittlichen „tail moment“ von etwa 3300 durchgeführt (Abb. 57).

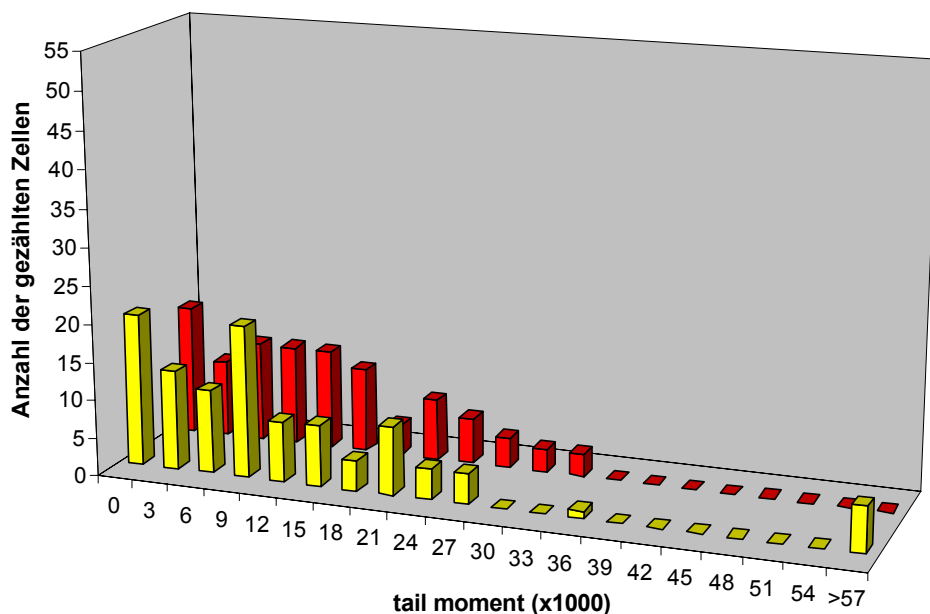


Abb. 56: Individuelle DNA-Schadensverteilung bei N57-Zellen nach erfolgter Bestrahlung mit einem Ti:Saphir-Laser in Ab- und Anwesenheit von DMSO (8%) bei einem durchschnittlichen „tail moment“ von etwa 12000. Blindwerte sind bereits abgezogen. Pulslänge 150fs. Gelb: ohne DMSO, Energiedosis $4,65\text{J}/\text{cm}^2$. Rot: mit DMSO, Energiedosis $6,20\text{J}/\text{cm}^2$.

Beim Vergleich der Einzelmeßwertverteilung bei N57 mit und ohne DMSO bei einem durchschnittlichen „tail moment“ von etwa 12000 (Abb. 56) zeigten sich Unterschiede, wenn auch nicht so deutlich wie in Abb. 57. Beide Verteilungen waren langgestreckt und zeigten eine größere Zellanzahl (etwa 20 Zählungen) im untersten Schadensbereich. Während in Anwesenheit von DMSO, und bei einer Energiedosis von 6,20J/cm², die Streuung normalverteilt war, lag ohne DMSO, bei einer Energiedosis von 4,65J/cm², keine Normalverteilung vor. Weiterhin waren ohne DMSO einige Zellen nicht mehr auswertbar, obwohl die Energiedosis um 1,55J/cm² geringer war.

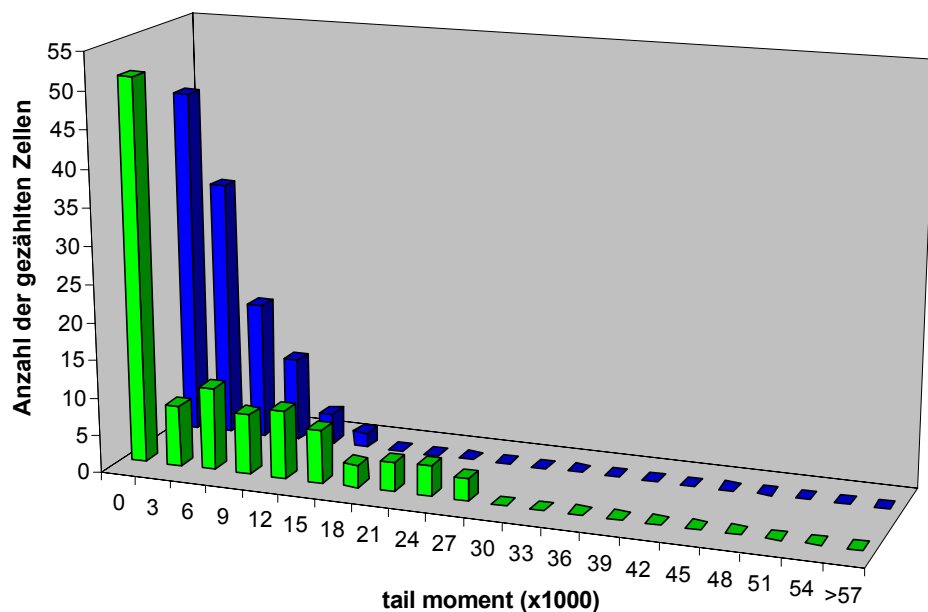


Abb. 57: Individuelle DNA-Schadensverteilung bei NHDF-Zellen und N57-Zellen nach erfolgter Bestrahlung mit einem Ti:Saphir-Laser bei einem durchschnittlichen „tail moment“ von etwa 3300. Blindwerte sind bereits abgezogen. Pulslänge 400fs. Energiedosis 1,55J/cm². Grün: NHDF. Blau: N57.

Obwohl die gewählten Parameter (Pulslänge, Energiedosis) und das durchschnittliche „tail moment“ bei beiden Zelllinien gleich war, zeigten sich Unterschiede in den Einzelmeßwertverteilungen (Abb. 57). Bei N57 (blaue Balken) zeigte die Verteilung eine exponentielle Abnahme der Zellzahl bei zunehmender Schädigung. Das maximale „tail moment“ wurde bei etwa 18000 erreicht. Die Zellen der Linie NHDF (grüne Balken) zeigten hingegen eine eher langgestreckte Verteilung mit einer maximalen Schädigung bei etwa 30000. Die Zahl der geringstgeschädigten Zellen ($tm \leq 3000$) war bei beiden Zelllinien annähernd gleich.

4. Diskussion

4.1 Temperaturmessung/-effekte

Temperaturmessungen:

Die Messungen der Temperaturentwicklungen verschiedener Laser bei unterschiedlichen Strahlungsleistungen erfolgten in Wasser mittels eines Thermosensors. Alle Laser pulsten dabei im Dauerbetrieb über mehrere Minuten, was im klinischen Einsatz selten vorkommen dürfte, da mögliche Bestrahlungsobjekte (Tumoren, Blutgefäße, usw.) eher kleine Volumina besitzen und damit nur kürzere Bestrahlungszeiten erforderlich sind.

Beim Ti:Saphir-Laser zeigten sich relativ geringe Temperaturerhöhungen, bezogen auf die berechnete Maximaltemperatur: Bei 30mW um 1,6°C, bei 60mW um 2,4°C und bei 120mW um 5,4°C. Im Vergleich dazu betrug beim CO₂-Laser die Temperaturerhöhung bei 100mW um die 11°C. Der Er:YAG-Laser zeigte bei 64mW eine Temperaturerhöhung von 6,7°C (Tab. 5).

Setzte man die berechnete Temperaturerhöhung mit der eingebrachten Leistung in Relation, so zeigten die Geraden der drei Lasertypen deutliche Unterschiede: Der Ti:Saphir-Laser erzeugte trotz der höchsten eingebrachten Leistung (120mW) nicht die größte Temperaturerhöhung. Diese entsprach mit 5,4°C der eines CO₂-Lasers bei 50mW.

Die größten berechneten Temperaturerhöhungen erzeugte der CO₂-Laser, was auch aus dem Verhältnis von aufzuwendender Leistung pro Erhöhung um einen Grad Celsius zwischen den Lasern deutlich wird (Tab. 5): Der Faktor lag zwischen Ti:Saphir-Laser und CO₂-Laser bei etwa 2,5, zwischen Ti:Saphir-Laser und Er:YAG-Laser bei etwa 1,5. Zu beachten ist, daß bei den Versuchen mit dem CO₂-Laser das Deckgläschen zur Abdeckung der Wasserkammer fehlte. Es hätte zu sehr hohen Leistungsverlusten geführt. Bei den anderen beiden Lasern lagen die Verluste unter 5%. Eine Wärmeaufnahme aus der Luft bei der CO₂-Messung ist damit wahrscheinlich, was bedeutet, daß der wirkliche Temperaturanstieg unterhalb der Meßergebnisse liegen müßte und damit der Er:YAG-Messung nahekommen würde.

Die Temperaturentwicklung läßt sich theoretisch beschreiben:

$$\Delta T \text{ [K]} = \Delta Q / m \cdot c \quad \text{[VII]}$$

Dabei ist ΔQ die zugeführte Wärmemenge [J], m die Masse [kg] und c die spezifische Wärmekapazität des Wasser [J/kg·K].

Vergleicht man die jeweils gemessene Temperaturentwicklung mit der theoretischen Beschreibung der Temperaturentwicklung [VII], dann liegen die theoretischen Werte in allen Fällen über den gemessenen Werten. Eine Erklärung für diese Differenz liegt in der Tatsache begründet, daß in der Berechnung davon ausgegangen wird, daß die gesamte eingebrachte Laserenergie im Wasser absorbiert wird. Wärmeverluste an die Luft und die Meßkammer werden genauso wenig berücksichtigt wie Unterschiede in den Wellenlängen der Laserstrahlung und den damit verbundenen Unterschieden in den Absorptionskoeffizienten des Wassers. Untersuchungen zeigten jedoch, daß etwa 30% der im Plasma erzeugten Wärmeenergie an die Umgebung abgegeben wird (Noack, 1998).

Durch die hohen Absorptionskoeffizienten von Wasser bei etwa $3\mu\text{m}$ und $10\mu\text{m}$ Wellenlänge, in Verbindung mit einer langen Pulsdauer von $100\text{-}200\mu\text{s}$, kam es bei Er:YAG-Laser und CO_2 -Laser zu einem deutlichen Temperaturanstieg.

Beim Ti:Saphir-Laser mit seinen sehr kurzen Pulsdauern, und dem sehr geringen Absorptionskoeffizienten von Wasser bei 780nm Wellenlänge, blieben größere thermische Erhöhungen aus. Das bedeutet, daß die Temperaturerhöhungen in Geweben mit hohen Wasseranteilen zu keinen oder kaum thermischen Effekten über eine größere Fläche führen werden. Effekte im Fokusbereich sind davon ausgenommen.

Für geschlossene knöcherne Hohlräume, wie im Falle der Cochlea, zeigen die Messungen die richtige Tendenz der Temperaturentwicklung, sind aber mit einem Fehler behaftet, da der Hohlzylinder aus PVDF gefertigt wurde. PVDF hat nicht dieselben Wärmeparameter wie die Knochenhöhlung der Cochlea.

Für Untersuchungen, die sich speziell mit der Cochlea befassen, sollte auch der Zylinder aus einem Material mit knochenähnlichen thermischen Eigenschaften (zum Beispiel PMMA) gewählt werden. Um dem Bereich der physiologischen Körpertemperatur möglichst nahe zu kommen, sollte die Ausgangstemperatur bei 37°C liegen. Das Volumen der humanen Cochlea beträgt etwa $19\text{-}25\mu\text{l}$ (Yost, 1994).

Thermische Veränderungen von Hart- und Weichgeweben nach Laserablation:

Beim Vergleich von Knochenstrukturen nach Bestrahlung mit einem freilaufenden Er:YAG-Laser und einem Ti:Saphir-Laser waren deutliche Unterschiede in der fokushen Oberflächenbeschaffenheit zu erkennen. Beim Er:YAG traten Verschmelzungen entlang der Strahlachse auf. Die feinporöse Knochentextur war nicht mehr zu erkennen, Schmelzringe verliefen innerhalb des Ablationskraters (Abb. 24A). Der Beschuß von Knochengewebe mit einem Er:YAG-Laser wurde mehrfach wiederholt, wobei das Ergebnis immer sehr ähnlich war. Eine thermische Schädigung aufgrund einer Defokussierung ist somit auszuschließen.

Beim Ti:Saphir-Laser waren die feinporösen Strukturen des Knochens immer erkennbar (Abb. 24B). Selbst bei defokussierten Bestrahlungen konnten keine Schmelzzonen erkannt werden (nicht dargestellt), lediglich der Abtrag war reduziert. Die zu erkennende hohe Kantensteilheit in Abb. 24B kann als ein Maß für geringe Schädigungen betrachtet werden. Im lateralen Bereich zur Ablationsachse wurden ebenfalls keine Anzeichen thermischer Effekte gefunden (Abb. 25). Auch dort blieben die Feintexturen der Kanälchen erhalten.

Nach Bestrahlung von Weichgeweben mit einem Ti:Saphir-Laser zeigte sich ein sehr ähnliches Bild, die Strukturen blieben größtenteils erhalten. Bei Nervengewebe konnten bei einer Pulsenergie von $33\mu\text{J}$ und einer Repetitionsrate von 3kHz histologisch keine thermischen Schädigungen in Form von Karbonisierung oder Koagulation gefunden werden (Abb. 26A). Rasterelektronenmikroskopische Überprüfungen belegten, daß das Gewebe mit den einzelnen Nervenfasern keine sichtbaren thermischen Schäden erlitten hatte (Abb. 26B). Auch bei Versuchen mit höheren Pulsenergien ($50\mu\text{J}$, $80\mu\text{J}$, $100\mu\text{J}$ bei jeweils 5kHz) konnten keine thermischen Schäden nachgewiesen werden (Abb. 27).

Um eventuelle gewebespezifische Eigenheiten von Nervengewebe auszuschließen, wurden ebenfalls Fettgewebe ($130\mu\text{J}$) und Muskelgewebe ($33\mu\text{J}$) bestrahlt. Auch bei diesen beiden Gewebetypen konnte keine großflächige, tief ins Gewebe eindringende thermische Schädigung gefunden werden (Abb. 28). Sollten Schäden entstanden sein (in Abb. 28 erscheint der laterale Ablationsbereich bei beiden Geweben etwas dunkler), so lagen diese im subzellulären Bereich. Schadensbereiche unterhalb einer Zellgröße sind tolerabel, da sie zu keiner kompletten Inaktivierung eines Gewebes, auch nicht bei Nerven, führen.

Als Vergleich zum Ti:Saphir-Laser wurden die nach Beschuß mit einem freilaufenden Er:YAG-Laser angefertigten histologischen Schnitte herangezogen (15mJ, Abb. 29). Deutlich ist entlang des Ablationskraters eine dunkle Verfärbung im Gewebe zu erkennen, die sich etwa 20-30 μ m seitlich ins Gewebe hineinzieht und auf eine einsetzende Karbonisierung des Gewebes hindeutet. Diese Dunkelfärbung war anscheinend von der Pulsenergie unabhängig und damit typisch für die Gewebeschnitte nach Er:YAG-Beschuß. Beim Ti:Saphir-Laser wurden derartige Veränderungen in dieser Größendimension nie gefunden.

Eine Erklärung für die Unterschiede hinsichtlich der thermischen Effekte zwischen Er:YAG-Laser und Ti:Saphir-Laser in den histologischen Schnitten liegt in den unterschiedlichen Prozessen (Pulsdauern) und emittierten Wellenlängen. Während beim Er:YAG-Laser ($\tau = 2940\text{nm}$) die lineare Absorption (Pulsdauer im Mikrosekundenbereich bei hohem Absorptionskoeffizienten von Wasser), und damit die Photoablation durch Wasserverdampfung, zum Gewebeabtrag führt, unterliegt der Ti:Saphir-Laser ($\tau = 780\text{nm}$) der nicht-linearen Absorption (Pulsdauer im Femtosekundenbereich bei geringem Absorptionskoeffizienten von Wasser). Bei diesem Laser führt die gleichzeitige Absorption mehrerer Photonen durch ein Atom oder Molekül zu einer Energiesummierung, die ein zur Ionisation notwendiges Energieniveau überschreitet und zur Plasmazündung führt. Der Materialabtrag erfolgt über explosionsartige Verdampfung (Photodisruption).

Die eingebrachte Energie eines Lasers wird innerhalb einiger Pikosekunden an Ionen und Atome abgegeben, und es kommt zu einer lokalen Erwärmung. Da es sich jedoch im Falle des Ti:Saphir-Lasers um ein Volumen handelte, das nur für Femtosekunden bestrahlt wurde, blieb eine Energieabgabe an die Ionen und Atome, und damit eine Erwärmung der Umgebung, aus.

Für thermische Schädigungszonen von 1-10 μ m in wasserreichen Geweben ergeben sich maximale Laserpulsdauern von 1-100 μ s (Lubatschowski, 1994). Im Gegensatz zum Ti:Saphir-Laser lag die Dauer des Laserpulses beim verwendeten Er:YAG-Laser bei 120 μ s (bei 15mJ). Die Energie wurde an Ionen und Atome abgegeben, überschritt die thermische Relaxationszeit des Gewebes und verursachte dadurch eine Gewebeschädigung.

4.2 Druckmessung/-effekte

Druckmessungen:

Die Druckmessungen in physiologischer Kochsalzlösung wurden bei einem Ti:Saphir-Laser und vergleichend bei einem freilaufenden Er:YAG-Laser durchgeführt. Dabei wurde beim Ti:Saphir-Laser die Pulslänge (130fs, 700fs) und beim Er:YAG-Laser der Abstand zwischen Fokus und Drucksensor (2,5mm, 5mm, 10mm) variiert.

Beim Ti:Saphir-Laser streuten die Meßwerte, in Abhängigkeit von der jeweiligen Pulsenergie (40-147 μ J), zwischen 50-410mbar. Die Spitzendrücke bei den genannten Pulslängen unterschieden sich in einem Abstand von 2,8mm zum Fokus kaum voneinander (Abb. 30A). Wahrscheinlich waren aufgrund der Entfernung zum Fokus die akustischen Ereignisse zu auslaufenden Schallwellen reduziert.

Beim Anlegen einer linearen Trendlinie zeigten sich geringfügig verringerte Spitzendrücke bei 150fs Pulslänge gegenüber 700fs Pulslänge. Dabei könnte es sich um ein zufälliges Ergebnis aufgrund der Streuung der Einzelmeßwerte handeln.

Für Effekte der Kavitationsblasendynamik war die zeitliche Dauer der Druckänderungen (für etwa 150ns; ca. 300ns nach Plasmazündung) zu kurz, vorausgesetzt der Drucksensor wäre sensitiv genug gewesen, da die Entfernung zum Fokus 2,8mm betrug (Abnahme des Spitzendrucks bei zunehmender Entfernung vom Fokus; Noack, 1998). Die Entwicklung einer Kavitationsblase bei einer Pulsenergie von 5 μ J (Pulsdauer 175fs) beginnt etwa 50ns nach Erzeugung des optischen Durchbruchs und endet ca. 2,65 μ s nach Plasmabildung mit dem Blasen kollaps. Danach erfolgt noch zweimal ein Schwingungszyklus der Blase. Der gesamte Verlauf der Kavitation dauert etwa 10 μ s (Ripken, 2000). Damit sind Kavitationseffekte für die hier gezeigten Ergebnisse eher auszuschließen.

Beim Er:YAG-Laser lagen die Druckspitzen bei ähnlichem Fokusabstand (2,5mm) um mehr als eine Größenordnung über denen des Ti:Saphir-Lasers (Abb. 30B). Deutlich ist eine Abhängigkeit zwischen Spitzendruck und Fokusabstand zu erkennen, die auch für den Ti:Saphir-Laser gilt. Bei einem Abstand von 1mm zum Fokus wurde bei einer Pulsenergie von 4 μ J (Pulslänge 250fs) bereits ein Spitzendruck von 4bar gemessen, der bei weiterer Annäherung (200 μ m Abstand) auf etwa 7bar anstieg (Maatz, 1999). Berechnungen deuten auf Spitzendrücke von einigen Kilobar in unmittelbarer Fokusnähe hin (Noack, 1998).

Photoakustische Veränderungen von Hart- und Weichgeweben nach Laserablation:

Mögliche Auswirkungen der Spitzendrücke sollten an verschiedenen Geweben aufgezeigt werden, deren physiologischer Wassergehalt beibehalten wurde. Dazu wurde Hartgewebe mit abnehmenden Linienabständen und verschiedenen Laserdurchläufen (Scans) mittels Ti:Saphir-Laser bestrahlt (Abb. 31). Bei einer Pulsenergie von $80\mu\text{J}$ bei 76 Scans traten bei einem Linienabstand (Stegbreite) von $40\mu\text{m}$ deutliche Schäden in Form von Gewebeverlusten im oberflächennahen Bereich auf (Abb. 31B). Wurde die Anzahl der Scans bei gleicher Pulsenergie halbiert, so war noch immer ein Schaden am $40\mu\text{m}$ breiten Gewebesteg zu erkennen, wenn auch deutlich geringer ausgeprägt (Abb. 31A). Ob es sich bei den Schäden jedoch um einen rein photoakustischen Effekt handelte, konnte nicht geklärt werden. Bei breiteren Gewebestegen traten keine derartigen Schäden auf. Für die Erstellung feiner Strukturen in Hartgeweben scheint damit eine Pulsenergie von $80\mu\text{J}$ nur bedingt geeignet zu sein.

An einem mechanisch sensibleren Modell (Wabenmuster in Knochen) wurde der Grad der Gewebeschädigung bei einer reduzierten Pulsenergie von $50\mu\text{J}$ und einer Stegbreite von etwa $40\mu\text{m}$ weiter untersucht (Abb. 32). Die dort entstandenen Schäden (Gewebeverluste) waren vereinzelt und minimal und lagen nur im direkten Oberflächenbereich des Gewebes (Abb. 32B). Die Bestrahlungsdauer zur Erstellung des Wabenmusters bei $50\mu\text{J}$ (Repetitionsrate 5kHz) war nur geringfügig länger als die Bestrahlungsdauer zur Erstellung des Linienmusters bei $80\mu\text{J}$ (Repetitionsrate 5kHz). Damit stellt eine Pulsenergie von $50\mu\text{J}$ eine geeignete Energiegröße für die zeitlich effektive Bearbeitung feiner Strukturen in Knochengewebe dar.

Auch Weichgewebe sollte auf photoakustische Effekte nach Ti:Saphir-Laserbestrahlung untersucht werden. Dazu wurden zuerst mehrere unbestrahlte Gewebeprouben aufgearbeitet, um mögliche Bearbeitungsartefakte von photoakustischen Schäden differenzieren zu können. Als Gewebetyp wurde Nervengewebe benutzt, da es ein sehr sensibles Gewebe ist. Außerdem können Schäden an Nerven zu den größten Beeinträchtigungen führen, da sie den Ausfall von Sinnesorganen oder Muskelgruppen herbeiführen können.

Wie die dargestellte Nullprobe (Abb. 33) zeigt, traten durch Entwässerung und Schneiden am Mikrotom sternförmige Zerreißen innerhalb der Gewebeprouben als Artefakte auf. Diese Zerreißen variierten in ihrer Größe und Anzahl, waren aber bei fast allen Gewebeschnitten vorhanden. Bei der Bewertung bestrahlter Gewebe wurden diese Artefakte mit berücksichtigt.

Bei einer Pulsenergie von 50 μ J (Abb. 34) konnten keine eindeutigen Druckeffekte in den Gewebeschnitten gefunden werden. Zwar waren in einigen Nervenbündeln Zerreißen zu sehen, da diese aber sternförmig waren, handelte es sich wahrscheinlich um Artefakte.

Nach Bestrahlung mit einer Pulsenergie von 100 μ J waren ebenfalls Zerreißen als Artefakte zu erkennen (Abb. 35). Es traten jedoch auch längs zur Strahlachse Gewebeauflockerungen auf, die nicht sternförmig ausgebildet waren, sondern einen eher länglichen, zur Strahlachse parallelen Verlauf zeigten. Diese Auflockerungen kamen nur in unmittelbarer Nähe der Strahlachse vor. Wären es Artefakte des Schneidens gewesen, dann hätten sie über die ganzen Schnitte verteilt zu finden sein müssen. Das war jedoch nicht der Fall.

Aufgrund der aufgetretenen Auflockerungen stellt sich eine Gewebeablation am Nerven mit einer Pulsenergie von 100 μ J als ungeeignet dar. Ob und in welchen Maßen diese Auflockerungen zu einer Verringerung der Reizleitung führen, kann aufgrund der durchgeführten Versuche und Beobachtungen nicht beantwortet werden. Elektrophysiologische Untersuchungen könnten dazu nähere Erkenntnisse liefern.

Eine weitere drucksensitive Struktur, für die Hals-Nasen-Ohrenheilkunde von besonderem Interesse, ist die Cochlea. Sie besitzt in ihrem flüssigkeitsgefüllten Hohlraum Haarzellen, die vier Reihen von Zilien ausbilden. Diese empfindlichen Zellausläufer können durch Druckeffekte Verformungen oder Lageveränderungen bis hin zur Abscherung erfahren. In unbestrahlten Proben zeigen die drei Reihen äußerer Zilien (gebildet von etwa 12.000 Haarzellen pro Cochlea beim Menschen; Yost, 1994) eine v-förmige Anordnung, während die eine Reihe innerer Zilien (gebildet von etwa 3.500 Haarzellen pro Cochlea beim Menschen; Yost, 1994) eine linienförmige Anordnung zeigt (Abb. 36). Da die Hörschnecke des Meerschweinchens im Aufbau der menschlichen Cochlea ähnlich ist (die humane Schnecke hat mit fast 3 kompletten Windungen etwa 1,5 Windungen weniger; Yost, 1994), sind Meerschweinchen als Tiermodell besonders geeignet.

Die Präparation der Cochlea zur Freilegung der Zilien stellte aufgrund der Sensitivität der Strukturen eine besondere Herausforderung dar. Deformierte Haarzellen mußten nicht zwangsläufig ein Resultat der Laserapplikationen sein, sie konnten sich auch als Artefakte der Präparation darstellen. Daher wurden alle nachfolgenden Versuche mehrfach durchgeführt. Bei bestrahlten Cochleae, deren Zilien keine sichtba-

ren Schäden zeigten, konnte daraus resultierend davon ausgegangen werden, daß der Laserbeschuß zumindest zu keinen unmittelbaren Schäden führte.

Bei einer Bestrahlung mit einer Pulsenergie von $50\mu\text{J}$ konnten keine druckspezifischen Schäden an den Zilien erkannt werden (Abb. 37). Auch in unmittelbarer Nähe zum Ablationsort (Pfeil) zeigten die äußeren Zilien ihre v-förmige Struktur. Da in wässrigen Lösungen mit zunehmender Entfernung vom Fokus die Druckspitzen sehr stark abnehmen (Noack, 1998), war mit einer Schädigung der Zilien in größerem Abstand nicht zu rechnen.

Bei einer Pulsenergie von $80\mu\text{J}$ ergab sich ein sehr ähnliches Bild mit optisch ungeschädigten Zilien in unmittelbarer Nähe zum Ablationsort (Abb. 38). Zwar zeigten einige äußere Zilien eine leicht seitlich geneigte Form, bei den inneren Zilien hingegen konnte keine abweichende Morphologie gefunden werden. Damit stellten die leichten Verformungen wahrscheinlich ein Artefakt der rasterelektronenmikroskopischen Aufarbeitung dar.

Wurde die Pulsenergie auf $100\mu\text{J}$ erhöht, dann zeigten sich teilweise Schädigungen an den äußeren Zilien in Form von Strukturverlusten (Abb. 39). Die charakteristische V-Form der Zilienanordnung war stellenweise verlorengegangen und die Zilien lagen auf den eigentlichen Zellkörpern. Auch bei den inneren Zilien konnten derartige Formverluste beobachtet werden. Am auffälligsten waren jedoch die strukturellen Auflockerungen aufgrund von photoakustischen Effekten in dem die Haarzellen umgebenden Gewebe. Der äußere Tunnel unterhalb der äußeren Haarzellen, gebildet von Hensenschen Zellen und Phalangenzellen, wurde in Richtung Tektorialmembran aufgerissen. Dabei wurden die dünnen Phalangenzellen vom Ablationsort weggedrückt. Teilweise waren die Gewebe auch direkt zerrissen. Bei der Parallelprobe zeigte sich ein ähnliches Bild. Das Aufplatzen des äußeren Tunnels konnte bei mißglückten Haarzellpräparationen in dieser Form nicht beobachtet werden. Somit ist ein Präparationsartefakt unwahrscheinlich. Inwieweit die Schallwahrnehmung und Reizleitung durch diese photoakustischen Effekte beeinträchtigt werden, kann hier nicht beantwortet werden. Elektrophysiologische Untersuchungen könnten auch hier ergänzende Erkenntnisse liefern.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde auf eine weitere Erhöhung der Pulsenergie verzichtet. Eine Verringerung der Pulsenergie auf unter $50\mu\text{J}$ wurde nicht durchgeführt, da bei $50\mu\text{J}$ kein Schaden optisch detektierbar war und sich der Pulsspitzen-
druck mit abnehmender Pulsenergie ebenfalls verringert.

Die Meßergebnisse lassen folgende Schlußfolgerung zu: Bei Laserapplikationen an Nervengewebe und am Innenohr sollten die verwendeten Pulsenergien deutlich unter $100\mu\text{J}$ liegen. Kommt dazu noch eine möglichst feine Bearbeitung von Knochengewebe, dann stellt eine Pulsenergie von $50\mu\text{J}$ einen Kompromiß zwischen geringstmöglichem Schaden und maximaler Abtragseffizienz dar. Es muß jedoch beachtet werden, daß die beobachteten Schäden nur unmittelbar sichtbare Schäden waren. Langzeiteffekte, zum Beispiel durch Schädigungen der Zellmembranen, wurden nicht untersucht.

Um den Ti:Saphir-Laser mit einem etablierten Lasersystem vergleichen zu können, wurden die Haarzelluntersuchungen mit einem Er:YAG-Laser wiederholt. Die dazu verwendeten Pulsenergien lagen mit $6,7\text{mJ}$ und $13,3\text{mJ}$ im anwendungstypischen Bereich. In Abb. 40 sind deutliche Verformungen an einzelnen Haarzellen zu erkennen, die über $100\mu\text{m}$ vom Ablationsort entfernt lagen. Die dabei verwendete Pulsenergie rangierte mit $6,7\text{mJ}$ im eher unteren Anwendungsbereich. Wurde die Pulsenergie auf $13,3\text{mJ}$ erhöht, so kam es zu großflächigen Zilienverformungen, stellenweise zu Abscherungen (Abb. 41). Die Entfernung zum Ablationsort lag dabei ebenfalls über $100\mu\text{m}$.

Im direkten Vergleich der photoakustischen Effekte im Innenohr zwischen Ti:Saphir-Laser und Er:YAG-Laser verursacht anscheinend, bei rein morphologischer Betrachtung, der Ultrakurzpuls-Laser den geringeren Schaden. Der Grund dafür liegt in den Parametern der beiden Laser: Beim Er:YAG-Laser war der Fokus mit einem Durchmesser von $200\mu\text{m}$ etwa fünfmal größer als beim verwendeten Ti:Saphir-Laser. Die für die Ablation verwendete durchschnittliche Pulsenergie lag beim Er:YAG-Laser im Millijoule-Bereich, beim Ultrakurzpuls-Laser hingegen im Mikrojoule-Bereich. Würde der Fokusbereich beim Er:YAG-Laser reduziert werden, dann könnte auch die Pulsenergie gesenkt werden. Bei geringeren Pulsenergien wären auch die Spitzendrücke reduziert.

4.3 Gewebespezifische Abtragsraten

Neben den physikalischen Parametern Temperatur und Druck sollte auf Unterschiede in den gewebespezifischen Abtragsraten in Abhängigkeit der verwendeten Pulsenergie untersucht werden. Dazu wurden verschiedene Weichgewebe und Hartgewebe vom Hausschwein benutzt, bei denen der Wassergehalt der jeweiligen Gewebeprobe künstlich variiert wurde.

Die Messungen der Abtragsraten sollten einen Hinweis auf eine mögliche Abschätzung der benötigten Pulsanzahl einer Pulsenergie bei bekannter Gewebedicke liefern. Da beim verwendeten Ti:Saphir-Laser der Abtrag nach dem Prinzip der Kaskadenionisation erfolgte, wurde eine ähnliche, Gewebetyp unabhängige Abtragsrate pro Puls vermutet.

Wie in Abb. 42 zu erkennen ist, unterschieden sich die Weichgewebe (Muskel, Nerv, Knorpel) bei Bestrahlung im Zustand relativ hohen Feuchtigkeitsgehaltes in der Abtragsrate nicht sehr stark voneinander. Bei einer Pulsenergie von $40\mu\text{J}$ gab es fast keinen Unterschied; die Abtragsrate war bei allen Geweben sehr gering ($<500\text{nm/Puls}$). Wurde die Pulsenergie auf $80\mu\text{J}$ verdoppelt, stieg die Abtragsrate für Nervengewebe auf fast $4\mu\text{m/Puls}$ an, während sich für die beiden anderen Gewebe nur geringe Erhöhungen ergaben. Bei einer Pulsenergie von $110\mu\text{J}$ stieg die Rate bei allen drei Geweben an, jedoch war auch hier der Abtrag bei Nervengewebe am größten, gefolgt von Muskelgewebe und Knorpelgewebe. Mit zunehmender Pulsenergie glichen sich die Abtragsraten der drei Gewebe immer mehr an: Bei $130\mu\text{J}$ überschritten sich das Konfidenzintervall von Nervengewebe und Knorpelgewebe deutlich, bei $160\mu\text{J}$ das Konfidenzintervall von Nervengewebe und Knorpelgewebe.

Für Hartgewebe sah die Entwicklung des Abtragsratenverlaufs gegenüber den Weichgeweben deutlich anders aus. Bei Knochengewebe im trockenen Zustand konnte keine massive Abtragsratenerhöhung wie bei den feuchten Weichgeweben erzielt werden. Bei einer Pulsenergie von $160\mu\text{J}$ lag die Rate für Knochengewebe (trocken) im Mittel noch immer unter einem Mikrometer pro Puls. War das Knochengewebe jedoch zuvor künstlich befeuchtet worden, zeigte sich eine ganz andere Entwicklung: Während bei einer Pulsenergie von $60\mu\text{J}$ die durchschnittliche Abtragsrate noch bei etwa 400nm/Puls lag, stieg sie bei einer Pulsenergie von $80\mu\text{J}$ auf über $36\mu\text{m/Puls}$ an. Wurde die Pulsenergie auf $110\mu\text{J}$ erhöht, lag die Rate sogar bei über $39\mu\text{m/Puls}$. Vergleicht man die benötigten Pulszahlen für die Durchdringung der Knochenscheiben im trockenen und feuchten Zustand, so differieren die

Zahlen maximal um den Faktor 100. Beachtet man das Konfidenzintervall für die Abtragsraten bei $80\mu\text{J}$ und $110\mu\text{J}$, so können die wahren Mittelwerte deutlich tiefer, aber auch deutlich höher liegen. Sicher ist jedoch, daß es eine große Differenz in der Abtragsrate gibt, die durch den Wassergehalt bestimmt wird. Welcher Effekt bei der verstärkten Ablation greift, ist zur Zeit noch ungewiß:

1. Das Wasser könnte die pulsbedingte Druckwelle (und/oder Kavitationsblase) besser als Luft an das poröse Knochengewebe weiterleiten. Dadurch könnte es in seiner Struktur bereits geschädigt und beim nachfolgenden Puls entfernt werden.
2. Die Ionisation des Wassers könnte zu verstärkten Radikalbildungen führen, die die Knochenstruktur zerstören.

Vielleicht sind auch beide Erklärungsansätze zutreffend.

Unterschiede in den Abtragsraten durch Variation des Wasseranteils auf den Gewebeerflächen traten auch bei den Weichgeweben auf. Sie waren gegenüber dem Hartgewebe deutlich geringer ausgeprägt.

Höhere Pulsenergien als $160\mu\text{J}$ wurden nicht benutzt, da durch die zuvor durchgeführten Untersuchungen zu möglichen Druckeffekten abzusehen war, daß der geeignete Pulsenergiebereich mit $160\mu\text{J}$ bereits überschritten wurde.

Das verwendete Gewebeabtragsmodell [V] eignete sich sehr gut zur Beschreibung der gewonnenen Meßwerte, wie die jeweiligen Modellanpassungen (R^2) zeigen. Damit sind auch Aussagen über Abtragsraten bei Pulsenergien möglich, die nicht experimentell gemessen wurden.

Die beschriebene Methode (siehe Kap. 2.2.5) ermöglicht eine direkte Abtragsratenmessung mit geringem zeitlichen Aufwand. Die mechanische Ungenauigkeit liegt unter $10\mu\text{m}$ (entspricht 2% der Schnittdicke), die Ungenauigkeit der Pulszahlmessung ist mit ≤ 1 Puls nicht von Bedeutung. Mögliche Meßungenauigkeiten könnten aber bei der Gewebedickenbestimmung durch Wasseranziehung der Metallkugel entstehen, das Gewebe würde gegenüber dem realen Wert als dicker gemessen werden. Bei der Berechnung der Abtragsrate würde diese dann als zu groß ausfallen. Daher darf keine Wasserfläche auf dem Gewebe stehen, sondern es soll nur eine Austrocknung verhindert werden. Ein Betupfen des Gewebes mit einem wassergetränkten Papier ist geeignet.

Der Einsatz der Meßmethode ist nicht auf Ti:Saphir-Laser beschränkt, bei Verwendung entsprechender Photodetektoren können die Abtragsraten für unterschiedliche Laser bestimmt werden.

Um einen größtmöglichen Abtrag zu erzielen, besonders bei der Bestrahlung von Knochengewebe (zum Beispiel der Cochlea), ergibt sich aus dem gezeigten Einfluß des Wassergehaltes die Notwendigkeit einer zusätzlichen Befeuchtung. Eine online-Kontrolle wird notwendig sein, wenn eine Präzision beim Abtrag wie bei homogenen Materialien erzielt werden soll. Eine hinreichende Vorhersage der Abtragsrate, nur auf Basis der gewählten Pulsenergie, ist aufgrund von Schwankungen im Feuchtigkeitsgehalt der Gewebe während der Bestrahlung nicht möglich.

4.4 Akute Zytotoxizität (MTT-Test)

Die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase der Mitochondrien ist ein direktes Maß für die Vitalität von eukaryotischen Zellen. Nach der Bestrahlung mit unterschiedlichen Energiedosen wurde die Zellaktivität von NHDF und N57 nach dreistündiger Nachinkubation photometrisch gemessen.

Bei beiden Zelllinien war ein Anstieg der Vitalität auf 105% (NHDF), bzw. 108% (N57) bei einer Dosis von 0,31J/cm² zu erkennen (Abb. 43). Dieses Phänomen wird als „Hormesis“ bezeichnet. Unter der Strahlungshormesis versteht man die stimulierende Wirkung kleiner Dosen ionisierender Strahlung auf Organismen (BfS, 2003). Die strahlenbiologische Forschung zeigt, daß lebende Systeme gerade auf kleine Dosen ionisierender Strahlen adaptiv für eine bestimmte Zeit von Stunden bis mehreren Wochen oder sogar Monaten reagieren können (Feinendegen *et al.*, 1995; Wolff, 1998; Feinendegen, 1999). Sie stellen den Versuch des biologischen Systems zur Anpassung an die Strahlenbelastung dar und dienen der Aufrechterhaltung der strukturellen und funktionellen Integrität. Zellen und Gewebe sollen wahrscheinlich einer erneuten Belastung durch Strahlung effektiv begegnen können. Dazu wurden eine Vielzahl biopositiver Effekte beschrieben:

- ROS abbauende biochemische Reaktionen durch Antioxidantien (Feinendegen *et al.*, 1995; Zamboglou *et al.*, 1981; Feinendegen *et al.*, 1987; Kojima *et al.*, 1998)
- erhöhte Reparaturrate von DNA-Schäden durch verstärkte Genexpression (Ikushima *et al.*, 1996; Le *et al.*, 1998; Raaphorst & Boyden, 1999)

- genauere Reparatur von Doppelstrangbrüchen (Tachibana, 2004)
- Einleitung von Apoptose (Chandra *et al.*, 2000; Bauer, 2000; Kondo, 1988)
- positive Stimulation des Immunsystems (James & Makinodan, 1990; Anderson, 1992).

Der meßbare Schutz ähnelt den durch erhöhte ROS-Konzentrationen ausgelösten physiologischen Streßreaktionen, die Schädigungen der DNA und deren Akkumulation verhindern sollen (Finkel & Holbrook, 2000; Chandra *et al.*, 2000).

Wird die Strahlendosis über die maximale Reparaturkapazität der Zellen erhöht, so kommt es zu Schädigungen, die die Vitalität verringern. Bei beiden Zelllinien (NHDF, N57) nahm die Vitalität mit steigender Energiedosis ab. Bei einer Dosis von 0,77J/cm² fiel die Zellvitalität der beiden Fibroblastenkulturen unter die 100% Ausgangsvitalität der Nullproben. Während bei NHDF die Abnahme exponentiell erfolgte, war bei N57 eine exponentielle Abnahme nicht eindeutig zu erkennen. Der Vergleich der EC₃₀- und EC₅₀-Werte zeigte, daß die Vitalitätshemmung bei NHDF zu N57 etwa doppelt so groß war, obwohl die Aktivität (bezogen auf die Teilungsrate) bei N57 zu NHDF nur halb so groß war. Eine mögliche Erklärung könnte in unterschiedlichen Reparaturkapazitäten der beiden Kulturen liegen. Aufgrund der Ergebnisse ist anscheinend die Reparaturkapazität bei N57 gegenüber NHDF größer. Welche Mechanismen dafür verantwortlich sind, kann hier nicht geklärt werden. Es ist aber möglich, daß die N57-Zellen schon während der Kultivierung verstärkt Reparaturmechanismen aufgrund nicht optimaler Wachstumsbedingungen aktiviert hatten. Das wäre eine mögliche Erklärung für ihre geringere Teilungsrate.

Auffällig war bei beiden Zelllinien, daß auch mit höheren Energiedosen (zum Beispiel 12,4J/cm²) keine Vitalität unterhalb von 15% erreicht werden konnte. Das könnte bedeuten, daß entweder die Zellen mit nicht ausreichend hohen Dosen bestrahlt wurden und sie tatsächlich noch die Vitalität besaßen, oder hier eine falsch positive Aktivität aufgrund von Versuchsartefakten sichtbar wird. Ein mögliches Artefakt liegt in der nicht vollständigen Bestrahlung aller Zellen. Da es sich bei dem verwendeten Laser um einen gepulsten Ti:Saphir-Laser handelte, konnte gegenüber einem cw-Modell keine einheitliche und gleichmäßige Bestrahlung der Chamber slides erfolgen. Um eine Überlappung der Laserpulse, und damit Verdopplung der Energiedosis auf der jeweiligen Fläche, zu verhindern, wurden die Einzelpulse in Reihen nebeneinander appliziert. Dadurch entstanden Flächen, die keiner direkten Bestrahlung ausgesetzt waren. Befanden sich Zellen auf diesen Flächen, wurden die-

se nicht von einem Puls getroffen. Durch die sehr kurzen Reaktionszeiten von Radikalen könnten diese Zellen nicht oder kaum geschädigt worden sein. Ebenso könnte es sich bei Zellen am unmittelbaren Rand der jeweiligen Chamber slides verhalten. Ein direkter Beschuß der Kunststoffränder mußte, um die nach erfolgter Bestrahlung mit MTT-Lösung zu befüllende Reaktionskammer nicht zu beschädigen, verhindert werden. Diese nicht geschädigten Zellen könnten mehr oder weniger unbeeinflusst den MTT-Farbstoff durch ihre Mitochondrien zu Formazan umsetzen. Eine in den Meßergebnissen sichtbare „Rest- oder Mindestvitalität“ wäre die Folge.

Eine andere Erklärung liegt möglicherweise in einer Enzymaktivität, die trotz Zellinaktivierung noch etwas länger anhält. Auch wenn der Fibroblast durch den Laserpuls irreparabel geschädigt sein und sich das Zytoplasma mit Kulturmedium füllen sollte, könnten die Mitochondrien noch eine Zeit aktiv bleiben und das MTT umsetzen, bis ihre endogen befindlichen Substanzen (wie zum Beispiel Adenosindiphosphat, Nicotinamidadenindinucleotid, Brenztraubensäureanion (Pyruvat)) aufgebraucht wären.

Um diese möglichen Artefakte zu eliminieren, sollten die MTT-Versuche mit einem Laser im cw-Betrieb wiederholt werden. Das würde den Anteil unbestrahlter Zellen verringern. Würde dann noch die Zeit der Nachinkubation verlängert werden, könnte der fehlerhafte Einfluß noch aktiver Mitochondrien weiter reduziert werden. Allerdings müßten Teilungen vitaler Zellen dabei verhindert werden.

Da die Ergebnisse im MTT-Test auch von den Reparaturkapazitäten der kultivierten Zellen abhängig sind, sollten die Messungen, um eine definiertere Aussage über den tatsächlichen Schädigungsgrad der Strahlung zu erhalten, mit anderen Körperzellkulturen wiederholt werden.

4.5 Gentoxizität (Kometen-Assay)

Mittels Kometen-Assay (Einzelzellgelelektrophorese) sollte untersucht werden, ob es aufgrund des Wirkungsprinzips des Ti:Saphir-Lasers zu einer Schädigung der nukleären DNA kommt. Dazu wurden verschiedene Zelllinien mit unterschiedlichen Pulslängen und in An- oder Abwesenheit von DMSO bei verschiedenen Pulsenergien bestrahlt.

Vor Beginn der eigentlichen Zellbestrahlungen wurde die Fokusgröße des Lasers durch Beschuß von Agarose ermittelt. Mehrfachmessungen (Abb. 44) ergaben einen Durchmesser von etwa 40µm bei einer Pulsenergie von 80µJ. Bei höheren Pulsener-

gien änderte sich der Durchmesser nicht, bei kleineren Pulsenergien nahm er linear ab (Abb. 45). Durch die Ermittlung des maximalen Fokusbereichs sollten bei den nachfolgenden Versuchen Mehrfachbestrahlungen von Zellen durch Überschneidungen der einzelnen Pulse verhindert werden. Als Folge aufgrund von Mehrfachbestrahlungen der Zellen würde die Bandbreite der Meßwerte der Einzelmessungen pro Energiedosis deutlich erhöht werden. Eine falsche Erhöhung der Strahlungsschäden wäre die Folge.

Mit Hilfe des ermittelten Durchmessers wurde ein Scan-Raster programmiert, das bei kleinen Pulsenergien möglichst geringe Abstände zwischen den Fokussen zuließ, ohne bei höheren Pulsenergien zu Überschneidungen der Fokusse zu führen. Es konnte, aufgrund der kreisförmigen Geometrie des Laserfokus, jedoch nicht verhindert werden, daß Agarosestege, die Bereiche niedrigster Strahlung darstellen, bei der Applikation stehenblieben (Abb. 46). In diesen Bereichen liegende Zellen würden bei den Versuchen geringeren Strahlendosen ausgesetzt sein und ihre Schädigung wäre damit wesentlich kleiner, da Hydroxylradikale aufgrund ihrer Reaktivität nicht aus einer Zellkomponente zum Kern wandern und dort Schäden verursachen können. Sie können nur ein oder zwei Molekülebenen passieren und würden spätestens dann mit einer Zellkomponente reagieren (Pryor, 1986). Dieser Fehler in den Messungen konnte nicht verhindert werden, aber mit zunehmender Pulsenergie wurde er aufgrund der Vergrößerung des Fokusbereichs kleiner.

Einen weiteren Einfluß auf die Meßergebnisse übte die gewählte LMP-Agarosekonzentration aus. Je größer der prozentuale Anteil der in Wasser gelösten Agarose, desto weniger wurde die DNA des Zellkerns während der Elektrophorese bewegt (Abb. 47). Wurde der Anteil der Agarose von 0,5% auf 0,35% reduziert, so erhöhte sich der meßbare Schaden bei den mittleren Energiedosen signifikant. Allerdings befand sich die Agaroselösung bei einer Konzentration von 0,35% an der Ausfällungsgrenze, die einen sicheren Transport der Objektträger verhinderte. Daher wurde die vielfach in der Literatur angegebene Konzentration von 0,5% für die Versuche gewählt. Es muß daraus resultierend bei allen Ergebnissen berücksichtigt werden, daß der wirkliche Schaden größer sein muß.

Beim Kometen-Assay kann, je nach pH-Wert des Elektrophoresepuffers, zwischen der Detektion von SSBs und DSBs gewählt werden. Doppelstrangbrüche stellen für die Zelle den größeren Schaden dar, da sie zu Veränderungen in der Chromosomenstruktur führen können, während Einzelstrangbrüche Auswirkungen auf Basenpaar-

rungen haben können. Wie in Abb. 48 zu erkennen ist, war der Anteil von DSBs am Gesamtschaden nach erfolgter Bestrahlung sehr gering, während die Anzahl der SSBs bei allen Energiedosen um ein Vielfaches höher war. Diese Beobachtung entspricht den Angaben in der Literatur (Olive, 1999). Die untere Nachweisgrenze lag für SSBs bei etwa $0,77\text{J}/\text{cm}^2$, während sie für DSBs bei etwa $1,55\text{J}/\text{cm}^2$ lag. Damit zeigte sich die SSB-Detektion als sensiblere Meßmethode, besonders in den unteren Energiedosen, und wurde daraufhin für die nachfolgenden Versuche benutzt.

Der erste Versuch mit beiden Zelllinien (NHDF, N57) wurde bei einer Pulslänge von 150fs durchgeführt. Dabei sollte untersucht werden, ob es möglicherweise Unterschiede zwischen verschiedenen Fibroblastenkulturen in Hinblick auf entstehende Strahlenschäden gibt. Das Ergebnis (Abb. 49) zeigte für die schnellproliferierenden NHDF bei allen Energiedosen ein signifikant höheres „tail moment“ an. Trotz der höheren Aktivität der NHDF war bei ihnen die Reparatur, bzw. der Schutz vor Strahlung, weniger effizient als bei N57. Die zugrundeliegenden Reparaturmechanismen müssen sich daher bei beiden Fibroblastenkulturen unterscheiden. Sollte die Proliferationsrate von N57 aufgrund nicht optimaler Wachstumsbedingungen reduziert worden sein, so könnte die Ursache dafür ROS-bedingter oxidativer Streß gewesen sein, was eine erhöhte Grundreparaturrate zur Folge gehabt hätte. Ein kultivierungsbedingter Hormesis-Effekt könnte somit einen größeren Strahlungsschaden, zumindest bei den geringeren Energiedosen, verhindert haben. Die Erforschung von Streßeffekten aufgrund von ROS hat gezeigt, daß der beste Schutz vor Streß der Streß selbst ist (Finkel & Holbrook, 2000).

Der Versuch wurde mit einer auf 400fs erhöhten Pulslänge wiederholt (Abb. 50), um einen möglichen Einfluß der Pulslänge auf die bei 150fs Pulslänge gemachten Beobachtungen aufzuzeigen. Der Anstieg des „tail moments“ in Abhängigkeit von der Pulsenergie zeigte kaum signifikante Unterschiede zwischen NHDF und N57. Lediglich bei $0,77\text{J}/\text{cm}^2$ und $6,20\text{J}/\text{cm}^2$ zeigte sich eine statistische Differenz. Es muß jedoch für die Dosis $0,77\text{J}/\text{cm}^2$ bezüglich der Schäden (NHDF: $t_m = 190$, N57 = 90) beachtet werden, daß diese sehr nahe der rechnerischen Nulllinie (Nulllinie = gemessener Strahlenschaden minus Schaden Nullprobe) lagen und damit in direkter Abhängigkeit der Nullprobe standen. Bei der Dosis $6,20\text{J}/\text{cm}^2$ lag der Strahlungsschaden der N57-Zelllinie über der von NHDF. Bei allen Versuchen, unabhängig von Pulslänge und DMSO-Gehalt, war das der einzig höhere Meßwert für N57 gegenüber NHDF. Es ist daher möglich, daß an diesem Versuchsmeßpunkt ein Fehler bei der

N57-Bestrahlung oder Aufarbeitung, geltend für beide Objektträger des Doppelversuches, auftrat. Ob jedoch die Zellschädigung beim Fixieren in Agarose auf den Objektträgern auftrat (zum Beispiel durch zu heiße Agarose), während des eigentlichen Bestrahlebens mit dem Laser durch zusätzliche Fremdstrahlung (Einschalten der Raumbelichtung) oder während der nachfolgenden Aufarbeitung der Proben im Labor durch zusätzliche Fremdstrahlung, kann nachträglich nicht geklärt werden. Sicher ist jedoch, daß es sich nicht um eine fehlerhafte Laserbestrahlung (zum Beispiel durch eine falsche Fokusslage) handeln konnte, da nur ein Meßmittelwert betroffen war.

Vergleicht man die Meßwerte für N57 bei den Pulslängen 150fs und 400fs miteinander, so zeigten sich in den Strahlungsschäden keine einseitigen Unterschiede, die Schadensgrößen wechselten (keine Abbildung). Bei NHDF lag das „tail moment“ bei 150fs Pulslänge immer über dem von 400fs Pulslänge (Abb. 51). Eine Signifikanz lag aber nur bei $0,77\text{J}/\text{cm}^2$ und $3,10\text{J}/\text{cm}^2$ vor. Damit könnte die Pulslänge bei NHDF einen Einfluß auf den Schadensgrad haben, wenn dieser auch nicht statistisch signifikant war. Bei N57 konnte ein Einfluß der Pulslänge nicht erkannt werden. Das könnte aber an dem bereits zuvor in Betracht gezogenen Hormesis-Effekt und den daraus resultierenden aktivierten Reparaturmechanismen gelegen haben.

Ob die bei den bereits beschriebenen Versuchen entstandenen DNA-Schäden wirklich durch Radikale und nicht durch zum Beispiel photoakustische Effekte verursacht wurden, sollten Versuche mit DMSO als Radikalfänger für Hydroxylradikale zeigen. Da diese Radikale, die unter anderem durch die Ionisation von Wasser entstehen können, sehr reaktionsfreudig sind und nur sehr kurze Zeit existieren, ist eine direkte Analytik sehr schwierig. Mit Hilfe von Radikalfängern ist jedoch ein indirekter Nachweis möglich. Dazu wurden die Medien und die LMP-Agarose zur Fixierung der Zelllinien NHDF und N57 mit 8% DMSO versetzt. Bei NHDF war eine signifikante Reduzierung der Strahlenschäden bei allen Energiedosen zu erkennen (Abb. 52). Bei $0,77\text{J}/\text{cm}^2$ war in Anwesenheit von DMSO noch kein Schaden zu messen. Erst ab $1,55\text{J}/\text{cm}^2$ stieg das „tail moment“ langsam an. Ab einer Dosis von $4,65\text{J}/\text{cm}^2$ stieg die Differenz in den Schäden mit und ohne DMSO deutlich an. Dieses Ergebnis belegte, daß durch den Ti:Saphir-Laser tatsächlich Hydroxylradikale entstanden sind, die durch das DMSO teilweise abgefangen wurden. Bei den Versuchen an N57-Zellen war die Differenz in den Schäden mit und ohne DMSO noch eindeutiger gegenüber den NHDF-Zellen (Abb. 53). Die Schadensreduzierung war bei fast allen

Energiedosen höchst signifikant, die ersten deutlich meßbaren Schäden in Anwesenheit von DMSO traten erst bei $4,65\text{J}/\text{cm}^2$ auf. Das belegte zum einen die Radikalentstehung und -blockung durch DMSO wie bei NHDF, zum anderen deutete es auf die möglicherweise entstandene Hormesis bei N57 hin. Ein additiver Effekt von aktivierten Reparaturmechanismen und DMSO bei N57 könnte für eine so starke Schadensreduzierung gegenüber N57 ohne DMSO und NHDF mit DMSO sprechen. Beim Vergleich dieser Effektreduzierung von Radikalwirkungen in Gegenwart von DMSO zu Literaturdaten treten jedoch Unterschiede auf: Während bei den hier durchgeführten Untersuchungen die Schadensreduzierung mit 8% DMSO bei etwa 40-60% lag, wird sie beispielsweise für Zigarettenrauch und Asbest bei 0,7% DMSO mit fast 100% angegeben (Jackson *et al.*, 1987). Diese Differenz resultiert aus der besonderen Arbeitsweise des Ti:Saphir-Laser (Kaskaden-Ionisation). Die Ionisation des Materials bewirkt nicht nur die Bildung von Radikalen, sondern auch eine sehr große Anzahl freier Elektronen, die ebenfalls die DNA schädigen können (vgl. Abb. 5). Diese freien Elektronen können nicht komplett vom DMSO abgefangen werden, die Bildung von SSBs ist die Folge.

Strahlenschäden durch Radikale und Elektronen unterliegen keinen gerichteten Reaktionen, vielmehr reagieren sie mehr oder weniger zufällig mit den Molekülen in ihrer Umgebung. Aus dieser Tatsache ergab sich die Überlegung, daß die Strahlenschäden bei hohen Dosen, resultierten sie denn aus Radikalreaktionen, keiner Normalverteilung unterliegen dürften, sondern ein anderes Verteilungsmuster zeigen müßten. Um das zu überprüfen, wurden die Einzelmeßwerte der N57-Versuche mit und ohne DMSO in „tail moment“-Gruppen zusammengefaßt und gegen die jeweilige Zellzahl aufgetragen. In Abb. 54 ist die Verteilung ohne DMSO dargestellt. Während bei den geringen Energiedosen ($0,77\text{J}/\text{cm}^2$, $1,55\text{J}/\text{cm}^2$) der Anteil der nicht oder geringstgeschädigten Zellen (bis $t_m = 3000$) deutlich überwog, nahm bei den höheren Dosen diese Gruppe rasch ab. Die Verteilung der Meßwerte streute bei zunehmender Dosis ebenfalls zunehmend über mehrere Gruppen. Ab $4,65\text{J}/\text{cm}^2$ traten die ersten nicht auswertbaren Kometen auf, deren Anzahl sich mit steigender Dosis weiter erhöhte. Die anteilmäßige Verteilung der Meßwerte bei den jeweiligen Energiedosen bestätigte in der anschließenden statistischen Überprüfung die zuvor gemachte Überlegung, daß die Verteilung der Meßwerte nicht normal sein dürfte. Als Vergleich wurden die Daten für die N57-Zelllinie mit DMSO herangezogen (Abb. 55). Der Anteil der nicht oder geringstgeschädigten Zellen (bis $t_m = 3000$) lag bis zu ei-

ner Dosis von $4,65\text{J}/\text{cm}^2$ deutlich über den anderen Gruppenzellzahlen der jeweiligen Dosis. Ab $6,20\text{J}/\text{cm}^2$ erstreckte sich die Verteilung über eine deutlich größere Gruppenzahl. Nicht auswertbare Kometen traten nicht auf. Die statistische Überprüfung zeigte, daß ab einer Dosis von $4,65\text{J}/\text{cm}^2$ eine Normalverteilung vorlag. Damit wurde nochmals indirekt die Beteiligung von Radikalen an den Strahlenschäden des Ti:Saphir-Lasers bestätigt. Bauer *et al.* (1998) haben bei ihren Untersuchungen gezeigt, daß durch UV-A-Strahlung induzierte „tail moments“ nicht einer Normalverteilung folgen, sie sind eher einer Chi-Quadratverteilung ähnlich. Diese Beobachtung konnten durch die hier durchgeführten Messungen bestätigt werden.

Die unterschiedlichen Schadensverteilungen (normal verteilt, nicht normal verteilt) bei An- und Abwesenheit von DMSO als Radikalfänger dürfte nicht nur bei der entsprechenden Energiedosis zu finden sein, vielmehr müßte es auch Verteilungsunterschiede beim selben durchschnittlichen „tail moment“ geben. Diese Theorie wurde an den Einzelmeßwertverteilungen bei einem „tail moment“ von etwa 12000 überprüft. In Abb. 56 wurde die gezählte Zellzahl pro Schadensgruppe mit und ohne DMSO in den Zellen dargestellt. Auch hier wurde im statistischen Test die unterschiedliche Verteilungslage der Meßwerte deutlich. Trotz desselben Schadensmaßes war in Anwesenheit von DMSO die Verteilung der Werte normal, bei Abwesenheit entsprach sie nicht dem Gausschen Modell. Das bestätigt nochmals die Literatur (Bauer *et al.*, 1998). Die Methode des Vergleichs der Schadensverteilung beim selben durchschnittlichen „tail moment“ kann somit Unterschiede in der Reparatur, bzw. in der Schutzkapazität von Zellen, bzw. Versuchsgruppen aufzeigen. Im Hinblick auf die Vermutung eines Hormesis-Effektes bei der N57-Kultur wurde deswegen die Verteilungslage bei NHDF und N57 bei einem durchschnittlichen „tail moment“ von etwa 3300 und einer Pulslänge von 400fs überprüft (Abb. 57). Wie deutlich zu erkennen war, differierte die Zellzahl pro Gruppe zwischen den beiden Fibroblastenlinien stark. Während bei N57 die Anzahl an Zellen pro Schadensgruppe exponentiell schnell abnahm, zeigte sich bei NHDF eine langgestreckte Verteilung mit relativ geringen Zellzahlen pro Gruppe. Vergleicht man die Zellzahlsumme der untersten drei Gruppen von NHDF und N57 miteinander, so lagen dort für NHDF 65% aller Zellen des „tail moments“, bei N57 waren es 85% der Zellen. Da aufgrund der Versuchsdurchführung eine effektive Reparatur der DNA durch die Zellen nach der Bestrahlung nicht möglich war, die Objektträger beider Zelllinien kamen sofort nach

der Laserapplikation in den eiskalten Lysepuffer, müssen bei N57 bereits Reparaturmechanismen aktiviert gewesen sein.

Alle hier angegebenen „tail moments“ dürfen nicht als absolute Schadensgrößen verstanden werden. Die wirklichen DNA-Schäden werden

- bei allen Energiedosen größer sein, da im Versuch die erstarrte LMP-Agarose mit 0,5% das Auswandern der DNA-Fragmente während der Elektrophorese erschwert
- bei kleinen Energiedosen größer sein, da im Versuch bei kleiner Energiedeposition Agarosestege (Flächen geringer Bestrahlung) entstanden
- bei großen Energiedosen größer sein, da im Versuch nur sichtbare (erkennbare) Kometen ausgewertet werden konnten.

Beim Vergleich der zytotoxischen (Abb. 43) und gentoxischen Effekte (Abb. 49) der Nah-Infrarotstrahlung (NIR) in Abhängigkeit von der Energiedosis wird deutlich, daß die Zytotoxizität wahrscheinlich nicht nur durch die Gentoxizität bedingt wird, sondern auch durch Membranschäden. Genaue Aussagen sind aber nur nach Messung der Reparaturkapazitäten möglich.

Eine Übertragung der Ergebnisse auf andere Körperzellen in Kultur ist möglich, solange die Reparaturmechanismen der unterschiedlichen Körperzellen nicht berücksichtigt werden müssen. Werden bei den Messungen jedoch Reparaturkapazitäten mit einbezogen, zum Beispiel durch Apoptose- oder Reparaturmessungen, dann ist eine Übertragbarkeit nicht mehr gegeben. Grund dafür sind unterschiedliche Reparaturkapazitäten (bedingt durch Alter des Zellspenders, Passagezahl der Zellen, Grundmetabolismus, usw.) zwischen den Zelllinien oder Zellarten.

Zukünftige Untersuchungen könnten sich mit der DNA-Reparatur beschäftigen (zum Beispiel Messung der Reparatur nach 15, 30, 60, 120 Minuten bei gleicher Pulsenergie), um einen Hinweis auf den biologischen Grad der DNA-Schäden zu liefern. In diesem Zusammenhang wären Untersuchungen zur Induzierung von Apoptose interessant, um Aussagen über die Gefahr möglicher Zellentartungen durch Laserstrahlung machen zu können.

Ein Vergleich der hier vorgestellten Ergebnisse mit Literaturdaten zur Gentoxizität des Ti:Saphir-Lasers oder anderer Lasersysteme ist kaum möglich, da nur in ganz wenigen Fällen der Kometen-Assay als Meßmethode benutzt wurde. Stocker *et al.* (1998) untersuchten unter anderem mittels Kometen-Assay die Gentoxizität beim

CO₂-Laser. Als DNA-Träger benutzten sie Vollblut aus humanen Venen. Allerdings wurden nicht wie in der vorliegenden Arbeit direkte Strahlungsschäden betrachtet, sondern die durch strahlungsbedingte Pyrolyseprodukte verschiedener Gewebe induzierten Schäden. Daher ist ein Vergleich mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen nicht möglich.

Bei Mohanty *et al.* (2002) wurde ebenfalls der Kometen-Assay zur Bestimmung der Gentoxizität benutzt. Als Zellen verwendeten sie kultivierte humane Lymphoblasten (NC-37), die mit verschiedenen Wellenlängen (1064nm, Nd:YAG-Laser im cw-Mode; 750-850nm, Ti:Saphir-Laser im cw-Mode) bestrahlt wurden. Der dort verwendete Ti:Saphir-Laser war ein unverstärkter seed-Laser. Der größte Schaden an der DNA trat zwischen 750-780nm Wellenlänge, mit einem Spitzenwert bei etwa 760nm Wellenlänge, auf. Die Schäden bei 800-1064nm Wellenlänge waren nur halb so groß. Die Bestrahlungszeiten der Zellen bei beiden Lasern lagen bei 30 Sekunden und 60 Sekunden mit jeweils 60mW und 120mW Leistung. Damit ist ein Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit aufgrund der differierenden Zeit- und Leistungsparameter ebenfalls nicht möglich.

Die Messungen bei Mohanty *et al.* (2002) belegen, daß es Unterschiede in den DNA-Schäden in Abhängigkeit von der Laserwellenlänge und den damit verbundenen Ablations- und Wirkungsmechanismen gibt. Es muß jedoch beachtet werden, daß es bei allen Wellenlängenbereichen der Lasersysteme zu genetischen Schäden kommt (siehe Kap. 1.2 – DNA-Schäden bei Lasersystemen mit unterschiedlichen Wellenlängen). Wie bereits erwähnt, können diese aber aufgrund unterschiedlicher Meßmethoden nicht miteinander verglichen werden.

4.6 Schlußfolgerung

Für den klinischen Einsatz bedeutet der Ti:Saphir-Laser eine Erweiterung und Verbesserung der bestehenden Möglichkeiten von Bohren und Schneiden mittels Laser. Aufgrund der geringen thermischen und photoakustischen Schäden ist er etablierten Lasersystemen (CO₂-Laser, Er:YAG-Laser) überlegen. Eine durchschnittlichen Pulsenergie von 50µJ (5kHz, 150fs) stellt einen Kompromiß zwischen geringstmöglichem Schaden und maximalem Abtrag dar und ist sowohl für Weichgewebe, als auch für Hartgewebe, geeignet.

Besonders bei Hartgeweben besteht eine direkte Abhängigkeit zwischen der zu erzielenden Abtragsrate und dem Wassergehalt des Gewebes. Bei zeitlich aufwendigeren Operationen an Knochengeweben sollte dieser Einfluß berücksichtigt und gegebenenfalls künstlich nachbefeuchtet werden.

Auf zellulärer Ebene ergeben sich strahlungsinduzierte DNA-Schäden. Ob ein induzierter Schaden zu einer Tumorbildung des Gewebes führen würde, kann hier nicht beantwortet werden, das Risiko von sich manifestierenden DNA-Schäden wird aber steigen.

5. Literaturverzeichnis

Ames, B.N., Shigenaga, M.K. (1993). Oxidants are a major contributor to cancer and aging. In: DNA and free radicals. Eds. Halliwell, B., Aruoma, O. Ellis Horwood, New York. 1-18.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagan, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. Proc. Natl. Acad. Sc. USA 90, 7915-7922.

Anderson, R.E. (1992). Effects of low-dose radiation on the immune response. In: Biological effects of low level exposures to chemicals and radiation. Ed. Calabrese, E.J. Lewis Pub. Inc., Chelsea. 95-112.

Ashby, J., Tinwell, H., Lefevre, P.A., Browne, M.A. (1995). The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay): measurement of tail length and moment. Mutagenesis 10 (2), 85-90.

Aujard, C., Trincal, G. (1985). The effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on KB cells. II. Cell sensitivity to the lethal effect of the drug as a function of the cell age and of the nature of the culture medium. Chem. Biol. Interact. 54 (3), 349-361.

Bains, J.S., Shaw, C.A. (1997). Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. Brain Res. Rev. 25, 335-358.

Bauer, E., Recknagel, R.-D., Fiedler, U., Wollweber, L., Bock, C., Greulich, K.O. (1998). The distribution of the tail moments in single cell gel electrophoresis (comet assay) obeys a chi-square () not a gaussian distribution. Mutat. Res. 398, 101-110.

Bauer, G. (2000). Reactive oxygen and nitrogen species: efficient, selective, and interactive signals during intercellular induction of apoptosis. Anticancer Res. 20, 4115-4139.

Bayreuther, K., Rodemann, H.P., Hommel, R., Dittmann, K., Albiez, M., Francz, P.I. (1988). Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 5112-5116.

Bernstein, C., Bernstein, H. (1991). Aging, sex and DNA repair. Academic Press, San Diego.

Birngruber, R., Hillenkamp, F., Stefani, F.H., Gabel, V.P. (1977). Q-switched ruby laser damage of the rabbit eye lens. Adv. Ophthalmol. 34, 158-163.

Bloembergen, N. (1999). From nanosecond to femtosecond science. Rev. Mod. Phys. 71 (2), 283-287.

Bongarzone, E.R., Pasquini, J.M., Soto, E.F. (1995). Oxidative damage to proteins and lipids of CNS myelin produced by in vitro generated reactive oxygen species. J. Neurosci. Res. 41, 213-221.

- Booth**, H. (2003). Surface micro-structuring of large area substrates using pulsed lasers. PhotonicNet-Forum "Laser – Oberflächenbearbeitung", 17.09.03, Göttingen.
- Borenfreund**, E., Babich, H., Martin-Alguacil, N. (1988). Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays – The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol. in Vitro* 2 (1), 1-6.
- Boudaiffa**, B., Cloutier, P., Hunting, D., Huels, M.A., Sanche, L. (2000). Resonant formation of dna strand breaks by low-energy (3 to 20 eV) electrons. *Science* 287, 1658-1660.
- Boulnois**, J.L. (1986). Photophysical processes in recent medical laser developments: a review. *Lasers Med. Sci.* 1, 47-66.
- Brawn**, K., Fridovich, I. (1981). DNA strand scission by enzymically generated oxygen radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* 206 (2), 414-419.
- Bredesen**, D.E. (1995). Neuronal apoptosis. *Ann. Neurol.* 38, 839-851.
- Bundesamt für Strahlenschutz** (2003). Hormesis (Adaptive Response). <http://www.bfs.de/ion/wirkungen/hormesis.html>.
- Cerruti**, P.A. (1985). Proxidant states and tumor activation. *Science* 227, 375-381.
- Chandel**, N.S., Schumacker, P.T. (2000). Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J. Appl. Physiol.* 88, 1880-1889.
- Chandra**, J., Samali, A., Orrenius, S. (2000). Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 323-333.
- Cheeseman**, K.H. (1993). Lipid peroxidation and cancer. In: DNA and free radicals. Eds. Halliwell, B., Aruoma, O. Ellis Horwood, New York. 109-144.
- Cohen**, J.J. (1993). Apoptosis. *Immunol. Today* 14 (3), 126-130.
- Collins**, R.J., Kisliuk, P. (1962). The control of population in pulse ruby optical masers. *J. Appl. Phys.* 33, 2009ff.
- Curnette**, J.T., Babior, B.M. (1987). Chronic granulomatous disease. *Adv. Hum. Genet.* 16, 229-297.
- DeMaria**, A.J., Stetser, D.A., Heynau, H. (1966). Self mode-locking of lasers with saturable absorbers. *Appl. Phys. Lett.* 8, 174-176.
- Dinkloh**, L., Becker, W.-J., Beyer, A., Böhmeke, S., Dammann, V., Dürr, W., Funk, W., Hesse, H.P., Klopp, R., Kolloch, B., Krutz, H., Regnet, W., Schleichert, U., Schulte, A., Weisbrodt, W. (1980). Ringversuche in der Wasseranalytik - II. Auswertung. *Z. Wasser, Abwasser, Forschung* 13, Nr.5, 174-187.
- Duck**, F.A. (1990). Physical properties of tissue: a comprehensive reference book. Academic Press, London.

- Einstein**, A. (1917). Zur Quantentheorie der Strahlung. *Physik. Zeitschr.* 18, 121-128.
- Esterbauer**, H., Eckl, P., Ortner, A. (1990). Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat. Res. Rev. Genet. Toxicol.* 238, 223-233.
- Esterbauer**, H., Gebicki, J., Puhl, H., Jurgens, G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* 13 (4), 341-390.
- Feinendegen**, L.E. (1999). The role of adaptive responses following exposure to ionizing radiation. *Hum. Exp. Toxicol.* 18, 426-432.
- Feinendegen**, L.E., Loken, M.K., Booz, J., Muehlensiepen, H., Sondhaus, C.A., Bond, V.P. (1995). Cellular mechanisms of protection and repair induced by radiation exposure and their consequences for cell system responses. *Stem Cells* 13 (1), 7-20.
- Feinendegen**, L.E., Muehlensiepen, H., Bond, V.P., Sondhaus, C.A. (1987). Intracellular stimulation of biochemical control mechanisms by low-dose low-LET irradiation. *Health Phys.* 52, 663-669.
- Feng**, Q., Moloney, J.V., Newell, A.C., Wright, E.M., Cook, K., Kennedy, P.K., Hammer, D.X., Rockwell, B.A., Thompson, C.R. (1997). Theory and simulation on the threshold of water breakdown induced by focused ultrashort laser pulses. *IEEE J. Quant. Elect.* 33 (2), 127-137.
- Fenton**, H.J. (1894). The oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc.* 65, 899-910.
- Finkel**, T., Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature* 408 (9), 239-247.
- Frentzen**, M., Hamrol, D. (2000). Kavitätenpräparation mit dem Er:YAG-Laser – eine histologische Studie. *Dtsch. Zahnärztl. Z.* 55 (2), 114-117.
- Fridovich**, I. (1986). Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 247 (1), 1-11.
- Goldenberg**, G.J., Lyons, R.M., Lepp, J.A., Vanstone, C.L. (1971). Sensitivity to nitrogen mustard as a function of transport activity and proliferative rate in L5178Y lymphoblasts. *Cancer Res.* 31 (11), 1616-1619.
- Gonsior**, B. (1984). *Physik für Mediziner, Biologen und Pharmazeuten.* Schattauer, Stuttgart, New York.
- Green**, D., Kroemer, G. (1998). The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell. Biol.* 8 (7), 267-271.

Green, H., Boll, J., Parrish, J.A., Kochevar, I.E., Oseroff, A.R. (1987). Cytotoxicity and mutagenicity of low intensity, 248 and 193nm excimer laser radiation in mammalian cells. *Cancer Res.* 47 (2), 410-413.

Grubbs, F.E., Beck, G. (1972). Extension of Sample Sizes and Percentage Points for Significance Tests of Outlying Observations. *Technometrics*, 14 (4), 847-854.

Halliwell, B. (1992). Reaktive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 59 (5), 1609-1623.

Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *The Lancet* 344, 721-724.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1989). The superoxid theory of oxygen toxicity. In: *Free radicals in biology and medicine*. Eds. Halliwell, B., Gutteridge, J.M. Oxford University Press, New York. 136-176.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1992). Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. *FEBS Lett.* 307, 108-112.

Hansen, M.B., Nielsen, S.E., Berg, K. (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth / cell kill. *J. Immunol. Methods* 199, 203-210.

Hargrove, L.E., Fork, R.L., Pollack, M.A. (1964). Locking of He-Ne laser modes induced by synchronous intracavity modulation. *Appl. Phys. Lett.* 5, 4-5.

Harris, S.E., Targ, R. (1964). Fm oscillation of the He-Ne laser. *Appl. Phys. Lett.* 5, 202-204.

Hefetz, Y., Dunn, D.A., Deutsch, T.F., Buckley, L., Hillenkamp, F., Kochevar, I.E. (1990). Laser Photochemistry of DNA: Two-photon absorption and optical breakdown using high-intensity, 532-nm radiation. *J. Am. Chem. Soc.* 112 (23), 8528-8532.

Heisterkamp, A. (2002). Einsatz ultrakurzer Laserpulse in der refraktiven Laserchirurgie. Dissertation, Universität Hannover.

Heisterkamp, A., Ripken, T., Lutkefels, E., Drommer, W., Lubatschowski, H., Welling, H., Ertmer, W. (2001). Optimizing laser parameters for intrastromal incision with ultra-short laser pulses. *Ophthalmologie* 98 (7), 623-628.

Hellwarth, R.W. (1961). Control of fluorescent pulsations. In: *Advances in quantum electronics*. Ed. Singer, J.R. Columbia University Press, New York. 334-341.

Helma, C., Uhl, M. (2000). A public domain image-analysis program for the single-cell gel-electrophoresis (comet) assay. *Mutat. Res.* 466, 9-15.

Henderson, L.M., Chappell, J.B. (1993). Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? *Eur. J. Biochem.* 217, 973-980.

- Hessling**, J.J., Miller, S.E., Levy, N.L. (1980). A direct comparison of procedures for the detection of mycoplasma in tissue-culture. *J. Immunol. Methods* 38 (3-4), 315-328.
- Hetts**, S.W. (1998). To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 279 (4), 300-307.
- Hopkins**, J.-M., Sibbett, W. (2000). Ultrakurze Laserblitze. In: *Spektrum der Wissenschaft* 11/2000. Spektrum, Heidelberg, Berlin. 66-73.
- Husøy**, T., Syversen, T., Jenssen, J. (1993). Comparisons of four in vitro cytotoxicity tests: The MTT assay, NR assay, uridine incorporation and protein measurements. *Toxicol. in Vitro* 7 (2), 149-154.
- Ikushima**, T., Aritomi, H., Morisita, J. (1996). Radioadaptive response: Efficient repair of radiation-induced DNA damage in adapted cells. *Mutat. Res.* 358: 193-198.
- Imlay**, J., Linn, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240, 1302-1309.
- Jackson**, J.H., Schraufstatter, I.U., Hyslop, P.A., Vosbeck, K., Sauerheber, R., Weitzmann, S.A., Cochrane, C.G. (1987). Role of oxidants in dna damage. Hydroxyl radical mediates the synergistic dna damaging effects of asbestos and cigarette smoke. *J. Clin. Invest.* 80, 1090-1095.
- Jaeschke**, H. (1995). Mechanisms of oxidant stress-induces acute tissue injury. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 209 (2), 104-111.
- James**, S.J., Makinodan, T. (1990). T-cell potentiation by low dose ionizing radiation: possible mechanisms. *Health Physics* 59, 29-34.
- Janssen**, Y., Van Houten, B., Borm, P., Mossman, B. (1993). Biology of disease. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab. Inv.* 69, 261-274.
- Jaschke**, W., Claussen, C., Loose, R. (2001). *Einführung in die Radiologie*. Thieme, Stuttgart.
- Jesberger**, J.A., Richardson, J.S. (1991). Oxygen free radicals and brain dysfunction. *Intern. J. Neurosci.* 51, 1-17.
- Joenje**, H. (1989). Genetic toxicology of oxygen. *Mutat. Res.* 219 (4), 193-208.
- Jung**, I.D., Kärtner, F.X., Matuschek, N., Sutter, D.H., Morier-Genoud, F., Shi, Z., Scheuer, V., Tilsch, M., Tschudi, T., Keller, U. (1997). Semiconductor saturable absorber mirrors supporting sub-10-fs pulses. *Applied Physics B: Lasers and Optics* 65 (2), 137-150.
- Karu**, T. (1989a). Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys.* 56 (5), 691-704.

- Karu, T.** (1989b). Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. *J. Photochem. Photobiol. B.* 3 (4), 638-640.
- Kauffmann, G.W., Moser, E., Sauer, R.** (1996). *Radiologie.* Urban und Fischer, München.
- Keller, U.** (1994). Ultrafast all-solid-state laser technology. *Applied Physics B: Lasers and Optics* 58, 347-363.
- Keller, U., Weingarten, K.J., Kärtner, F.X., Kopf, D., Braun, B., Jung, I.D., Fluck, R., Hönniger, C., Matuschek, N., Aus der Au, J.** (1996). Semiconductor saturable absorber mirrors (SESAM) for femtosecond to nanosecond pulse generation for solid-state lasers. *IEEE J. Sel. Top. Quant. Elect.* 2 (3), 435-453.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R.** (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Brit. J. Cancer* 26, 239-247.
- Kneubühl, F.K., Sigrist, M.W.** (1999). *Laser.* 5. Auflage. Teubner, Stuttgart, Leipzig.
- Knippers., R., Philippsen, P., Schäfer, K.P., Fanning, E.** (1990). *Molekulare Genetik.* 5. Auflage. Thieme, Stuttgart, New York.
- Koechner, W.** (1996). *Solid-State Laser Engineering.* Band 1, 4. Auflage. Springer, Berlin.
- König, K.** (2000). Laser tweezers and multiphoton microscopes in life sciences. *Histochem. Cell Biol.* 114, 79-92.
- Kojima, S., Matsuki, O., Nomiura, T., Shimura, N., Kubodera, A., Yamaoka, K., Tanooka, H., Wakasugi, H., Honda, Y., Sasaki, T.** (1998). Localization of glutathione and induction of glutathione synthesis-related proteins in mouse brain by low doses of gamma-rays. *Brain Res.* 808, 262-269.
- Kondo, S.** (1988). Altruistic cell suicide in relation to radiation hormesis. *Intern. J. Radiat. Biol.* 53, 95-102.
- Kulik, C.** (2003). Grundlagen der Oberflächenbearbeitung. PhotonicNet-Forum "Laser – Oberflächenbearbeitung", 17.09.03, Göttingen.
- Kurtz, R.M., Horvath, C., Liu, H.H., Krueger, R.R., Juhasz, T.** (1998). Lamellar refractive surgery with scanned intrastromal picosecond and femtosecond laser pulses in animal eyes. *J. Refract Surg.* 14 (5), 541-548.
- Le, X.C., Xing, J.Z., Lee, J., Leadon, S.A., Weinfeld, M.** (1998). Inducible repair of thymine glycol detected by an ultrasensitive assay for DNA damage. *Science* 280, 1066-1069.
- Leist, M., Nicotera, P.** (1997). The shape of cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236 (1), 1-9.

LePecq, J.-B., Paoletti, C. (1967). A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. Physical-chemical characterization. *J. Mol. Biol.* 27, 87-106.

Lewin, Benjamin (1998). *Molekularbiologie der Gene*. Spektrum, Heidelberg, Berlin.

Lindner, H. (1999). *Physik für Ingenieure*. 15. Auflage. Fachbuchverlag, Leipzig.

Loft, S., Poulsen, H.E. (1996). Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J. Mol. Med.* 74, 297-312.

Lubatschowski, H. (1994). *Untersuchungen zur Photoablation biologischer Gewebe*. Dissertation, Institut für angewandte Physik, Bonn.

Lubatschowski, H., Heisterkamp, A., Will, F., Singh, A.I., Serbin, J., Ostendorf, A., Kermani, O., Heermann, R., Welling, H., Ertmer, W. (2003). Medical applications for ultrafast laser pulses. *RIKEN Review* 50, 113-118.

Lubatschowski, H., Maatz, G., Heisterkamp, A., Hetzel, U., Drommer, W., Welling, H., Ertmer, W. (2000). Application of ultrashort laser pulses for intrastromal refractive surgery. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 238 (1), 33-39.

Maatz, G. (1999). *Grundlegende Untersuchungen zum Einsatz ultrakurzer Laserpulse für die intrastromale Hornhautchirurgie*. Diplomarbeit, Universität Hannover.

Maiman, T.H. (1960). Stimulated optical radiation in ruby. *Nature* 187, 493-494.

Majno, G., Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 146 (1), 3-15.

Maly, F.E. (1990). The b-lymphocyte: A newly-recognized source of reactive oxygen species with immunoregulatory potential. *Free Radic. Res. Commun.* 8, 143-148.

Meier, B., Radeke, H., Selle, S., Raspe, H.H., Sies, H., Resch, K., Habermehl, G.G. (1990). Human fibroblasts release reaktive oxygen species in response to treatment with synovial fluids from patients suffering from arthritis. *Free Radic. Res. Commun.* 8, 149-160.

Meschede, D. (1999). *Optik, Licht und Laser*. Teubner, Stuttgart, Leipzig.

Mocker, H.W., Collins, R.J. (1965). Mode competition and self-locking effects in a Q-switched ruby laser. *Appl. Phys. Lett.* 7, 270ff.

Mohanty, S.K., Rapp, A., Monajembashi, S., Gupta, P.K., Greulich, K.O. (2002). Comet assay measurements of DNA damage in cells by laser microbeams and trapping beams with wavelenghts spanning a range of 308 nm to 1064 nm. *Radiat. Res.* 157, 378-385.

- Mosmann**, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- Moulton**, P.F. (1982). Ti-doped sapphire: tunable solid-state laser. *Opt. News* 8, 9ff.
- Mourou**, G., Barty, C.P., Perry, M.D. (1998). Ultrahigh-intensity lasers: physics of the extreme on a tabletop. *Phys. Today* 51, 22-28.
- Muller**, H.J. (1925). The regionally differential effect of X-rays on crossing over in autosomes of *Drosophila*. *Genetics* 10, 470-506.
- Muller**, H.J. (1927). Artificial transmutation of the gene. *Science* 66, 84-87.
- Murell**, G.A., Francis, M.J., Bromley, L. (1990). Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem. J.* 265, 659-665.
- Nisoli**, M., Stagira, S., De Silvestri, S., Svelto, O., Sartania, S., Cheng, Z., Lenzner, M., Spielmann, Ch., Krausz, F. (1997). A novel-high energy pulse compression system: generation of multigigawatt sub-5-fs pulses. *Applied Physics B: Lasers and Optics* 65 (2), 189-196.
- Noack**, J. (1998). Optischer Durchbruch in Wasser mit Laserpulsen zwischen 100ns und 100fs. Dissertation, Universität Lübeck.
- Nolte**, S. (1999). Mikromaterialbearbeitung mit ultrakurzen Laserpulsen. Dissertation, Laserzentrum Hannover (LZH).
- Östling**, O., Johanson, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123 (1), 291-298.
- Olive**, P.L. (1999). Review: DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int. J. Radiat. Biol.* 75 (4), 395-405.
- Perry**, M.D., Mourou, G. (1994). Terawatt to petawatt subpicosecond lasers. *Science* 264, 917-924.
- Phillis**, J.W. (1994). A radical view of cerebral ischemic injury. *Progr. Neurobiol.* 42, 441-448.
- Pippert**, K. (2003). Laser-Oberflächenbearbeitung. PhotonicNet-Forum "Laser – Oberflächenbearbeitung", 17.09.03, Göttingen.
- Porter**, N.A. (1986). Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids. *Acc. Chem. Res.* 19, 262-268.
- Powell**, S., McMillan, T.J. (1990). DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation. *Radiother. Oncol.* 19, 95-108.
- Pryor**, W.A. (1986). Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Annu. Rev. Physiol.* 48, 657-667.

Raaphorst, G.P., Boyden, S. (1999). Adaptive response and its variation in human and tumour cells. *Intern. J. Radiat. Biol.* 75, 865-873.

Remacle, J., Raes, M., Toussaint, O., Renard, P., Rao, G. (1995). Low levels of reactive oxygen species as modulators of cell function. *Mutat. Res.* 316, 103-122.

Ripken, T. (2000). Optimierung der Parameter für die intrastromale Hornhautchirurgie mittels ultrakurzer Laserpulse. Diplomarbeit, Universität Hannover.

Saul, R.L., Ames, B.N. (1986). Background levels of DNA damage in the population. In: *Mechanisms of DNA damage and repair. Implications for carcinogenesis and risk assessment.* Eds. Simic, M.G., Grossman, L., Upton, A.C. Plenum Press, New York, London. 529-536.

Savill, J., Fadok, V., Henson, P., Haslett, C. (1993). Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol. Today* 14 (3), 131-136.

Schwab, B., Hagner, D., Müller, W., Lubatschowski, H., Lenarz, T., Heermann, R. (2004). Knochenablation mittels ultrakurzer Laserpulse. Eine neue Technik für die Mittelohrchirurgie. *Laryngo-Rhino-Otol.* 83, 219-225.

Shafirovich, V., Dourandin, A., Luneva, N.P., Singh, C., Kirigin, F., Geacintov, N.E. (1999). Multiphoton near-infrared femtosecond laser pulse-induced DNA damage with and without the photosensitizer proflavine. *Photochem. Photobiol.* 69 (3), 265-274.

Shank, C.V., Ippen, E.P. (1974). Subpicosecond kilowatt pulses from a mode-locked cw dye laser. *Appl. Phys. Lett.* 24 (8), 373-375.

Shea, J.J. (1958). Fenestration of the oval window. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 67, 932-951.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175, 184-191.

Slater, A.F., Stefan, C., Nobel, I., van den Dobbelen, D.J., Orrenius, S. (1995a). Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicol. Lett.* 82/83, 149-153.

Slater, A.F., Stefan, C., Orrenius, S. (1995b). The role of intracellular oxidants in apoptosis. *Biochem. Biophys. Acta* 1271, 59-62.

Slater, T.F., Sawyer, B., Sträuli, U. (1963). Studies on succinate-tetrazolium reductase systems; III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochem. Biophys. Acta* 77, 383-393.

Sonntag, C. von (1989). *The chemical basis of radiation biology.* Taylor and Francis, London.

- Spence**, D.E., Kean, P.N., Sibbett, W. (1991). 60-fsec pulse generation from a self-mode-locked Ti:sapphire laser. *Opt. Lett.* 16 (1), 42-44.
- Srinivasan**, R., Mayne-Banton, V. (1982). Self-developing photoetching of poly (ethylene terephthalate) films by far-ultraviolet excimer laser radiation. *Appl. Phys. Lett.* 41 (6), 576-578.
- Stocker**, B., Meier, T., Fliedner, T.M., Plappert, U. (1998). Laser pyrolysis products: sampling procedures, cytotoxic and genotoxic effects. *Mutat. Res.* 412, 145-154.
- Stohs**, S.J., Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18 (2), 321-336.
- Strickland**, D., Mourou, G. (1985). Compression of amplified chirped optical pulses. *Opt. Commun.* 56, 219-221.
- Stuart**, B.C., Feit, M.D., Rubenchik, A.M., Shore, B.W., Perry, M.D. (1995). Laser-induced damage in dielectrics with nanosecond to subpicosecond pulses. *Phys. Rev. Lett.* 74 (12), 2248-2251.
- Tachibana**, A. (2004). Genetic and physiological regulation of non-homologous end-joining in mammalian cells. *Adv. Biophys.* 38, 21-44.
- Tan**, S., Schubert, D., Maher, P. (2001). Oxytosis: A novel form of programmed cell death. *Curr. Top. Med. Chem.* 1 (6), 497-506.
- Tan**, S., Wood, M., Maher, P. (1998). Oxidative stress induces a form of programmed cell death with characteristics of both apoptosis and necrosis in neuronal cells. *J. Neurochem.* 71 (1), 95-105.
- Tappeiner**, H. von, Jesionek, A. (1903). Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Med. Wochenschr.* 50, 2042-2051.
- Thompson**, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.
- Timberlake**, G.T., Gemperli, A.W., Larive, C.K., Warren, K.A., Mainster, M.A. (1997). Free radical production by Nd:YAG laser photodisruption. *Ophthalmic Surg. Lasers* 28 (7), 582-588.
- Tirlapur**, U.K., König, K. (2001). Femtosecond near-infrared laser pulse induced strand breaks in mammalian cells. *Cell. Mol. Biol.* 47 (18), 131-134.
- Tirlapur**, U.K., König, K., Peuckert, C., Krieg, R., Halbhuber, K.-J. (2001). Femtosecond near-infrared laser pulses elicit generation of reactive oxygen species in mammalian cells leading to apoptosis-like death. *Exp. Cell Res.* 263, 88-97.
- Trush**, M., Kensler, T. (1991). Role of free radicals in carcinogen activation. In: *Oxidative stress. Oxidants and antioxidants*. Ed. Sies, H. Academic Press, London. 277-317.

- Turrens**, J.F., Beconi, M., Barilla, J., Chavet, U.B., McCord, J.M. (1991). Mitochondrial generation of oxygen radicals during reoxygenation of ischemic tissues. *Free Radic. Res. Commun.* 12-13 Pt 2, 681-689.
- Vaux**, D.L. (1993). Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 786-789.
- Vogel**, A., Busch, S., Asiyo-Vogel, M. (1993). Time-resolved measurements of shock-wave emission and cavitation-bubble generation in intraocular laser surgery with ps- and ns-pulses and related tissue effects. *Proc. SPIE* 1877, 312-323.
- Vogel**, A., Busch, S., Parlitz, U. (1996). Shock wave emission and cavitation bubble generation by picosecond and nanosecond optical breakdown in water. *J. Acoust. Soc. Am.* 100 (1), 148-165.
- Ward**, J.F. (1988). DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation and reparability. *Progr. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 35, 95-125.
- Williams**, L.R. (1995). Oxidative stress, age-related neurodegeneration and the potential for neurotrophic treatment. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 7 (1), 55-73.
- Wiseman**, H., Halliwell, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* 313, 17-29.
- Wolff**, S. (1998). The adaptive response in radiobiology: evolving insights and implications. *Environ. Health Perspect.* 106, 277-283.
- Wyllie**, A.H. (1992). Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev.* 11 (2), 95-103.
- Wyllie**, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L., Dunlop, D. (1984). Chromatin cleavage in apoptosis – association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* 142, 67-77.
- Xu**, H.H., Kelly, J.R., Jahanmir, S., Thompson, V.P., Rekow, E.D. (1997). Enamel subsurface damage due to tooth preparation with diamonds. *J. Dent. Res.* 76 (10), 1698-1706.
- Yost**, W.A., Ed. (1994). *Fundamentals of hearing: An introduction*. 3rd edition. Academic Press, San Diego, New York.
- Zamboglou**, N., Porschen, W., Muehlensiepen, H., Booz, J., Feinendegen, L.E. (1981). Low dose effect of ionizing radiation on incorporation of iodo-deoxyuridine into bone marrow cells. *Intern. J. Radiat. Biol.* 39, 83-93.
- Zhang**, Y., Marcillat, O., Giulivi, C., Ernster, L., Davies, K.J. (1990). The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J. Biol. Chem.* 265, 16330-16336.

Anhang A. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, im höchstmöglichen Reinheitsgrad verwendet.

- Aceton; Baker, Deventer, Holland
- Agarose: I.D.NA[®] Agarose; FMC BioProducts, Rockland, USA
SeaPlaque[®] GTG[®] Agarose; BMA, Rockland, USA
- Aminosäuren (essentiell); Biochrom, Berlin
- Aminosäuren (nicht essentiell); Biochrom, Berlin
- Benzol; Merck, Darmstadt
- Chlorwasserstoff (Salzsäure, 25%); Merck, Darmstadt
- Chlorwasserstoff (Salzsäure, 1M); Merck, Darmstadt
- Corbit-Balsam; Hecht, Kiel-Hassee
- N,N-Dimethylformamid (DFM); Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Dimethylsulfoxid (DMSO); Merck, Darmstadt
- 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT); Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat; Baker, Deventer, Holland
- Dinatriumhydrogenphosphatmonohydrat; Merck, Darmstadt
- Eosin G (gelblich); Merck, Darmstadt
- Essigsäure (80%); Merck, Darmstadt
- Ethidiumbromid; Merck, Darmstadt
- Ethylendinitrilotetraessigsäuredinatriumdihydrat (Titriplex[®] III); Merck, Darmstadt
- Fötale Kälberserum (FKS); Invitrogen, Life Technologies[®], Karlsruhe
- Glutaraldehyd (25%ige Lösung in Wasser); Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
- Hämalaulösung nach Mayer; Merck, Darmstadt
- Kaliumchlorid; Merck, Darmstadt
- Kaliumdihydrogenphosphat; Merck, Darmstadt
- Karbolxylol; Merck, Darmstadt
- Kohleleitfilm, Plano, Wetzlar

- Methylbenzoat; Merck, Darmstadt
- *Minimum essential medium* (MEM) mit EARLE's Salzen und L-Glutamin; Biochrom, Berlin
- Natriumchlorid; Merck, Darmstadt
- Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat; Merck, Darmstadt
- Natriumdodecylsulfat (SDS); ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA
- Natriumhydrogencarbonat; Biochrom, Berlin
- Natriumhydroxid; Merck, Darmstadt
- N-Lauroyl-Sarkosinnatrium; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Paraffin; Merck, Darmstadt
- Paraformaldehyd; Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
- Penicillin (10.000U/ml) / Streptomycin (10.000µg/ml); Biochrom, Berlin
- Poly-L-Lysin; Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA
- Reinstwasser (Leitfähigkeit 0,055µS/cm); Seral Reinstwasser-Systeme, Ransbach-Baumbach
- Tris-[hydroxymethyl]aminomethan (Tris); ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA
- Triton[®] X-100; Merck, Darmstadt
- Trypsin, 1:250 aus Rinderpankreas (4U/ml); Serva, Heidelberg
- Vitamine; Biochrom, Berlin
- Xylol; Baker, Deventer, Holland

Anhang B. Puffer und Lösungen

Zellkulturmedien:

- Serumfreies Medium (SFM)
 - 1 Packung (für 5l-Ansatz) *minimum essential medium* (MEM) mit EARLE's Salzen und L-Glutamin in 4.500ml Reinstwasser lösen
 - 150ml 7,5%ige (11,25g in 150ml) NaHCO₃-Lösung
 - 60ml nicht essentielle Aminosäuren (100x)
 - 120ml essentielle Aminosäuren (50x)
 - 60ml Vitamineauf 5.000ml mit Reinstwasser auffüllen; steril filtrieren

- Medium mit 12% fötalem Kälberserum (FKS)
 - 360ml serumfreies Medium (SFM)
 - 50ml fötales Kälberserum (FKS)
 - 4ml Penicillin (10.000U/ml) / Streptomycin (10.000µg/ml)

- Trypsinlösung (0,124%); pH 7,4
 - 500ml Reinstwasser
 - 0,62g Trypsin
 - 4g NaCl
 - 0,1g KCl
 - 0,1g KH₂PO₄
 - 0,57g Na₂HPO₄ x 2H₂O
 - 0,62g Titriplex IIIsteril filtrieren

- PBS-Puffer (*phosphate buffered saline*), Ca²⁺- und Mg²⁺-frei; pH 7,4
 - 950ml Reinstwasser
 - 8g NaCl
 - 0,2g KCl
 - 1,44g Na₂HPO₄ x 2H₂O
 - 0,2g KH₂PO₄auf 1.000ml mit Reinstwasser auffüllen

Kometen-Assay (SCGE):

- Agarose zum Beschichten der Objektträger
 - 1,5g Agarose (I.D.NA[®] Agarose)in 100ml PBS-Puffer lösen

- LMP-Agarose
 - 0,25g LMP-Agarose (Sea Plaque GTG Agarose)in 50ml PBS-Puffer lösen

- Lysepuffer-Stammlösung; pH 10
 - 146,1g NaCl
 - 37,2g Titriplex III
 - 1,2g Tris
 - 10g Na-Lauroylsarkosinatauf 890ml mit Reinstwasser auffüllen

- Lysepuffer-Gebrauchslösung für 150ml
 - 133,5ml Lyse-Stammlösung
 - 1,5ml Triton X-100
 - 15ml DMSO

- Elektrophoresepuffer-Stammlösungen
 - 20g NaOH / 50ml Reinstwasser -> 10M NaOH, max. 14 Tage lagern
 - 3,72g Titriplex III / 50ml Reinstwasser -> 200mM Titriplex III;pH 10

- Elektrophoresepuffer-Gebrauchslösung; pH \geq 13
 - 15ml 10M NaOH
 - 2,5ml 200mM Titriplex IIIauf 500ml mit Reinstwasser auffüllen

- Neutralisationspuffer; pH 7,5
 - 24,3g Trisauf 500ml mit Reinstwasser auffüllen

- Ethidiumbromid-Stammlösung
 - 5mg Ethidiumbromid
 - in 25ml Reinstwasser lösen
- Ethidiumbromid-Gebrauchslösung
 - 0,5ml Stammlösung
 - 4,5ml Reinstwasser

MTT-Test:

- MTT-Stammlösung
 - 5mg MTT/ml PBS-Puffer
- MTT-Gebrauchslösung (vor Gebrauch frisch ansetzen)
 - 2,5ml MTT-Stammlösung
 - 10ml Medium (mit 12% fötales Kälberserum)
- SDS-Lysepuffer, pH 4,2
 - 20g SDS
 - 500ml N,N-Dimethylformamid (DMF)
 - 500ml Reinstwasser
 - 25ml Essigsäure (80%)
 - 25ml 1 mol/l HCl
 - pH-Wert mit NaOH einstellen

Paraffineinbettung von Weichgeweben:

- PBS-Puffer (*phosphate buffered saline*), pH 7,4
 - 115,7g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ in 3,5 Liter Reinstwasser
 - 27,6g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ in 1 Liter Reinstwasser
 - 16g NaCl in 1 Liter Reinstwasser

Dinatriumhydrogenphosphatmonohydrat-Lösung (3,5 Liter) langsam mit Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat-Lösung auffüllen, bis pH 7,4 erreicht wird (-> 0,2mol/l PB (*phosphate buffer*))

- pro Liter Phosphat-Puffer ein Liter Salzlösung dazugeben
(-> 0,1mol/l PBS)

- Paraformaldehyd-Lösung (PFA), 4%ig
 - 2g Paraformaldehyd in 50ml PBS (*phosphate buffered saline*) unter Rühren auf 60°C erhitzen bis Lösung transparent wird
 - gegebenenfalls tropfenweise 10M NaOH zugebenLösung abkühlen lassen und nicht länger als 5 Tage lagern

Hämalaun / Eosin (HE) - Färbung:

- Eosin G – Lösung
 - 0,1% Eosin G in 70% Ethanol lösen
 - 4 Tropfen Eisessig zugebenLösung filtrieren
- Hämalaunlösung nach Mayer
 - wird unverdünnt benutzt

Agaroseeinbettung von Weichgewebe:

- Agaroselösung 7%ig
 - 7g Agarose langsam in 100ml kaltes Wasser einrühren und vorsichtig erhitzen (nicht kochen)
 - Agaroselösung unter Rühren auf etwa 45°C abkühlen lassen
 - Gewebe in vorgewärmte Aluminiumform (42°C) legen, mit Agaroselösung befüllen und bei Raumtemperatur aushärten lassen

Haarzellpräparation:

- PB-Puffer (*phosphate buffer*), pH 7,4
 - 115,7g Na₂HPO₄ x H₂O in 3,5 Liter Reinstwasser (Lösung 1)
 - 27,6g NaH₂PO₄ x H₂O in 1 Liter Reinstwasser (Lösung 2)Lösung 1 (3,5 Liter) langsam mit Lösung 2 auffüllen, bis pH 7,4 erreicht wird (-> 0,2mol/l PB)
- Glutaraldehyd 2%ig
 - 20ml Glutaraldehyd-Stammlösung (25%ig)
 - 230ml 0,1mol/l PB (verdünnte 0,2mol/l PB (*phosphate buffer*), pH 7,4)

Anhang C. Geräte und Software

- Bildverarbeitungskarte: Soft Imaging System GmbH, GrabBit Framegrabber, Münster
- Brutschrank: Heraeus Instruments, B 5060 EK-CO2, Hanau
- Chamber slides: Falcon[®], CultureSlide, Chamber Polystyrene Vessel Tissue Culture Treated Glass Slide
- Cleanbench: Clean Air Technik bv, CA/REV 4, Woerden, Niederlande
- Digitalwaage: Kern, 510-63, Albstadt
- Elektrophorese-Kammer: Kodak, BioMax MP 1015, Kodak GmbH, Stuttgart
- Gefrieröhrchen: Nalge Company, Nalgene[®] Cryoware[™] 1,8ml, Rochester, NY, USA
- Kamera: Soft Imaging System GmbH, CCD-Farbkamera ColorView 12, Münster
- Kritisch-Punkt-Trocknung: Bal-Tec AG, Balzers CPD 030, Liechtenstein
- Laser (CO₂): ESC Sharplan, Sharplan 40 C, Unterhaching
- Laser (Er:YAG): Carl Zeiss AG, mod. OPMI TwinER, Oberkochen
- Laser (Ti:Saphir): Thales Laser, BRIGHT Multi-KiloHertz High Energy Ti-Sapphire Femtosecond System, Orsay Cedex, Frankreich
- Leistungsmeßgerät: Spectra-Physics, Model 407 A, Mountain View, CA, USA
- Microplate-Reader: Thermo Electron GmbH, Multiskan Ascent, Dreieich
- Mikrometerschraube (digital): Preisser Messtechnik, Elektronisches Digital-Mikrometer 0-25mm, Gammertingen
- Mikroskop (Invers-): Olympus, CKX 41, Hamburg
- Mikroskop (Fluoreszenz-): Zeiss, Axioskop, Jena
- Mikroskop (Fluoreszenz-) - Objektiv: Zeiss, Plan-NEOFLUAR 40x, Jena
- Mikroskopleuchte für Fluoreszenz: Zeiss, HBO 50, Jena
und Filtersatz: Anregung 546nm, Barriere 590nm
- Mikrotiterplatte (96-Wells): Falcon, Tissue Culture Plate, 96 wells, Flat Bottom with Low Evaporation Lid, No 353072
- Mikrotom: Thermo Electron GmbH, Shandon Finesse 315, Dreieich

- Oszilloskop: Tektronix, TDS 220, Beaverton, OR, USA
 - Petrischalen: Nunc, Nunclon Surface, 5ml
 - Petrischalen: Falcon[®], Tissue Culture Dish, 100 x 20mm, 15ml
 - Photodetektor: Centronix Electronics, AEPX 65, Taiwan
 - Pulszähler (digital): Trumeter Deutschland, 7110 DIN AS, Steinenbronn
 - Rasterelektronenmikroskop: Philips, SEM 505, Hamburg
 - REM-Tellerchen: Plano, Wetzlar
 - Scanner: Scanlab AG, SCANgine[®] 14 mit Linse (f = 250mm), Puchheim
 - Schüttler: Infors AG, Labotron, Bottmingen, Schweiz
 - Spannungsversorgung für Elektrophorese: Novex, Power Ease[™] 500, San Diego, CA, USA
 - Sputterer / Coater: Quorum Technologies, Polaron E 5400, Newhaven, UK
 - Temperatursensor: Siemens AG, Heißeiter NTC M104-J, München
 - Vibratom: Leica Mikrosysteme, VT 1000 S, Bensheim
 - Wärmeplatte: Harry Gestigkeit GmbH, Präzitherm PZ 28-1, Düsseldorf
 - Zählkammer (Neubauer): Jürgens, Tiefe 0,1mm, Feld 0,04mm², Hannover
-
- Bildaufnahme: Soft Imaging System GmbH, analySIS[®] Pro 3.2, Münster
 - Bildanalyse: Scion Corp., Scion Image for Windows Beta 4.0.2, based on NIH Image, Frederick, MD, USA
 - Bildanalyse-Makro: Helma & Uhl, Scion comet 1.3, Freiburg
 - Grafik: Microsoft Deutschland GmbH, Excel 2000, Unterschleißheim
 - Grafik + Modell: SPSS Inc., SigmaPlot 4.01 for Windows, Chicago, IL, USA
 - Scannersteuerung: SCAPS GmbH, SAM 2D (Version 2.5.14), München
 - Statistik: GraphPad Software Inc., Prism 3.02, San Diego, CA, USA

Danksagung

Für die freundliche Zusammenarbeit und die Finanzierung notwendiger Anschaffungen im Rahmen der Dissertation danke ich Prof. Dr. R. Heermann. Es freut mich sehr, daß er nach langem bürokratischen Kampf letztlich doch noch Gutachter werden konnte.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich bei PD Dr. H. Lubatschowski für die spontane Übernahme der Erstgutachteraufgabe, ebenso wie bei Prof. Dr. H.-A. Kolb für die Übernahme der Zweitgutachtertätigkeit, bedanken.

Weiterhin danke ich meinen Mitstreitern in der AG Laser – Dietrich Hagner für das Mitwirken bei Messungen, die Entwicklung und Konstruktion zahlreicher Komponenten, die das Leben einfacher machten (Abtragstool, diverse Schaltungen, usw.) und die ständige Diskussionsbereitschaft – Janet Remke für das Aufarbeiten von Proben, Verteilen von „Motivase“ und das Korrekturlesen – Wiebke Müller für die Einführung in die Femtosekudentechnologie und die Durchführung der Druckmessungen.

Der Gruppe MED am Laserzentrum Hannover, und besonders Tammo Ripken, danke ich für die Koordination der Strahlzeiten und die Diskussionsbereitschaft bei den ständigen Problemen mit dem Laser.

Ein besonderer Dank für das angenehme Arbeitsklima und die vielen privaten Kontakte außerhalb der Hochschule gilt allen Kolleginnen und Kollegen in den Forschungslaboren der HNO („der dritte Stock“). Außerdem noch danke ich Patrick Wefstaedt für Kritik und Lob an der ersten Fassung dieser Arbeit und Dr. F. Nicolaus Trabandt für die Korrekturen des Abstracts.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die Verständnis und Geduld zeigten, wenn es mal nicht so rund lief und sie sich deswegen bei Besuchen meinen Unmut anhören durften.

Ihnen allen und vielen anderen, die hier nicht namentlich genannt sind, sei an dieser Stelle nochmals herzlich gedankt.

Lebenslauf

Name: Jörg Bornemann
Geburtsdatum: 30.03.1969
Geburtsort: Delmenhorst

Schulischer Werdegang

1975 – 1981 Grundschule und Orientierungsstufe in Delmenhorst
1981 – 1985 Realschule a. d. Holbeinstraße in Delmenhorst
1985 – 1989 Max-Planck-Gymnasium in Delmenhorst

Beruflicher Werdegang

06/1989 – 06/1991 Soldat auf Zeit beim BeobBtl 113
08/1991 – 06/1993 Ausbildung zum Industriekaufmann
06/1993 – 08/1993 Befristete Anstellung als Industriekaufmann
10/1993 – 12/2000 Studium der Biologie an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
02/2000 – 12/2000 Diplomarbeit an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, Institut für Chemie und Biologie des Meeres (ICBM), AG Biochemie/Toxikologie, Prof. Dr. I. Witte:
Kultivierung von Fibroblasten aus den Fischarten *Scardinius erythrophthalmus* (Rotfeder) und *Brachydanio rerio* (Zebrafisch) und Vergleich zytotoxischer und kardiotoxischer Effekte gegenüber Pentachlorphenol (PCP) und γ -Hexachlorcyclohexan (Lindan)
01/2001 – 04/2001 Fortführung der Untersuchungen zu den kardiotoxischen Effekten gegenüber 2,4-Dinitrophenol und Cadmiumchlorid
05/2001 – 07/2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Klinik für HNO-Heilkunde (Prof. Dr. T. Lenarz) der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH), AG Laser, Prof. Dr. R. Heermann
08/2004 – 05/2005 Hospitant in den Forschungsabteilungen der Klinik für HNO-Heilkunde
seit 12/2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Klinik für Urologie (Prof. Dr. G. Jakse) und am Institut für Pathologie (Prof. Dr. R. Knüchel-Clarke) der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen