

# **Dekontaminierende Effekte auf Mikroorganismen bei Laserapplikation unter Berücksichtigung thermisch induzierter Apoptose humaner Zellsysteme**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Philipp Jonas Franken**

aus Waldbröl

2021

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Frentzen
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Helmut Stark

Tag der Mündlichen Prüfung: 15.07.2021

Aus der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. S. Jepsen, M.S.

Meinen Eltern  
und  
Lucy



## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	8
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	10
1.1	Einführung in die Thematik	10
1.2	Keimspektrum der Mundhöhle und Biofilmbildung	11
1.2.1	Besiedlung der Mundhöhle	13
1.2.2	Entstehung einer Plaque	14
1.2.3	Konventionelle Maßnahmen zur Biofilmreduktion	17
1.2.3.1	Mechanische Dekontamination	18
1.2.3.2	Chemische Dekontamination	18
1.2.3.3	Antibiotika	20
1.3	Klinische Laseranwendung mit dem Ziel der Reduktion der mikrobiellen Belastung	21
1.3.1	Photoinduzierte Effekte auf Zellsysteme und Mikroorganismen	22
1.3.1.1	Photochemische Dekontamination	23
1.3.1.2	Photothermische Dekontamination	24
1.3.1.3	Zusammenfassung des bisherigen Kenntnisstandes photothermischer Effekte	27
1.4	Zielsetzung	29
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	30
2.1	Verwendete Modellsysteme	30
2.1.1	Einführung	30
2.1.2	Thermocycler	30
2.1.3	Laser – Modellsystem	31
2.1.3.1	Verwendete Diodenlaser FOX III und IV	31
2.1.3.2	Thermographiekamera	32
2.2	Methoden	33
2.2.1	Kultur der verwendeten Mikroorganismen und Zelllinie	33
2.2.1.1	Anzucht von Mikroorganismen aus Kryokulturen und Erhaltungskulturen	33

2.2.1.2	Messung der optischen Dichte mittels Photometer	35
2.2.1.3	Anzucht von humanen Suspensionszellen (THP-1)	36
2.2.2	Temperaturversuche	36
2.2.2.1	Temperaturbelastung der Mikroorganismen mittels Thermocycler	36
2.2.2.2	Bestimmung der "Colony Forming Units" der eingesetzten Bakterienstämme	37
2.2.2.3	Ermittlung und Einstellung der Zellzahl (THP-1)	39
2.2.2.4	Untersuchung des Wachstumsverhaltens humaner Zellsysteme nach Wärmeeinwirkung	40
2.2.3	Temperaturentwicklung unterschiedlicher Medien (BHI + RPMI) unter Laserbestrahlung	42
2.2.4	Laserbestrahlung der Bakterien- und Zellkulturen	45
2.2.4.1	Laserbestrahlung von Mikroorganismen	45
2.2.4.2	Laserbestrahlung von Zellsystemen	46
2.3	Auswertung	47
2.4	Statistische Auswertung	47
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	49
3.1	Messung der Temperaturentwicklung unterschiedlicher Medien (BHI/RPMI) bei Laserbestrahlung mittels Thermographiekamera	49
3.2	Untersuchung des mikrobiellen Wachstumsverhaltens nach Wärmeeinwirkung und Laserbestrahlung	56
3.2.1	Wachstumsverhalten bei Wärmeeinwirkung	56
3.2.1.1	<i>S. sobrinus</i>	56
3.2.1.2	<i>S. salivarius</i>	60
3.2.1.3	<i>E. faecalis</i>	64
3.2.1.4	Vergleich des Wachstumsverhaltens aller untersuchten Mikroorganismen nach Wärmeeinwirkung	67
3.2.2	Wachstumsverhalten bei Laserbestrahlung	70
3.2.2.1	<i>S. sobrinus</i>	70
3.2.2.2	<i>S. salivarius</i>	73
3.2.2.3	<i>E. faecalis</i>	76

3.2.2.4	Vergleich des Wachstumsverhaltens aller untersuchten Mikroorganismen nach Laserbestrahlung	79
3.2.3	Gegenüberstellung der thermischen Effekte auf Mikroorganismen bei Temperaturbelastung und Laserbestrahlung	81
3.3	Untersuchung des Wachstumsverhaltens humaner Zellsysteme (THP-1) nach Wärmeeinwirkung und Laserbestrahlung	83
3.3.1	Wärmeeinwirkung	83
3.3.2	Laserbestrahlung	84
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>87</b>
4.1	Methodenkritik	87
4.2	Bewertung der Ergebnisse und Literaturvergleich	88
4.3	Ausblick	95
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>97</b>
<b>6.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>99</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>101</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>107</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang</b>	<b>119</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>126</b>

## Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Amp.	Ampicillin
aPDT	antimicrobial photodynamic therapy
BHI	Brain-Heart-Infusion
cfu	colony forming units (Kolonie-bildende Einheiten)
CHX	Chlorhexidin
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
EPS	Extrazelluläre Proteine
Er,Cr:YSGG	Erbium, Chromium:Yttrium-Scandium-Gallium-Granat
Er:YAG	Erbium-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
etc.	et cetera
g	Gramm
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
ICG	Indocyaningrün
kg	Kilogramm
MB	Methylenblau
min	Minute
mL	Milliliter



mm	Millimeter
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer ( $10^{-6}$ m)
n	Fallzahl
NaOCl	Natriumhypochlorid
Nd:YAG	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
NIR	Nah-Infrarot
nm	Nanometer ( $10^{-9}$ m)
OD	optische Dichte
PCT	photochemischer Therapie
PTT	photothermische Therapie
s	Sekunde
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate (Natrium-Dodecylsulfat)
spp.	Spezies
Tab.	Tabelle
TBO	Toluidin blue O
TC	Thermocouple
TK	Thermographiekamera
UA	Unterabschnitt
W	Watt; Maßeinheit für Leistung ( $m^2 \cdot kg \cdot s^{-3}$ )
WHO	Weltgesundheitsorganisation (englisch: World Health Organization)
z.B.	zum Beispiel

# 1. Einleitung

## 1.1 Einführung in die Thematik

Der menschliche Organismus, insbesondere innere Körperoberflächen, wie beispielsweise die Mundhöhle als Teil des Gastrointestinaltraktes, weisen eine hohe Besiedlung mit Mikroorganismen auf. Allein auf den Gastrointestinaltrakt entfallen Mikroorganismen mit einer Biomasse von ca. 1,5 kg (Kaper und Sperandio, 2005). Primär treten die Mikroorganismen jedoch nicht pathogen in Erscheinung, sondern liegen als apathogene oder fakultativ pathogene Erreger in der physiologischen Kolonisationsflora vor. Fakultativ pathogene Erreger wirken pathogen nur bei Vorliegen begünstigender Faktoren (Suerbaum et al., 2012).

Eine Dekontamination von oralen Oberflächen ist zur Behandlung von Infektionserkrankungen essentiell. Laut Deutscher Mundgesundheitsstudie V (DMS V) bilden die Karies und Parodontitis den Hauptanteil der oralen Infektionserkrankungen. Es zeigte sich in den vergangenen 20 Jahren ein positiver Trend durch adäquate, regelmäßige Prophylaxe, sowie eine effiziente Diagnostik und Therapie (Cholmakow-Bodechtel, 2016). Den derzeitigen Goldstandard der Parodontitistherapie stellt z.B. das subgingivale Debridement im Rahmen einer antiinfektiösen Therapie dar (Drisko, 2014), was eine mechanische Dekontamination der infizierten intraoralen Oberflächen fördert. Ebenso wird im Rahmen der Kariestherapie oder der Behandlung endodontischer Erkrankungen auf mechanische oder chemische Dekontaminationstechniken zurückgegriffen. So ist eine endodontische Therapie ohne Verwendung desinfizierender Spüllösungen (z.B. NaOCl) im Sinne einer chemischen Desinfektion weitestgehend ineffektiv (Kandaswamy und Venkateshbabu, 2010). Neben der mechanischen und chemischen Dekontamination stellen photoinduzierte Effekte in Form von Laserapplikation eine weitere Möglichkeit zur Dekontamination von oralen Oberflächen dar (Soukos et al., 2003).

Nach Entwicklung und Einsatz erster Lasersysteme (Rubinlaser) in der Zahnmedizin im Jahre 1964 (Goldman et al., 1964), konnte sich die orale Laseranwendung durch stetig voranschreitende Forschung und Entwicklung in der Zahnheilkunde etablieren. Mittlerweile sind verschiedene Lasertypen in Anwendung, die in ihren jeweiligen

Einsatzgebieten spezifische Eigenschaften aufweisen. Neben dem Diodenlaser werden auch Nd:YAG-, Er:YAG-, Argon-Ionen-, Er,Cr:YSGG- und CO<sub>2</sub>-Laser in der Zahnheilkunde verwendet (Suliman, 2005). Eine Bearbeitung der Zahnhartsubstanz im Sinne einer Kavitätenpräparation ist z.B. durch Erbium-Laser möglich und kann als Alternative zu herkömmlichen mechanischen Präparation gesehen werden (Tao et al., 2017). Im Rahmen einer endodontischen Behandlung kann eine Laseranwendung zur Desinfektion des Wurzelkanalsystems beitragen (Moritz et al., 1997a). Die antibakterielle photodynamische Therapie (aPDT) gilt als ein alternatives dekontaminierendes Behandlungskonzept der Parodontitis (Kikuchi et al., 2015). Neben der Dekontamination von mikrobiell belasteten Oberflächen werden Laser in der Chirurgie auch zum Schneiden von Weichgewebe oder zur Osteotomie verwendet (Frentzen et al., 2003).

Es existieren einige Studien über die dekontaminierenden Eigenschaften der Laserapplikation. Diese sind allerdings ob der verwendeten Parameter und unterschiedlicher in-vitro-Bedingungen nur schwer vergleichbar. Deutlich wird, dass gewisse Parameter die dekontaminierenden Eigenschaften von Laserstrahlung bestimmen (Saydjari et al., 2016). Jedoch gibt es keine Untersuchungen, die unter gleichbleibenden Bedingungen die Effekte bei Temperaturbelastung von Mikroorganismen bei der Bestrahlung mit Diodenlasern (450 – 1000 nm) mit den desinfizierenden Eigenschaften unter Rückbezug auf humane Zellkulturen untersuchen und vergleichen. Dies ist Zielsetzung dieser Studie, in der entsprechende Rahmenbedingungen durch ein eigens entwickeltes Modellsystem geschaffen werden sollten.

## **1.2 Keimspektrum der Mundhöhle und Biofilmbildung**

Die Mundhöhle stellt die Haupteintrittspforte des menschlichen Körpers dar. Durch den Speisebolus bei der Nahrungsaufnahme, den Atemvorgang und die andauernde Speichelproduktion findet eine stetige Kolonisation und Fluktuation von Mikroorganismen auf epithelialen und dentalen Oberflächen statt. Die Mundhöhle bietet folglich ein geeignetes Milieu für das Wachstum von Bakterien, Hefen, Mykoplasmen, Viren,

gelegentlich Protozoen und somit auch für die Entstehung von Infektionserkrankungen (Dewhirst et al., 2010; Wright et al., 2013).

Infektionserkrankungen in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde sind meist bakterieller, viraler oder mykotischer Genese. In den Gebieten der Endodontie, Parodontologie, konservierenden Zahnheilkunde oder Chirurgie zeigen sich bakterielle Infektionen als hauptverantwortlich für die Ätiologie und Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen (Reitemeier et al., 2006). Das Keimspektrum der Mundhöhle setzt sich aus einer Mischflora von gram-positiven und gram-negativen Aerobiern und Anaerobiern zusammen. Die Human Oral Microbiom Database enthält Gensequenzen von über 700 Taxa oraler Bakterien (HOMD), welche physiologisch in der Mundflora vorliegen und im Rahmen von opportunistischen Infektionen pathologisch in Erscheinung treten können (Suerbaum et al., 2012).

Planktonisch vorliegende orale Mikroorganismen organisieren sich als Teil eines komplexen, einer Oberfläche adhärierenden Systems – dem Biofilm (O'Toole et al., 2000). Biofilme sind definiert als eine Bakterienpopulation, die, in einer Matrix eingeschlossen, aneinander und/oder an Oberflächen oder Schnittflächen anheften (Costerton et al., 1995). Die Zusammensetzung des Biofilms (Tab. 1) ist variabel und wird bestimmt durch die im Biofilm organisierten Bakterien und deren physiologischen Status, sowie durch exogene Faktoren, wie der Verfügbarkeit und Zugänglichkeit von Nährstoffen (Sutherland, 2001).

**Tab. 1:** Zusammensetzung der Biofilm – Matrix (Sutherland, 2001).

<b>Komponente</b>	<b>Anteil an der Biofilm - Matrix</b>
Wasser	bis zu 97 %
Mikroorganismen	2 – 5 %
Homo- und Heteropolysaccharide (neutral und polyanionisch)	1 – 2 %
Proteine (extrazellulär und aus Lyse entstanden)	< 1 – 2 %
DNA / RNA (aus Lyse von Zellen)	< 1 – 2 %
Gebundene und freie Ionen	?

Die Organisation von planktonischen Bakterien in einem Biofilm ist vorteilhaft, da so synergetische Mechanismen zwischen den Mikroorganismen stattfinden können (van Steenberghe et al., 1984) und spielt eine essentielle Rolle in deren Überleben (Jakubovics und Kolenbrander, 2010). Änderungen des oralen pH-Wertes durch stetige Nahrungsaufnahme, Veränderungen in der Verfügbarkeit von Nährstoffen und Sauerstoff, sowie antimikrobielle Eigenschaften des Speichels (Abiko und Saitoh, 2007) erschweren das Überleben planktonischer Bakterien in der Mundhöhle. Die Organisation in einem Biofilm bietet dagegen eine erhöhte Retention an exponierten Oberflächen, erleichterten Austausch von Stoffwechselprodukten und erhöhte Nährstoffverfügbarkeit (Wright et al., 2013).

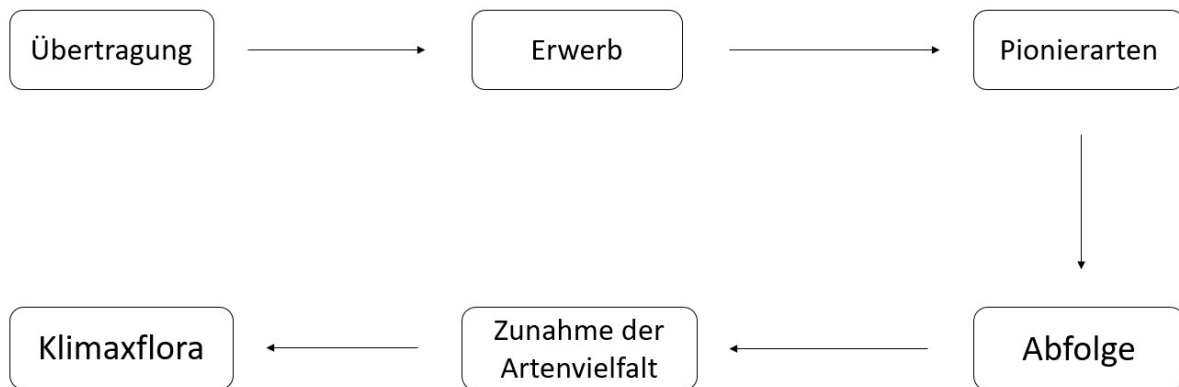
### 1.2.1 Besiedlung der Mundhöhle

Biofilme bilden sich bevorzugt an Orten mit hoher Feuchtigkeitsexposition, z.B. in industriellen Bioreaktoren oder auf Steinen in Fließgewässern. Im menschlichen Körper dagegen finden sich Biofilme beispielsweise im otolaryngischen System, in der Vagina oder im Gastrointestinaltrakt (Huang et al., 2011).

Der Biofilmbildung geht eine Exposition und Kolonisation der Mundhöhle mit Mikroorganismen voraus. Die Mundhöhle ist bei Neugeborenen noch weitestgehend steril. Die Kolonisation mit Mikroorganismen beruht also auf exogene Faktoren. Die Ausbildung einer oralen Residentmikroflora beginnt ab dem Ende der Entbindung (Puerperium). Atmung, Nahrungsaufnahme und der elterliche Kontakt sorgen für eine erste Inokulation der Mundhöhle mit Mikroorganismen (Sampaio-Maia und Monteiro-Silva, 2014). Zu den Pionierkeimen gehören Streptokokken und Staphylokokken, insbesondere *S. mitis*, *S. salivarius* und *S. oralis* (Bagg, 2006). Die IgA<sub>1</sub> – Protease dieser Pionierarten verschafft ihnen einen Vorteil gegenüber anderen Bakterien, da sie dadurch in gewissem Maße die Wirtsabwehr unterlaufen können (Cole et al., 1994).

Durch Veränderungen des lokalen pH-Wertes, Freilegung neuer Rezeptoren und Bildung neuer Nährstoffe (z.B. Lactat) werden günstige Bedingungen für die Besiedlung von nachfolgenden Populationen geschaffen. Schließlich bildet sich die sogenannte Klimaxflora, eine stabile Situation mit einer großen Artenvielfalt. In Abb. 1 wird die Abfolge

der Kolonisation der Mundhöhle mit Mikroorganismen veranschaulicht. Pionierkeime müssen außerdem eine hohe Affinität zu epithelialen Oberflächen aufweisen. Meist handelt es sich hierbei um aerobe und fakultativ anaerobe Bakterien (Marsh und Martin, 2003).



**Abb. 1:** Die ökologischen Stadien bei der Entstehung einer mikrobiellen Gemeinschaft nach Marsh und Martin (2003).

Da die Mundhöhle mit Mikroorganismen besiedelt ist, findet die Organisation in einem Biofilm statt. Die Biofilmbildung wird dadurch begünstigt, dass dentale Oberflächen mit Speichelglykoproteinen beschichtet sind - einem sogenannten Pellicle (0,1 – 0,8 µm dick) (Heidemann, 1997). Das Pellicle bildet die Grundvoraussetzung für die Adhärenz von Mikroorganismen und die Entstehung von Plaque.

### 1.2.2 Entstehung einer Plaque

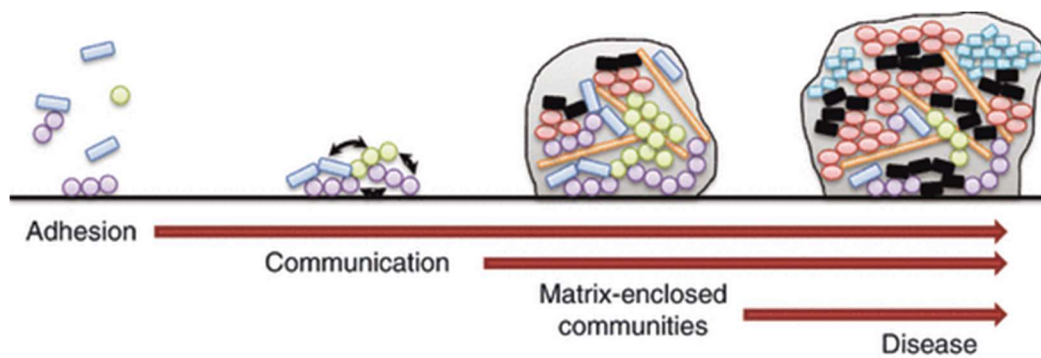
Plaque ist ein strukturierter, zäher, verfilzter Zahnbelag bestehend aus Bakterien, eingebettet in einer Matrix aus bakteriellen Stoffwechselprodukten, Speichelbestandteilen und Speiseresten. Die Plaque ist essentiell in der Pathogenese biofilmassoziiertes Erkrankungen wie der Karies oder der Parodontitis. Karies entwickelt sich durch eine konsekutive Demineralisation der Zahnhartsubstanz durch organische Säuren, welche aus bakterieller Verstoffwechslung von niedermolekularen

Kohlenhydraten entstehen (Hellwig et al., 2013). Die Parodontitis dagegen ist ein multifaktorielles Geschehen und manifestiert sich durch den fortschreitenden Verlust des Zahnhalteapparats. Als opportunistische Erkrankung ist ein multifaktorielles Zusammenspiel potentiell pathogener Keime grundlegend für die Entstehung einer Parodontitis (American Academy of Periodontology, 2000). Diese beiden Krankheitsbilder machen den Großteil aller oralen Erkrankungen aus (Cholmakow-Bodechtel, 2016).

Bestimmte Bakterienspezies initiieren die Ausbildung eines Biofilms, indem direkte Interaktionen mit dem Pellicle auf dentalen Oberflächen stattfinden. Zu den Erstbesiedlern („early colonizer“) zählen hauptsächlich gram-positive, orale Streptokokken (Viridans Streptokokken), aber auch *Actinomyces spp.*, *Granulicatella adiacens*, *Abiotrophia defectiva*, *Gemella spp.* und *Rothia* (Jenkinson, 2011). Sie sind alle ein Teil des natürlichen Mikrobioms (Aas et al., 2005) und weisen geringes pathogenes Potential auf. Jedoch können insbesondere Streptokokken das pathogene Potential des Biofilms verändern (Whitmore und Lamont, 2011).

Mikroorganismen, die kein Attachment zu oralen Oberflächen aufbauen, können nicht bei der Entwicklung einer Residentflora, bzw. eines Biofilms mitwirken und werden durch den Speichelfluss und andere mechanische Scherkräfte abtransportiert (Scannapieco, 1994).

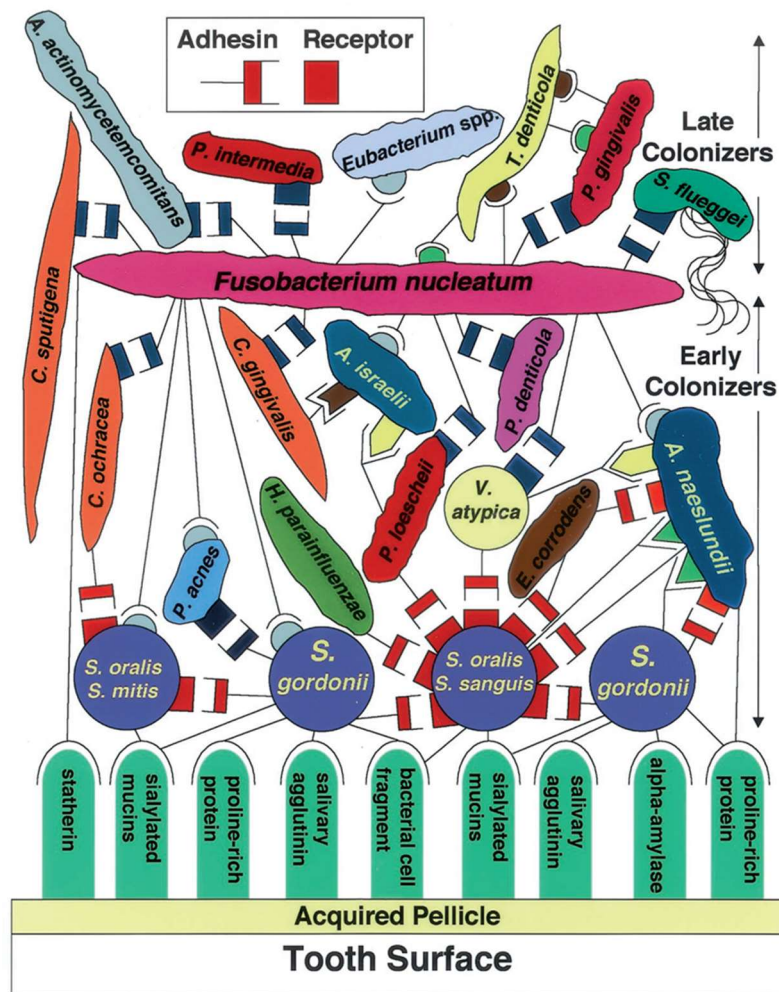
Die adhärierenden Bakterien beginnen mit der Ausbildung extrazellulärer Polysaccharide (EPS). Diese sind für die dreidimensionale Ausbreitung der Plaque zuständig und ermöglichen eine voranschreitende Adhäsion von Bakterien, sowie deren Versorgung mit Nährstoffen. Zell-zu-Zell – Interaktionen, metabolische Kommunikation und synergistische Mechanismen werden durch die EPS gefördert (Abb. 2). Des Weiteren bietet die Plaquematrix den Organismen Schutz vor Austrocknung, oxidierenden oder geladenen Bioziden, einigen Antibiotika, vor ultravioletter Strahlung und der Immunabwehr (Flemming und Wingender, 2010).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Organisation von planktonischen Bakterien in einer Plaquematrix und Steigerung des pathogenen Potentials nach Jakubovics und Kolenbrander (2010).

Abb. 3 zeigt die bakterielle Zusammensetzung einer etablierten Plaque. Die dargestellten Bakterienarten werden in zwei allgemeine Kategorien eingeteilt: Frühe Kolonisatoren oder späte Kolonisatoren. Das Bakterium *F. nucleatum* nimmt an dieser Stelle eine Schlüsselrolle in der Entstehung einer etablierten Plaque ein. Es besitzt die Fähigkeit gleichermaßen mit frühen- sowie späten Kolonisatoren Bindungen einzugehen und stellt somit eine Art Bindeglied der Plaque dar. Allgemein kommt es in einer etablierten Plaque zu einer Zunahme an gram-negativen Kokken, Stäbchen und Filamenten. Zu den späten Kolonisatoren zählen unter anderem *Eubacterium spp.*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Prevotella denticola*. Bis auf *P. gingivalis* und *T. denticola*, welche eng mit der Ausbildung einer Parodontitis assoziiert sind (Socransky und Haffajee, 1994), sind die übrigen Bakterien nicht untereinander verbunden (Kolenbrander et al., 2002; Andersen et al., 1998).





**Abb. 3:** Schematische Darstellung der bakteriellen Zusammensetzung einer etablierten Plaquematrix. Die Speichelrezeptoren (grün) bieten als Teil des acquired pellicles die Grundlage für die Adhäsion von Bakterien. Zunächst adhären Viridans Streptokokken und weitere frühe Kolonisatoren (early colonizers), bis hin zu einer Adhärenz von späten Kolonisatoren (late colonizers) mit *F. nucleatum* als Bindeglied (Kolenbrander et al., 2002).

### 1.2.3 Konventionelle Maßnahmen zur Biofilmreduktion

Auf Grund der engen Kausalität zwischen Biofilmbildung und der Entstehung biofilmassoziiertes Erkrankungen wie zum Beispiel der Karies oder Parodontitis, geht eine erfolgreiche Prophylaxe mit einer Desinfektion oraler Oberflächen einher.

### **1.2.3.1 Mechanische Dekontamination**

Nebst einer stetig stattfindenden natürlichen mechanischen Plaquekontrolle durch Selbstreinigungskräfte der Wangenschleimhäute und der Zunge ist die gängigste Art der mechanischen Dekontamination die Zahnreinigung mit Zahnbürsten. Sie sollte mehrmals am Tag stattfinden, um die Oralpathogene zu reduzieren und somit das Risiko einer oralen Infektionserkrankung zu minimieren (Kumar et al., 2016). Die häusliche Zahnpflege kann mit manuellen oder elektrischen Bürsten, Zahnseide oder Interdentalbürsten durchgeführt werden (Müller, 2012). Die Oralhygiene ist abhängig von der Compliance der Patienten und nicht immer ausreichend gegeben. So zeigt sich laut einer Querschnittsstudie in Dänemark aus dem Jahre 2003, dass nur 68 % der Probanden die Zähne zweimal pro Tag pflegen. Weitaus geringer fiel die Frequenz der Interdentalraumhygiene aus (Christensen et al., 2003). Eine zahnärztliche Unterstützung der mechanischen Plaqueentfernung ist also ratsam. Scaler, Küretten, Schall- und Ultraschallinstrumente können im Rahmen einer professionellen Zahnreinigung die supra- und subgingivale Plaque deutlich reduzieren (Arnold, 2010).

Obwohl auch die ausschließliche mechanische Reinigung durch Bürsten zu einer Reduktion der bakteriellen Belastung führt (Verkaik et al., 2010), erhöht der Einsatz von antimikrobiellen Zusätzen in Zahnpasten die Erfolgchancen der mechanischen Dekontamination (Verkaik et al., 2011).

### **1.2.3.2 Chemische Dekontamination**

Die Studie von Verkaik et al. aus dem Jahre 2011 untersucht die dekontaminierenden Eigenschaften von Zahnpasten mit den antimikrobiellen Zusätzen Chlorhexidin und dem pflanzlichen Chitosan. Deutlich wird hier der Vorteil antimikrobieller Zusätze auf die Zusammensetzung der intraoralen Plaque im Gegensatz zu der alleinigen Benutzung mechanischer Dekontamination ohne Zahnpasta.

Die Dekontamination mit chemischen Zusätzen kommt in Zahnpasten, Mundspüllösungen, Gelen oder Rachensprays zur Anwendung und hat sich zum Goldstandard bei der Prävention und Behandlung von bakteriellen oder mykotischen Infektionen entwickelt (Wolf et al., 2012). Ebenso finden sich chemische Zusätze in Spüllösungen zur

Desinfektion des infizierten Wurzelentins im Rahmen einer endodontischen Behandlung (Koçkapan, 2003).

Häufig verwendete chemische Zusätze in Zahnpasten oder Spüllösungen umfassen die Stoffklassen der Biguanide, Aminoalkohole, Phenoxyphenole, quartäre Ammoniumverbindungen, ätherische Öle, Metallionen oder O<sub>2</sub>-abspaltenden Verbindungen (Müller, 2012). Das Biguanid Chlorhexidin (1,1'-Hexamethylen-bis[5-(p-chlorphenyl)]-biguanid) beispielsweise wirkt bakterizid auf gram-positive Kokken und weist antimykotische Eigenschaften auf (Salim et al., 2013). Es findet Verwendung in der Therapie einer oralen Candidose (Scheibler et al., 2017), begleitend im Rahmen einer Parodontitistherapie oder auch als Desinfektion der Mundhöhle vor operativen Eingriffen (Müller, 2012). Die antibakterielle Wirkungsweise von Chlorhexidin beruht auf einer Veränderung der Permeabilität der negativ geladenen Bakterienzellwand. Das kationische Chlorhexidinmolekül wird von der Bakterienzelloberfläche angezogen und an phosphathaltigen Verbindungen adsorbiert. Dies verändert die Integrität der bakteriellen Zellmembran, was zu einer erhöhten Permeabilität führt, wodurch die Zelle wichtige niedermolekulare Komponenten verliert (Jones, 1997).

Weitere Zusätze wie Fluoride führen zu einer verringerten Bakterienadhärenz am Dentin (Hannig et al., 2013) und über eine Veränderung des intrabakteriellen pH-Wertes zu einer Veränderung der Stoffwechselaktivität der Erreger (Hellwig et al., 2013). Triclosan dagegen interferiert mit dem Arachidonsäuremetabolismus und hat durch eine reduzierte Produktion von proinflammatorischen Mediatoren (PGE<sub>2</sub> und Leukotrien B<sub>4</sub>) eine entzündungshemmende Wirkung (Gaffar et al., 1995). Das Aktivsauerstoff-abspaltende Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) wird als Antiseptikum in der adjuvanten Parodontitistherapie, sowie bei der Spülung von Abszessen verwendet (Marshall et al., 1995). Bei der chemo-mechanischen Reinigung eines Wurzelkanals ist Natriumhypochlorid (NaOCl) durch die bakterizide Wirkung auf gram-negative Erreger und die Fähigkeit der Lyse nekrotischen Gewebes der Goldstandard im Rahmen einer endodontischen Behandlung.

Die bereits genannten Methoden zur bakteriellen Dekontamination gelten in der Zahnmedizin als etabliert. Obwohl bei einer antibakteriellen Therapie in der modernen Medizin der Einsatz von Antibiotika ein probates Mittel darstellt, ist eine antibiotische Therapie bei der Behandlung von oralen Infektionserkrankungen nicht unproblematisch.

### 1.2.3.3 Antibiotika

Die Antibiotikaaanwendung hat sich seit der Entdeckung von Penicillin durch Fleming im Jahre 1928 in der modernen Medizin nicht nur etabliert, sondern inflationär verbreitet. Laut einer Studie von Kern et al. ist die Zahl der in deutschen Akutkrankenhäusern verabreichten Tagesdosen pro 100 Pflage tage in den letzten 10 Jahren um 15-30 % angestiegen (Kern et al., 2015). Die Hauptproblematik an dieser Entwicklung ist die Ausbildung von Resistenzen der Mikroorganismen gegen ursprünglich wirksame Medikamente (Michael et al., 2014). Der steigende Gebrauch von Antibiotika ist eine der treibenden Faktoren dieser Resistenzentwicklung (zur Wiesch et al., 2011). Es sollte darauf geachtet werden, über eine möglichst kurze Zeitspanne hochdosierte Antibiotika zu verabreichen und eine Kombinationstherapie anzustreben, um das Risiko einer Resistenzentwicklung zu minimieren (Read et al., 2011).

Im Rahmen der Antibiotikatherapie bei parodontalen Erkrankungen ergibt sich zusätzlich das Problem der eingeschränkten Bioverfügbarkeit im Gingivaexsudat und die gegenüber planktonischen Kulturen 100- bis 1000-fach erhöhte minimale Biofilm-Eradikationskonzentration (Müller, 2012). Die inhärente Matrix des Biofilms, die extrazelluläre polymere Substanzen und das Vorhandensein von persistenten Zellen, die mit niedrigen Stoffwechselraten überleben, tragen zu dem weitverbreiteten Phänomen der reduzierten Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Mitteln bei (Hoyle und Costerton, 1991).

Neben einer Resistenzentwicklung schränken weitere Nebenwirkungen die Indikationsstellung einer Antibiotikagabe ein. So kann es im Rahmen einer Behandlung mit Clindamycin, Cephalosporin, Ampicillin und anderen  $\beta$ -lactam Antibiotika, sowie mit Fluorchinolonen zu einer Ausbildung einer pseudomembranösen Enterokolitis kommen. Diese wird ausgelöst durch ein überproportional starkes Wachstum des Bakteriums *Clostridium difficile*, im Gesunden unterdrückt durch die physiologische Darmflora (Tsuji und Kaneko, 2015). Allergien gegen Chemotherapeutika, sowie kontraindizierte Substanzklassen bei Schwangerschaft und Kindern, sowie Leber- und Niereninsuffizienz schränken die therapeutische Antibiotikagabe weiter ein (Frank et al., 2011).

Zusammenfassend sollte in der Zahnmedizin die Gabe von Antibiotika nur unter strenger Indikationsstellung erfolgen (Epstein et al., 2000). Während eines blutigen Eingriffs sind

Antibiotikagaben im Rahmen einer Endokarditisprophylaxe, bei immunsupprimierten Patienten oder Patienten mit schweren systemischen Erkrankungen, bzw. schnell voranschreitenden Infektionen indiziert (Oberoi et al., 2015). In der Parodontologie sollte eine systemische Antibiotikagabe ausschließlich auf akute Infektionen beschränkt werden, in denen ein Debridement bzw. eine Drainage unmöglich erscheinen (Addy und Martin, 2003).

Somit ist es erstrebenswert, neuartige Methoden zur Dekontamination zu entwickeln. In diesem Kontext bieten photonische Technologien eine innovative Möglichkeit der bakteriellen Dekontamination und sollen im Folgenden näher erläutert werden.

### **1.3 Klinische Laseranwendung mit dem Ziel der Reduktion der mikrobiellen Belastung**

Die Verwendung photonischer Technologien zur Bestrahlung von biologischem Gewebe hat sich seit der Entwicklung erster Lasersysteme in der Zahnheilkunde in den 1960er Jahren etabliert (Goldman et al., 1964a). Mittlerweile können Lasersysteme, wie schon erläutert, in vielen Bereichen der modernen Zahnmedizin zum Einsatz kommen.

Durch Laserbestrahlung lässt sich in belastetem Gewebe eine „photonische Antibiose“ erzielen. Die voranschreitende Resistenzentwicklung gegen Antibiotika, die komplexe Anatomie des Zahnhalteapparats und Endodonts und die damit verbundenen Komplikationen bei mechanischer und chemischer Dekontamination haben Lasersysteme in den Fokus moderner Methoden der Dekontamination gerückt. In Abhängigkeit verschiedener Laserparameter, wie der Wellenlänge, der applizierten Energie- und Leistungsdichte, sowie Betriebsmodus und Handhabung des Applikators (Kontakt / non-Kontakt) können unterschiedliche Interaktionsmechanismen mit dem bestrahlten Gewebe beobachtet werden (Meister, 2011; Niemz, 2019) (Tab. 2).

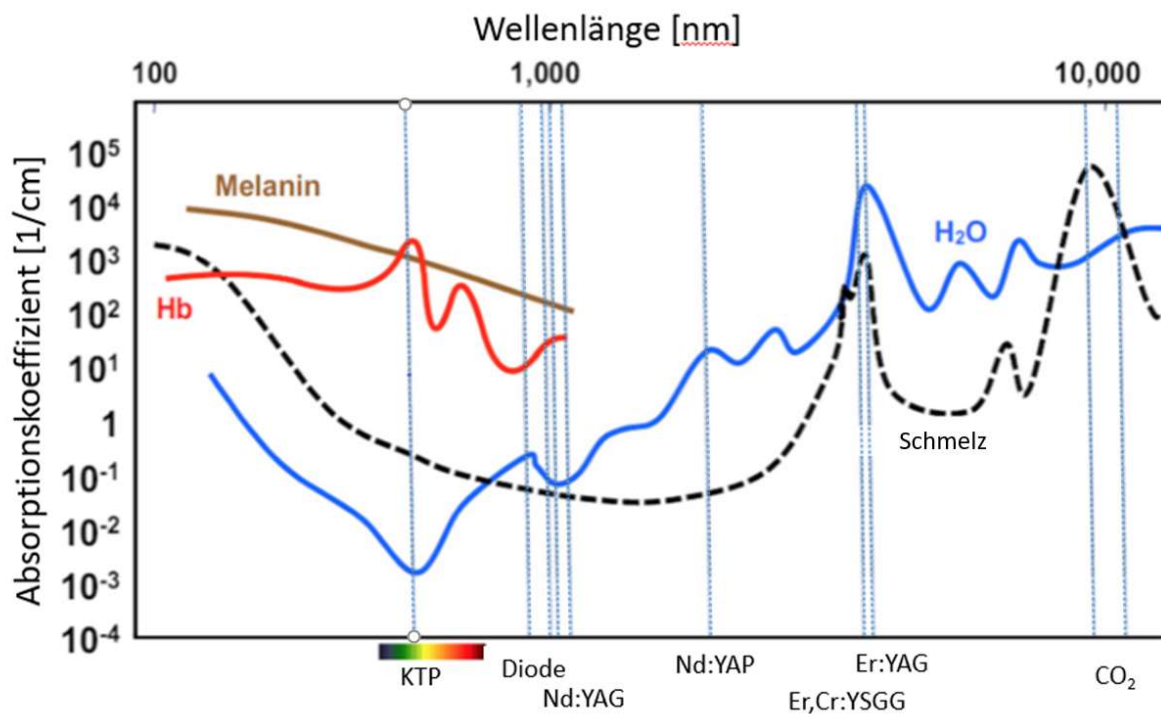
**Tab. 2:** Die bei Laserbestrahlung von biologischem Gewebe in Abhängigkeit von eingestrahelter Energiedichte und Einwirkzeit grundlegend stattfindenden Prozesse und deren Unterteilungen nach (Meister et al., 2004).

<b>Photochemische Effekte</b>	<b>Photothermische Effekte</b>	<b>Nichtlineare Prozesse</b>
Biostimulation	Koagulation	Photoablation
Photodynamische Therapie (PDT)	Vaporisation	Photodisruption

### 1.3.1 Photoinduzierte Effekte auf Zellsysteme und Mikroorganismen

Allgemein lässt sich die Photodynamik definieren als eine durch Photonen und Chromophoren (griech.: Farbträger) hervorgerufene Interaktion, welche durch die Anpassung beider Größen (Wellenlänge und Absorption) optimiert werden können (Meister et al., 2014). Das Ausmaß der Absorption wird durch die im Gewebe oder auf Mikroorganismen vorliegenden Chromophore bestimmt. Diese lassen sich in natürlich vorkommende und künstliche Chromophore unterteilen.

Zu den natürlich vorkommenden Chromophoren zählen beispielsweise das Melanin der Melanozyten, das bedeutendste epidermale Chromophor, oder auch das Hämoglobin der Erythrozyten, Hauptabsorber bei der Koagulation von Blut (van den Berg und Cabri, 2003). Erwähnt seien auch Chromophore in Form von Pigmenten in der Membran von Bakterienzellen (rot, braun, schwarz). Diese sind im Rahmen einer antimikrobiellen Therapie von Bedeutung. Abhängig vom jeweiligen Absorptionsspektrum der natürlichen Farbstoffe können auf die bestrahlten Zellsysteme photoinduzierte Effekte wirken. In Abb. 4 sind Absorptionsspektren natürlicher Chromophore (Melanin, Hämoglobin, H<sub>2</sub>O und Zahnschmelz) dargestellt (Niemz, 2019).



**Abb. 4:** Graphische Darstellung der Absorption [1/cm] in Abhängigkeit von der bestrahlten Wellenlänge [nm] natürlich vorkommender Chromophore (Melanin, Hämoglobin, H<sub>2</sub>O, Zahnschmelz) (Niemz, 2019).

Jede Wellenlänge interagiert mit den entsprechenden Chromophoren innerhalb des Zielgewebes. Die Wirkung eines Lasersystems definierter Wellenlänge auf das zu bearbeitende Gewebe ist im Vorfeld kalkulierbar. Den angewandten Wellenlängen können so spezifischen Indikationen zugeordnet werden.

### 1.3.1.1 Photochemische Dekontamination

Sind die antimikrobiellen Effekte nicht direkte Folge photodynamischer Wirkungen auf das bestrahlte Gewebe, sondern indirekt vermittelt, so geschieht dies durch die Verwendung sogenannter Photosensitizer, bzw. künstlicher Chromophore (Nagahara et al., 2013). Im Rahmen der optischen Dekontamination, genannt antimikrobielle photodynamische Therapie (aPDT), werden die künstlichen Chromophore auf die zu bestrahlenden Strukturen appliziert. Entsprechend der Indikationsstellung findet die aPDT Anwendung in kariösen Defekten, parodontalen Läsionen oder auch im infizierten Wurzelkanal. Es

finden, je nach verwendetem Photosensitizer, photochemische- (PCT) und photothermische Effekte (PTT) statt (Yaseen et al., 2005). Die bei der photochemischen Therapie angewandten Photosensitizer wirken photooxidativ. Aktuell kommerziell erhältlich sind Photosensitizer auf der Basis von Methyleneblau (MB), Toluidinblau-O (TBO) und Methyleneblauderivate (Meister et al., 2014). Über Licht-induzierte Aktivierung kommt es zu chemischen Reaktionen durch Anhebung von Elektronen auf ein höheres Energieniveau. Dies kann eine Zerstörung der Bakterienzellen bewirken. Folgende zwei Reaktionstypen laufen, in Abhängigkeit zum verwendeten Photosensitizer und der Sauerstoffkonzentration im Gewebe, simultan ab (Henderson und Dougherty, 1992): Die Typ-I-Reaktion zeichnet sich durch einen Elektronentransfer und die Bildung von Radikalen, welche weiterreagieren können, aus. Bei der Typ-II-Reaktion findet keine Radikalbildung statt, sondern lediglich ein Energietransfer auf im Gewebe vorhandenes O<sub>2</sub>. Dies führt zur Bildung von reaktivem Singulett-Sauerstoff (Foote, 1991). Eine Schädigung der Gewebsstrukturen bleibt aus, da der Sensitizer selektiv auf Mikroorganismen bindet (Maisch, 2007).

#### **1.3.1.2 Photothermische Dekontamination**

Dem gegenüber stehen photothermisch-wirkende Photosensitizer. Hierzu zählt z.B. das Indocyaningrün (ICG). Obwohl dessen genauer Wirkmechanismus aktuell noch kontrovers diskutiert wird, gilt eine photothermische Wirkung als gesichert (Engel et al., 2008; Beytollahi et al., 2017). Die Entstehung von reaktivem Singulett-Sauerstoff als antimikrobiell wirksames Produkt bei der Verwendung von ICG gilt als weiterer dekontaminierender Faktor. In einer Studie von Abels et al. werden bei Laserintensitäten von 0,1 W/cm<sup>2</sup> photothermische Effekte ausgeschlossen. Die stattfindende Dekontamination wäre somit der Ausbildung von Singulett-Sauerstoff im Rahmen von photooxidativen Prozessen zuzuschreiben (Abels et al., 2000).

Abschließend erwähnt sei Curcumin als neuartiger photothermisch-wirkender Photosensitizer. Der natürlich vorkommende Farbstoff wirkt antimikrobiell und antiinflammatorisch. Des Weiteren verspricht er eine photothermische Dekontamination ohne gewebstoxische Eigenschaften aufzuweisen und ist Gegenstand aktueller

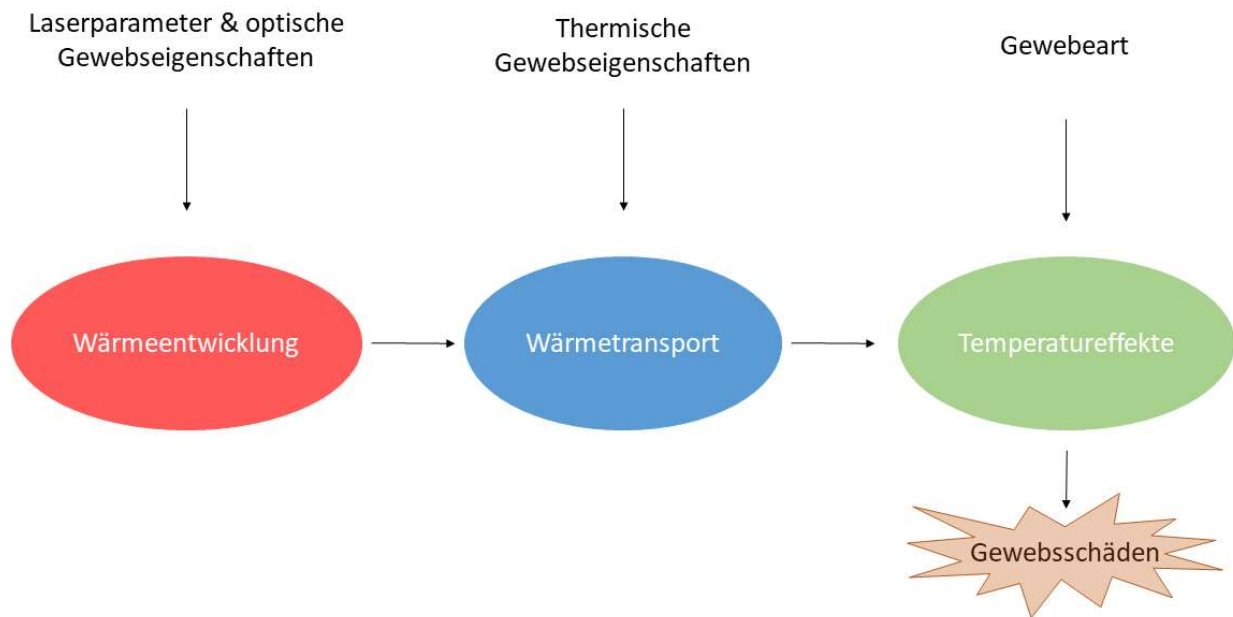


Forschungen (Ivanaga et al., 2019; Pourhajibagher et al., 2018). In einer Studie von Neelakantan et al. konnte der phototoxische Effekt im Rahmen einer endodontischen Behandlung in Kombination mit Blaulichtbestrahlung (380–515 nm) gezeigt werden. Es kam zu einer Reduktion von *E. faecalis* von bis zu 97,3 % (Neelakantan et al., 2015).

Allgemein beruht die thermische Dekontamination auf einer Anregung von Elektronen durch das Laserlicht. Die dabei entstehende kinetische Energie führt in Form von Hitze zur Denaturierung bakterieller Proteine (Hopp und Biffar, 2013). Künstliche Chromophore können die optischen Gewebeeigenschaften modifizieren und auch photochemische Effekte induzieren, so wurde in einer Studie von Moritz et al. eine bis zu 99,9 %ige Bakterienreduktion in einem mit *E. coli* und *E. faecalis* beimpften Wurzelkanal bei Bestrahlung mit einem 810 nm-Diodenlaser erreicht (Moritz et al., 1997b). Auch konnte in parodontalen Taschen bei Bestrahlung mit einem Diodenlaser ohne zugesetzte Photosensitizer eine deutlich bessere Dekontamination im Vergleich zum ausschließlichen subgingivalen root planning (SRP) erzielt werden (Moritz et al., 1998). Photothermische und antimikrobielle Effekte als Konsequenz entstehen somit unabhängig von zuvor zugeführten künstlichen Chromophoren. Optische Dekontamination findet also auch auf Basis von natürlich vorhandenen Chromophoren statt. In wie weit allein thermische Effekte die Dekontamination bestimmen, gilt es weiter zu untersuchen.

Abhängig von den optischen und thermischen Gewebeeigenschaften können bei der Bestrahlung mit Laserlicht Kollateralschäden im umgebenden Gewebe entstehen. Dabei ist es bedeutsam, dass nur Wellenlängen eingesetzt werden, die das Hartgewebe nicht zerstören, gleichzeitig aber eine positive Wirkung auf das in der Tasche vorhandene Keimspektrum haben (Krause und Frentzen, 2007).

Abb. 5 veranschaulicht die Laser-Gewebe-Interaktionen in einer Grafik. Die Wärmeentwicklung wird durch Laserparameter und optische Gewebeeigenschaften bestimmt – insbesondere den jeweiligen Absorptionskoeffizienten, welche in Abhängigkeit zur Wellenlänge stehen. Der Wärmetransport ist durch die jeweiligen thermischen Eigenschaften des Gewebes, wie z.B. Wärmeleit- oder Wärmespeicherfähigkeit charakterisiert. Die Temperatureffekte sind das Resultat aus den beschriebenen Faktoren. Die Ausprägung der Gewebsschäden ist abhängig von der Gewebeart, der jeweilig erzielten Temperatur im Gewebe, sowie der Applikationsdauer (Niemz, 2019).



**Abb. 5:** Grafik der Laser-Gewebe-Interaktionen nach Niemz (2019).

In Abhängigkeit der jeweilig eingestellten Laserparameter, den optischen und thermischen Gewebeeigenschaften, sowie der bestrahlten Gewebeart kann es zu einer Schädigung der bestrahlten Strukturen durch die jeweilig bei Laserbestrahlung entstehende Temperatur kommen (Tab. 3). Die räumliche Ausdehnung der Schädigung ist abhängig von den gewählten Laserparametern, sowie von den optischen und thermischen Gewebeeigenschaften.

**Tab. 3:** Laserwirkung und Gewebeveränderungen in Abhängigkeit von der Temperatur nach (Koort, 1994).

Temperatur	Auswirkung
37 °C	keine irreversiblen Gewebeschäden
40-45 °C	Enzyminduktion, Ödembildung, Membranauflockerung, Zelltod (zeitabhängig)
60 °C	Proteindenaturierung, Koagulation, Nekrosen
80 °C	Kollagen-denaturierung, Membrandefekte
100 °C	Trocknung
>150 °C	Karbonisierung
>300 °C	Verdampfung, Vergasung

### 1.3.1.3 Zusammenfassung des bisherigen Kenntnisstandes photothermischer Effekte

Laserlicht weist nicht nur dekontaminierende Effekte auf, sondern fördert durch Mechanismen, die der sogenannten Biostimulation zugeschrieben werden, die Wundheilung (Adamskaya et al., 2011). Im Rahmen der blutarmen chirurgischen Therapie erweist sich dies als vorteilhaft. Sie basiert auf einer Koagulation von Gefäßen durch Laseranwendung. Die photothermische Interaktion beruht auf den Absorptionseigenschaften des im Gewebe enthaltenen Hämoglobins (Moritz und Blum, 2006).

In wie weit durch photothermische Interaktion dekontaminierende Effekte und dadurch auch eine verbesserte Wundheilung hervorgerufen werden, ist Gegenstand aktueller Studien. Diverse Untersuchungen mit animalischen und humanen Zellen lassen auf vielversprechende antimikrobielle Effekte blauen Lichtes bei Bestrahlung von gram-positiven und gram-negativen Bakterien schließen. Neben einer bakteriziden Wirkung, welche auf intrinsische Faktoren zurückzuführen ist, besteht auch die Hypothese, dass komplexe biomodulierende und stimulierende Effekte auf Mikroorganismen ausgeübt werden (Bumah et al., 2015; Wang et al., 2017).

Insbesondere blaues Licht im Wellenlängenbereich zwischen 400 und 470 nm scheint auch ohne den Zusatz künstlicher Chromophore in Form von Photosensitizern einen antimikrobiellen Effekt aufzuweisen. So untersuchte Halstead et al. (2016) antimikrobielle Effekte von Blaulicht mit einer Wellenlänge von 400 nm auf ein Panel mit 34 Bakterienisolaten. Die gram-positiven und gram-negativen Bakterien lagen planktonisch und in einem Biofilm organisiert vor. Gram-negative Arten erschienen anfälliger für blaues Licht. Nach einer Exposition von  $216 \text{ J/cm}^2$  bei 400 nm wurde je nach Bakterienstamm eine Reduktion der Lebensfähigkeit von Bakterien in Biofilmen von 34,6 - 96,4 % beobachtet. Biofilme, die von gram-negativen Arten gebildet wurden, waren anfälliger für Blaulicht-Inaktivierung als solche, die von gram-positiven Arten gebildet wurden (Halstead et al., 2016).

Kim et al. verglichen die antimikrobielle Wirkung einer LED-Bestrahlung mit den Wellenlängen 425 nm (blau), 525 nm (grün) und 625 nm (rot) (Kim et al., 2013). Die untersuchten Bakterien waren *P. gingivalis*, *S. aureus* und *E. coli*. *P. gingivalis* und *E. coli* wurden bei 425 nm vollständig eliminiert und das Wachstum von *S. aureus* wurde bei

525 nm gehemmt. Eine Bestrahlung mit 625 nm hatte keine antimikrobielle Wirkung auf die drei Bakterienarten.

Auch Fontana et al. untersuchten die Wirkung von blauem Licht (455 nm) auf das parodontale Biofilmwachstum in vitro (Fontana et al., 2015). Biofilme wurden in Well-Mikrotiterplatten generiert und dann für 4 Minuten unmittelbar nach der Bakterienimpfung, sowie 1, 2 und 3 Tage nach der Impfung mit 50 mW/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Nach der Blaulicht-Exposition wurde der mittlere Überlebensanteil der Bakterien in Biofilmen um bis zu 48,2% reduziert. In einer ähnlichen Studie beobachteten Song et al. eine Abnahme der cfu von *P. gingivalis* in Biofilmen mit zunehmender Blaulicht-Exposition. Populationen von *A. actinomycetemcomitans* und *F. nucleatum* blieben unbeeinträchtigt (Song et al., 2013).

Auch die Anwendung von Nahinfrarotstrahlung im Wellenlängenbereich von 800 – 850 nm zeigt antimikrobielle Effekte. In zwei Pilotstudien von Moritz et al. konnten dekontaminierende Effekte durch die Bestrahlung mit Diodenlasern der Wellenlänge 810 nm im Rahmen einer endodontischen Behandlung und einer antiinfektiösen Therapie des Parodonts nachgewiesen werden (Moritz et al., 1997b; Moritz et al., 1998).

Fontana et al. berichtet von einer erheblichen mikrobiellen Reduktion (*Prevotella spp.*, *Pseudomonas spp.* und *Fusobacterium spp.*) in parodontalen Taschen von Ratten. Diese wurden für 9 Sekunden mit einem 810 nm - Diodenlaser im Leistungsbereich von 0,2 - 1,2 W bestrahlt (Fontana et al., 2004a).

Eine Studie von Song et al. verglich antimikrobielle Effekte eines 810 nm – Diodenlasers mit der Applikation des Antibiotikums Minocyclin. Es zeigt sich eine geringer ausfallende Reduktion von organisierten Bakterien nach Bestrahlung mit 0,8 W für 30 Sekunden als bei Antibiotikaanwendung (Song et al., 2014).

Die antimikrobielle Effektivität einer Bestrahlung mit Diodenlasern im Nahinfrarotbereich (800 - 850 nm) bleibt also kontrovers diskutiert und ist Gegenstand aktueller Forschungen.

Der genaue antimikrobielle Wirkungsmechanismus bei der Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge ist noch nicht vollständig verstanden. Eine gängige Hypothese ist, dass durch die Bestrahlung natürlich vorkommende endogene photosensibilisierende Chromophore (eisenfreie Porphyrine oder/und Flavine) in mikrobiellen Zellen angeregt

werden und es anschließend zur Produktion von zytotoxischem Singulett-Sauerstoff kommt (Dai et al., 2012). In Abhängigkeit vom Alter der Bakteriensuspension und damit einhergehender Steigerung der optischen Dichte ergab sich in der Studie eine positive Korrelation zwischen Phototoxizität und Porphyrin-Anteil (Hamblin et al., 2005).

In diversen Studien fand neben der Untersuchung phototoxischer Prozesse auf bestimmte Mikroorganismen eine Fluoreszenzspektroskopie oder HPLC-Analyse statt. Die Ergebnisse deuteten auf das Vorhandensein von endogenen Porphyrinen und/oder Flavinen in mikrobiellen Zellen hin (Fyrestam et al., 2015; Biener et al., 2017; Dai et al., 2013). Sie lieferten ebenfalls Nachweise, dass die Zytotoxizität von blauem Licht gegenüber Mikroorganismen durch die Produktion von reaktiven Singulett-Sauerstoff vermittelt wird (Cieplik et al., 2014; Ramakrishnan et al., 2016).

#### **1.4 Zielsetzung**

Vor dem Hintergrund der progredienten Resistenzentwicklung gegen Antibiotika und der komplexen Anatomie oraler Strukturen, durch die konventionelle Desinfektionsmaßnahmen an ihre Grenzen stoßen, ist die optische Dekontamination mit Laserlicht von steigendem wissenschaftlichem und klinischem Interesse.

Gegenstand dieser Arbeit sollte sein, unter identischen Bedingungen zu untersuchen, wie sich humane Zellsysteme (THP-1) im Vergleich zu den Mikroorganismen *Streptokokkus salivarius*, *Streptokokkus sobrinus* und *Enterokokkus faecalis* in einem eigens hierfür entwickelten Modellsystem nach kurzzeitiger thermischer Belastung bzw. Laserapplikation verhalten. Hierbei wird von Unterschieden in der Widerstandsfähigkeit von mikrobiellen Systemen und Zellsystemen ausgegangen. Es wird vermutet, dass die orale pathogene Mikroflora empfindlicher auf Wärme bzw. Laserstrahlungseffekte reagiert als die Zellsysteme. Darüber hinaus sollte die antimikrobielle Potenz zweier Applikationssysteme mit unterschiedlichen optischen Eigenschaften unter Verwendung eines Blaulicht-Lasers zu untersuchen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Verwendete Modellsysteme**

#### **2.1.1 Einführung**

Die verwendeten Modellsysteme sollen den Einfluss thermischer Effekte auf Mikroorganismen und Zellkulturen in vitro untersuchen und vergleichen, ob eine Korrelation zu den thermischen Effekten unter Laserbestrahlung besteht. Ein standardisierter Ablauf im Sinne einer thermischen Belastung, bzw. Laserbestrahlung unter definierten Umständen soll durch die Modellsysteme realisiert werden.

#### **2.1.2 Thermocycler**

Als Modellsystem für kurzzeitige Temperatureffekte wurde ein Thermocycler-System (TGradient) (Abb. 6) verwendet. Voraussetzung für eine definierte Erwärmung entsprechender Bakterien- und Zellsuspensionen ist ein schnelles Erreichen der Zieltemperatur über einen festgelegten Zeitraum. So kann eine valide Aussage über das Verhalten von Mikroorganismen und Zellsystemen bei unterschiedlichen Temperaturbelastungen getroffen werden. Der Thermocycler TGradient (Biometra GmbH, Göttingen) stellt ein Modellsystem dar, das es ermöglicht, eine Temperatursteigerung von 4°C/Sekunde und eine maximale Abkühlgeschwindigkeit von 3°C/Sekunde (Biometra GmbH, 2009) zu erreichen. Somit kann, ausgehend von einer Raumtemperatur von annähernd 21°C, eine möglichst schnelle und lineare Temperaturerhöhung auf einen vorher festgelegten Sollwert erreicht werden. Um die jeweilige Solltemperatur in kurzer Zeit zu erreichen und den für Temperaturbelastungen benötigten Energieeintrag gering zu halten, wurden kleine Probenvolumina angestrebt. Das Verfahren sollte automatisiert ablaufen, damit eine entsprechende Probenzahl untersucht werden konnten.



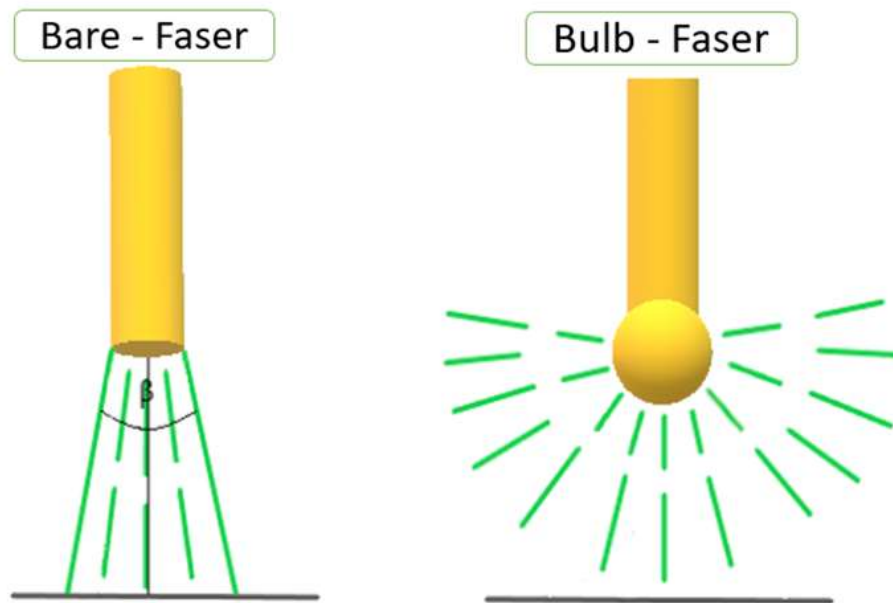
**Abb. 6:** Thermocycler (TGradient) für die standardisierte Wärmebelastung von Mikroorganismen und Zellen.

### 2.1.3 Laser – Modellsystem

#### 2.1.3.1 Verwendete Diodenlaser FOX III und IV

Die Mikroorganismen und Zellsysteme wurden im hier angewandten Modellsystem mit zwei verschiedenen Diodenlasern der Firma A.R.C. Laser (Nürnberg) unter identischen Bedingungen bestrahlt. Die Wellenlänge von 445 nm konnte durch das Modell FOX IV und 810 nm durch FOX III generiert werden.

Zwei verschiedene Laserfasern, Bare-Faser bzw. Bulb-Faser, wurden für die Versuche mit dem Blaulichtlaser eingesetzt, während der Nahinfrarotlaser nur mit Bare-Faser betrieben werden konnte. Die Durchmesser der verwendeten Laserfasern betragen 320  $\mu\text{m}$  (Bare) und 300  $\mu\text{m}$  (Bulb). Die Bare-Faser besitzt ein gerades, flaches Faserende, die Bulb-Faser weist an ihrem Faserende eine Kugel auf. Die Bare-Faser strahlt in einem entsprechenden Abstrahlwinkel ( $\text{NA}=0,22$ ), was einem Öffnungswinkel von  $25^\circ$  entspricht, wohingegen die Bulb-Faser in einem breiteren Streuungsfeld (Abstrahlwinkel =  $360^\circ$ ) in den gesamten Raum strahlt (Abb. 7).



**Abb. 7:** Schematische Darstellung des Strahlenverlaufs bei den verwendeten Laserfasern (Bulb / Bare), mit den unterschiedlichen Abstrahlverhalten.

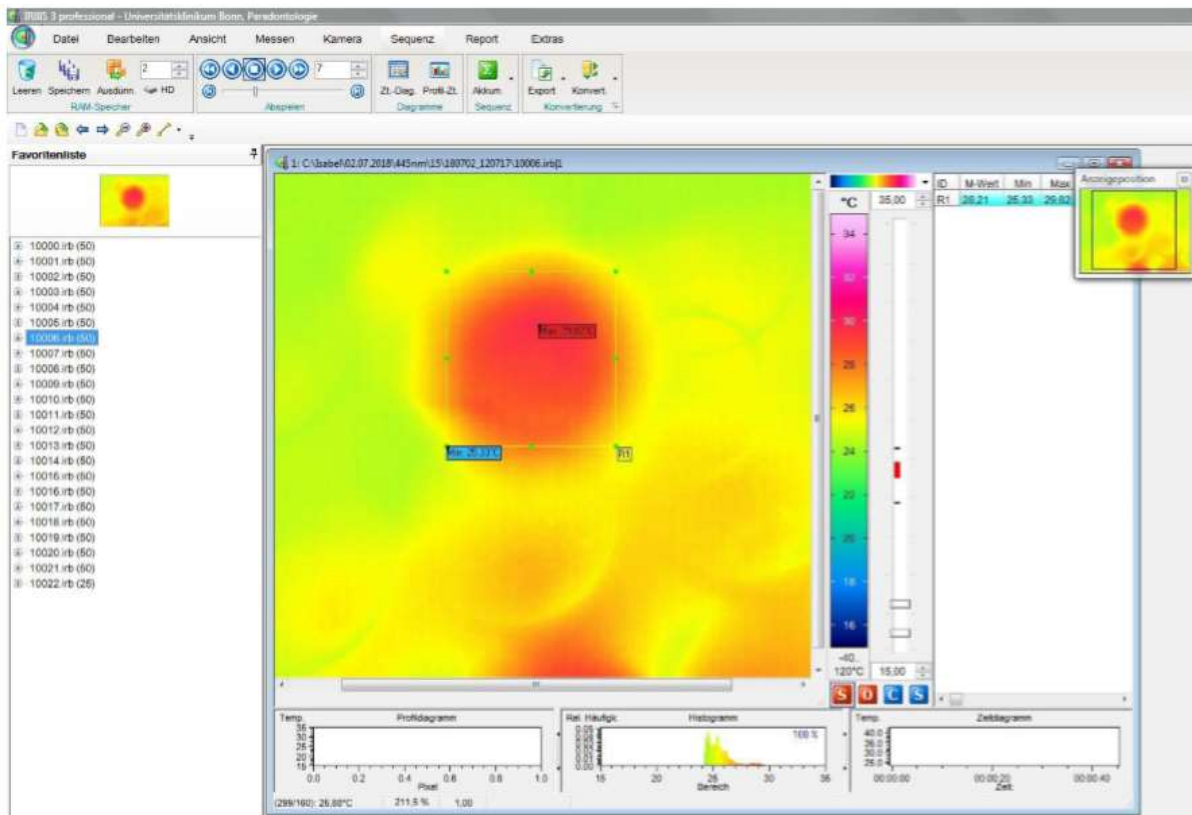
Die Kalibrierung der Laserleistung der Bare-Faser fand durch ein Laserleistungs- und Energiemessgerät (LabMax-Top + dazugehörigem Leistungsmesskopf PM10) statt. Die verwendete Laserfaser wurde vor jeder Bestrahlung auf den Messsensor gehalten und die einstellbare Leistung am Laser so verändert, dass die durch das Laserleistungsmessgerät gemessene Leistung der Sollleistung entsprach. Eine Kalibrierung der Bulb-Faser war durch den radialen Abstrahlwinkel nicht möglich. Somit wurden die bei Kalibrierung der Bare-Faser verwendeten Leistungseinstellungen verwendet.

### 2.1.3.2 Thermographiekamera

Der Einsatz einer Thermographiekamera (InfraTec GmbH Infrarotsensorik und Messtechnik, Dresden) ermöglicht die Detektion oberflächlicher Temperaturveränderungen in einem Flüssigkeitsmedium. Die Auswertung der Messungen erfolgt durch die Software „IRBIS® 3 Analyse-Software“ (Abb. 8). Die Validität des Modellsystems wurde im Rahmen der Masterarbeit „Dekontamination von oralen Oberflächen durch photonische Technologien“ (Schmidt, 2018) verifiziert, indem Messungen unter gleichen



Bedingungen mit einer Thermocouple vorgenommen und anschließend mit den Daten der Thermographiekamera verglichen wurden.



**Abb. 8:** Exemplarische Darstellung einer Aufnahme mit Thermographiekamera bei Laserbestrahlung von BHI-Medium für 20 s (445 nm; 2,0 W). Das markierte Rechteck gibt den Temperaturanalysebereich an, während die kreisrunde rote Fläche das erhitze PCR-Tube darstellt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultur der verwendeten Mikroorganismen und Zelllinie

#### 2.2.1.1 Anzucht von Mikroorganismen aus Kryokulturen und Erhaltungskulturen

Die Versuchsreihen der untersuchten Bakterienstämme setzen sich aus den Keimen *S. sobrinus*, *S. salivarius*, und *E. faecalis* zusammen.

*S. sobrinus* gilt als Biofilmbildner und ist einer der Leitkeime bei der Kariesentstehung (Loesche, 1986). Wie in Tab. 4 veranschaulicht, zeigt *S. salivarius* eine eingeschränkte Fähigkeit zur Biofilmbildung auf dentalen Oberflächen. Socransky et al. (1977) und Leonhardt et al. (1995) zeigen, dass *S. salivarius* hauptsächlich epitheliale Oberflächen besiedelt und in der Biofilmbildung und Plaqueformation auf dentalen Oberflächen kaum eine Rolle spielt. Tatsächlich wirkt *S. salivarius* antagonistisch auf die Biofilmbildung von *S. sobrinus* und *S. mutans* (Tamura et al., 2009). *E. faecalis* ist ein weiterer Biofilmbildner und Leitkeim therapierefraktärer endodontischer Infektionen (Sundqvist et al., 1998).

**Tab. 4:** Auflistung der in den Versuchsreihen verwendeten Mikroorganismen inklusive Stoffwechseleigenschaften, Klassifikation nach Gram-Färbung und Fähigkeit der Biofilmbildung auf dentalen Oberflächen.

Bakterium (Genus)	Stoffwechsel/Gram	Biofilmbildend
<i>S. sobrinus</i>	fakultativ anaerob / +	+
<i>S. salivarius</i>	fakultativ anaerob / +	(+)
<i>E. faecalis</i>	fakultativ anaerob / +	+

Die bei -80°C in Glycerinkulturen (20% (v/v)) gelagerten Bakterienkulturen (Tab. 5) wurden im Rahmen der Anzucht mit einer sterilen Impföse aufgenommen und in 5 mL steriles BHI-Medium (Tab. 6) überführt und angezogen. Eine Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C unter aeroben Bedingungen.

Aus den Erhaltungskulturen wurden jeweils am Vorabend 30 µL Bakteriensuspension in 5 mL steriles BHI-Medium überimpft, sodass für die Durchführung der Versuche gleiche Bedingungen herrschten.

Die Anzahl der Bakterien bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0 wurde für jede Bakterienart spezifisch im Vorfeld ermittelt.

**Tab. 5:** Darstellung der verwendeten Bakterienstämme mit jeweiligem Konservierungsdatum (bei -80°C in Glycerin), den Zellzahlen (in Zellen/mL) bei entsprechenden OD<sub>600</sub> von 1,0; 0,5 und 0,25.

Bakterienstamm	Datum	Zellen/mL	Zellen/mL	Zellen/mL
		bei OD <sub>600</sub> 1,0	bei OD <sub>600</sub> 0,5	bei OD <sub>600</sub> 0,25
<i>S. sobrinus</i> DSMZ; DSM No. 20742	19.01.2011	12,16 x 10 <sup>8</sup>	6,08 x 10 <sup>8</sup>	3,04 x 10 <sup>8</sup>
<i>S. salivarius</i> (Andrews und Horder 1905) DSMZ; No. 20067	25.10.2013	8,38 x 10 <sup>8</sup>	4,19 x 10 <sup>8</sup>	2,1 x 10 <sup>8</sup>
<i>E. faecalis</i> (ATCC 19433)	05.02.2014	2,07 x 10 <sup>8</sup>	1,04 x 10 <sup>8</sup>	0,52 x 10 <sup>8</sup>

**Tab. 6:** Übersicht der Inhaltsstoffe des in den Versuchen verwendeten BHI-Broth sowie BHI-Agars (Oxoid Limited). Bei 25°C beträgt der pH-Wert des Mediums 7,4 ± 0,2.

Substanz	Konzentration [g/L H <sub>2</sub> O destill.]
<u>Brain Heart Infusion <b>BROTH</b></u>	
Infusion aus Kalbshirn	12,5
Infusion aus Rinderherzen	5,0
Proteose Pepton	10,0
Glucose	2,0
Natriumchlorid	5,0
Dinatriumphosphat	2,5
<u>Brain Heart Infusion <b>AGAR</b></u>	
Agar	10,0

### 2.2.1.2 Messung der optischen Dichte mittels Photometer

Die Messung der optischen Dichte der Bakteriensuspensionen erfolgte durch ein Photometer (Amersham Bioscience Ultrospec™ 10) in einem Reagenzglas bei einer Wellenlänge von 600 nm. Den Referenzwert bildet steriles BHI-Medium. Die jeweils gemessenen Werte wurden nach jedem Versuchsdurchlauf (n=2) protokolliert.

### **2.2.1.3 Anzucht von humanen Suspensionszellen (THP-1)**

Für die Zellversuche wurden nicht adhärente humane Suspensionszellen (THP-1) in einem RPMI Medium (+ 10% FCS / + 1% AB (Streptomycin, Penicillin)) angezüchtet (Tab. 11). Die Inkubation der Zellkulturen erfolgte in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> (ThermoForma, Thermo-Fisher Scientific) für ca. 1 Woche, bis sich diese unter dem Mikroskop als subkonfluent darstellten.

## **2.2.2 Temperaturversuche**

### **2.2.2.1 Temperaturbelastung der Mikroorganismen mittels Thermocycler**

Vor Versuchsbeginn wurde am Vortag eine Vorkultur aus der jeweiligen Hauptkultur des zu untersuchenden Bakteriums erstellt. 30 µL der Hauptkultur des zu untersuchenden Bakteriums wurden in 5 mL BHI-Flüssigmedium überführt und über Nacht bei 37°C ohne CO<sub>2</sub>-Zufuhr angezüchtet. Zu Beginn wurde am folgenden Morgen die optische Dichte für die Versuchsdurchläufe (n=6) mit allen Teststämmen in Reagenzgläsern auf die benötigten OD<sub>600</sub> von 1,0; 0,5; sowie 0,25 eingestellt. So waren die optischen Dichten der einzelnen Suspensionen vor dem "Heat-Shock" vergleichbar. Eine Gegenüberstellung der gewünschten und tatsächlich erreichten Werte aller Bakterienstämme ist in Tab. 12 ersichtlich.

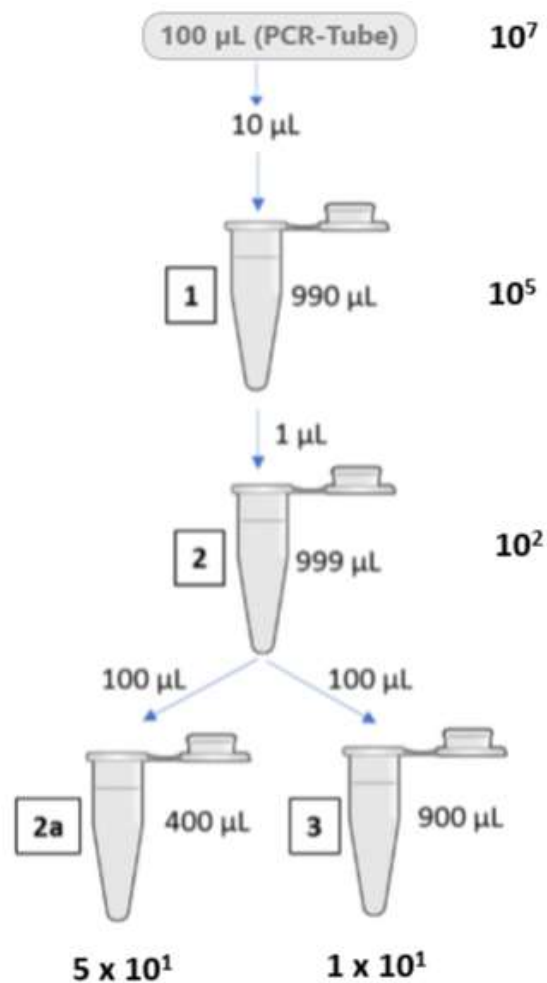
Jeweils 100 µL der entsprechenden Suspensionen wurden im Doppelansatz (n=2) in PCR-Tubes pipettiert und so für den "Heat-Shock" vorbereitet. Dieser Ablauf sollte für jedes Bakterium jeweils 3-fach im Doppelansatz durchgeführt (n=6) werden. Der "Heat-Shock" im Thermocycler (TGradient, Biometra GmbH) fand bei Temperaturen von 40°C, 60°C und 80°C für je 20 s statt (Abb. 9). Um weiteres Bakterienwachstum auszuschließen, lagerten die PCR-Tubes direkt nach dem Heat-Shock direkt auf Eis. Der erste Durchgang fand bei einer Temperaturbelastung von 40°C für 20 s statt. Anschließend wurden die entsprechenden Tubes simultan mit den 20°C Tubes in Eis gestellt. Die Raumtemperatur wurde mit 20°C gleichgesetzt.



**Abb. 9:** Positionierung der PCR-Tubes (mit 100  $\mu$ L Medium) im Thermocycler vor “Heat-Shock“. Spalte 1) enthält eine Bakteriensuspension mit einer  $OD_{600}$  1,0; (2) eine  $OD_{600}$  0,5 und (3) eine  $OD_{600}$  von 0,25. Der Heat-Shock fand wie oben beschrieben statt.

#### 2.2.2.2 Bestimmung der “Colony Forming Units“ der eingesetzten Bakterienstämme

Die dem Heat-Shock ausgesetzten Suspensionen ( $OD_{600}$  1,0; 0,5; 0,25) wurden entsprechend dem folgenden Pipettierschema verdünnt (Abb. 10). Dies ist erforderlich, um eine auszählbare Anzahl an cfu's auf dem BHI-Agar zu erhalten. Die Anzahl der cfu's sollte laut eines Artikels von Tomasiewicz et al. zwischen 25-250 liegen um auszuschließen, dass sich die Bakterien im Wachstum gegenseitig inhibieren und somit keine validen Aussagen über die Zellzahl getroffen werden können (Tomasiewicz et al., 1980). Des weiteren steigt die Fehlerwahrscheinlichkeit beim Auszählen von Platten, welche mehr als 300 cfu's aufweisen, um das Vierfache (Fisher et al., 1922).



**Abb. 10:** Exemplarische Darstellung des Pipettierschemas der Verdünnungsreihen. Die Zahlen am rechten Bildrand geben die jeweilige Bakterienverdünnung an.

Bei jedem Verdünnungsschritt wurde das Eppendorf-Gefäß gevortext, um eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen in den Tubes zu gewährleisten.

Aus den Verdünnungen **2a** und **3** (Abb. 10) wurden je  $100\ \mu\text{L}$  auf eine Petri-Schale mit BHI-Agar ausplattiert. Dabei wurde die Suspension für 40 s mittels steriler Glasperlen auf dem Agar gleichmäßig verteilt.

Die anschließende Inkubation erfolgte über Nacht (24 h: *E. faecalis* / *S. salivarius*, 48 h: *S. sobrinus*) bei  $37^\circ\text{C}$  unter aeroben Bedingungen. Eine Positivkontrolle wurde in jedem Versuchsansatz mit  $5\ \mu\text{L}$  Ampicillin ( $25\ \text{mg/mL}$  Amp) und  $5\ \mu\text{L}$  sodium dodecyl

sulfate (10%iges SDS) mitgeführt. Hier zeigte sich ein Hemmhof um das Antibiotikum und SDS.

Die Auszählung und die fotografische Dokumentation der vorhandenen Kolonien (colony forming units) fand am Folgetag statt. Das Auszählen erfolgte nach Positionierung der umgedrehten Petri-Schalen auf schwarzem Untergrund durch Markieren (Edding AG, Ahrensburg) der ausgezählten cfu's. Durch die ausgezählten cfu's konnten die jeweiligen Ausgangskonzentration der untersuchten optischen Dichten berechnet werden. Der Faktor für **2a** betrug 5.000.000 ( $5 \times 10^6$ ) und 10.000.000 ( $10^7$ ) für **3**. Die Mittelwerte der gesammelten Daten (n=6) der entsprechenden Verdünnungen wurden für jede Temperatur (20°C, 40°C, 60°C und 80°C) und jede OD<sub>600</sub> (1,0; 0,5; 0,25) gebildet und graphisch dargestellt.

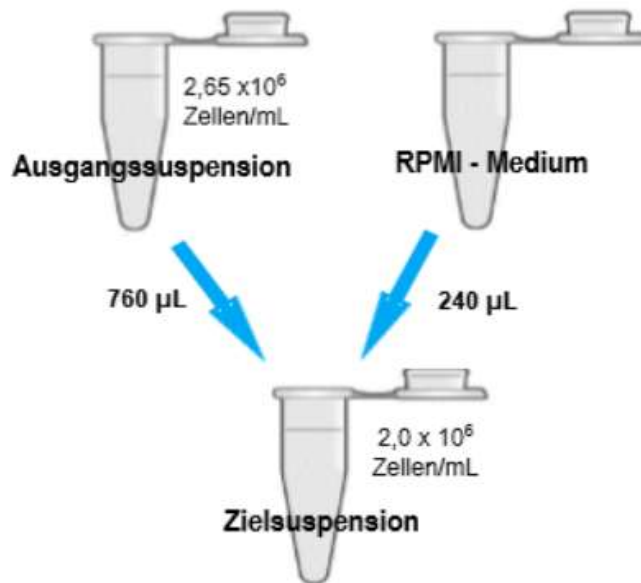
### **2.2.2.3 Ermittlung und Einstellung der Zellzahl (THP-1)**

Nach Überprüfung, ob die Zellen unter dem Mikroskop in subkonfluenten Kolonien vorlagen, folgte die Ermittlung und anschließende Einstellung der Zellkonzentration. Durch Zentrifugation in einem 15 mL Falcon-Tube bei 600 g für 5 Minuten konnte das entstandene Zellpellet in 1 mL RPMI-Medium resuspendiert werden. Anschließend wurde eine 1:5 Verdünnung durch Zugabe von 10 µL der Ausgangssuspension in 40 µL RPMI-Medium erstellt. Eine Auszählung der Zellen in der 1:5 Verdünnung erlaubt nun Rückschlüsse auf die Gesamtzellzahl der Ausgangssuspension.

Folgende Konzentrationen sollten in den zu untersuchenden Zielsuspensionen vorliegen:

- $2,0 \times 10^6$  Zellen/mL
- $1,0 \times 10^6$  Zellen/mL
- $0,5 \times 10^6$  Zellen/mL

Die Einstellung dieser Zielkonzentrationen (Abb. 11) erfolgte durch mathematisches Ermitteln der nötigen Verdünnungsmenge (RPMI-Medium), die der Ausgangssuspension zugegeben werden musste.



**Abb. 11:** Exemplarische Darstellung der Einstellung der gewünschten Zellkonzentration. Bei einer Ausgangskonzentration von  $2,65 \times 10^6$  Zellen/mL setzt sich die Zielsuspension aus  $760 \mu\text{L}$  Zellsuspension und  $240 \mu\text{L}$  RPMI-Medium zusammen.

#### 2.2.2.4 Untersuchung des Wachstumsverhaltens humaner Zellsysteme nach Wärmeeinwirkung

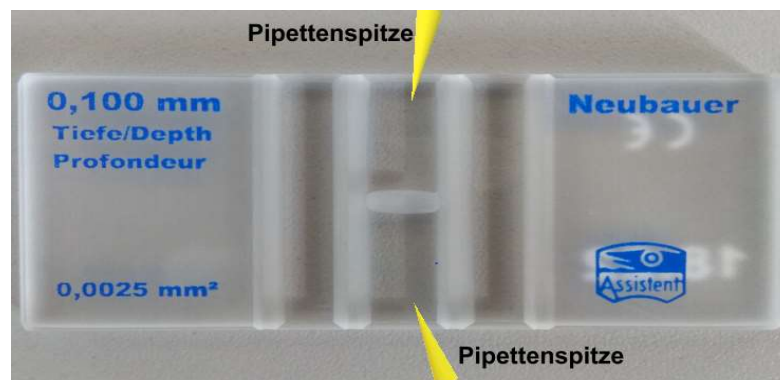
Nach der Einstellung der jeweiligen Zellkonzentrationen (siehe UA 2.2.2.3), fand die Überführung der Suspensionen in PCR-Tubes statt. So wurden je  $100 \mu\text{L}$  im Doppelansatz ( $n=2$ ) pipettiert. Die weitere Durchführung des "Heat-Shocks" entsprach dem der Untersuchung des Wachstumsverhaltens von Mikroorganismen (siehe UA 2.2.2.1), die angewandten Temperaturen und die Dauer der Belastung blieben identisch.

Abschließend fand eine Verdünnung der jeweiligen Zellsuspensionen statt.



Zunächst wurden 30  $\mu\text{L}$  Trypanblau (0,4%) in ein Eppendorf-Tube (1,5 mL) pipettiert, um dann 10  $\mu\text{L}$  der jeweiligen Ausgangssuspension dem Trypanblau hinzuzufügen. Die Färbung durch Trypanblau ermöglicht eine Unterscheidung zwischen toten und lebenden Suspensionszellen. Weil die Membranen der toten Zellen geschädigt sind, nehmen sie Trypanblau auf. Sie stellen sich unter dem Mikroskop dunkelblau dar.

Die Auszählung fand unter einem Mikroskop (Primover, Carl Zeiss AG, Oberkochen) statt. Von der durch mehrmaliges Wiederaufnehmen mittels Pipette gut durchmischten Suspensionen wurden 2 X 10  $\mu\text{L}$  unter ein Deckglas auf einem Hämozytometer (Neubauer Zählkammer, Marienfeld-Superior GmbH, Königshofen) pipettiert (Abb. 12).



**Abb. 12:** Exemplarische Darstellung einer Neubauer Zählkammer. Die gelben Kegel stellen die Pipettenspitzen dar. Diese enthalten jeweils 10  $\mu\text{L}$  Zellsuspension / Trypanblaugemisch.

Nun konnten die in den jeweiligen Feldern befindlichen Zellen (lebend/tot) ausgezählt werden. Da je Hämozytometer ein Quadrat mit 4 Feldern auszählbar ist, wurde der Mittelwert aus den beiden erhaltenen Werten für jede Temperatur (20°C, 40°C, 60°C und 80°C) gebildet und graphisch dargestellt. Dieser Versuch fand im Doppelansatz (n=2) statt.

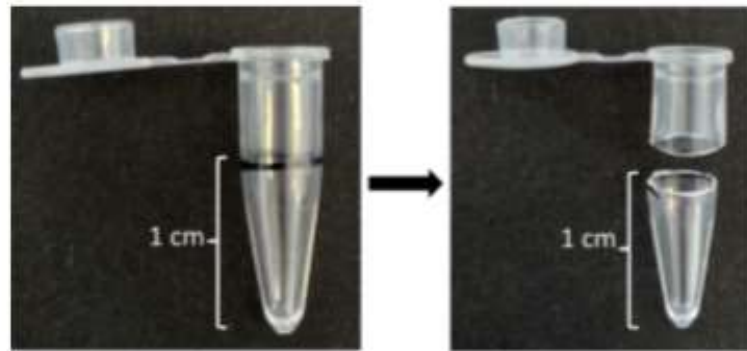
### 2.2.3 Temperaturentwicklung unterschiedlicher Medien (BHI + RPMI) unter Laserbestrahlung

Um die Effekte bei Laserbestrahlung auf Mikroorganismen und Zellsysteme beurteilen und bewerten zu können, wurde die Temperaturentwicklung der jeweiligen Suspensionen unter Lasereinwirkung mit einer Thermographiekamera gemessen. Bei den untersuchten Medien handelte es sich um:

- BHI-Broth ohne Bakterienkulturen
- RPMI-Medium ohne THP-1 Zellen
- BHI-Broth + *S. salivarius*

Die jeweiligen Medien wurden unter gleichbleibenden Bedingungen bestrahlt. Hierbei wurden die Laserleistungen nachfolgend auf 0,5 W; 1,0 W; 1,5 W und 2,0 W eingestellt. Die Bestrahlungsdauer betrug 20 s bei den Wellenlängen 445 und 810 nm. Somit wird eine Vergleichbarkeit zu den anderen Versuchsreihen hergestellt (siehe 2.2.2 / 2.2.4.2). Die Messungen fanden für jede Wattleistung aufgrund des hohen versuchstechnischen Aufwandes lediglich im Vierfachansatz statt.

Für den Versuchsaufbau wird das Rack für die PCR-Tubes auf den Motortisch (Physik Instrumente GmbH & Co. KG, Karlsruhe) plaziert und mit einem K-Silikonblock (Alphasil, Müller Omicron, Lindlar) fixiert. Dieser ermöglicht eine genaue Reponierbarkeit der Tube-Halterung. PCR-Tubes auf 1 cm vom Boden ausgehend gekürzt, sorgten für eine präzise Positionierung der Bare-Faser im Medium (Abb. 13). Die Faser konnte nun, eingeführt in dem Handstück des Lasers und gehalten durch ein Stativ, 2 mm tief in das jeweilige Medium eintauchen.



**Abb. 13:** Exemplarische Darstellung eines auf 1cm gekürzten PCR-Tubes.

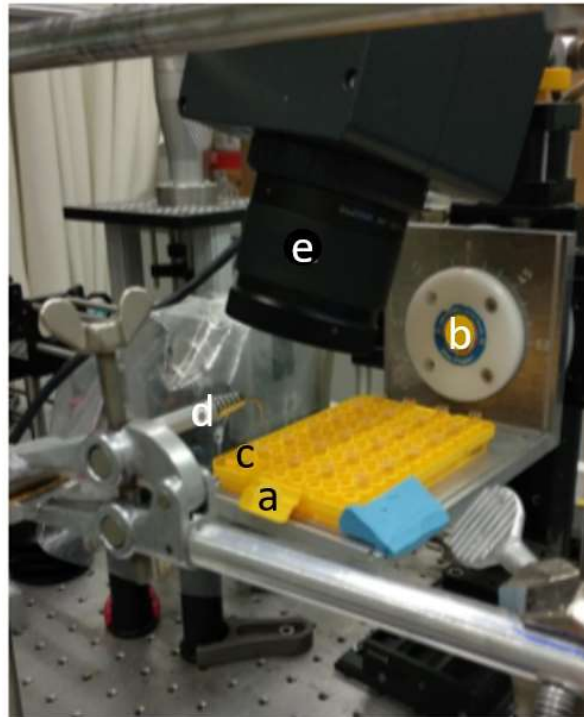
Die Ausrichtung der Thermographiekamera fand über dem Motortisch statt, sodass eine möglichst orthogonale Aufnahme des bestrahlten Tubes angefertigt werden konnte. Die Steuerung des Tisches mit den PCR-Tubes erfolgte durch eine speziell programmierte Software in drei Dimensionen (x-y-z).

Durch die Kalibrierung des Motortisches und dadurch entsprechende Bestimmung der Absolutposition der Tube-Halterung, konnte eine identische Durchführung aller Messungen gewährleistet werden. Die Schrittweite in mm kann beliebig eingestellt werden.

Die Thermographiekamera wurde mit der „IRBIS® 3 Analyse-Software“ verbunden und die Messungen durch folgende, vorher eingestellte Parameter durchgeführt:

- Dauer der Aufnahme: 45 Sekunden
- Temperaturbereich: 25° – 120° C
- Umgebungstemperatur
- Emission: 1

Anschließend erfolgte die Fokuseinstellung. Durch jede Aufnahme entstand ein Diagramm, in dem die Temperaturveränderung gegen die Zeit aufgetragen wurde (Abb. 16).



**Abb. 14:** Versuchsaufbau zur Messung der Temperaturentwicklung unterschiedlicher Medien bei Laserbestrahlung. Rack PCR-Tubes aus Alphasil (a), Halterung des Motortisches (b), gekürzte PCR-Tubes (c), Handstück mit Laserfaser (d), Thermographiekamera (e).

An den Graphen der Temperaturentwicklung konnte die maximal erreichte Temperatur im Bestrahlungsintervall abgelesen werden. Die Mittelwerte der Maximaltemperaturen und deren Standardabweichung wurden berechnet und anschließend graphisch dargestellt (Abb. 18).

Zusätzlich zu der Untersuchung der Temperaturentwicklung der Leermidien (BHI- und RPMI-Medium) erfolgte eine Versuchsreihe unter Zusatz eines Bakteriums (*S. salivarius*) in das BHI-Medium. Zunächst fand die Einstellung der optischen Dichten der Bakteriensuspension auf  $OD_{600}$  1,0; 0,5 und 0,25 statt. Die jeweiligen Suspensionen wurden in 2 mL Eppendorf-Tubes überführt und in Eis gelagert. Anschließend konnten je 100  $\mu$ L jeder optischen Dichte in die vorbereiteten PCR-Tubes pipettiert und bei 445 nm, bzw. 810 nm für 20 Sekunden bei Leistungen von 0,5 W; 1,0 W; 1,5 W und 2,0 W bestrahlt werden. Auch diese Versuchsreihe fand im Vierfachansatz statt. Die Mittelwerte

der Maximaltemperaturen und deren Standardabweichung wurden berechnet und anschließend graphisch dargestellt.

## **2.2.4 Laserbestrahlung der Bakterien- und Zellkulturen**

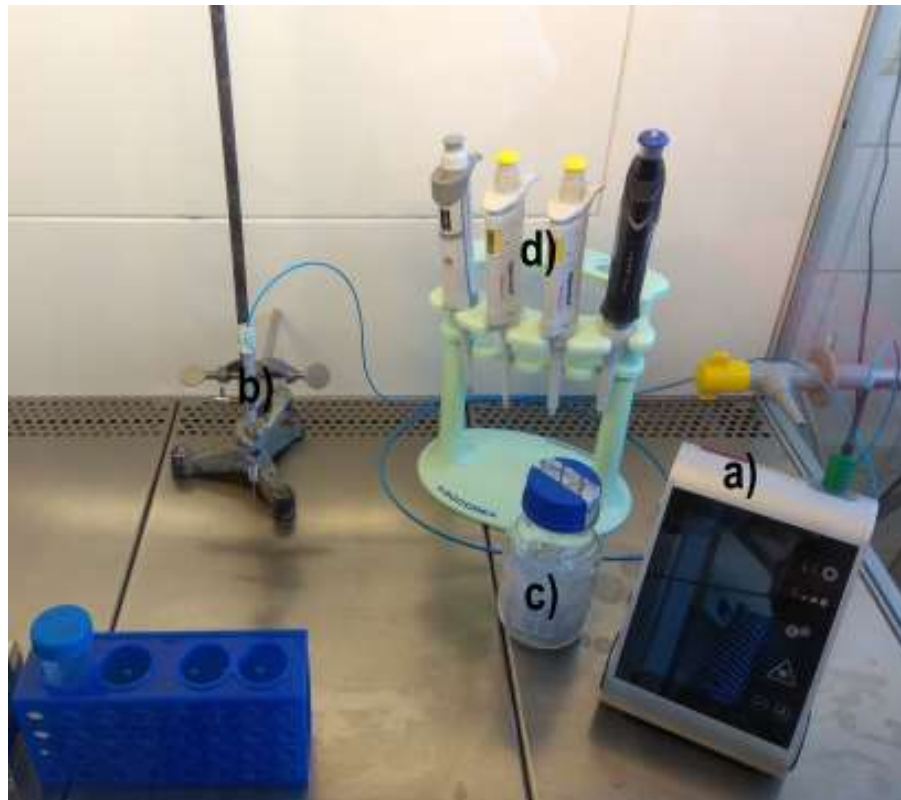
### **2.2.4.1 Laserbestrahlung von Mikroorganismen**

Die vorbereitenden Maßnahmen entsprechen denen der Temperaturversuche mit Mikroorganismen (siehe UA 2.2.2.1). Eine Gegenüberstellung der gewünschten und tatsächlich erreichten Werte aller Bakterienstämme ist in Tab. 13 ersichtlich.

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurden die drei zuvor untersuchten Bakterienstämme verwendet (Tab. 5). Von den vorher ermittelten optischen Dichten ( $OD_{600}$  1,0; 0,5; 0,25) der Bakteriensuspensionen wurden je 100  $\mu$ L im Doppelansatz ( $n=2$ ) in gekürzte PCR-Tubes (Abb. 13) pipettiert und die Laserfaser zentral 2 mm tief in die Flüssigkultur eingeführt. Die sichere Positionierung der Faser wurde durch die Befestigung des Laserhandstücks in einem Stativ sichergestellt.

Vor Bestrahlung der Suspensionen durch die Laser bei 445 nm (Bulb- und Bare-Faser) und 810 nm (Bare-Faser), fand eine Kalibrierung der Laserleistung wie in UA 2.1.3.1 erläutert statt. Eine tabellarische Darstellung kalibrierter Ist-Werte [W] findet sich im Anhang (Tab. 14).

Die Bestrahlung mittels Bare-Faser erfolgte für 20 s bei einer Wellenlänge von 445 nm bzw. 810 nm mit einer Leistung von je 0,5 W; 1,0 W; 1,5 W und 2,0 W, während die Bulb-Faser lediglich bei einer Wellenlänge von 445 nm verwendet wurde.



**Abb. 15:** Versuchsaufbau exemplarisch zur Bestrahlung von Mikroorganismen und Zellsystemen. (a) FOX IV Laser-Steuerereinheit, (b) Stativ mit Handstück und Laserfaser, (c) Glaskugeln zum Ausplattieren der Suspensionen (nur in 0 verwendet), (d) Pipetten mit Pipettenständer.

Nach der Bestrahlung wurden die Bakteriensuspensionen entsprechend dem Pipettierschema in Abb. 10 verdünnt und die jeweiligen Verdünnungen auf BHI-Agar-Platten ausplattiert. Wie in UA 2.2.2.2 beschrieben, fand die Inkubation der Keime sowie die Auswertung und Berechnung der Bakterienzahl/mL statt.

#### 2.2.4.2 Laserbestrahlung von Zellsystemen

Die vorbereitenden Maßnahmen zu dieser Versuchsreihe entsprechen denen der in UA 2.2.1.3 und UA 2.2.2.3 beschriebenen Verfahren zur Anzucht der humanen Suspensionszellen (THP-1), der Ermittlung und Einstellung der gewünschten Zellzahl. Die Ausgangszellzahlen waren identisch zu denen der Temperaturversuche (siehe UA

2.2.2.3). Im Doppelansatz ( $n=2$ ) erfolgte die Laserbestrahlung unter den vorgegebenen Parametern:

- Wellenlänge: 445 nm und 810 nm
- Fasern: Bulb / Bare
- Laserleistung: 0,5 W; 1,0 W; 1,5 W und 2,0 W
- Bestrahlungsdauer: 20 Sekunden

Der Versuch wurde im Sechsfachansatz bei einer Wellenlänge von 445 nm unter Verwendung beider Fasertypen (Bare- und Bulb) durchgeführt. Die Bestrahlung mit 810 nm und Bare-Faser fand im Dreifachansatz statt.

Anschließend erfolgte die Färbung und Auszählung unter dem Mikroskop mittels Hämozytometer (Abb. 12). Die Ergebnisse wurden erfasst und graphisch dargestellt.

### **2.3 Auswertung**

Die Ergebnisse der Bestimmung der Colony Forming Units, bzw. der Zellzahl wurden in Excel-Tabellen erfasst. Die Tabellen bildeten die Grundlage für eine deskriptive Auswertung. Im Rahmen dieser Auswertung wurden die Standardabweichungen ermittelt. Die Ergebnisse nach thermischer Belastung, bzw. Laserbestrahlung wurden mit den Kontrollproben abgeglichen. Zur Qualitätskontrolle der durchgeführten Untersuchungen wurden stets Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

### **2.4 Statistische Auswertung**

Für die Datenaufbereitung und die statistische Auswertung wurde das Programm Microsoft Excel, Version 2016, der Firma Microsoft Corporation (USA) verwendet. Im Rahmen der Durchführung des Projektes erfolgte eine statistische Beratung durch Frau Annika Strömer am Institut für medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie (IMBIE) der Universität Bonn. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde entschieden, mittels deskriptiver Statistik den arithmetischen Mittelwert und die Standardabweichung zu bestimmen. Anhand der deskriptiven

Auswertung wurden die Temperaturversuche sowie die Laserversuche mit Mikroorganismen und THP-1 Zellen untersucht. Zusätzlich erfolgte eine statistische Auswertung mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests die Temperaturentwicklung unter Laserbestrahlung betreffend (Abschnitt 3.1). Als Signifikanzniveau ( $\alpha$ ) wurde  $\alpha = 0,05$  festgelegt. Der Mann-Whitney-U-Test liefert als nichtparametrischer statistischer Test lediglich eine bestätigende oder widerlegende Aussage über die Signifikanz der Abweichung zweier Vergleichswerte.



### 3. Ergebnisse

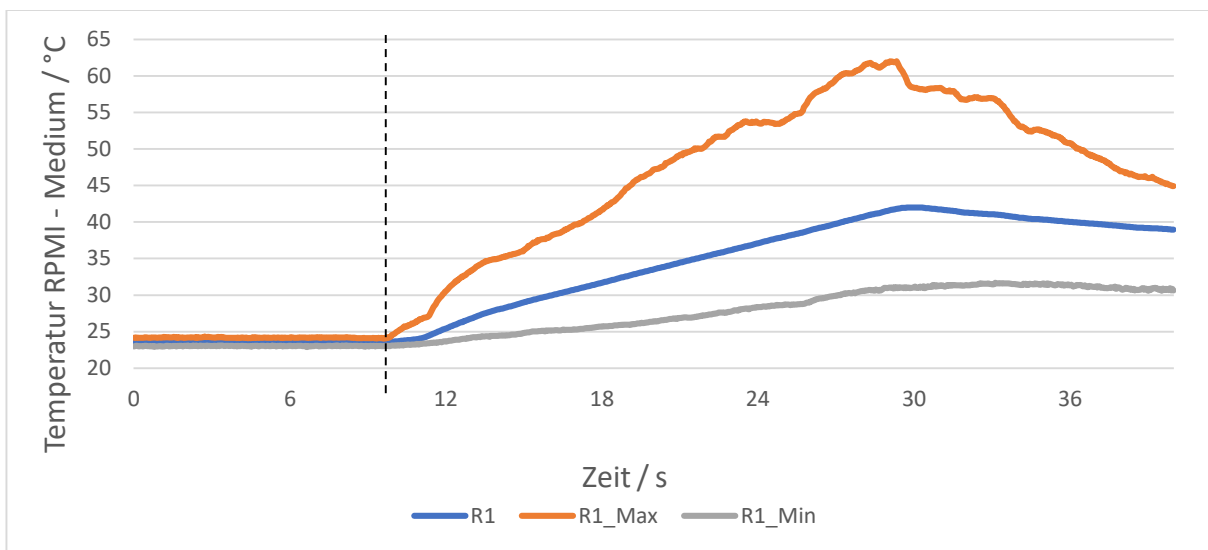
#### 3.1 Messung der Temperaturentwicklung unterschiedlicher Medien (BHI/RPMI) bei Laserbestrahlung mittels Thermographiekamera

Die Messungen der Temperaturentwicklung unterschiedlicher Medien fanden wie unter Abschnitt 2.2.3 erläutert für 20 s, einer Wellenlänge des bestrahlenden Lasers von 445 nm und 810 nm (je mit Bare-Faser) bei 0,5 W; 1,0 W; 1,5 W und 2,0 W im Vierfachansatz statt. Das jeweils bestrahlte Volumen betrug 100 µL. Folgende Medien wurden untersucht:

- RPMI – Medium +10% FCS, +1% AB [Streptomycin, Penicillin] (Thermo-Fisher Scientific)
- BHI – Broth (Oxoid Limited)
- BHI – Broth + *S. salivarius*

Letztgenannte Versuchsreihe soll exemplarisch das Temperaturverhalten unter Zusatz einer Bakteriensuspension veranschaulichen.

Anhand der gemessenen Daten konnten Zeitdiagramme erstellt werden. Diese ermöglichen ein vergleichendes Auswerten der maximal erreichten Temperaturen bei unterschiedlichen Wellenlängen in den jeweils untersuchten Medien. Eine exemplarische Darstellung eines solchen Zeitdiagramms ist in Abb. 16 dargestellt.

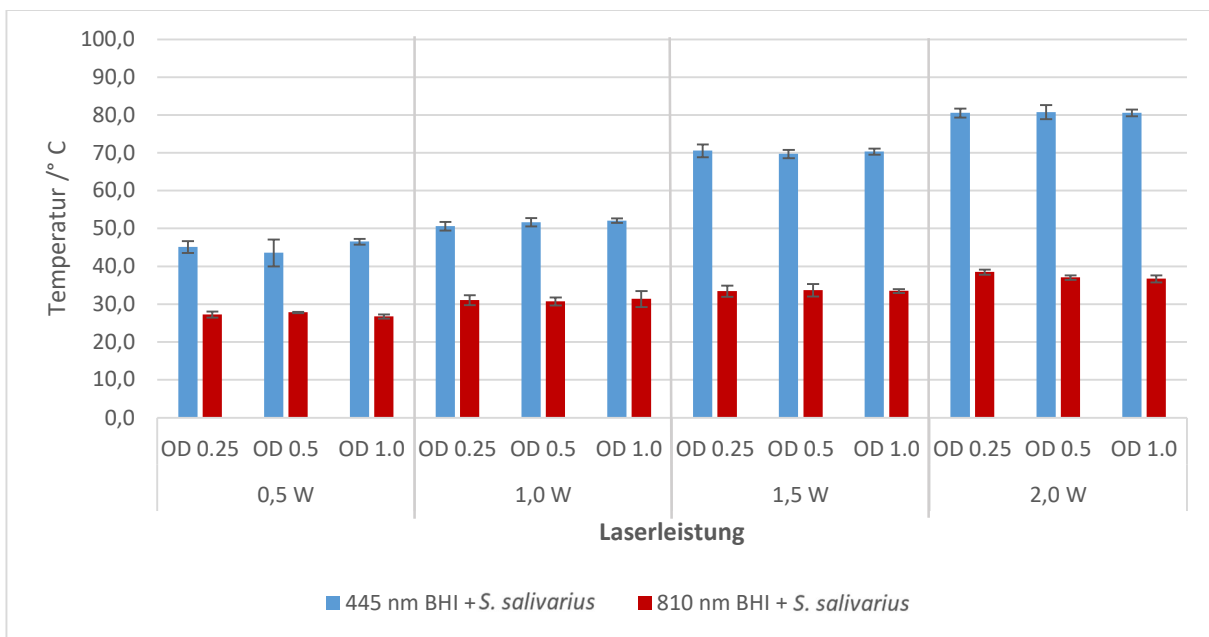


**Abb. 16:** Exemplarische graphische Darstellung der Temperaturentwicklung bei Laserbestrahlung von RPMI-Medium mit 445 nm und Bare-Faser für 20 s bei 2,0 W. Die gestrichelte Linie verdeutlicht den Beginn der Laserbestrahlung.

Für die weitere Auswertung wurden jedoch nur die Messdaten von R1\_Max ausgewertet. Der Start der Laserbestrahlung entspricht nicht  $x=0$ , sondern der gestrichelten Linie (Abb. 16).

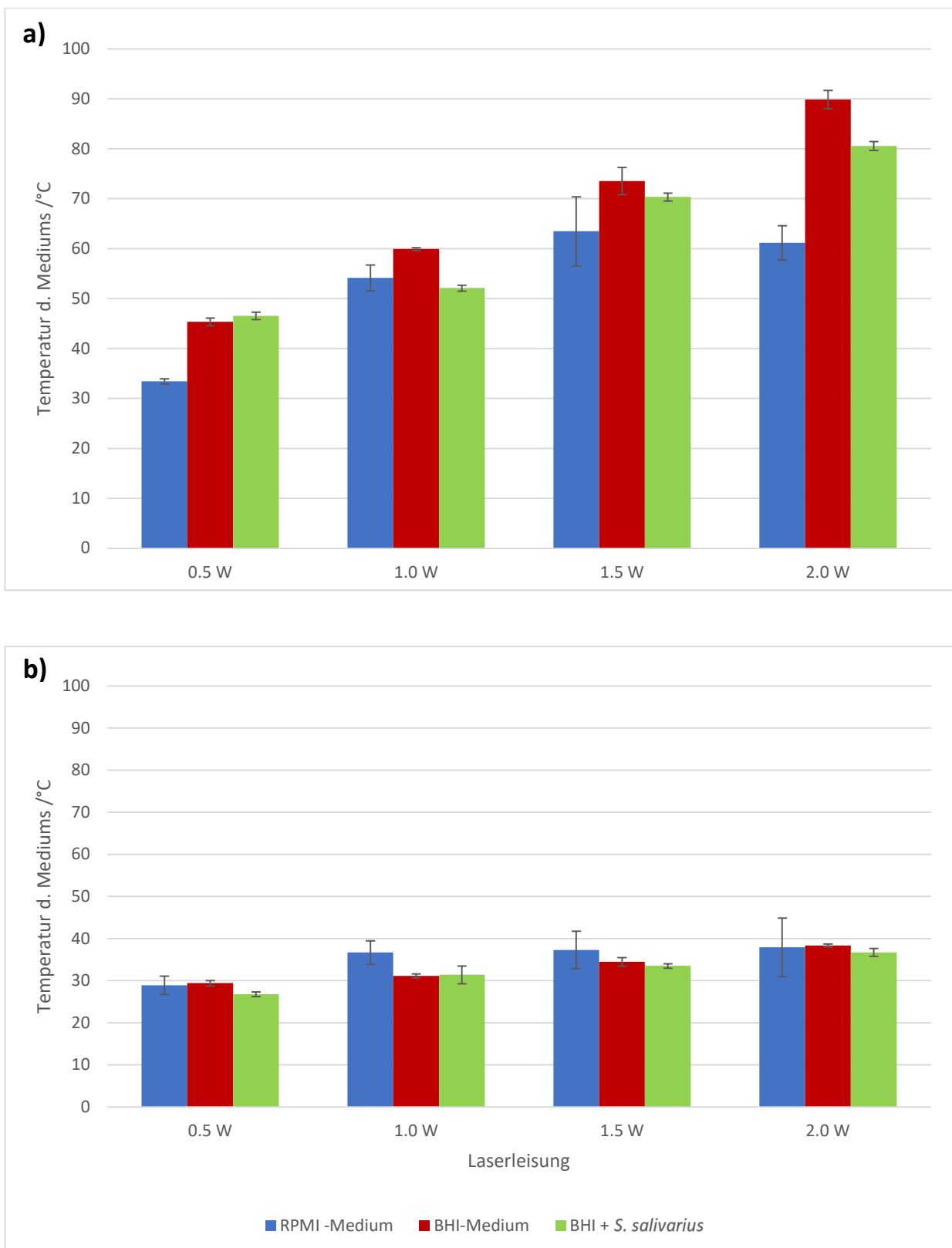
Im Rahmen der Masterarbeit „Dekontamination von oralen Oberflächen mit photonischen Technologien“ konnte verifiziert werden, dass die Verwendung der Thermographiekamera für Temperaturmessungen valide Messergebnisse liefert. Die Verifizierung fand durch Vergleich der Messwerte der Kamera mit Messungen durch eine Thermocouple bei identischen Bedingungen statt (Schmidt, 2018).

Für die Versuchsreihe BHI + *S. salivarius* erfolgten die Messungen bei unterschiedlichen optischen Dichten ( $OD_{600}$  1,0; 0,5; 0,25). Wie Abb. 17 zeigt, ist die Abweichung zwischen den Temperaturmessungen bei unterschiedlichen optischen Dichten nicht signifikant ( $\alpha \leq 0,05$ ), weshalb in den vergleichenden Graphen in Abb. 18 exemplarisch die Messdaten bei  $OD_{600}$  1.0 verwendet wurden.



**Abb. 17** Graphische Darstellung der Untersuchung des Temperaturanstiegs bei Laserbestrahlung einer Bakteriensuspension (BHI + *S. salivarius*) bei unterschiedlichen optischen Dichten (OD<sub>600</sub> 1,0; 0,5; 0,25) und Wellenlängen (445 nm / 810 nm). Die Ausgangstemperatur betrug bei allen Ansätzen 24°C.

Erkennbar ist ein annähernd linearer Anstieg der Temperatur (auf ca. 80°C bei 2,0 W) bei ansteigender Laserleistung unter Verwendung einer Wellenlänge von 445 nm. Unter Anwendung einer Wellenlänge von 810 nm ergaben sich bei 0,5 W ca. 27°C, bei 1,0 W ca. 31°C, bei 1,5 W ca. 33°C und bei 2,0 W ca. 37°C.



**Abb. 18:** Graphische Darstellung der Temperaturentwicklung in den untersuchten Medien (RPMI / BHI / BHI + *S. salivarius*) bei Laserbestrahlung mit 445 nm (a) und 810 nm (b) für 20 s (n=4).

Deutlich sichtbar ist eine annähernd lineare Temperaturerhöhung innerhalb des BHI-Mediums bei 445 nm. Die Ausgangstemperatur betrug bei allen Ansätzen 24°C. Die maximal erreichten Temperaturen liegen bei 89,9°C im BHI-Medium und 80,57°C im BHI-Medium + *S. salivarius* (jeweils bei 2,0 W). Die Maximaltemperatur des RPMI-Mediums wurde mit 63,46°C bei 1,5 W gemessen. Die gemessenen Temperaturen liegen im BHI-Medium + *S. salivarius* zwischen 1,0 W und 2,0 W geringfügig ( $\Delta T_{\max} = 9,33^\circ\text{C}$  bei 2,0 W) unter denen im BHI-Medium ohne Bakterienzusatz. Dagegen bleiben die gemessenen Temperaturen bei 810 nm in allen drei untersuchten Medien unabhängig von der applizierten Laserleistung annähernd konstant.

Die statistische Auswertung der Temperaturmessung fand durch den Mann-Whitney-U-Test statt. Es wurden je zwei Vergleichsgruppen ( $n=4$ ) anhand des Signifikanzniveaus  $\alpha \leq 0,05$  ausgewertet. Die jeweils gemessenen Daten einer Versuchsgruppe lagen nicht Normalverteilt vor. Der Test liefert keine p-Werte, sondern lediglich bestätigende oder widerlegende Aussagen die statistische Signifikanz betreffend.

Die Auswertung zeigt statistisch signifikante Abweichungen der Temperaturentwicklung in BHI-Medien mit und ohne *S. salivarius* bei zunehmender Laserleistung bei 445 nm Wellenlänge. Ein nicht statistisch signifikanter Unterschied besteht bei den gemessenen Temperaturen zwischen 1,0 W und 2,0 W bei 445 nm und 810 nm Wellenlänge im RPMI Medium (Tab. 7). Der statistische Vergleich der BHI Medien mit und ohne *S. salivarius* untereinander zeigt bei einer Wellenlänge von 445 nm bei 1,0 W und 2,0 W statistisch signifikante Unterschiede, während die Temperaturen bei 0,5 W und 1,5 W nicht signifikant voneinander abweichen. Bei 810 nm stellen sich die Temperaturen bei 0,5 W und 2,0 W als signifikant abweichend dar (Tab. 9). Der Vergleich der Temperaturentwicklung in den jeweiligen Medien bei 445 nm gegenüber 810 nm zeigt durchweg statistisch signifikante Abweichungen in der Temperaturentwicklung bei ansteigender Laserleistung (Tab. 8).

**Tab. 7:** Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der statistischen Auswertung der Temperaturmessungen bei steigender Laserleistung (0,5 W, 1,0 W, 1,5 W, 2,0 W) im entsprechenden Medium (RPMI, BHI, BHI + *S. salivarius*) bei unterschiedlichen Wellenlängen (445 nm, 810 nm). Dabei entspricht "Ja" einer statistisch signifikanten Abweichung der Messungen. Die gelb unterlegten Felder sollen die in 0,5 W – Schritten ansteigenden Laserleistungen veranschaulichen.

			1,0 W	1,5 W	2,0 W
445 nm	RPMI	0,5 W	Ja	Ja	Ja
		1,0 W	-	Nein	Ja
		1,5 W	Nein	-	Nein
	BHI	0,5 W	Ja	Ja	Ja
		1,0 W	-	Ja	Ja
		1,5 W	Ja	-	Ja
	BHI + <i>S. saliv.</i>	0,5 W	Ja	Ja	Ja
		1,0 W	-	Ja	Ja
		1,5 W	Ja	-	Ja
<hr/>					
810 nm	RPMI	0,5 W	Ja	Ja	Ja
		1,0 W	-	Nein	Ja
		1,5 W	Nein	-	Nein
	BHI	0,5 W	Nein	Ja	Ja
		1,0 W	-	Ja	Ja
		1,5 W	Ja	-	Ja
	BHI + <i>S. saliv.</i>	0,5 W	Ja	Ja	Ja
		1,0 W	-	Nein	Ja
		1,5 W	Nein	-	Ja

**Tab. 8:** Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der statistischen Auswertung der Temperaturmessungen bei steigender Laserleistung (0,5 W, 1,0 W, 1,5 W, 2,0 W). In dieser Tabelle werden die Messungen bei unterschiedlichen Wellenlängen (445 nm und 810 nm) bei jeweils einer Laserleistung in einem Medium verglichen. Dabei entspricht "Ja" einer statistisch signifikanten Abweichung der Messungen.

		0,5 W	1,0 W	1,5 W	2,0 W
RPMI	445 nm / 810 nm	Ja	Ja	Ja	Ja
BHI	445 nm / 810 nm	Ja	Ja	Ja	Ja
BHI + <i>S. saliv.</i>	445 nm / 810 nm	Ja	Ja	Ja	Ja

**Tab. 9:** Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der statistischen Auswertung der Temperaturmessungen bei steigender Laserleistung (0,5 W, 1,0 W, 1,5 W, 2,0 W). In dieser Tabelle werden die Messungen von BHI und BHI + *S. salivarius* in einer Wellenlänge (445 nm, 810 nm) und bei gleicher Laserleistung verglichen. Dabei entspricht "Ja" einer statistisch signifikanten Abweichung.

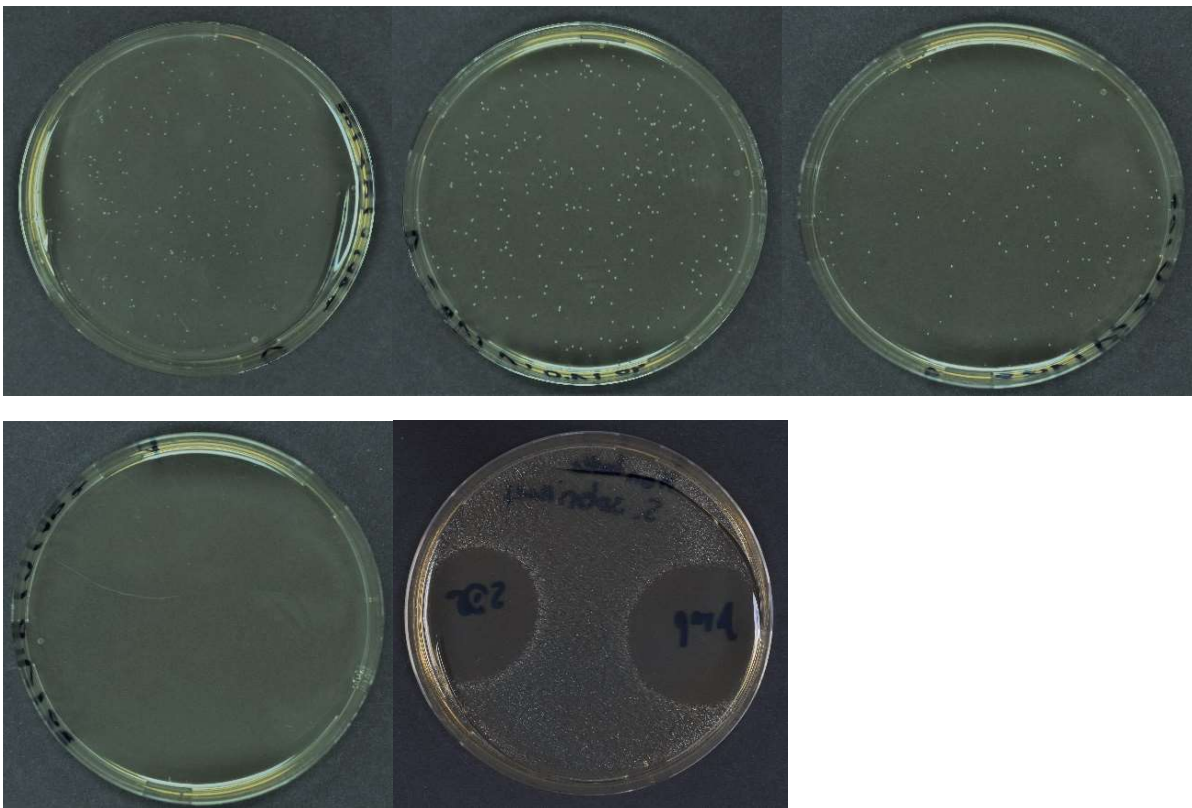
		0,5 W	1,0 W	1,5 W	2,0 W
BHI / BHI + <i>S. saliv.</i>	445 nm	Nein	Ja	Nein	Ja
	810 nm	Ja	Nein	Nein	Ja

## 3.2 Untersuchung des mikrobiellen Wachstumsverhaltens nach Wärmeeinwirkung und Laserbestrahlung

### 3.2.1 Wachstumsverhalten bei Wärmeeinwirkung

#### 3.2.1.1 *S. sobrinus*

Eine exemplarische Darstellung des Wachstumsverhaltens von *S. sobrinus* in der Plattenkultur und der ausgezählten Kolonien eines Versuches vom 13.09.2017 zeigt Abb. 19.



**Abb. 19** Darstellung der ausgezählten Kolonien von *S. sobrinus* des Versuches vom 13.09.2017 nach 48 h Inkubationszeit. Die gezeigten Platten mit den Kolonien stammen aus der Verdünnung von  $10^2$  mit einer  $OD_{600}$  von 1,0. Oben (von links nach rechts): Nach "Heat-Shock" bei 20°C, 40°C, 60°C (je 20 s). Unten (von links nach rechts): Nach "Heat-Shock" bei 80°C (20 s); Positive Kontrolle mit Ampicillin [25 mg/mL] und SDS [10 %].

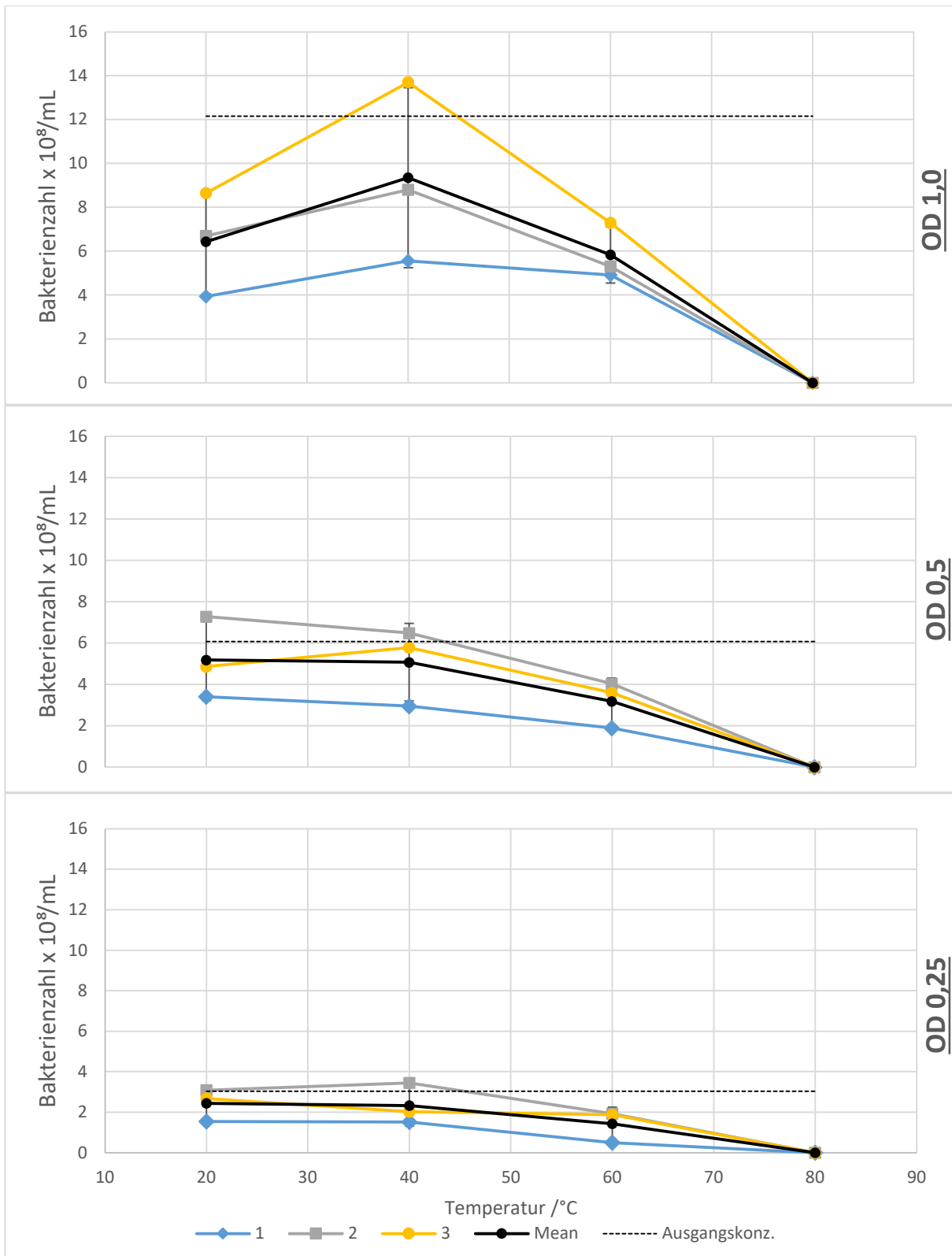


In Abb. 20 lässt sich das Wachstumsverhalten von *S. sobrinus* nach Temperaturbelastung (20°C, 40°C, 60°C und 80°C für 20 s) ablesen. Dabei zeigte sich im Mittel ein kontinuierlicher Abfall der Zellzahl bis 80°C und ein leichtes Wachstum bei 40°C (OD<sub>600</sub> 1,0). Zwischen 60°C und 80°C verzeichneten alle Bakterien einen starken linear abfallenden Rückgang der Population. Bei 80°C waren keine Kolonien mehr vorhanden. Bei keiner OD<sub>600</sub> wurde die vorher ermittelte Bakterienzahl/mL der Hauptkultur ( $\approx 1.21 \times 10^9$  Bakterien/mL) im Mittel überschritten.

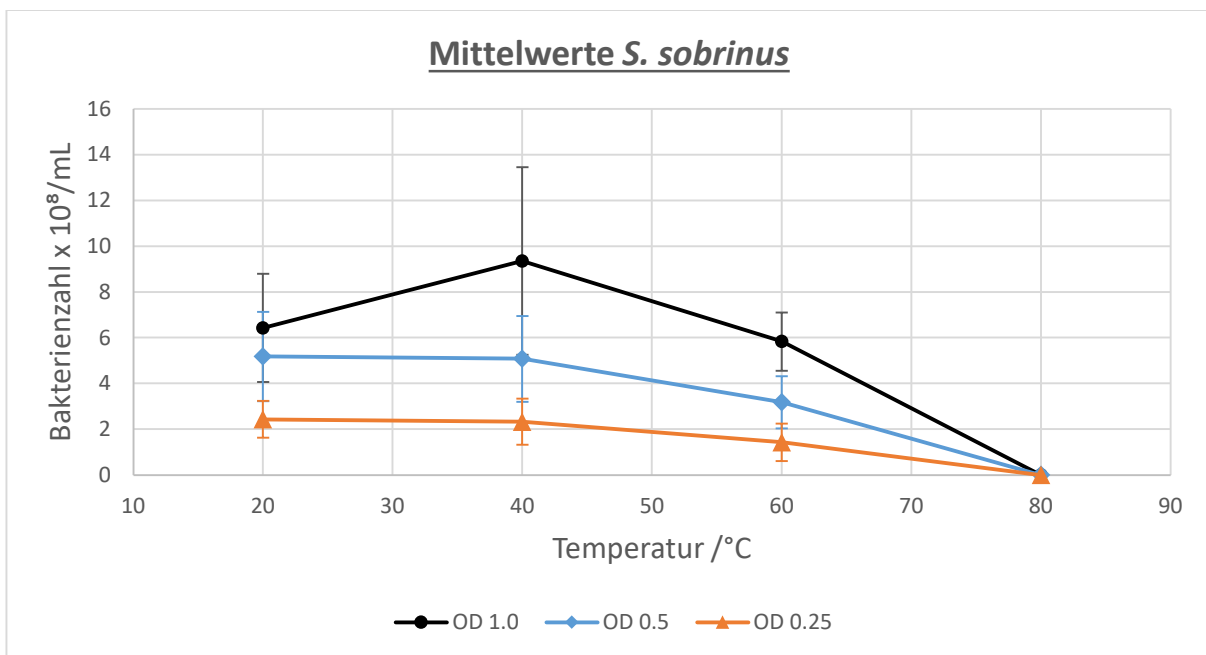
Mit der OD<sub>600</sub> von 1,0 verzeichnen alle Versuche eine Abnahme der Bakterienpopulation im Vergleich zum Anfangswert bei 20°C. Bei 40°C zeigen alle Graphen einen Anstieg der Zellzahl/mL über die Ausgangsgröße der Population bei 20°C. Die Graphen verlaufen allesamt parabelförmig und erreichen mit 80°C eine vollständige Dekontamination.

Bei einer OD<sub>600</sub> 0,5 verzeichnen die Bakterienzahlen/mL bei allen Versuchsdurchläufen (1-3) einen stetigen Abfall der Population. Die einzelnen Ansätze sind in ihrem Kurvenverlauf sehr ähnlich. Lediglich bei Durchlauf Nr. 3 lässt sich ein leichter Anstieg der Bakterienzahl/mL bei 40°C verzeichnen. Die vorher ermittelte Bakterienzahl/mL in der Hauptkultur von  $6,08 \times 10^8$  [Bakterien/mL] wird von der durchschnittlich ermittelten Bakterienzahl bei allen gemessenen Temperaturen (gestrichelte schwarze Linie) unterschritten. Der Kurvenverlauf der Durchschnittswerte kann im Intervall [40°C; 80°C] als annähernd linear beschrieben werden.

Zuletzt ergab sich bei einer OD<sub>600</sub> von 0,25 ebenfalls ein im Mittel stetiger Abfall der Bakterienzahl/mL bis zur vollständigen Dekontamination bei 80°C. Die maximale mittlere Bakterienzahl/mL betrug  $2,44 \times 10^8$  Bakterien/mL bei einer Temperaturbelastung von 20°C. Es schließt sich eine stetige Abnahme der Bakterienpopulation bei steigender Temperaturbelastung an.



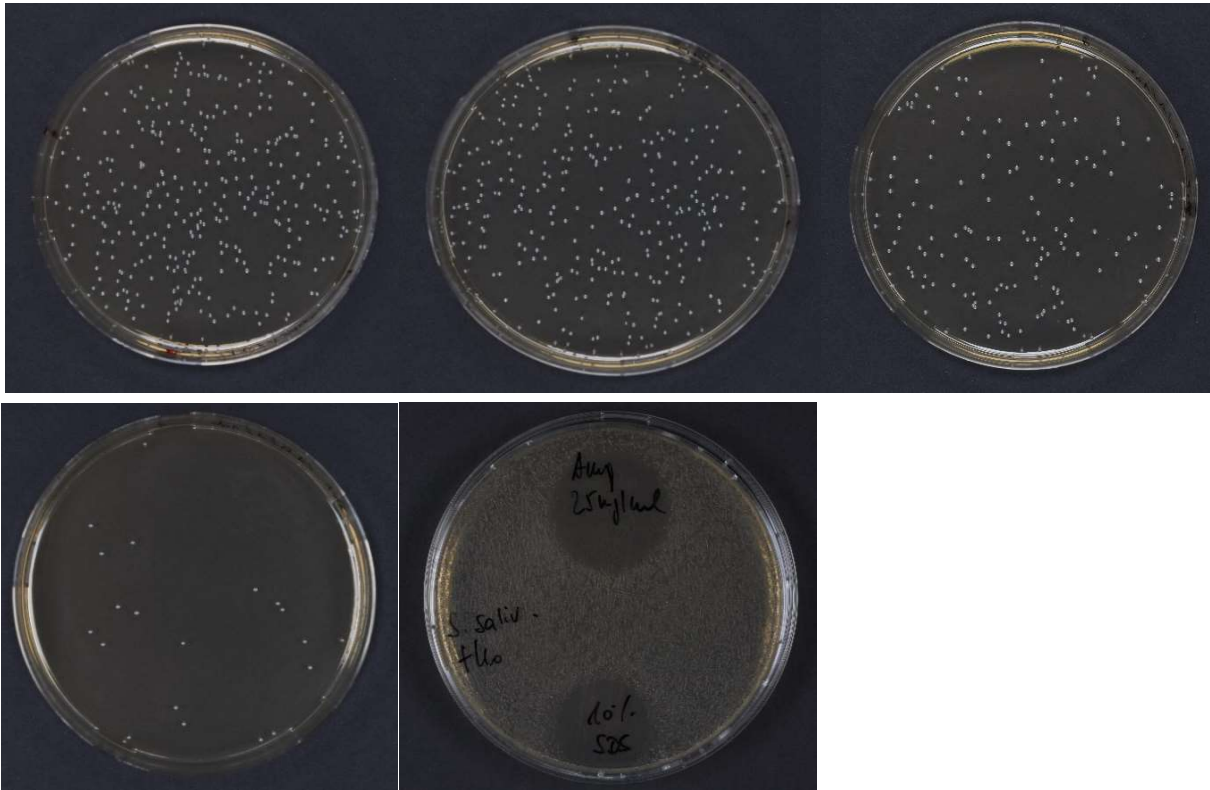
**Abb. 20:** Graphische Darstellung des Wachstumsverhaltens von *S. sobrinus* (n=6) bei 20°C, 40°C, 60°C und 80°C und den OD<sub>600</sub> von 1,0; 0,5; 0,25. Versuchsdurchläufe 1, 2, 3 mit jeweils n=2. Die gestrichelte Linie stellt die für die entsprechende OD<sub>600</sub> die ermittelte Bakterienzahl/mL dar (Tab. 5).



**Abb. 21:** Zusammenfassung der jeweiligen arithmetischen Mittelwerte aus je n=6 Proben für die unterschiedlichen OD<sub>600</sub> 1,0; 0,5; 0,25 aller Versuche.

### 3.2.1.2 *S. salivarius*

Eine exemplarische Darstellung des Wachstumsverhaltens von *S. salivarius* in der Plattenkultur und der ausgezählten Kolonien eines Versuches vom 02.08.2017 zeigt Abb. 22.



**Abb. 22:** Darstellung der ausgezählten Kolonien von *S. salivarius* des Versuches vom 02.08.2017 nach 24 h Inkubationszeit. Die gezeigten Platten mit den Kolonien stammen aus der Verdünnung von  $10^2$  mit einer  $OD_{600}$  von 1,0. Oben (von links nach rechts): Nach "Heat-Shock" bei 20°C, 40°C, 60°C (je 20 s). Unten (von links nach rechts): Nach "Heat-Shock" bei 80°C (20 s); Positive Kontrolle mit Ampicillin [25 mg/mL] und SDS [10%].

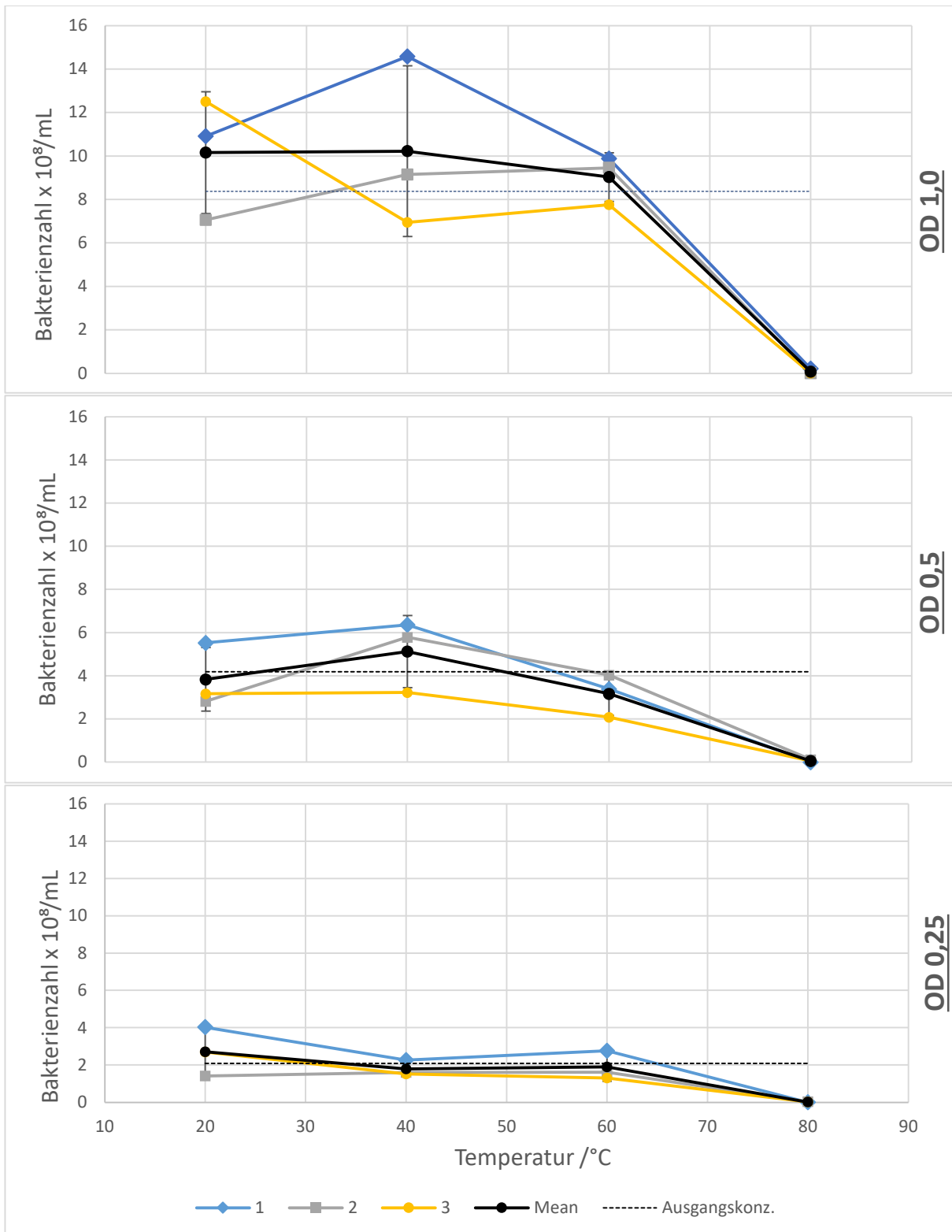
Anhand der Abb. 23 kann das Wachstumsverhalten von *S. salivarius* nach Temperaturbelastung (20°C, 40°C, 60°C und 80°C für 20 s) beurteilt werden. Zwischen 60°C und 80°C verzeichneten alle Zellen einen Rückgang der Population, bei 80°C konnten nur noch vereinzelt Kolonien ausgezählt werden (Abb. 22).

Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,25 lagen die auszählbaren cfu's im Versuchsdurchlauf Nr. 2 ab 40°C unter der in der Hauptkultur gemessenen Grenze von  $2,1 \times 10^8$  Bakterien/mL.

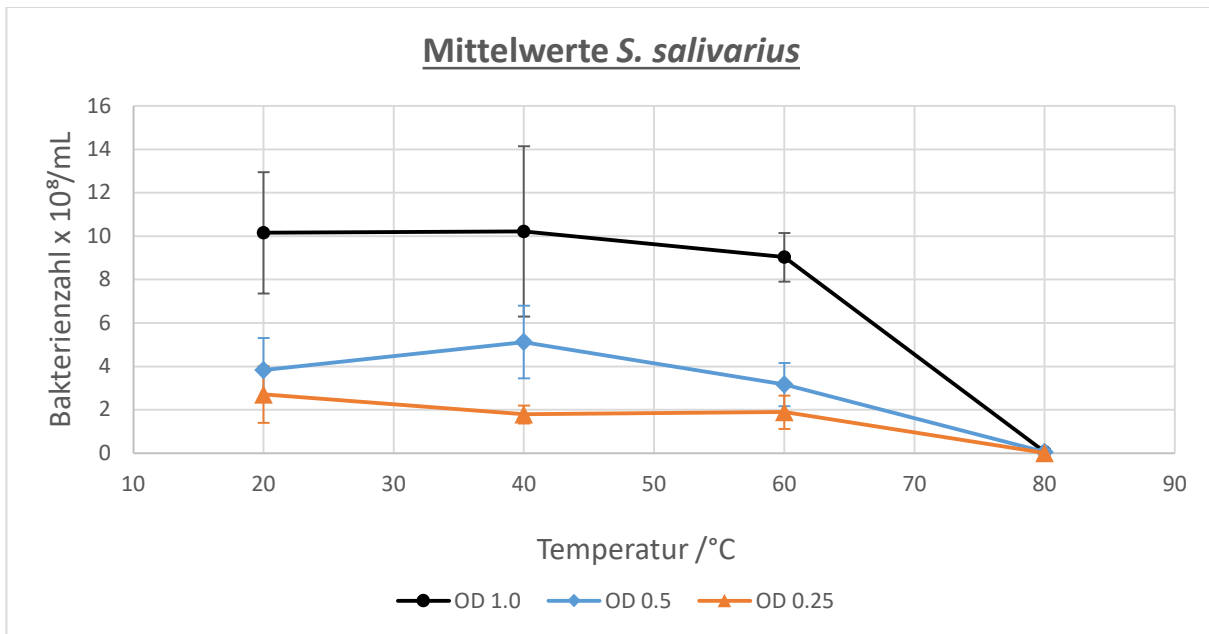
Die OD<sub>600</sub> von 1,0 zeigt abweichendes Verhalten gegenüber der OD<sub>600</sub> von 0,5 und 0,25. Bei 40°C lässt sich bei Durchlauf Nr. 2 eine Wachstumshemmung und eine Wachstumsstimulation erkennen. Die Mittelwerte zeigen ein ausgeglichenes Wachstumsverhalten. Im Mittel tritt ab 60°C eine geringfügige Keimreduktion ein. Ein Abfall der Bakterienzahl/mL (auf  $2,1 \times 10^7$  Bakterien/mL) war in diesem Ansatz bei 80°C zu verzeichnen. Auszählbar waren nur vereinzelt colony forming units (cfu's). Der relative Anteil betrug ca. 0,7% ausgehend von der bei 20°C gemessenen Ausgangskonzentration ( $1,02 \times 10^9$  Bakterien/mL). Es kommt im Mittel zu einer Keimreduktion von ca. 99,3% bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0 und 80°C Temperaturbelastung für 20 s.

Die Bakterienzahl/mL verzeichnete bei der OD<sub>600</sub> 0,5 bei allen Versuchsdurchläufen einen Anstieg der Population bei 40°C. Auch hier kommt es im Mittel zu einer fast vollständigen Keimreduktion bei 80°C ( $5,67 \times 10^6$  Bakterien/mL).

Abschließend nimmt bei einer OD<sub>600</sub> von 0,25 die Bakterienzahl/mL zwischen 20°C und 40°C im Mittel ( $\bar{x}$ ) ab. Sie bleibt bis 60°C weitgehend konstant und fällt dann bei 80°C auf  $1,5 \times 10^6$  Bakterien/mL. Dies sind 0,5% der zuvor bei 20°C gemessenen Ausgangskonzentration von  $2,71 \times 10^8$  Bakterien/mL.



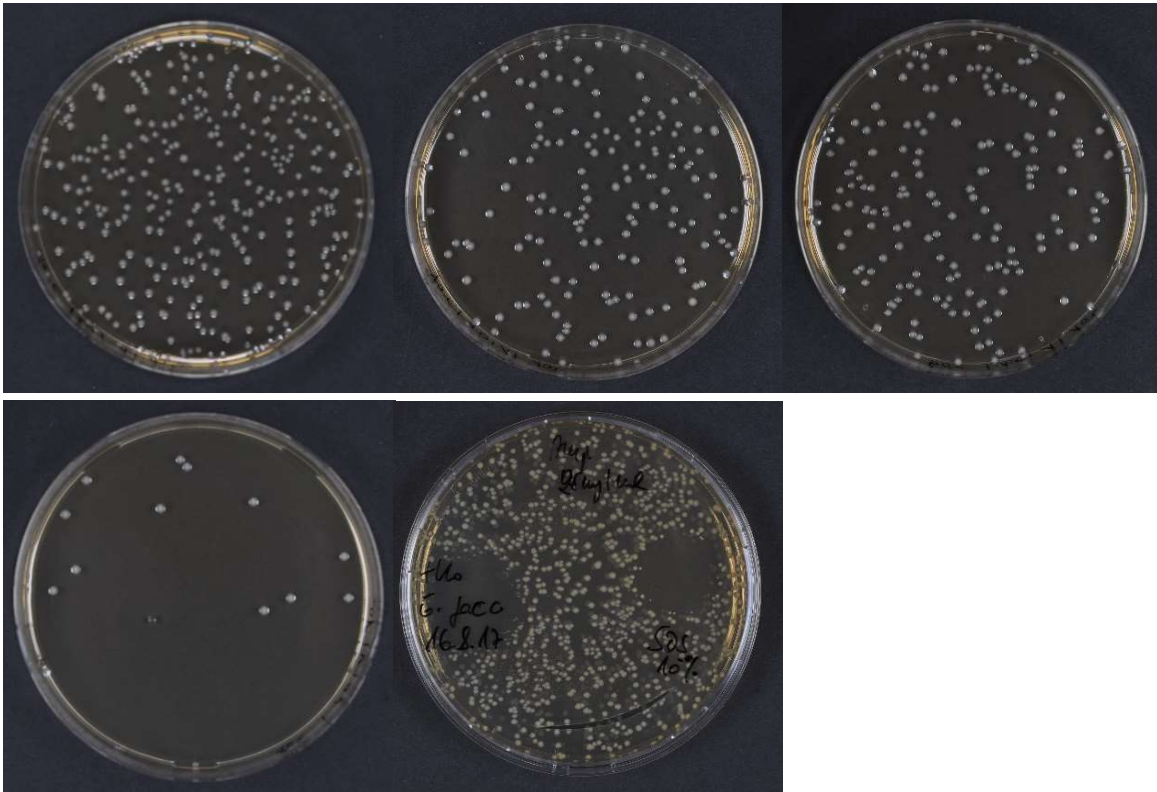
**Abb. 23:** Graphische Darstellung des Wachstumsverhaltens von *S. salivarius* (n=6) bei 20°C, 40°C, 60°C und 80°C und den OD<sub>600</sub> von 1,0; 0,5; 0,25. Versuchsdurchläufe 1, 2, 3 mit jeweils n=2. Die gestrichelte Linie stellt die für die entsprechende OD<sub>600</sub> die ermittelte Bakterienzahl/mL dar (Tab. 5).



**Abb. 24:** Zusammenfassung der jeweiligen arithmetischen Mittelwerte aus je n=6 Proben für die unterschiedlichen OD<sub>600</sub> 1,0; 0,5; 0,25 aller Versuche.

### 3.2.1.3 *E. faecalis*

Eine exemplarische Darstellung des Wachstumsverhaltens von *E. faecalis* in der Plattenkultur und der ausgezählten Kolonien eines Versuches vom 22.08.2017 zeigt Abb. 25.



**Abb. 25:** Darstellung der ausgezählten Kolonien von *E. faecalis* des Versuches vom 22.08.2017 nach 24 h Inkubationszeit. Die gezeigten Platten mit den Kolonien stammen aus der Verdünnung von  $10^2$  mit einer  $OD_{600}$  von 1,0. Oben (von links nach rechts): Nach "Heat-Shock" bei 20°C, 40°C, 60°C (je 20 s). Unten (von links nach rechts): Nach "Heat-Shock" bei 80°C (20 s); Positive Kontrolle mit Ampicillin [25 mg/mL] und SDS [10 %].

Anhand der Abb. 26 lässt sich das Wachstumsverhalten von *E. faecalis* nach Temperaturbelastung (20°C, 40°C, 60°C und 80°C für 20 s) beurteilen. Dabei zeigte sich im Mittel bei gemessenen  $OD_{600}$  von 1,0 und 0,5 ein Abfall der Bakterienzahl bei 40°C und ein leichter Anstieg bei 60°C. Zwischen 60°C und 80°C verzeichneten alle Keime einen deutlichen Rückgang der Population, bis bei 80°C nur noch vereinzelt Kolonien (cfu) vorhanden waren. Die vorher ermittelte Bakterienzahl/mL der Hauptkultur wurde bei jeder

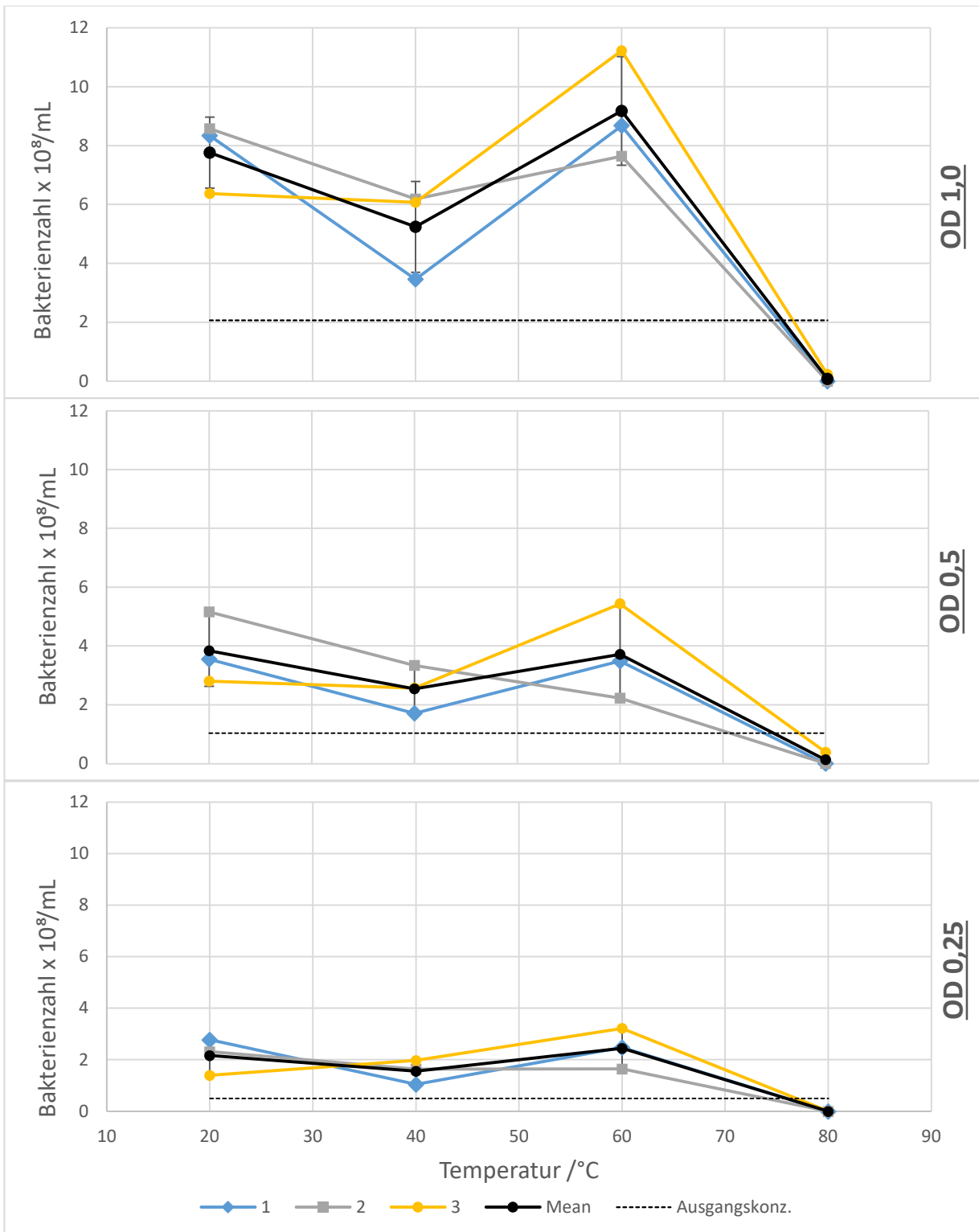


OD<sub>600</sub> und allen durchgeführten Versuchsansätzen überschritten und erst zwischen 60°C und 80°C unterschritten.

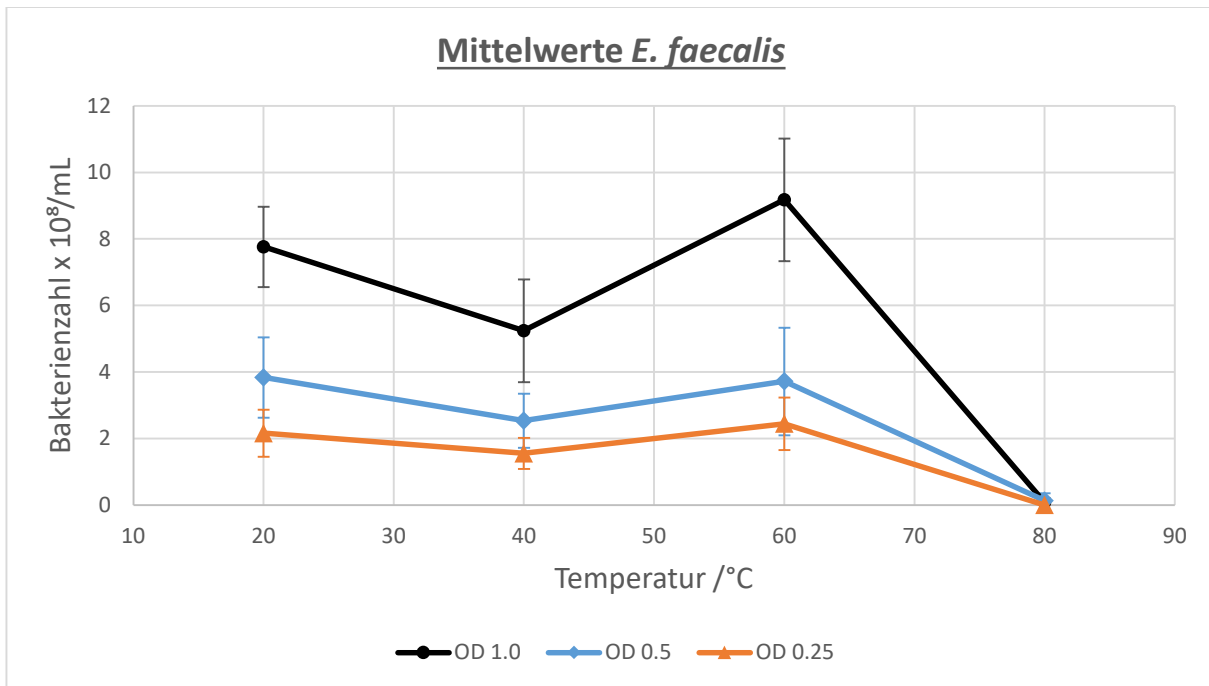
Bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0 zeigen alle Ansätze im Vergleich zum Anfangswert eine Abnahme der Bakterienpopulation bei 40°C. Hingegen verzeichnen die entsprechenden Ansätze bei 60°C einen Anstieg der Bakterienzahl/mL teils über die Ausgangsgröße der Population bei 20°C. Die Mittelwerte entsprechen einem Abfall der Bakterienzahl/mL bei 40°C auf 67,5% der Anfangspopulation. Es folgt ein Anstieg auf 118,3% bei 60°C und letztendlich ein Abfall bei 80°C auf ca. 1% der Ausgangskonzentration. Dieser Verlauf ist auch bei der OD<sub>600</sub> 0,5 zu beobachten.

Die Bakterienzahl/mL verzeichnete bei der OD<sub>600</sub> 0,5 in allen Versuchsdurchläufen einen Abfall der Population bei 40°C mit einem darauffolgenden Anstieg bei 60°C. Des weiteren bleibt erwähnenswert, dass die Bakterienpopulation bei allen Ansätzen erst zwischen 60°C und 80°C unter die vorher ermittelte Ausgangspopulation von  $1,04 \times 10^8$  Bakterien/mL (Tab. 5) sank. Der mittlere Kurvenverlauf weist ein Minimum bei  $T_{\min}=40^\circ\text{C}$  und einem Maximum bei  $T_{\max}=60^\circ\text{C}$  auf. Es erfolgt eine fast vollständige Keimreduktion bei 80°C.

Der Kurvenverlauf der mittleren Bakterienzahlen/mL bei der OD<sub>600</sub> von 0,25 entspricht dem der von OD<sub>600</sub> 1,0 und 0,5. Auch hier liegen alle Konzentrationen über der vorher ermittelten Bakterienzahl im Stammmedium von  $5,02 \times 10^7$  Bakterien/mL (Tab. 5).



**Abb. 26:** Graphische Darstellung des Wachstumsverhaltens von *E. faecalis* (n=6) bei 20°C, 40°C, 60°C und 80°C und den OD<sub>600</sub> von 1,0; 0,5; 0,25. Versuchsdurchläufe 1, 2, 3 mit jeweils n=2. Die gestrichelte Linie stellt die für die entsprechende OD<sub>600</sub> die ermittelte Bakterienzahl/mL dar (Tab. 5).

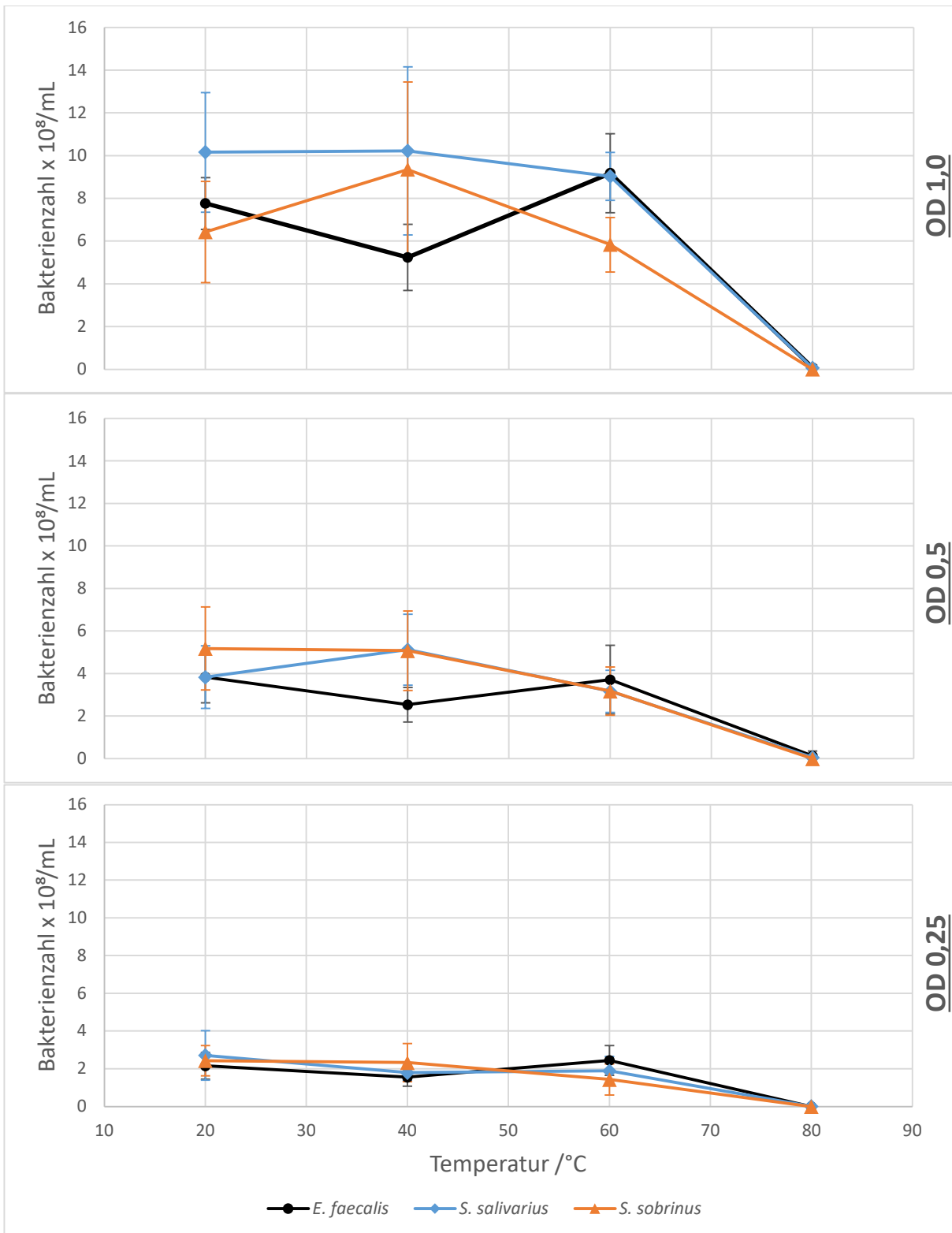


**Abb. 27:** Zusammenfassung der jeweiligen arithmetischen Mittelwerte aus je n=6 Proben für die unterschiedlichen OD<sub>600</sub> 1,0; 0,5; 0,25 aller Versuche.

### 3.2.1.4 Vergleich des Wachstumsverhaltens aller untersuchten Mikroorganismen nach Wärmeeinwirkung

Im Folgenden wurde das Wachstum der unterschiedlichen Bakterienstämme miteinander verglichen und graphisch dargestellt (Abb. 28).

Es wurden die jeweiligen Mittelwerte der drei untersuchten Teststämme bei unterschiedlichen OD<sub>600</sub> (1,0; 0,5; 0,25) nach einem Wärmeimpuls (20°C, 40°C, 60°C, 80°C) in drei Graphen den optischen Dichten entsprechend dargestellt.



**Abb. 28:** Vergleichende graphische Darstellung der Temperaturversuche (Mittelwerte) aller Teststämme (*E. faecalis*, *S. salivarius* und *S. sobrinus*). Dargestellt sind die optischen Dichten von OD<sub>600</sub> 1,0; 0,5 und 0,25 für die Temperaturen 20°, 40°, 60° und 80°.

Bei einer  $OD_{600}$  1,0 fällt auf, dass die Population von *E. faecalis* zwischen 40°C und 60°C einen Anstieg erfährt, nachdem es zwischen 20°C und 40°C zu einem Abfall der Bakterienzahl/mL kam. Dieser Kurvenverlauf setzt sich bei allen optischen Dichten fort. Bei  $OD_{600}$  1,0 beträgt die Konzentration von *E. faecalis* bei 60°C  $9,18 \times 10^8$  Bakterien/mL und liegt somit über der Ausgangskonzentration von  $7,76 \times 10^8$  Bakterien/mL. Bei allen drei Populationen kommt es zwischen 60°C und 80°C zu einer fast vollständigen Dekontamination. Die drei Teststämme bewegen sich im Temperaturintervall [20°C; 60°C] in einem Populationsbestand von  $5,24 \times 10^8$  –  $10,2 \times 10^8$  Bakterien/mL.

Der Kurvenverlauf bei einer  $OD_{600}$  0,5 zeigt bei *S. salivarius* und *S. sobrinus* einen kongruenten, annähernd linearen Abfall der Bakterienzahl/mL zwischen 40°C und 80°C. Alle drei Teststämme erreichen bei 80°C eine fast vollständige Dekontamination. Die Bakterienzahl/mL von *E. faecalis* fällt bei 40°C ab und steigt bei 60°C knapp auf die der Ausgangssuspension bei 20°C an. Bei einer Temperaturbelastung von 80°C weisen alle Teststämme eine fast vollständige Dekontamination auf. Während bei *S. sobrinus* in allen optischen Dichten bei 80°C keine Keime mehr nachweisbar waren, konnten bei *E. faecalis* und *S. salivarius* bei 80°C noch wenige colony forming units ausgezählt werden.

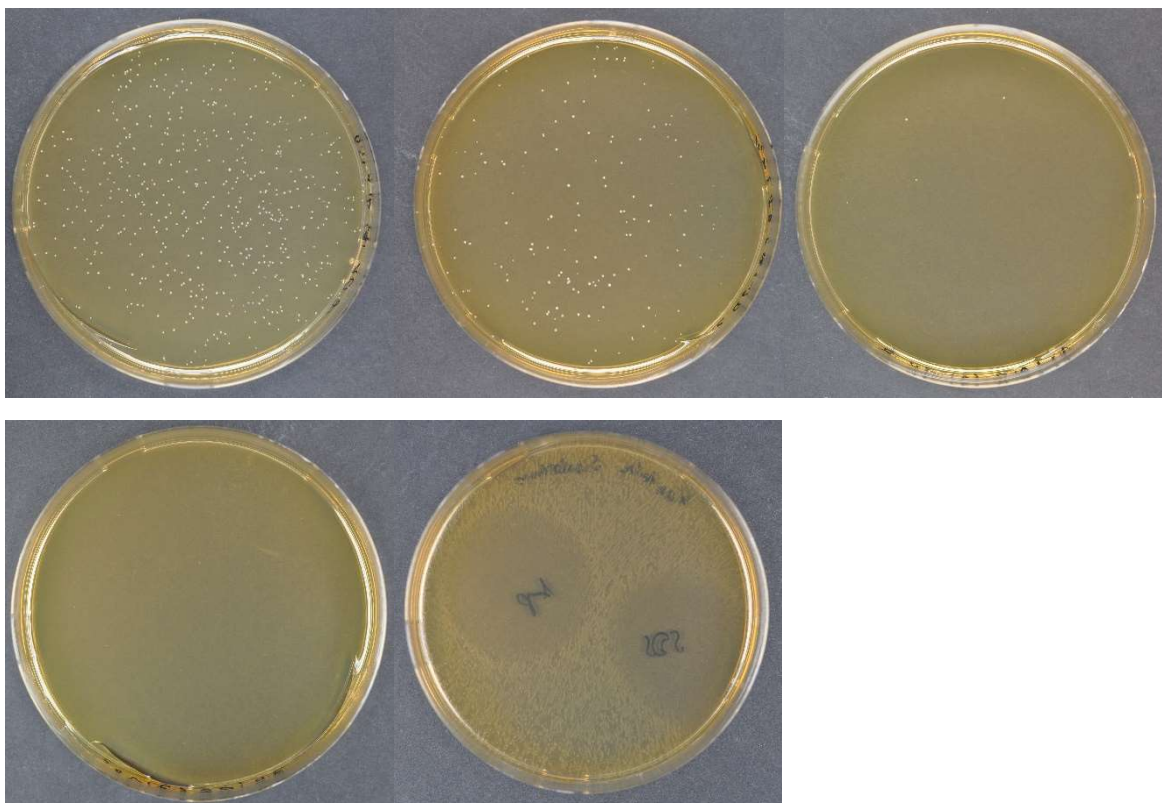
Die Kurven der Temperaturmessungen bei einer  $OD_{600}$  0,25 entsprechen in deren Verlauf denen der vorherigen Graphen bei  $OD_{600}$  1,0 und 0,5. Es besteht eine vollständige Dekontamination bei 80°C. Lediglich *S. salivarius* weist Restpopulationen im Promillebereich verglichen mit der Ausgangskonzentration bei 20°C auf. Die Bakterienzahl/mL fällt bei *S. sobrinus* mit steigender Temperaturbelastung annähernd linear ab, während *E. faecalis* bei 60°C einen Anstieg seiner Bakterienzahl/mL erfährt. *S. sobrinus* weist zwischen 40°C und 60°C ein gleichbleibendes Konzentrationsniveau auf. Bei 80°C liegt eine vollständige Dekontamination vor.

### 3.2.2 Wachstumsverhalten bei Laserbestrahlung

Die Versuche unter Bestrahlung mit der Wellenlänge von 445 nm wurden mit n=6 durchgeführt. Die Ansätze mit der Wellenlänge von 810 nm fanden lediglich mit n=4 statt, da Effekte auf das Bakterienwachstum ausblieben (Abb. 30). Das weitere Vorgehen erfolgte wie in UA 2.2.4 erläutert.

#### 3.2.2.1 *S. sobrinus*

Eine exemplarische Darstellung der ausgezählten Platten des Versuches vom 09.08.2018 bei Bestrahlung mit Bare-Faser und 445 nm Wellenlänge zeigt Abb. 29. Auf Abbildungen der Platten der Ansätze mit Bulb-Faser (445 nm) und Bare-Faser (810 nm) wird aus Übersichtlichkeitsgründen verzichtet.



**Abb. 29:** Exemplarische Darstellung der ausgezählten Kolonien von *S. sobrinus* des Versuches vom 09.08.2018 mit einer bestrahlten Wellenlänge von 445 nm (Bare-Faser) und 48 h Inkubationszeit. Die gezeigten Kolonien stammen aus Verdünnungen von  $10^2$  mit einer  $OD_{600}$  von 1,0. Oben (von links nach rechts): Laserbestrahlung bei 0,5 W; 1,0 W und 1,5 W; Unten (von links nach rechts): Laserbestrahlung bei 2,0 W; Positive Kontrolle (siehe Hemmhoftbildung) mit Ampicillin [25 mg/mL] und SDS [10 %].

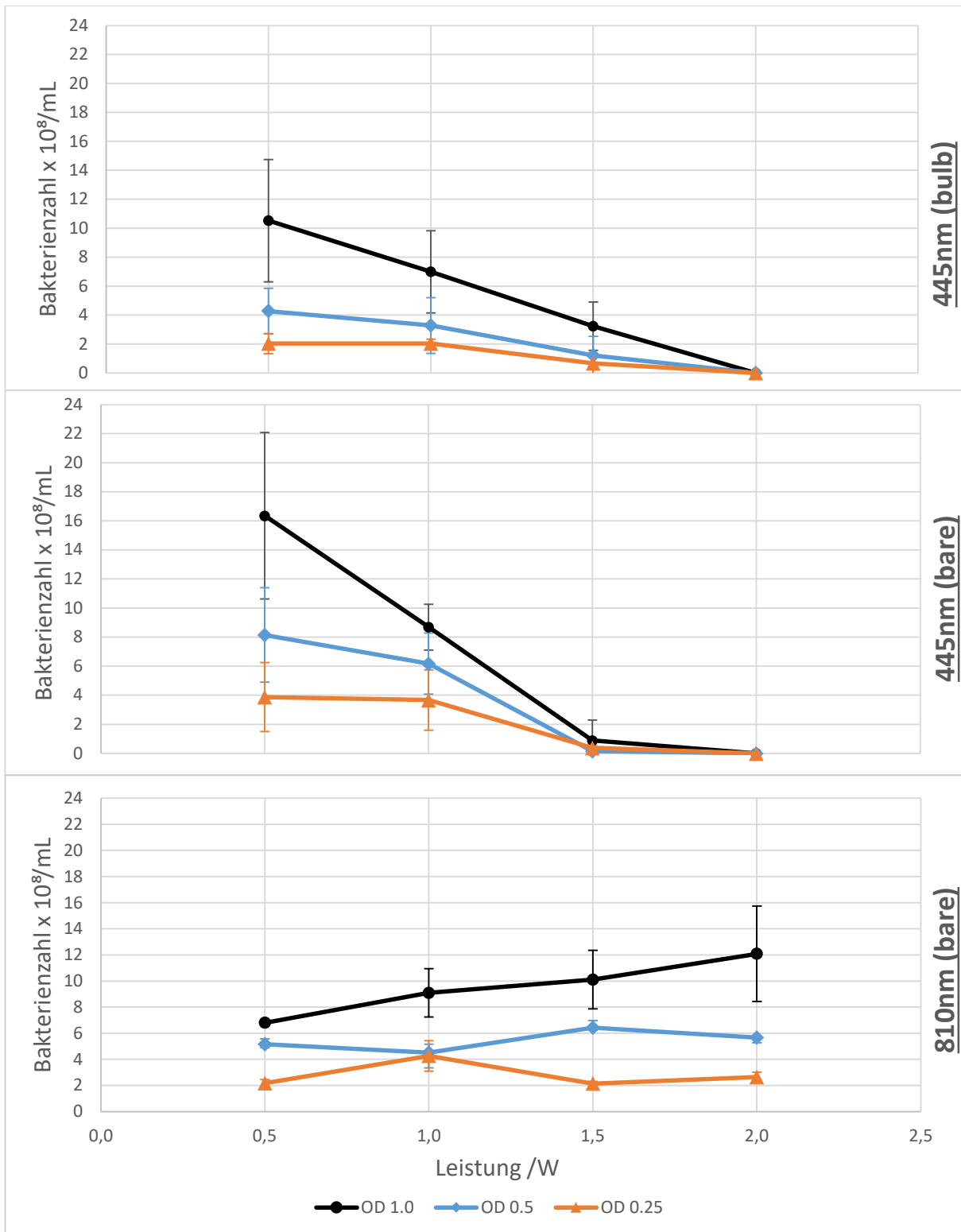
Hier zeigte sich, dass bei einer Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 445 nm für 20 s und Benutzung der Bare-Faser eine deutliche Bakterienreduktion ab 1,5 W Leistung auftrat. Anhand der Wachstumskurven kann nun die Wachstumsrate und der Effekt der Laserbestrahlung (20 s; 445 nm/810 nm; Bare- und Bulb-Faser) auf das Wachstum von *S. sobrinus* untersucht werden (Abb. 30).

Es fällt auf, dass es bei der Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 445 nm zu einer kontinuierlichen Reduktion des Bakterienwachstums bei ansteigender Laserleistung kommt.

Die Kurven mit einer  $OD_{600}$  1,0; 0,5 und 0,25 verlaufen bei Verwendung der Bulb-Faser (445 nm) annähernd linear abfallend. Mit absteigender  $OD_{600}$  sinkt die Ausgangskonzentration und somit auch die Steigung der Graphen. Bei 1,5 W kommt es unter Bestrahlung mit der Bulb-Faser (445 nm) zu einer deutlichen Keimreduktion und bei 2,0 W zu einer fast vollständigen Dekontamination.

Unter Verwendung der Bare-Faser mit der Wellenlänge (445 nm) fällt die Keimreduktion bei 1,5 W deutlich stärker aus. Bei allen untersuchten optischen Dichten kommt es im Vergleich zu der Bakterienzahl/mL bei 1,0 W zu einer Keimreduktion um mindestens 90% bei 1,5 W. Eine fast vollständige Dekontamination wird bei 2,0 W Laserleistung erreicht.

Bei einer Wellenlänge von 810 nm kommt es zu keinen keimreduzierenden Effekten. Der Graph bei einer  $OD_{600}$  1,0 zeigt ein Ansteigen der ausgezählten Mittelwerte und deren Standardabweichung mit zunehmender Laserleistung. Die Graphen der  $OD_{600}$  0,5 und 0,25 weisen geringe Schwankungen der Bakterienkonzentration auf. Die Bakterienzahl/mL bleibt unabhängig von der applizierten Laserleistung annähernd konstant.

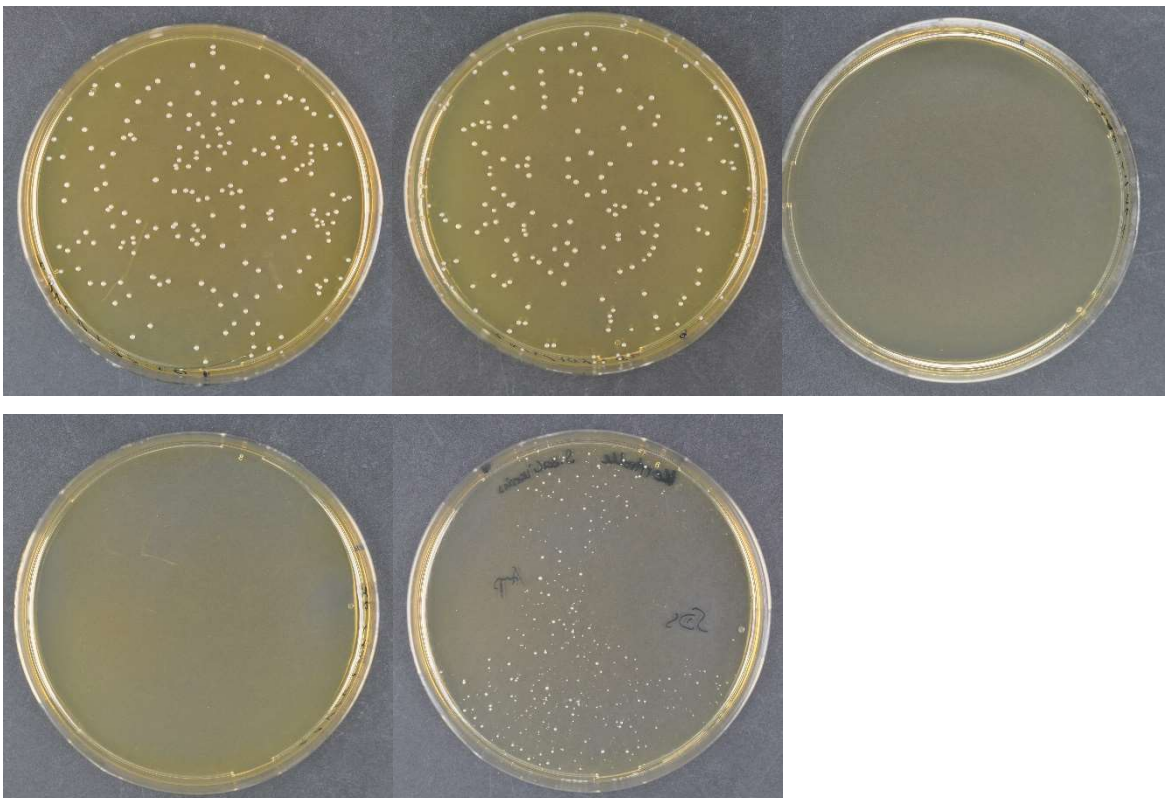


**Abb. 30:** Graphische Darstellung des Wachstumsverhaltens von *S. sobrinus* unter Laserbestrahlung bei ansteigender Laserleistung (0,5 W, 1,0 W, 1,5 W, 2,0 W), unterschiedlichen Wellenlängen und Fasertypen (445 nm + Bulb / 445 nm + Bare / 810 nm + Bare), sowie den OD<sub>600</sub> von 1,0; 0,5; 0,25. Auf Darstellung der ermittelten Bakterienzahl/mL wurde aus Übersichtlichkeitsgründen verzichtet.



### 3.2.2.2 *S. salivarius*

Eine exemplarische Darstellung der ausgezählten Platten des Versuches vom 25.07.2018 bei Bestrahlung mit der Bare-Faser unter 445 nm Wellenlänge zeigt Abb. 31. Auf Abbildungen der Platten der Ansätze mit Bulb-Faser (445 nm) und Bare-Faser (810 nm) wird aus Übersichtlichkeitsgründen verzichtet.



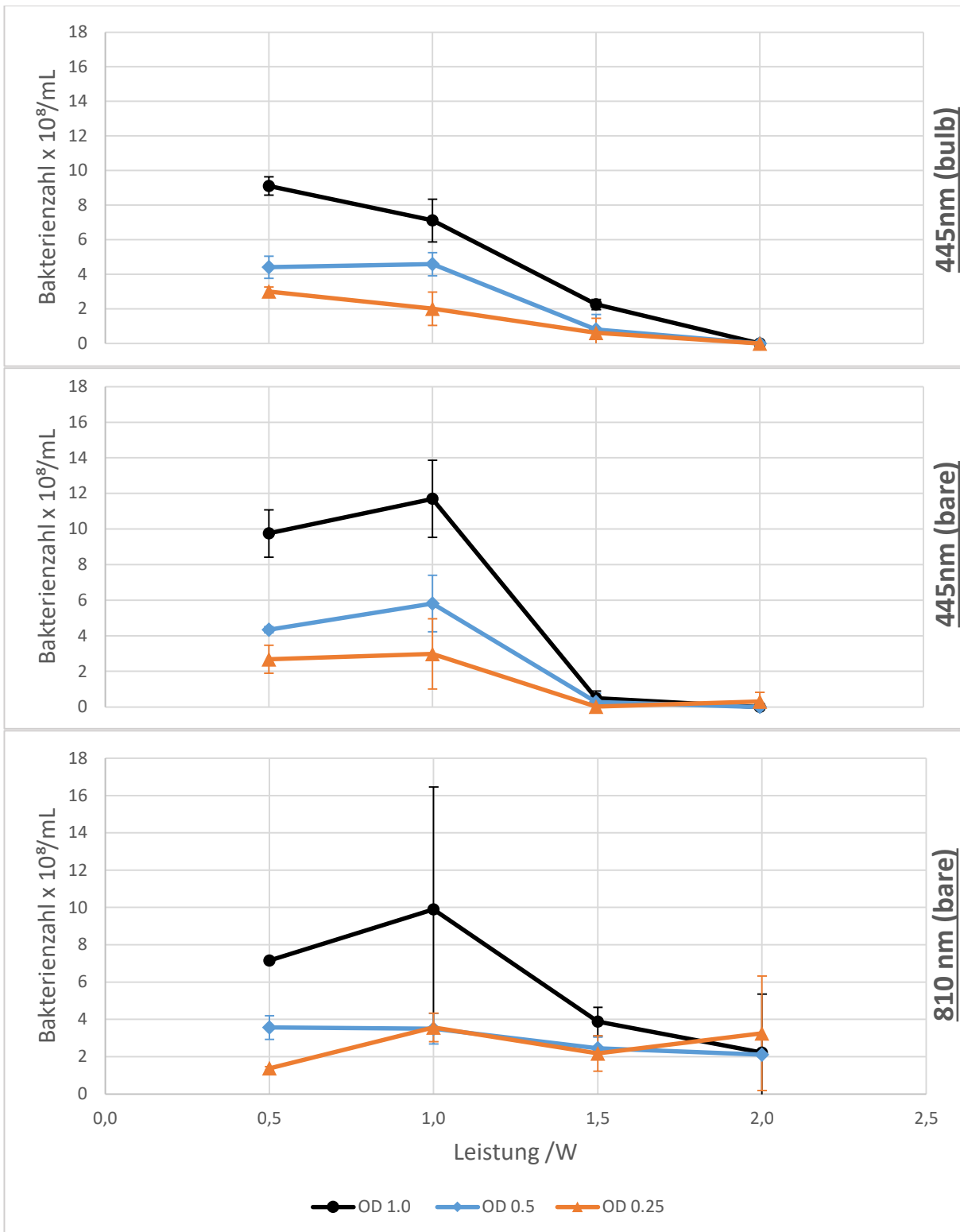
**Abb. 31:** Exemplarische Darstellung der ausgezählten Kolonien von *S. salivarius* des Versuches vom 25.07.2018 mit einer Wellenlänge von 445 nm (Bare-Faser) und 24 h Inkubationszeit. Die gezeigten Kolonien stammen aus Verdünnungen von  $10^2$  mit einer  $OD_{600}$  von 1,0. Oben (von links nach rechts): Laserbestrahlung bei 0,5 W; 1,0 W und 1,5 W; Unten (von links nach rechts): Laserbestrahlung bei 2,0 W; Positive Kontrolle (siehe Hemmhofbildung) mit Ampicillin [25 mg/mL] und SDS [10 %].

Abb. 31 verdeutlicht, dass bei einer Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 445 nm für 20 s und Benutzung der Bare-Faser eine vollständige Bakterienreduktion schon ab 1,5 W Leistung eintritt. Nur vereinzelt konnten in den weiteren Ansätzen noch Kolonien nachgewiesen werden.

Die Wachstumsraten für *S. salivarius* weisen, ähnlich wie die von *S. sobrinus*, kontinuierliche Reduktionen der auszählbaren Bakterien/mL bei ansteigender Laserleistung auf (Abb. 32). Es zeigen sich ab 1,5 W deutliche Inhibitionseffekte auf das Bakterienwachstum bei der Wellenlänge von 445 nm (bulb/bare).

Auffällig ist ein Anstieg der Bakterienkonzentration bei der Bestrahlung mit der Bare-Faser bei 445 nm und 1,0 W. Dieser Anstieg zeigt sich bei allen untersuchten optischen Dichten ( $OD_{600}$  1,0; 0,5; 0,25). Es folgt eine deutliche Reduktion der Bakterienzahl/mL bei 1,5 W Laserleistung ( $OD_{600}$  1,0 – 0,25) um mindestens 95% der bei 1,0 W gemessenen Konzentrationen. Bei Verwendung der Bare- und Bulb-Faser kommt es bei einer Wellenlänge von 445 nm bei 2,0 W zu einer fast vollständigen Dekontamination.

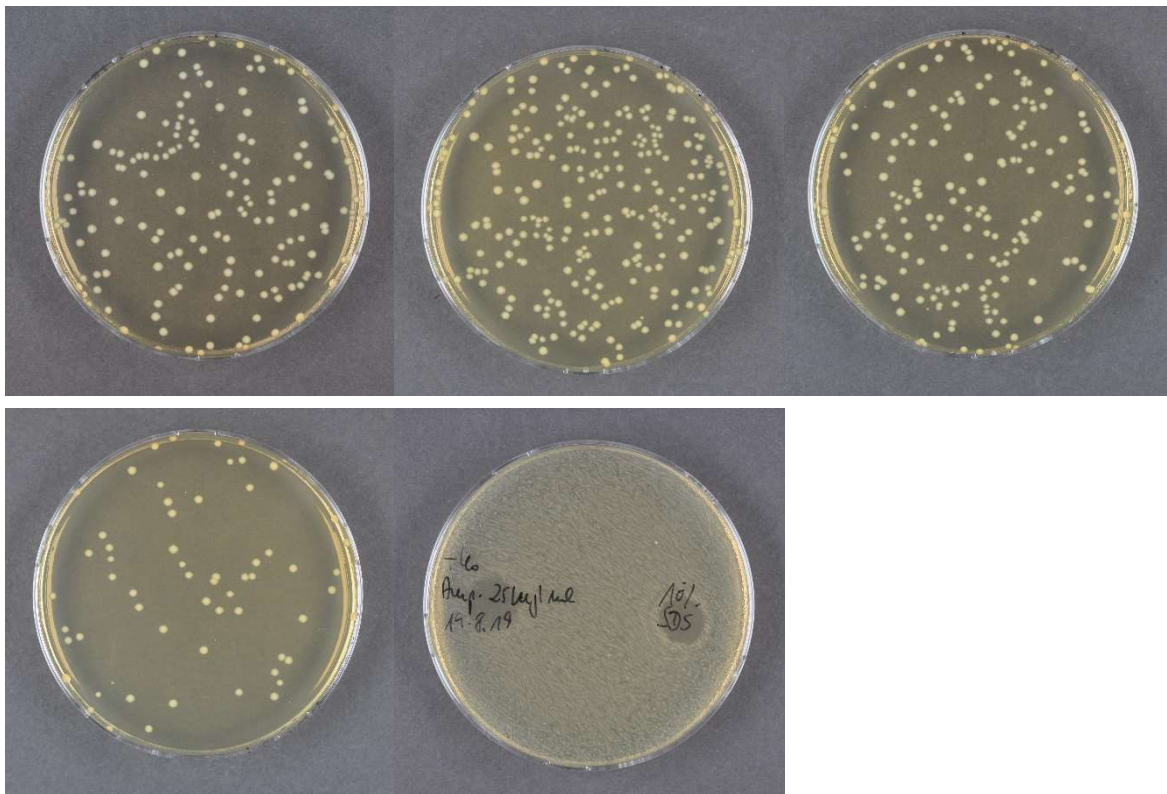
Bei der Wellenlänge von 810 nm kommt es zu keiner Dekontamination im untersuchten Leistungsspektrum. Die Bakterienzahl/mL schwankt je nach Versuchsansatz, bleibt jedoch im Mittel bei allen untersuchten optischen Dichten ( $OD_{600}$  1,0; 0,5; 0,25) auf einem ähnlichen Niveau. Bei einer  $OD_{600}$  0,25 zeigt sich im Mittel ein geringfügiges Wachstum der Bakterien.



**Abb. 32:** Graphische Darstellung des Wachstumsverhaltens von *S. salivarius* unter Laserbestrahlung bei ansteigender Laserleistung (0,5 W, 1,0 W, 1,5 W, 2,0 W), unterschiedlichen Wellenlängen und Fasertypen (445 nm + Bulb / 445 nm + Bare / 810 nm + Bare), sowie den OD<sub>600</sub> von 1,0; 0,5; 0,25. Auf Darstellung der im Vorhinein ermittelten Bakterienzahl/mL wurde aus Übersichtlichkeitsgründen verzichtet.

### 3.2.2.3 *E. faecalis*

Eine exemplarische Darstellung der ausgezählten Platten des Versuches vom 20.08.2019 bei Bestrahlung mit der Bare-Faser unter 445 nm Wellenlänge zeigt Abb. 33. Auf Abbildungen der Platten der Ansätze mit Bulb-Faser (445 nm) und Bare-Faser (810 nm) wird aus Übersichtlichkeitsgründen verzichtet.

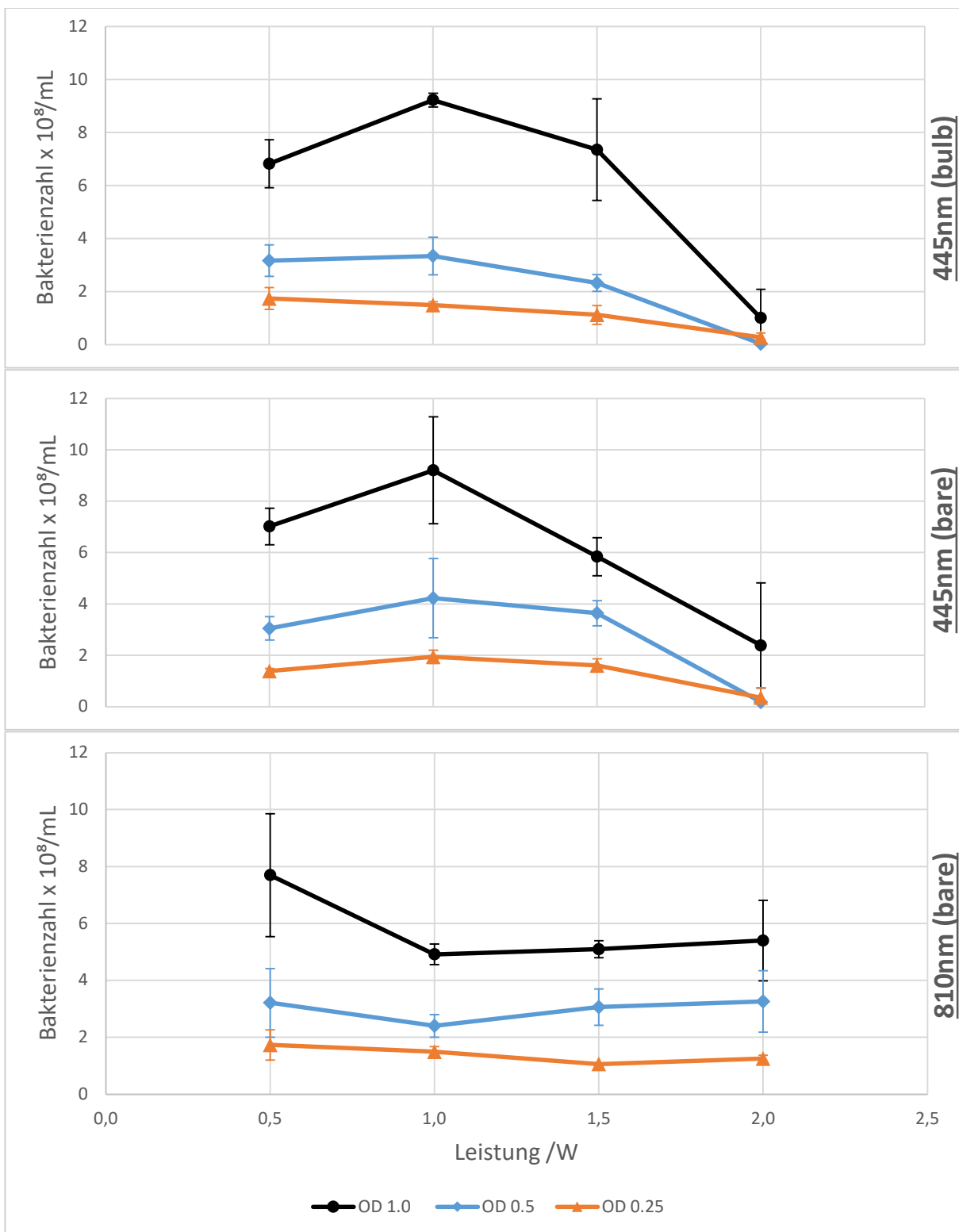


**Abb. 33:** Exemplarische Darstellung der ausgezählten Kolonien von *E. faecalis* des Versuches vom 20.08.2019 mit einer Wellenlänge von 445 nm (Bare-Faser) und 24 h Inkubationszeit. Die gezeigten Kolonien stammen aus Verdünnungen von  $10^2$  mit einer  $OD_{600}$  von 1,0. Oben (von links nach rechts): Laserbestrahlung bei 0,5 W; 1,0 W und 1,5 W; Unten (von links nach rechts): Laserbestrahlung bei 2,0 W; Positive Kontrolle (siehe Hemmhofbildung) mit Ampicillin [25 mg/mL] und SDS [10 %].

Bei der Bestrahlung mit 445 nm für 20 s und Benutzung der Bare-Faser zeigte sich im Vergleich zu *S. sobrinus* und *S. salivarius* eine deutlich geringere Bakterienreduktion (Abb. 34). Erst ab 2,0 W Leistung sind die inhibierenden Effekte der Laserbestrahlung auf das Wachstum erkennbar.

Beide Kurven der OD<sub>600</sub> 1,0 zeigen nach einem Wachstum der Population bei 1,0 W einen Abfall der Bakterienzahl/mL von  $9,23 \times 10^8$  bei 1,0 W auf  $1,0 \times 10^8$  (bulb) und  $9,2 \times 10^8$  bei 1,0 W auf  $2,39 \times 10^8$  (bare) bei je 2,0 W. Bei OD<sub>600</sub> 0,5 und 0,25 fallen die ausgezählten Werte bei 2,0 W auf annähernd 0.

Bei der Wellenlänge 810 nm zeigen sich keine Effekte der Laserbestrahlung auf das Wachstum der Bakterien. In den drei untersuchten Suspensionen (OD<sub>600</sub> 1,0; 0,5; 0,25) kommt es zu keiner deutlichen Abnahme der Bakterienzahl/mL bei ansteigender Laserleistung. Lediglich bei OD<sub>600</sub> 1,0 kommt es zwischen 0,5 W und 1,0 W zu einer geringen Abnahme der Bakterienkonzentration. Alle weiteren gemessenen Werte bei 1,5 W und 2,0 W bewegen sich auf einem gleichbleibenden Niveau.



**Abb. 34:** Graphische Darstellung des Wachstumsverhaltens von *E. faecalis* unter Laserbestrahlung bei ansteigender Laserleistung (0,5 W, 1,0 W, 1,5 W, 2,0 W), unterschiedlichen Wellenlängen und Fasern (445 nm + Bulb / 445 nm + Bare / 810 nm + Bare), sowie den OD<sub>600</sub> von 1,0; 0,5; 0,25. Auf Darstellung der im Vorhinein ermittelten Bakterienzahl/mL wurde aus Übersichtlichkeitsgründen verzichtet.

### 3.2.2.4 Vergleich des Wachstumsverhaltens aller untersuchten Mikroorganismen nach Laserbestrahlung

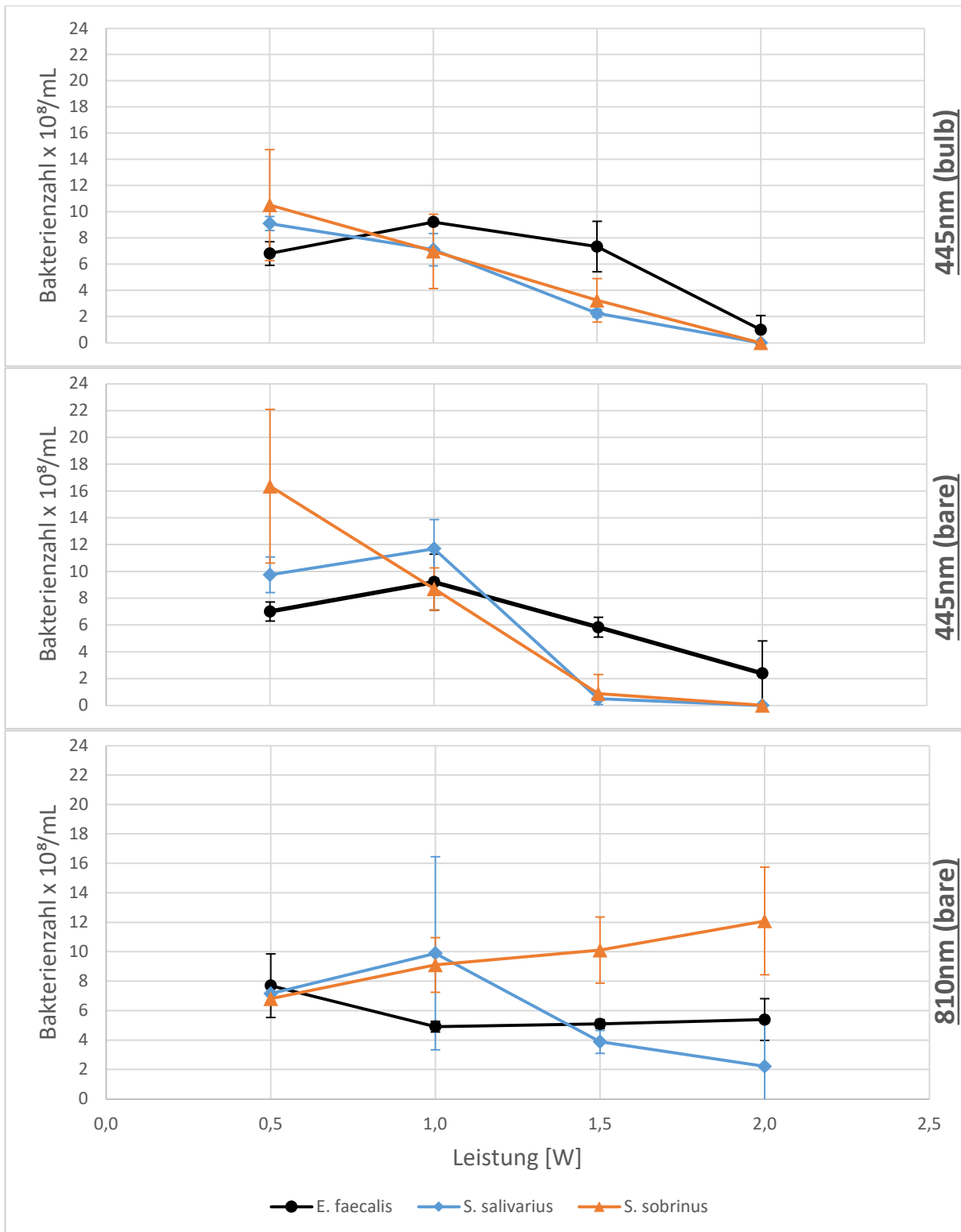
Im Folgenden wurde das Wachstum der unterschiedlichen Bakterienstämme miteinander verglichen und graphisch dargestellt (Abb. 35).

Es wurden die jeweiligen Mittelwerte der drei untersuchten Teststämme exemplarisch bei einer  $OD_{600}$  1,0 nach Laserbestrahlung (0,5 W, 1,0 W, 1,5 W, 2,0 W) in drei Graphen den jeweilig angewandten Wellenlängen und Fasern entsprechend dargestellt.

Bei 445 nm (bulb / bare) fällt auf, dass die Graphen von *S. salivarius* und *S. sanguinis* annähernd kongruent verlaufen. Es kommt bei beiden Bakterienstämmen zu einer erheblichen Keimreduktion bei 1,5 W und einer letztendlich fast vollständigen Dekontamination bei 2,0 W. *E. faecalis* dagegen zeigt bei einer Laserleistung von 1,0 W ein leichtes Wachstum. Anschließend erfolgt eine Reduktion der Population bei steigender Leistung (1,5 W; 2,0 W). Allerdings tritt im Gegensatz zu den beiden anderen Teststämmen (*S. salivarius* / *S. sobrinus*) keine Dekontamination bei 2,0 W ein. Es waren noch immer cfu's bei 2,0 W ( $OD_{600}$  1,0) auszählbar. Unterschiede zwischen Bare- und Bulb-Faser bestehen insoweit, dass die keimreduzierenden Eigenschaften bei 1,5 W unter Verwendung der Bare-Faser stärker ausfallen als bei Verwendung der Bulb-Faser. Es tritt schon bei 1,5 W Laserleistung unter Verwendung der Bare-Faser eine fast vollständige Dekontamination auf. Die Graphen von *S. salivarius* und *S. sobrinus* verlaufen bei Verwendung der Bulb-Faser nahezu linear absteigend.

Die Graphen der Wellenlänge 810 nm zeigen keine dekontaminierenden Effekte unter Laserbestrahlung. Unabhängig von der Laserleistung verlaufen die Graphen von *E. faecalis* und *S. sobrinus* in einem Seitwärtstrend. Im Mittel scheint es sogar zu einem Wachstum der Bakterienzahl/mL bei *S. sobrinus* zu kommen. Die Messungenauigkeiten steigen jedoch ebenfalls mit der applizierten Laserleistung. Lediglich die Laserbestrahlung mit einer Wellenlänge von 810 nm weist bei *S. salivarius* bei einer  $OD_{600}$  1,0 geringfügige keimreduzierende Effekte auf.

Es folgt die graphische Darstellung des Wachstumsverhaltens der untersuchten Bakterienstämme bei Bestrahlung verschiedener Wellenlängen (445 nm / 810 nm) und Fasern (bare / bulb).



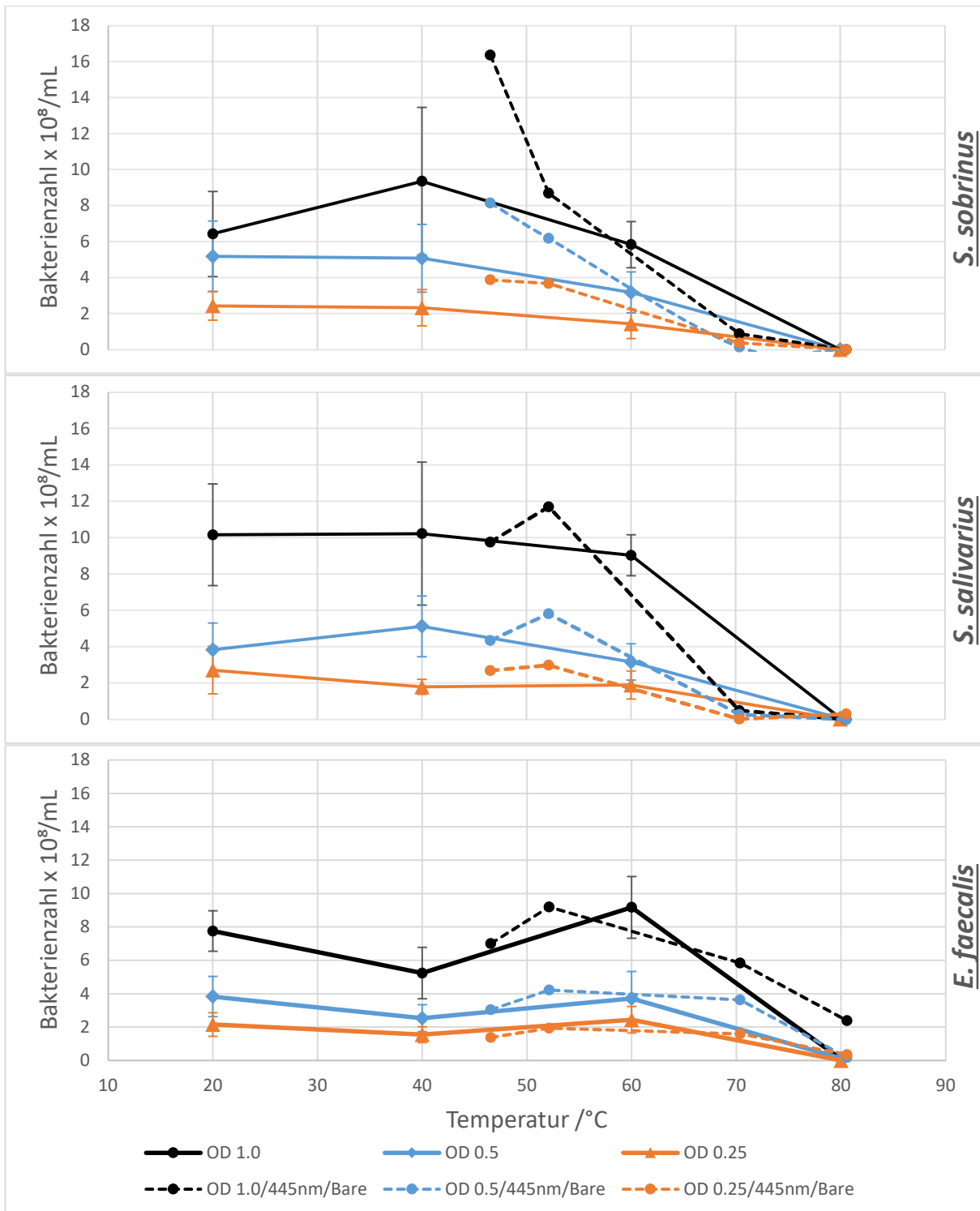
**Abb. 35:** Vergleichende graphische Darstellung der Mittelwerte für die Laserversuche aller Teststämme (*E. faecalis*, *S. salivarius* und *S. sobrinus*). Es wurden exemplarisch die Mittelwerte der Bakterienzahl/mL bei der optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) 1,0 für die Laserleistungen 0,5 W; 1,0 W; 1,5 W; 2,0 W dargestellt.



### 3.2.3 Gegenüberstellung der thermischen Effekte auf Mikroorganismen bei Temperaturbelastung und Laserbestrahlung

Im Folgenden wurden die bei Laserbestrahlung ermittelten Bakterienzahlen/mL in die Graphen der Thermoversuche eingefügt, um Rückschlüsse auf nicht temperaturbezogene, bakterienreduzierende Eigenschaften der Laserstrahlung ziehen zu können (Abb. 36). Es wurden die bei jeweiligen Laserleistungen (0,5 W, 1,0 W, 1,5 W, 2,0 W) in den Versuchen zur Messung der Temperaturentwicklung (Abschnitt 3.1) ermittelten Maximaltemperaturen im BHI-Medium + *S. salivarius* verwendet (Abb. 18). *S. salivarius* stellt exemplarisch einen Bakterienzusatz im BHI-Medium dar. Die gemessenen Maximaltemperaturen lagen im Mittel bei 46,54°C (0,5 W), 52,11°C (1,0 W), 70,35°C (1,5 W) und 80,57°C (2,0 W). Die angewandte Wellenlänge lag bei 445 nm unter Benutzung der Bare-Faser. Die Bare-Faser wurde exemplarisch verwendet, da bei Benutzung von Bare- und Bulb Faser nur geringfügige Unterschiede der bakterienreduzierenden Eigenschaften bestehen. Bei Bestrahlung mit 810 nm ist kein dekontaminierender Effekt bei Laserbestrahlung nachweisbar, daher entfällt eine graphische Gegenüberstellung.

Alle drei Bakterienstämme zeigten einen ähnlichen Kurvenverlauf bei Laserbestrahlung im Vergleich zur ausschließlichen Temperaturbelastung. Die Bakterienzahlen/mL aller optischen Dichten fallen bei *S. salivarius* und *S. sobrinus* erst ab einer Temperatur von ca. 60°C unter die der Graphen der Temperaturbelastung. Bei *E. faecalis* bewegen sich die bei Laserbestrahlung ermittelten Bakterienzahlen/mL im Schnitt bei allen untersuchten optischen Dichten über der jeweiligen Bakterienkonzentration der Temperaturversuche.



**Abb. 36:** Vergleichende graphische Darstellung der Temperatur- und Laserversuche (445 nm/Bare-Faser; Mittelwerte bei OD<sub>600</sub> 1,0; 0,5; 0,25) aller Teststämme (*E. faecalis*, *S. salivarius* und *S. sobrinus*). Die durchgezogenen Linien stellen die jeweiligen Bakterienzahlen/mL bei alleiniger Temperaturbelastung und die gestrichelten Linien bei Laserbestrahlung dar. Bei den Laserversuchen wurde aus Übersichtlichkeit auf Darstellung der Standardabweichung verzichtet.

### 3.3 Untersuchung des Wachstumsverhaltens humaner Zellsysteme (THP-1) nach Wärmeeinwirkung und Laserbestrahlung

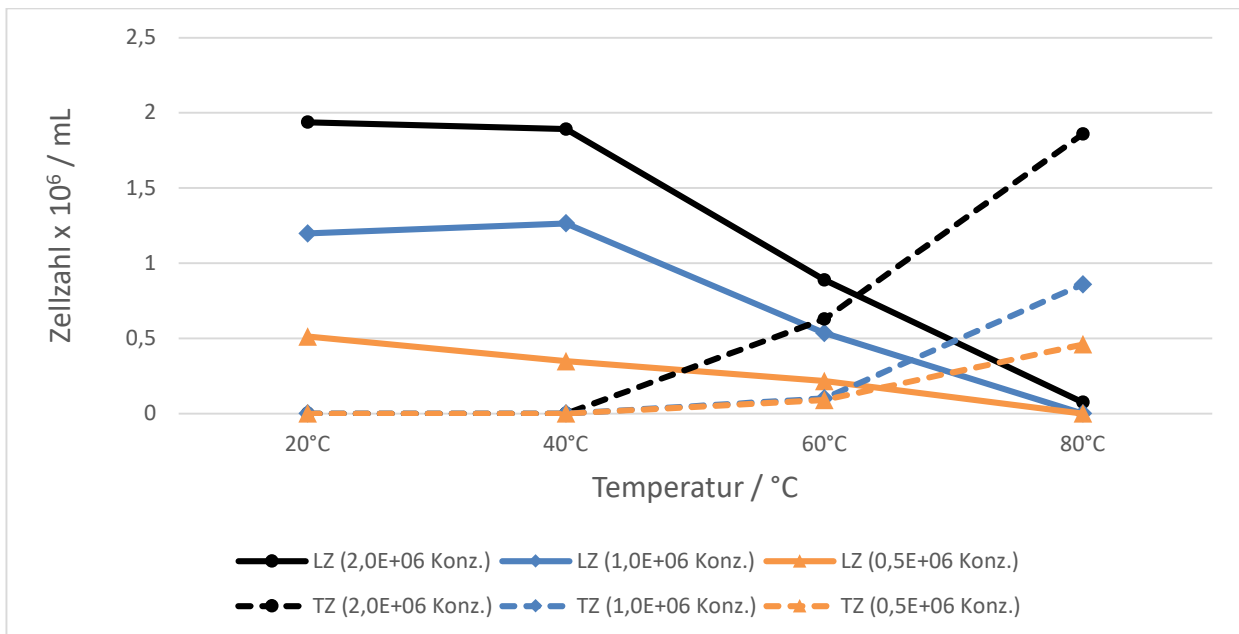
#### 3.3.1 Wärmeeinwirkung

Die Untersuchung des Wachstumsverhaltens der humanen THP-1 Zellen in RPMI-Medium nach Temperaturbelastung erfolgte wie in UA 2.2.2.4 beschrieben.

Der Versuch wurde im Doppelansatz (n=2) durchgeführt. Folgende Ausgangskonzentrationen wurden untersucht:

- $2,0 \times 10^6$  Zellen/mL
- $1,0 \times 10^6$  Zellen/mL
- $0,5 \times 10^6$  Zellen/mL

Es folgt eine graphische Darstellung der absoluten Zellzahl/mL lebender und toter THP-1 Zellen nach Temperaturbelastung (Abb. 37).



**Abb. 37:** Graphische Darstellung lebender und toter Zellen/mL (LZ/TZ) nach Temperaturbelastung (20°C, 40°C, 60°C, 80°C) bei unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen. Die durchgezogenen Linien stellen die Zellzahl/mL der lebenden, die gestrichelten Linien die der toten Zellen dar. Auf Standardabweichungen wurde aus Übersichtlichkeitsgründen verzichtet.

Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der Zellzahl/mL im Temperaturintervall zwischen 40°C und 80°C. Bei 80°C kommt es bei einer Ausgangskonzentration von 1,0 und 0,5 x 10<sup>6</sup> Zellen/mL zu einer vollständigen Nekrose der vorhandenen Zellen, es waren ausschließlich tote Zellen auszählbar. Bei einer Konzentration von 2,0 x 10<sup>6</sup> Zellen/mL ließen sich bei einer Temperaturbelastung mit 80°C noch vereinzelt lebende Zellen erkennen.

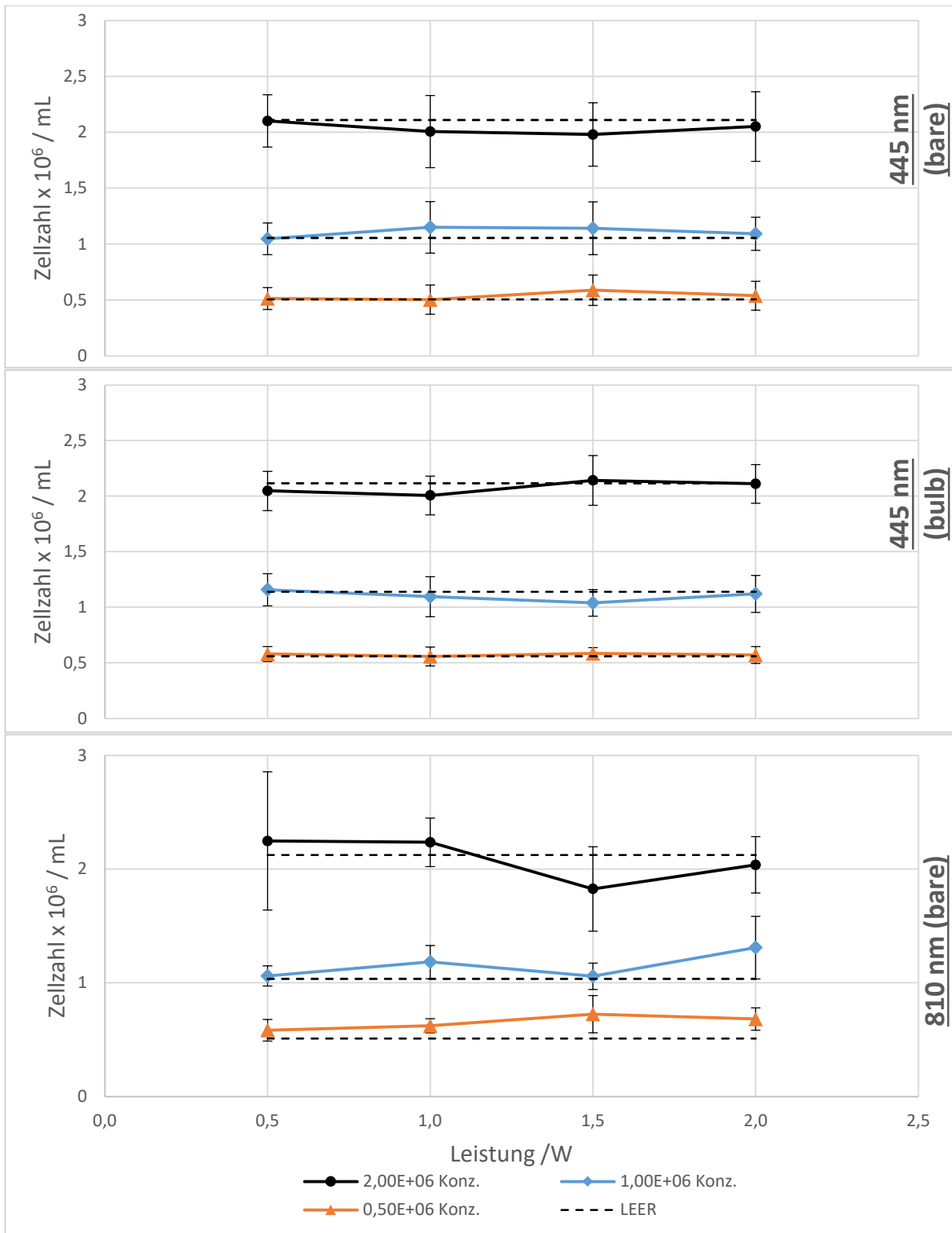
Die Graphen der toten Zellen (TZ) zeigen antiproportionales Verhalten zu den Graphen der lebenden Zellen (LZ). Es kommt ab 40°C zu einem Anstieg der absoluten Anzahl toter Zellen/mL.

Nach Auszählung wurden die Zellen der mit 80°C belasteten Suspensionen resuspendiert, um festzustellen, ob Restwachstum stattfand. Nach weiteren 24 h Inkubation konnte ein Restwachstum ausgeschlossen werden.

### **3.3.2 Laserbestrahlung**

Die Untersuchung des Wachstumsverhaltens der humanen THP-1 Zellen in RPMI-Medium nach Laserbestrahlung erfolgte wie in UA 2.2.4.2 beschrieben. Unter dem Mikroskop fand eine Zählung lebender Zellen (LZ) und toter Zellen (TZ) statt.

Es folgt eine graphische Darstellung der absoluten Zellzahl/mL lebender THP-1 Zellen nach Laserbestrahlung (445 nm + Bulb/Bare; 810 nm + Bare) (Abb. 38).



**Abb. 38:** Graphische Darstellung der lebenden Zellen/mL nach Laserbestrahlung (0,5 W, 1,0 W, 1,5 W, 2,0 W) mit den Wellenlängen 445 nm und 810 nm unter Verwendung aller Fasertypen. Die dünn gestrichelten Linien stellen die im Voraus gemessenen Mittelwerte der Zellen/mL der nicht bestrahlten Suspension dar.

Die Graphen zeigen unabhängig von der Laserleistung, der Wellenlänge oder der verwendeten Fasertypen eine ausbleibende Reduktion der Zellen/mL. Die Zellkonzentration der lebenden THP-1 Zellen bleibt in allen drei untersuchten Konzentrationen bei einer bestrahlten Wellenlänge von 445 nm und 810 nm gleich. Die jeweiligen Leerwerte der nicht bestrahlten Suspensionen entsprechen der gemessenen Zellzahl/mL nach Bestrahlung der Medien. Des weiteren besteht keine nennenswerte Diskrepanz zwischen ausgezählten toten Zellen vor und nach Bestrahlung. Deren relativer Anteil an der Gesamtzellzahl bewegt sich in allen drei Versuchsansätzen zwischen 0,5 – 2 %, unabhängig von einer vorher stattgefundenen Laserbestrahlung.

## 4. Diskussion

### 4.1 Methodenkritik

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss thermischer Effekte auf Mikroorganismen (*S. salivarius*, *S. sobrinus*, *E. faecalis*) und humanen Zellkulturen (THP-1) *in vitro* untersucht und verglichen, ob eine Korrelation zu den thermischen laserinduzierten Effekten unter Laserbestrahlung besteht.

Vorversuche dienten der Ermittlung von bei Laserbestrahlung entstehenden Temperaturen in den jeweilig verwendeten Medien (BHI-Broth / RPMI). Die Messungen fanden mit einer Thermographiekamera statt. Schmidt verglich und validierte die Ergebnisse der Thermographiekamera mit den direkt gemessenen Temperaturen über eine Thermocouple. Es zeigte sich, dass die mit der Thermographiekamera gemessenen Werte mit denen der Thermocouple vergleichbar sind. Der Versuchsaufbau war identisch mit dem in dieser Arbeit verwendetem Aufbau (Schmidt, 2018).

Für die Thermoversuche wurde das Modellsystem des Thermocyclers gewählt, da dieses Gerät durch eine Temperatursteigerung von 4°C/Sekunde und eine maximale Abkühlgeschwindigkeit von 3°C/Sekunde eine möglichst schnelle und lineare Temperaturerhöhung auf einen vorher eingestellten Sollwert zulässt. Das Verfahren lief automatisiert ab, damit eine entsprechende Probenzahl untersucht werden konnte. Kleine Probenvolumina ermöglichten ein entsprechend schnelles Erreichen der Solltemperatur.

Die aerobe Kultivierung bei 37°C aus einer Kryokultur der untersuchten Mikroorganismen in Brain-Heart-Infusion-Bouillon stellt ein anerkanntes, in zahlreichen Publikationen validiertes mikrobiologisches Verfahren dar (Pichhardt, 1984; Lee, 2013; Xia et al., 1993; Seth, 1970; Torres et al., 2017).

Ein im Rahmen der Laserversuche identischer Versuchsaufbau ermöglicht eine objektive Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Es mussten lediglich zwischen den verschiedenen Versuchsreihen die Lasersysteme gegeneinander ausgetauscht werden. Das auf einer sterilen Bank justierte Halte- und Fixierungselement, sowie das Leistungs- und Energiemessgerät blieben in ihrer Position unverändert, sodass für beide Lasersysteme (445 + 810 nm) gleiche Versuchsbedingungen gegeben waren. Vor jedem

Bestrahlungsdurchlauf erfolgte die Kalibrierung der eingestellten Sollleistung des Lasers und der tatsächlich emittierten Leistung. Zudem wurde die Eintauchtiefe der Laserfaserspitze in das Medium vor jeder Bestrahlung überprüft, um eine vergleichbare Lichtverteilung der emittierten Strahlen zu gewährleisten. Darüber hinaus erfolgte die Bestrahlung in allen Fällen bei konstanter, durch die Klimaanlage determinierter Umgebungstemperatur von 21°C. Die Ergebnisse der optischen Dekontamination mit den beiden Lasern sind vor dem Hintergrund identischer äußerer Einflüsse zu sehen. Ein objektiver Vergleich zwischen beiden Lasersystemen und unterschiedlichen Fasertypen ist also möglich.

Um Rückschlüsse auf etwaige thermische Schädigung umliegender Gewebsstrukturen ziehen zu können, wurde eine Bestrahlung sowie eine solitäre thermische Belastung von humanen Suspensionszellen (THP-1) veranlasst. Insbesondere sollte eine Abgrenzung von zytotoxischen Effekten durch Temperaturerhöhung zu möglicherweise stattfindenden phototoxischen Prozessen durch Laserbestrahlung stattfinden. Allgemein weisen THP-1 - Zellen Merkmale von Monozyten auf, so zum Beispiel die Fähigkeit zur Phagozytose und die Produktion von Lysozymen. Die Zellen wachsen in Suspension und bilden zum Teil lockere Anhäufungen (Gallauner, 2009). In den Versuchen fanden die THP-1 Zellen Anwendung auf Grund der guten Kultivierbarkeit und einer einfachen mikroskopischen Quantifizierung toter und lebender Zellen. Ob der oralen Histologie bliebe eine zusätzliche Untersuchung mit adhärennten Zellen zu diskutieren und sollte Gegenstand weiterer Forschung darstellen.

## **4.2 Bewertung der Ergebnisse und Literaturvergleich**

Die Temperaturentwicklung der Bakteriensuspension bei Laserbestrahlung zeigt, dass es unabhängig von der eingestellten optischen Dichte zu vergleichbaren Temperaturentwicklungen in Abhängigkeit von der eingestellten Leistung kommt. Folglich hat die optische Dichte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Temperaturentwicklung innerhalb der Bakteriensuspension.

Deutliche Temperatureffekte waren lediglich bei einer Wellenlänge von 445 nm erkennbar. Während das RPMI-Medium sich nicht über eine Temperatur von ca. 63°C



erwärmt, liegt das Temperaturmaximum des BHI-Mediums zwischen 80 – 90°C bei 2,0 W Laserleistung. Jedoch zeigt der Vergleich zwischen den BHI-Medien bei steigender Laserleistung deutliche Differenzen. Im BHI-Medium + Bakteriensuspension entwickelte sich im Vergleich zum BHI-Medium ohne Bakterienzusatz eine um 5° - 10° C niedrigere Temperatur. Die Bakterien scheinen also einen Teil der Wärme zu absorbieren, wodurch es zu einer geringeren Temperaturentwicklung im bestrahlten Medium kommt.

Bei Bestrahlung mit 810 nm kommt es zu wenig Wärmeentwicklung bei steigender Laserleistung (< 40°C). Die erreichten Temperaturen mit und ohne Zugabe von Bakterien unterscheiden sich kaum. Die Differenzen belaufen sich auf 1° bis 3° C. Auch das RPMI-Medium allein zeigt nur eine geringe Erwärmung. Es lässt sich vermuten, dass kaum Absorption bei Wellenlängen im Nahinfrarotbereich in den bestrahlten Medien stattfindet. Schmidt belegt diese Hypothese durch eine Spektralanalyse des BHI-Mediums. Die Extinktion nimmt bis zu einer Wellenlänge von 490 nm exponentiell ab und nähert sich mit zunehmender Wellenlänge asymptotisch gegen 0 an (Schmidt, 2018).

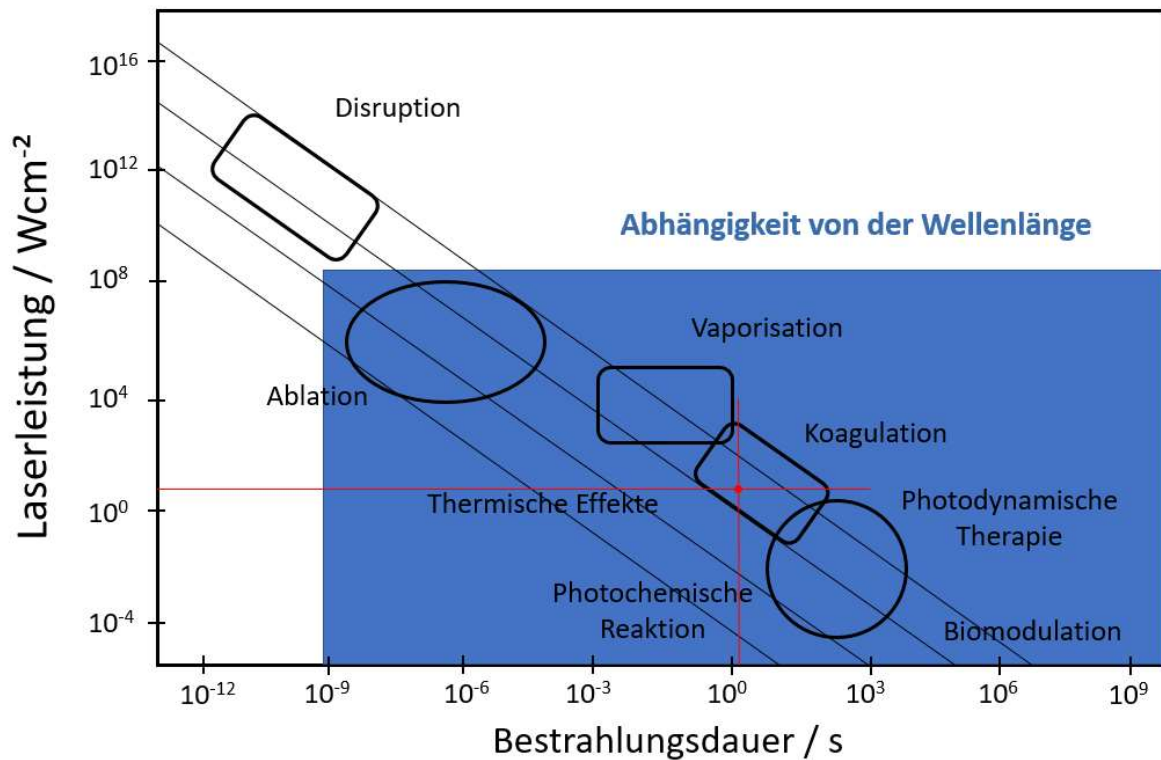
Zunächst sollen die rein thermischen Effekte auf die Mikroorganismen diskutiert werden. Aus Abb. 28 wird ersichtlich, dass es unabhängig vom bestrahlten Bakterium zu einer fast vollständigen Dekontamination zwischen 60°C und 80°C kommt. Diese Ergebnisse decken sich mit Studien der Lebensmittelindustrie, in denen eine Dekontamination von Nahrungsmitteln durch kurzzeitige Erwärmung im Rahmen einer Pasteurisierung erreicht wird. Das für eine Pasteurisierung relevante Temperaturintervall liegt zwischen 60 – 80°C (Lewis und Deeth, 2009). In einer Studie von Wills et al. aus dem Jahre 1982 zeigt sich eine vollständige Reduktion von *E. coli* und *S. aureus* bei einer Temperaturbelastung von 62,5°C über einen Zeitraum von 5 Minuten (Wills et al., 1982). Jedoch wurden in der vorliegenden Arbeit die Bakterienpopulationen über einen Zeitraum von nur 20 Sekunden erwärmt. Um nun entsprechende Dekontaminationseffekte zu erzielen, ist es erforderlich eine höhere Temperaturbelastung zu wählen. D'Aoust et al. zeigten, dass eine thermische Belastung im Bereich von 63 - 65°C für 10 - 15 Sekunden nicht immer ausreicht, um die Population der hitzebeständigeren vegetativen Bakterienpathogene signifikant zu reduzieren (D'Aoust et al., 1988; Farber et al., 1988). Studien zur Hitzeresistenz von Streptokokken beschreiben eine vollständige Keimreduktion bei 70°C für 10 Sekunden (Nevot et al., 1958). Im Allgemeinen liegen die von der International Dairy Federation

empfohlenen Kombinationen von Zeit und Temperatur während der Pasteurisierung von Lebensmitteln bei 63°C für 30 Minuten oder 72°C für 15 Sekunden (Juffs und Deeth, 2007). Es lässt sich also konstatieren, dass die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse mit der aktuellen Literatur, die thermischen Effekte auf Mikroorganismen betreffend, konform sind. Es besteht kein abweichendes Verhalten oraler Mikroorganismen. In zukünftigen Studien gilt es, das relevante Temperaturintervall zwischen 60°C und 80°C auch im Hinblick auf einen Vergleich zu phototoxischen Effekten genauer zu untersuchen.

Zudem bleibt zu diskutieren, dass *E. faecalis* bei Temperaturen zwischen 40°C - 60° C ein konsistentes Wachstumsverhalten zeigt. Für diesen kurzzeitigen Anstieg der Zelldichte könnten sog. heat shock proteins (HSP) verantwortlich sein. HSP umfassen insbesondere Chaperone und Proteasen, die bei thermalem Stress (Temperaturen von  $\geq 39^\circ\text{C}$ ) für das Überleben der Bakterienzelle sorgen, indem sie z.B. Proteindenaturierung verhindern (Maleki et al., 2016). Auch auf genetischer Ebene scheinen Schutzmechanismen bei kurzzeitiger thermischer Belastung abzulaufen. Eine Studie von Oliviera et al. belegt bei *E. faecalis* eine Hochregulation der Transkription einer bestimmten Gensequenz (*clpB*) ab einer Belastung mit 48 - 50°C. Die Expression dieser Sequenz spielt eine wichtige Rolle bei der Thermotoleranz von *E. faecalis* (Oliveira et al., 2011).

Die Ergebnisse der vorliegenden in-vitro-Untersuchung vergleichen die antimikrobielle Wirkung der Diodenlaser mit Wellenlängen von 445 nm und 810 nm auf die Bakterienstämme *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius* und *Streptococcus sobrinus* ohne Verwendung eines exogenen Photosensitizers.

Anhand der jeweilig eingestellten Parameter von 0,5 – 2,0 W Laserleistung appliziert für jeweils 20 Sekunden mit Laserfaserdurchmessern von 300  $\mu\text{m}$  und 320  $\mu\text{m}$  veranschaulicht Abb. 39 die stattfindenden Interaktionen zwischen Laser und bestrahltem Medium. Die Absorptionseigenschaften der bestrahlten Gewebe liefern hierzu nur eine Teilerklärung (Abb. 4). Zusätzlich zu den Absorptionseigenschaften bestimmen die eingestellte Laserleistung und die Bestrahlungsdauer die Art der stattfindenden photoinduzierten Effekte. Der Schnittpunkt der nachträglich eingefügten roten Linien verdeutlicht, dass es bei den in diesen Versuchen verwendeten Parametern hauptsächlich zu photothermischen Interaktionen im bestrahlten Medium kommt.



**Abb. 39:** Darstellung der Wechselwirkungen von Laser und Gewebe in Abhängigkeit von Einwirkzeit und Leistungsdichte (J. Meister). Die ergänzend eingefügten roten Linien beschreiben annähernd die in den Versuchen verwendeten Parameter.

Nach Moritz et al. hängt der Bakterien Schaden nach der Bestrahlung von der applizierten Energiemenge ab, wobei der Aufbau der Zellwand für die individuelle bakterielle Lichtanfälligkeit entscheidend ist. Gram-negative Arten erscheinen empfindlicher gegen Bestrahlung mit einem Nd:YAG-Laser, während gram-positive Mikroorganismen eine wiederholte Strahlenexposition erfordern (Moritz et al., 2000). Die in dieser Studie verwendeten Bakterienarten sind gram-positiv (Tab. 4).

Die Ergebnisse der in-vitro Untersuchungen zeigen, dass sich bakterizide Effekte bei einer Wellenlänge von 445 nm im Leistungsbereich zwischen 1,0 und 1,5 W einstellen (Abb. 35). Während eine vollständige Keimreduktion bei *S. salivarius* und *S. sobrinus* durch eine Bestrahlung mit einer Laserleistung von 2,0 W eintritt, zeigt *E. faecalis* noch vereinzelt Wachstum nach 24-stündiger Inkubation. Die ausgeprägtere Resistenz von *E. faecalis* entspricht den Ergebnissen bei solitärer thermischer Belastung und ist auf die erhöhte

Thermotoleranz des Bakteriums zurückzuführen (Maleki et al., 2016; Oliveira et al., 2011). Der Nachweis bakterizider Eigenschaften von Licht im blauen Spektralbereich auf oral-pathogene Bakterien in der vorliegenden Studie ist deckungsgleich mit Beobachtungen aus anderen in-vitro-Untersuchungen (Cieplik et al., 2014; Dai et al., 2012; Feuerstein et al., 2005; Song et al., 2013; Wang et al., 2017; Adamskaya et al., 2011; Biener et al., 2017).

Ein Vergleich zwischen den verwendeten Fasertypen (Bare und Bulb) zeigt eine geringfügig stärkere Keimreduktion von *S. salivarius* und *S. sobrinus* bei 1,5 W unter Verwendung der Bare-Faser. Bei 2,0 W bestehen kaum Unterschiede in der antimikrobiellen Effizienz (vgl. Abb. 29 und Abb. 35). Diese vergleichbaren antimikrobiellen Eigenschaften beider Fasern rücken die Bulb-Faser in den Fokus der oralen Anwendung, da durch dessen homogenere Lichtverteilung ein größeres Volumen bei gleichbleibender Applikationsdauer bestrahlt werden kann.

Dekontaminationseffekte bei Verwendung eines Diodenlasers mit einer Wellenlänge von 810 nm können in den Ergebnissen dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Lediglich zeigt sich eine deutliche Abnahme der auszählbaren cfu's der OD<sub>600</sub> 1,0 von *S. salivarius* bei Bestrahlung mit Leistungen von 1,5 – 2,0 W (Abb. 35). Vor dem Hintergrund der ausgeprägten Standardabweichung bei 1,0 W Laserleistung und einer gleichbleibenden Bakterienkonzentration bei den optischen Dichten von 0,5 und 0,25 (Abb. 32) liefert die Konzentrationsabnahme von *S. salivarius* ab 1,5 W Laserleistung (OD<sub>600</sub> 1,0) keine valide Aussage über mögliche dekontaminierende Effekte. Die Literatur liefert zudem keine eindeutigen Ergebnisse zu den antimikrobiellen Eigenschaften von Laserlicht mit einer Wellenlänge von 810 nm. Während Keimzahlreduktionen von Moritz et al. beschrieben werden (Moritz et al., 1997b; Moritz et al., 1998), zeigen sich eingeschränkte antimikrobielle Effekte in einer in vivo Studie von Song et al. (Song et al., 2014). Diese Studie zeigt auch, dass praktisch keine Reduktion der Zahl von gram-positiver Streptokokken vorlag. Auch konnte Engelbach et al. keine relevante Keimreduktion bei Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 810 nm feststellen (Engelbach und Frentzen, 2014). Dies deckt sich mit den in dieser Studie gewonnenen Ergebnissen.

Summa summarum zeigen sich Blaulicht-Diodenlaser der Wellenlänge 445 nm in puncto antimikrobieller Eigenschaften auf die Bakterienstämme *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius* und *Streptococcus sobrinus* der Bestrahlung im Nahinfrarotbereich (810 nm) deutlich überlegen.

Nun gilt es zu evaluieren, ob die Dekontamination durch Laserbestrahlung einer Wellenlänge von 445 nm ausschließlich auf photothermische Interaktion zurückzuführen ist. Generell lässt sich konstatieren, dass photothermische Interaktionen auf Grund der vorher festgelegten und eingestellten Parameter zu erwarten sind (Abb. 39).

Anhand Abb. 36 soll veranschaulicht werden, ob nebst photothermischer Interaktion weitere optische Dekontaminationseffekte zu einer Keimreduktion beitragen. Würden Diskrepanzen zwischen den Kurven der Laserapplikation und Temperaturbelastung bestehen, bzw. die Bakterienzahl/mL nach Laserbestrahlung die der Temperaturkurven unterschreiten, so wäre dies ein Hinweis auf Dekontamination, die nicht nur auf thermische Effekte beruht. Obwohl die Graphen nicht kongruent verlaufen, liefern sie keine eindeutigen Diskrepanzen, die auf weiterreichende optische Dekontaminationseffekte der Laserbestrahlung nebst Temperatureffekten schließen lassen. Für entsprechende Rückschlüsse sollten in Zukunft im relevanten Temperaturbereich von 60 – 80°C, sowie Laserleistungsbereich von 1,4 – 2,0 W weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Ein identischer Versuchsaufbau ist obligat.

Die Ergebnisse der Laserbestrahlung der THP-1 - Zelllinie zeigen keinerlei populationsdezimierende Effekte (Abb. 38). Lediglich bei Temperaturbelastungen von mehr als 60°C kommt es zu einer deutlichen Reduktion der Zellzahl/mL (Abb. 37). Obwohl es bei Bestrahlung des RPMI-Mediums im blauen Spektralbereich (445 nm) mit Laserleistungen von 2 W zu Temperaturentwicklungen von bis zu 60°C kommt (Abb. 18a), findet keine Schädigung der humanen Suspensionszellen statt. Die Population lebender Zellen bleibt konstant. Bei Verwendung des Lasers im Nahinfrarotbereich (810 nm) fällt die Temperaturentwicklung im Medium unabhängig von der Laserleistung noch geringer aus (< 40°C). In Folge dessen kommt es bei Bestrahlung der Zelllinie weder zu photothermischer- noch anderer optischer Schädigung durch den Laser.

Es wird deutlich, dass sich humane Zelllinien resistenter als Mikroorganismen gegenüber Laserbestrahlung im blauen Spektralbereich zeigen. Die in dieser Studie untersuchten Populationen (*S. salivarius*, *S. sobrinus* und *E. faecalis*) weisen schon bei Bestrahlung ab 1,5 W und 445 nm Wellenlänge eine Reduktion der Bakterienzahl/mL auf, während die Zellzahl/mL konstant bleibt. Ein Vergleich der Überlebensrate der Zellen und Bakterien bei Bestrahlung mit 2 W bei 445 nm ist nur bedingt möglich, da es zu einer deutlichen Diskrepanz der Temperaturentwicklung in den verwendeten Medien kommt (ca. 20°C). Werden die bei einer Laserleistung von 2 W stattfindenden Dekontaminationseffekte ausschließlich photothermischer Interaktion zugeschrieben, würde es bei entsprechend notwendiger Temperaturentwicklung (ca. 80°C) zu einer Schädigung der Zelllinie kommen (Abb. 37) – ein klinischer Nutzen wäre nicht vorhanden. Rein optische Interaktion mit Laserstrahlen (bis 2,0 W) schädigt die THP-1 Zellen nicht (Abb. 38). Bei 1,5 W dagegen überschneiden sich die jeweiligen Standardabweichungen der Temperaturbalken im RPMI- und BHI – Medium. Ein Vergleich photothermischer Dekontaminationseffekte und möglicher Schädigung von Zellkulturen bei 1,5 W ist also plausibel.

Die vorliegende Studie zeigt, dass eine Dekontamination der hier untersuchten Oralpathogene auch ohne Verwendung von Photosensitizern durch Anpassung der Laserparameter möglich ist. Zur deutlichen Keimzahlreduktion reichen geringe Flächenleistungsdichten und kurze Bestrahlungszeiten aus. Der Diodenlaser mit der Wellenlänge von 445 nm zeigte sich, antimikrobielle Effekte betreffend, dem 810 nm-Laser deutlich überlegen. Die zuvor aufgestellte Hypothese, dass klinischen Erfahrungen entsprechend humane Zellsysteme weniger empfindlich auf Laserbestrahlung reagieren als Mikroorganismen, konnte durch diese Studie belegt werden.

### 4.3 Ausblick

In Zukunft sollten weitere Studien die Temperaturentwicklung in oralen Geweben bei Laserbestrahlung im blauen Spektralbereich genauer untersuchen und simultan Dekontaminationseffekte unter Rückbezug auf möglicherweise stattfindende Gewebsschädigung feststellen. Auf Grund der stark ausgeprägten Diversität der oralen Mikroflora und dem damit einhergehenden pathogenen Potential, wären Untersuchungen antimikrobieller Effekte von Laserstrahlung auf parodontal-pathogene Keime wie z.B. *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* von großem klinischem Interesse. Studien mit *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* zeigen positive Keimreduzierte Effekte bei Bestrahlung mit Blaulicht (460 nm) (Cieplik et al., 2014; Yoshida et al., 2017). Erstrebenswert wäre jedoch eine vergleichende Studie unter identischen Versuchsbedingungen, um validierte Aussagen treffen zu können.

Die in dieser Studie nachgewiesenen Dekontaminationseffekte auf *E. faecalis* rücken die Verwendung von Lasern im blauen Spektralbereich ins Interesse der endodontischen Therapie. Die sogenannte Bulb-Faser erscheint ob der radialen Abstrahlungscharakteristik als besonders geeignet für die Anwendung im Wurzelkanal, da so die Strahlen nicht nur in apikaler Richtung emittiert werden. Auch hier gilt es zu evaluieren, in wieweit umgebende Zahnhartsubstanz durch photothermische Interaktion geschädigt wird. Nach Engelbach et al. liegt die Temperaturentwicklung im Dentin bei Bestrahlung mit einem 445 nm-Laser bei einer Leistung von 1 W bei 20 Sekunden Bestrahlungsdauer im Median bei 5,77°C (Engelbach und Frentzen, 2014). Weitere Untersuchungen die Temperaturentwicklung oraler Gewebe bei Laserbestrahlung betreffend, sowie Einflüsse unterschiedlicher Anstellwinkel der Faserspitze zur bestrahlten Oberfläche sind erforderlich, um validierte Aussagen über die Interaktionen des 445 nm-Lasers mit oralen Geweben treffen zu können.

Obwohl antimikrobielle Effekte durch den 810 nm - Laser in anderen Studien nachgewiesen wurden, kann dies durch die Ergebnisse dieser Studie nicht bestätigt werden. Keimreduzierende Effekte auf die hier untersuchten gram-positiven fakultativ anaeroben oralen Mikroorganismen sind nicht nachweisbar. Weitere Studien sollten evaluieren und abgrenzen, welche Bakterienarten optische Dekontamination durch

Laserlicht mit 810 nm Wellenlänge erfahren. Eine ausbleibende Schädigung der hier untersuchten Zelllinie stützt die Ergebnisse einer bereits existierenden Studie von Fontana et al. Hier wird gezeigt, dass eine bakterielle Schädigung durch einen Diodenlaser bei 810 nm ohne Verletzung des Parodontalgewebes durch Wärmeentwicklung möglich ist (Fontana et al., 2004b). Diese Selektivität der Laserbestrahlung mit 810 nm macht die Anwendung dieses Lasers für die klinische Anwendung interessant, obwohl die antimikrobiellen Effekte weniger ausgeprägt scheinen, als bei Bestrahlung mit Licht des blauen Spektralbereiches.



## 5. Zusammenfassung

Vor dem Hintergrund der progredienten Resistenzentwicklung gegen Antibiotika und der komplexen Anatomie oraler Strukturen, durch die konventionelle Desinfektionsmaßnahmen an ihre Grenzen stoßen, ist die photonische Dekontamination mit Laserlicht von steigendem wissenschaftlichem und klinischem Interesse.

Ziel dieser Arbeit war es, unter standardisierten Bedingungen zu untersuchen, wie sich humane Zellsysteme (THP-1) im Vergleich zu Mikroorganismen (*S. salivarius*, *S. sobrinus* und *E. faecalis*) in einem eigens hierfür entwickelten Modellsystem nach kurzzeitiger thermischer Belastung und Laserapplikation verhalten. Zudem gilt es, die antimikrobielle Potenz zweier Fasersysteme (Bulb und Bare) unter Verwendung eines Blaulichtlasers zu vergleichen.

Zunächst wurde das Wachstumsverhalten der Teststämme unter thermischem Stress untersucht. Anschließend wurden Laserversuche zur Untersuchung der Keimreduktion mittels Laserbestrahlung ohne Verwendung von Photosensitizer durchgeführt. Dazu wurde die optische Dichte der Teststämme ( $OD_{600}$  1,0; 0,5 und 0,25) eingestellt und diese anschließend einem Wärmeimpuls (20°C, 40°C, 60°C, 80°C für je 20 Sekunden) ausgesetzt bzw. mit einem Diodenlaser bestrahlt (20 Sekunden; 445 nm bzw. 810 nm; 0,5 W, 1,0 W, 1,5 W und 2,0 W; Bare- bzw. Bulb-Faser) und verdünnt. Die Verdünnungen wurden ausplattiert und inkubiert (37°C; 24 h). Es folgte die Auszählung der cfu, die Berechnung der Bakterienzahl/mL sowie die Erstellung von Wachstumskurven, anhand derer die benötigten Temperaturen und Laserleistungen zur Keimreduktion ermittelt werden konnten. Unter identischen Bedingungen und Parametern wurden die THP-1 – Zellen Temperatur und Laserbestrahlung ausgesetzt. Nach mikroskopischer Auszählung lebender und toter Zellen fand ebenfalls eine graphische Auswertung statt.

Es konnte gezeigt werden, dass es bei den Wärmeimpuls-Versuchen zwischen 60°C und 80°C zu einer deutlichen Keim- und Zellreduktion kam. Bei 80°C fand eine fast vollständige Dekontamination statt. Analog dazu zeigte sich bei den Laserversuchen eine keimreduzierende Wirkung bei 445 nm ab einer Leistung von 1,5 W für alle Teststämme, wohingegen bei 810 nm keine keimreduzierende Wirkung eintrat. Im Vergleich dazu

wurden zwei verschiedene Fasertypen (Bare- und Bulb-Faser) bei 445 nm verwendet und deren Wirkung auf die Teststämme untersucht. Hier zeigte sich eine höhere Keimreduktion für die Bare-Faser im Vergleich zur Bulb-Faser bei 1,5 W (*S. salivarius*, *S. sobrinus*). Ab 1,5 W zeigte sich mittels Bare-Faser bereits eine fast vollständige bakterizide Wirkung, wohingegen bei der Bulb-Faser erst ab 2,0 W eine solche Wirkung eintrat. Die untersuchte Zelllinie betreffend (THP-1) kam es zu keiner Reduktion Zellvitalität nach Laserbestrahlung mit Leistungen von 0,5 – 2,0 W.

Schlussendlich konnte festgestellt werden, dass die Laserapplikation im blauen Spektralbereich deutlich effizienter antimikrobiell wirkt als mit einem Nahinfrarot-Laser. Humane Zellsysteme scheinen auf Laserbestrahlung weniger sensibel in Bezug auf ihre Vitalerhaltung zu reagieren als Mikroorganismen. Strategisches Ziel des Einsatzes blauer Laserstrahlung wäre es, aufgrund dieser orientierenden Studie chirurgische, bzw. resektive Eingriffe mit dekontaminierenden Begleiteffekten durchführen zu können. Die in den vorliegenden Untersuchungen gewonnenen in-vitro Daten an modellhaften in-vitro Systemen können somit eine Grundlage für weitere tierexperimentelle und klinische Studien sein.

## 6. Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Zusammensetzung der Biofilm – Matrix (Sutherland, 2001).	12
<b>Tab. 2:</b> Die bei Laserbestrahlung von biologischem Gewebe in Abhängigkeit von eingestrahelter Energiedichte und Einwirkzeit grundlegend stattfindenden Prozesse und deren Unterteilungen nach (Meister et al., 2004).	22
<b>Tab. 3:</b> Laserwirkung und Gewebeveränderungen in Abhängigkeit von der Temperatur nach (Koort, 1994).	26
<b>Tab. 4:</b> Auflistung der in den Versuchsreihen verwendeten Mikroorganismen inklusive Stoffwechseleigenschaften, Klassifikation nach Gram-Färbung und Fähigkeit der Biofilmbildung auf dentalen Oberflächen.	34
<b>Tab. 5:</b> Darstellung der verwendeten Bakterienstämme mit jeweiligem Konservierungsdatum (bei -80°C in Glycerin), den Zellzahlen (in Zellen/mL) bei entsprechenden OD <sub>600</sub> von 1,0; 0,5 und 0,25.	35
<b>Tab. 6:</b> Übersicht der Inhaltsstoffe des in den Versuchen verwendeten BHI-Broth sowie BHI-Agars (Oxoid Limited). Bei 25°C beträgt der pH-Wert des Mediums $7,4 \pm 0,2$ .	35
<b>Tab. 7:</b> Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der statistischen Auswertung der Temperaturmessungen bei steigender Laserleistung (0,5 W, 1,0 W, 1,5 W, 2,0 W) im entsprechenden Medium (RPMI, BHI, BHI + <i>S. salivarius</i> ) bei unterschiedlichen Wellenlängen (445 nm, 810 nm). Dabei entspricht "Ja" einer statistisch signifikanten Abweichung der Messungen. Die gelb unterlegten Felder sollen die in 0,5 W – Schritten ansteigenden Laserleistungen veranschaulichen.	54
<b>Tab. 8:</b> Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der statistischen Auswertung der Temperaturmessungen bei steigender Laserleistung (0,5 W, 1,0 W, 1,5 W, 2,0 W). In dieser Tabelle werden die Messungen bei unterschiedlichen Wellenlängen (445 nm und 810 nm) bei jeweils einer Laserleistung in einem Medium verglichen. Dabei entspricht "Ja" einer statistisch signifikanten Abweichung der Messungen.	55

- Tab. 9:** Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der statistischen Auswertung der Temperaturmessungen bei steigender Laserleistung (0,5 W, 1,0 W, 1,5 W, 2,0 W). In dieser Tabelle werden die Messungen von BHI und BHI + *S. salivarius* in einer Wellenlänge (445 nm, 810 nm) und bei gleicher Laserleistung verglichen. Dabei entspricht "Ja" einer statistisch signifikanten Abweichung. 55
- Tab. 10:** Für die Thermoversuche und Laserapplikationen mit Mikroorganismen verwendeten Geräte und Hilfsmittel. 119
- Tab. 11:** Für die Versuche mit humanen Suspensionszellen (THP-1) zusätzlich verwendeten Geräte und Hilfsmittel. 120
- Tab. 12:** Tabellarische Darstellung der gewünschten und tatsächlich eingestellten optischen Dichten der entsprechenden Bakteriensuspensionen. 121
- Tab. 13:** Tabellarische Darstellung der gewünschten und jeweils tatsächlich eingestellten optischen Dichten der entsprechenden Bakteriensuspensionen (*S. sobrinus*, *S. salivarius*, *E. faecalis*) bei unterschiedlichen Wellenlängen (445 nm; 810 nm). 122
- Tab. 14:** Kalibrierung beider Diodenlaser (FOX III / IV) vor jedem Versuchsansatz aller drei Teststämme (*S. sobrinus*; *S. salivarius*; *E. faecalis*) mittels Laserleistungs- und Energiemessgerät. Aufgelistet sind die Soll-Werte der Laserleistung, die jeweils am Laserdisplay eingestellten Leistungswerte und die gemessenen Ist-Werte [W]. Aufgrund der Streuung der Laserstrahlen bei der Bulb-Faser entfällt eine Kalibrierung. 124

## 7. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Die ökologischen Stadien bei der Entstehung einer mikrobiellen Gemeinschaft nach Marsh und Martin (2003). 14
- Abb. 2:** Schematische Darstellung der Organisation von planktonischen Bakterien in einer Plaquematrix und Steigerung des pathogenen Potentials nach Jakubovics und Kolenbrander (2010). 16
- Abb. 3:** Schematische Darstellung der bakteriellen Zusammensetzung einer etablierten Plaquematrix. Die Speichelrezeptoren (grün) bieten als Teil des acquired pellicles die Grundlage für die Adhäsion von Bakterien. Zunächst adhären Viridans Streptokokken und weitere frühe Kolonisatoren (early colonizers), bis hin zu einer Adhärenz von späten Kolonisatoren (late colonizers) mit *F. nucleatum* als Bindeglied (Kolenbrander et al., 2002). 17
- Abb. 4:** Graphische Darstellung der Absorption [1/cm] in Abhängigkeit von der bestrahlten Wellenlänge [nm] natürlich vorkommender Chromophore (Melanin, Hämoglobin, H<sub>2</sub>O, Zahnschmelz) (Niemz, 2019). 23
- Abb. 5:** Grafik der Laser-Gewebe-Interaktionen nach Niemz (2019). 26
- Abb. 6:** Thermocycler (TGradient) für die standardisierte Wärmebelastung von Mikroorganismen und Zellen. 31
- Abb. 7:** Schematische Darstellung des Strahlenverlaufs bei den verwendeten Laserfasern (Bulb / Bare), mit den unterschiedlichen Abstrahlverhalten. 32
- Abb. 8:** Exemplarische Darstellung einer Aufnahme mit Thermographiekamera bei Laserbestrahlung von BHI-Medium für 20 s (445 nm; 2,0 W). Das markierte Rechteck gibt den Temperaturanalysebereich an, während die kreisrunde rote Fläche das erhitzte PCR-Tube darstellt. 33
- Abb. 9:** Positionierung der PCR-Tubes (mit 100 µL Medium) im Thermocycler vor "Heat-Shock". Spalte 1) enthält eine Bakteriensuspension mit einer OD<sub>600</sub> 1,0; (2) eine OD<sub>600</sub> 0,5 und (3) eine OD<sub>600</sub> von 0,25. Der Heat-Shock fand wie oben beschrieben statt. 37

- Abb. 10:** Exemplarische Darstellung des Pipettierschemas der Verdünnungsreihen. Die Zahlen am rechten Bildrand geben die jeweilige Bakterienverdünnung an. 38
- Abb. 11:** Exemplarische Darstellung der Einstellung der gewünschten Zellkonzentration. Bei einer Ausgangskonzentration von  $2,65 \times 10^6$  Zellen/mL setzt sich die Zielsuspension aus 760  $\mu$ L Zellsuspension und 240  $\mu$ L RPMI-Medium zusammen. 40
- Abb. 12:** Exemplarische Darstellung einer Neubauer Zählkammer. Die gelben Kegel stellen die Pipettenspitzen dar. Diese enthalten jeweils 10  $\mu$ L Zellsuspension / Trypanblaugemisch. 41
- Abb. 13:** Exemplarische Darstellung eines auf 1cm gekürzten PCR-Tubes. 43
- Abb. 14:** Versuchsaufbau zur Messung der Temperaturentwicklung unterschiedlicher Medien bei Laserbestrahlung. Rack PCR-Tubes aus Alphasil (a), Halterung des Motortisches (b), gekürzte PCR-Tubes (c), Handstück mit Laserfaser (d), Thermographiekamera (e). 44
- Abb. 15:** Versuchsaufbau exemplarisch zur Bestrahlung von Mikroorganismen und Zellsystemen. (a) FOX IV Laser-Steuereinheit, (b) Stativ mit Handstück und Laserfaser, (c) Glaskugeln zum Ausplattieren der Suspensionen (nur in 2.2.4 verwendet), (d) Pipetten mit Pipettenständer. 46
- Abb. 16:** Exemplarische graphische Darstellung der Temperaturentwicklung bei Laserbestrahlung von RPMI-Medium mit 445 nm und Bare-Faser für 20 s bei 2,0 W. Die gestrichelte Linie verdeutlicht den Beginn der Laserbestrahlung. 50
- Abb. 17:** Graphische Darstellung der Untersuchung des Temperaturanstiegs bei Laserbestrahlung einer Bakteriensuspension (BHI + *S. salivarius*) bei unterschiedlichen optischen Dichten ( $OD_{600}$  1,0; 0,5; 0,25) und Wellenlängen (445 nm / 810 nm). Die Ausgangstemperatur betrug bei allen Ansätzen 24°C. 51
- Abb. 18:** Graphische Darstellung der Temperaturentwicklung in den untersuchten Medien (RPMI / BHI / BHI + *S. salivarius*) bei Laserbestrahlung mit 445 nm (a) und 810 nm (b) für 20 s (n=4). 52

- Abb. 19:** Darstellung der ausgezählten Kolonien von *S. sobrinus* des Versuches vom 13.09.2017 nach 48 h Inkubationszeit. Die gezeigten Platten mit den Kolonien stammen aus der Verdünnung von  $10^2$  mit einer  $OD_{600}$  von 1,0. Oben (von links nach rechts): Nach "Heat-Shock" bei 20°C, 40°C, 60°C (je 20 s). Unten (von links nach rechts): Nach "Heat-Shock" bei 80°C (20 s); Positive Kontrolle mit Ampicillin [25 mg/mL] und SDS [10%]. 56
- Abb. 20:** Graphische Darstellung des Wachstumsverhaltens von *S. sobrinus* (n=6) bei 20°C, 40°C, 60°C und 80°C und den  $OD_{600}$  von 1,0; 0,5; 0,25. Versuchsdurchläufe 1, 2, 3 mit jeweils n=2. Die gestrichelte Linie stellt die für die entsprechende  $OD_{600}$  die ermittelte Bakterienzahl/mL dar (Tab. 5). 58
- Abb. 21:** Zusammenfassung der jeweiligen arithmetischen Mittelwerte aus je n=6 Proben für die unterschiedlichen  $OD_{600}$  1,0; 0,5; 0,25 aller Versuche. 59
- Abb. 22:** Darstellung der ausgezählten Kolonien von *S. salivarius* des Versuches vom 02.08.2017 nach 24 h Inkubationszeit. Die gezeigten Platten mit den Kolonien stammen aus der Verdünnung von  $10^2$  mit einer  $OD_{600}$  von 1,0. Oben (von links nach rechts): Nach "Heat-Shock" bei 20°C, 40°C, 60°C (je 20 s). Unten (von links nach rechts): Nach "Heat-Shock" bei 80°C (20 s); Positive Kontrolle mit Ampicillin [25 mg/mL] und SDS [10%]. 60
- Abb. 23:** Graphische Darstellung des Wachstumsverhaltens von *S. salivarius* (n=6) bei 20°C, 40°C, 60°C und 80°C und den  $OD_{600}$  von 1,0; 0,5; 0,25. Versuchsdurchläufe 1, 2, 3 mit jeweils n=2. Die gestrichelte Linie stellt die für die entsprechende  $OD_{600}$  die ermittelte Bakterienzahl/mL dar (Tab. 5). 62
- Abb. 24:** Zusammenfassung der jeweiligen arithmetischen Mittelwerte aus je n=6 Proben für die unterschiedlichen  $OD_{600}$  1,0; 0,5; 0,25 aller Versuche. 63
- Abb. 25:** Darstellung der ausgezählten Kolonien von *E. faecalis* des Versuches vom 22.08.2017 nach 24 h Inkubationszeit. Die gezeigten Platten mit den Kolonien stammen aus der Verdünnung von  $10^2$  mit einer  $OD_{600}$  von 1,0. Oben (von links nach rechts): Nach "Heat-Shock" bei 20°C, 40°C, 60°C (je 20 s). Unten (von links nach rechts): Nach "Heat-Shock" bei 80°C (20 s); Positive Kontrolle mit Ampicillin [25 mg/mL] und SDS [10%]. 64
- Abb. 26:** Graphische Darstellung des Wachstumsverhaltens von *E. faecalis* (n=6) bei 20°C, 40°C, 60°C und 80°C und den  $OD_{600}$  von 1,0; 0,5; 0,25.

Versuchsdurchläufe 1, 2, 3 mit jeweils  $n=2$ . Die gestrichelte Linie stellt die für die entsprechende  $OD_{600}$  die ermittelte Bakterienzahl/mL dar (Tab. 5). 66

- Abb. 27:** Zusammenfassung der jeweiligen arithmetischen Mittelwerte aus je  $n=6$  Proben für die unterschiedlichen  $OD_{600}$  1,0; 0,5; 0,25 aller Versuche. 67
- Abb. 28:** Vergleichende graphische Darstellung der Temperaturversuche (Mittelwerte) aller Teststämme (*E. faecalis*, *S. salivarius* und *S. sobrinus*). Dargestellt sind die optischen Dichten von  $OD_{600}$  1,0; 0,5 und 0,25 für die Temperaturen 20°, 40°, 60° und 80°. 68
- Abb. 29:** Exemplarische Darstellung der ausgezählten Kolonien von *S. sobrinus* des Versuches vom 09.08.2018 mit einer bestrahlten Wellenlänge von 445 nm (Bare-Faser) und 48 h Inkubationszeit. Die gezeigten Kolonien stammen aus Verdünnungen von  $10^2$  mit einer  $OD_{600}$  von 1,0. Oben (von links nach rechts): Laserbestrahlung bei 0,5 W; 1,0 W und 1,5 W; Unten (von links nach rechts): Laserbestrahlung bei 2,0 W; Positive Kontrolle (siehe Hemmhofbildung) mit Ampicillin [25 mg/mL] und SDS [10%]. 70
- Abb. 30:** Graphische Darstellung des Wachstumsverhaltens von *S. sobrinus* unter Laserbestrahlung bei ansteigender Laserleistung (0,5 W, 1,0 W, 1,5 W, 2,0 W), unterschiedlichen Wellenlängen und Fasertypen (445 nm + Bulb / 445 nm + Bare / 810 nm + Bare), sowie den  $OD_{600}$  von 1,0; 0,5; 0,25. Auf Darstellung der ermittelten Bakterienzahl/mL wurde aus Übersichtlichkeitsgründen verzichtet. 72
- Abb. 31:** Exemplarische Darstellung der ausgezählten Kolonien von *S. salivarius* des Versuches vom 25.07.2018 mit einer Wellenlänge von 445 nm (Bare-Faser) und 24 h Inkubationszeit. Die gezeigten Kolonien stammen aus Verdünnungen von  $10^2$  mit einer  $OD_{600}$  von 1,0. Oben (von links nach rechts): Laserbestrahlung bei 0,5 W; 1,0 W und 1,5 W; Unten (von links nach rechts): Laserbestrahlung bei 2,0 W; Positive Kontrolle (siehe Hemmhofbildung) mit Ampicillin [25 mg/mL] und SDS [10%]. 73
- Abb. 32:** Graphische Darstellung des Wachstumsverhaltens von *S. salivarius* unter Laserbestrahlung bei ansteigender Laserleistung (0,5 W, 1,0 W, 1,5 W, 2,0 W), unterschiedlichen Wellenlängen und Fasertypen (445 nm + Bulb / 445 nm + Bare / 810 nm + Bare), sowie den  $OD_{600}$  von 1,0; 0,5; 0,25. Auf



Darstellung der im Vorhinein ermittelten Bakterienzahl/mL wurde aus Übersichtlichkeitsgründen verzichtet. 75

**Abb. 33:** Exemplarische Darstellung der ausgezählten Kolonien von *E. faecalis* des Versuches vom 20.08.2019 mit einer Wellenlänge von 445 nm (Bare-Faser) und 24 h Inkubationszeit. Die gezeigten Kolonien stammen aus Verdünnungen von  $10^2$  mit einer  $OD_{600}$  von 1,0. Oben (von links nach rechts): Laserbestrahlung bei 0,5 W; 1,0 W und 1,5 W; Unten (von links nach rechts): Laserbestrahlung bei 2,0 W; Positive Kontrolle (siehe Hemmhofbildung) mit Ampicillin [25 mg/mL] und SDS [10%]. 76

**Abb. 34:** Graphische Darstellung des Wachstumsverhaltens von *E. faecalis* unter Laserbestrahlung bei ansteigender Laserleistung (0,5 W, 1,0 W, 1,5 W, 2,0 W), unterschiedlichen Wellenlängen und Fasern (445 nm + Bulb / 445 nm + Bare / 810 nm + Bare), sowie den  $OD_{600}$  von 1,0; 0,5; 0,25. Auf Darstellung der im Vorhinein ermittelten Bakterienzahl/mL wurde aus Übersichtlichkeitsgründen verzichtet. 78

**Abb. 35:** Vergleichende graphische Darstellung der Mittelwerte für die Laserversuche aller Teststämme (*E. faecalis*, *S. salivarius* und *S. sobrinus*). Es wurden exemplarisch die Mittelwerte der Bakterienzahl/mL bei der optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) 1,0 für die Laserleistungen 0,5 W; 1,0 W; 1,5 W; 2,0 W dargestellt. 80

**Abb. 36:** Vergleichende graphische Darstellung der Temperatur- und Laserversuche (445 nm/Bare-Faser; Mittelwerte bei  $OD_{600}$  1,0; 0,5; 0,25) aller Teststämme (*E. faecalis*, *S. salivarius* und *S. sobrinus*). Die durchgezogenen Linien stellen die jeweiligen Bakterienzahlen/mL bei alleiniger Temperaturbelastung und die gestrichelten Linien bei Laserbestrahlung dar. Bei den Laserversuchen wurde aus Übersichtlichkeit auf Darstellung der Standardabweichung verzichtet. 82

**Abb. 37:** Graphische Darstellung lebender und toter Zellen/mL (LZ/TZ) nach Temperaturbelastung (20°C, 40°C, 60°C, 80°C) bei unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen. Die durchgezogenen Linien stellen die Zellzahl/mL der lebenden, die gestrichelten Linien die der toten Zellen dar. Auf Standardabweichungen wurde aus Übersichtlichkeitsgründen verzichtet. 83

**Abb. 38:** Graphische Darstellung der lebenden Zellen/mL nach Laserbestrahlung (0,5 W, 1,0 W, 1,5 W, 2,0 W) mit den Wellenlängen 445 nm und 810 nm unter

Verwendung aller Fasertypen. Die dünn gestrichelten Linien stellen die im Voraus gemessenen Mittelwerte der Zellen/mL der nicht bestrahlten Suspension dar. 85

**Abb. 39:** Darstellung der Wechselwirkungen von Laser und Gewebe in Abhängigkeit von Einwirkzeit und Leistungsdichte (J. Meister). Die ergänzend eingefügten roten Linien beschreiben annähernd die in den Versuchen verwendeten Parameter. 91

## 8. Literaturverzeichnis

Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microb.* 2005. 43: 5721–5732

Abels C, Fickweiler S, Weiderer P, Bäuml W, Hofstädter F, Landthaler M, Szeimies RM. Indocyanine green (ICG) and laser irradiation induce photooxidation. *Arch Dermatol Res.* 2000. 292: 404–411

Abiko Y, Saitoh M. Salivary defensins and their importance in oral health and disease. *Curr Pharm Des.* 2007. 13: 3065–3072

Adamskaya N, Dungal P, Mittermayr R, Hartinger J, Feichtinger G, Wassermann K, Redl H, van Griensven M. Light therapy by blue LED improves wound healing in an excision model in rats. *Injury.* 2011. 42: 917–921

Addy M, Martin MV. Systemic antimicrobials in the treatment of chronic periodontal diseases: a dilemma. *Oral Dis.* 2003. 9 Suppl 1: 38–44

American Academy of Periodontology. Parameter on periodontitis associated with systemic conditions. American Academy of Periodontology. *J Periodontol.* 2000. 71: 876–879

Andersen RN, Ganeshkumar N, Kolenbrander PE. *Helicobacter pylori* adheres selectively to *Fusobacterium* spp. *Oral Microbiol Immunol.* 1998. 13: 51–54

Arnold WH. *Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie.* Stuttgart: Thieme. 2010

Bagg J. *Essentials of microbiology for dental students.* Oxford: Oxford University Press. 2006

Beytollahi L, Pourhajibagher M, Chiniforush N, Ghorbanzadeh R, Raoofian R, Pourakbari B, Bahador A. The efficacy of photodynamic and photothermal therapy on biofilm formation of *Streptococcus mutans*: An in vitro study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017. 17: 56–60

Biener G, Masson-Meyers DS, Bumah VV, Hussey G, Stoneman MR, Enwemeka CS, Raicu V. Blue/violet laser inactivates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by altering its transmembrane potential. *J Photochem Photobiol B*. 2017. 170: 118–124

User Manual TGradient. Biometra GmbH, Reg. 2009

Bumah VV, Masson-Meyers DS, Enwemeka CS. Blue 470 nm light suppresses the growth of *Salmonella enterica* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in vitro. *Lasers Surg Med*. 2015. 47: 595–601

Cholmakow-Bodechtel C. Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V). Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag DÄV. 2016

Christensen LB, Petersen PE, Krustrup U, Kjøller M. Self-reported oral hygiene practices among adults in Denmark. *Community Dent Health*. 2003. 20: 229–235

Cieplik F, Späth A, Leibl C, Gollmer A, Regensburger J, Tabenski L, Hiller K-A, Maisch T, Schmalz G. Blue light kills *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* due to its endogenous photosensitizers. *Clin Oral Investig*. 2014. 18: 1763–1769

Cole MF, Evans M, Fitzsimmons S, Johnson J, Pearce C, Sheridan MJ, Wientzen R, Bowden G. Pioneer oral streptococci produce immunoglobulin A1 protease. *Infect Immun*. 1994. 62: 2165–2168

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annual review of microbiology*. 1995. 49: 711–745

D'Aoust J-Y, Park CE, Szabo RA, Todd ECD, Emmons DB, McKellar RC. Thermal Inactivation of *Campylobacter* Species, *Yersinia enterocolitica*, and Hemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7 in Fluid Milk. *J Dairy Sci*. 1988. 71: 3230–3236

Dai T, Gupta A, Huang Y-Y, Yin R, Murray CK, Vrahas MS, Sherwood ME, Tegos GP, Hamblin MR. Blue light rescues mice from potentially fatal *Pseudomonas aeruginosa* burn infection: efficacy, safety, and mechanism of action. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013. 57: 1238–1245

- Dai T, Gupta A, Murray CK, Vrahas MS, Tegos GP, Hamblin MR. Blue light for infectious diseases: *Propionibacterium acnes*, *Helicobacter pylori*, and beyond? *Drug Resist Updat*. 2012. 15: 223–236
- Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu W-H, Lakshmanan A, Wade WG. The human oral microbiome. *J Bacteriol*. 2010. 192: 5002–5017
- Drisko CL. Periodontal debridement: still the treatment of choice. *J Evid Based Dent Pract*. 2014. 14 Suppl: 33-41.e1
- Engel E, Schraml R, Maisch T, Kobuch K, König B, Szeimies R-M, Hillenkamp J, Bäumler W, Vasold R. Light-induced decomposition of indocyanine green. *Invest ophthalmol Vis Sci*. 2008. 49: 1777–1783
- Engelbach C, Frentzen M. Antimikrobielle Wirkung von blauem Laserlicht (445 nm). 2014. *Med.Dis.Bonn*
- Epstein JB, Chong S, Le ND. A survey of antibiotic use in dentistry. *J Am Dent Assoc*. 2000. 131: 1600–1609
- Farber JM, Sanders GW, Speirs JI, D'Aoust J-Y, Emmons DB, McKellar R. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in inoculated and naturally contaminated raw milk. *Int J Food Microbiol*. 1988. 7: 277–286
- Feuerstein O, Ginsburg I, Dayan E, Veler D, Weiss EI. Mechanism of visible light phototoxicity on *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. *Photochem Photobiol*. 2005. 81: 1186–1189
- Fisher RA, Thornton HG, MacKenzie WA. The accuracy of the plating method of estimating the density of bacterial populations. *Ann Appl Biol*. 1922. 9: 325–359
- Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Sep; 8(9):623-33
- Fontana CR, Kurachi C, Mendonça CR, Bagnato VS. Microbial reduction in periodontal pockets under exposition of a medium power diode laser: an experimental study in rats. *Lasers Surg Med*. 2004a. 35: 263–268

- Fontana CR, Kurachi C, Mendonça CR, Bagnato VS. Temperature variation at soft periodontal and rat bone tissues during a medium-power diode laser exposure. *Photomed Laser Surg.* 2004b. 22: 519–522
- Fontana CR, Song X, Polymeri A, Goodson JM, Wang X, Soukos NS. The effect of blue light on periodontal biofilm growth in vitro. *Lasers Med Sci.* 2015. 30: 2077–2086
- Foote CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol.* 1991. 54: 659
- Frank U, Meyer E, Ebner W, Daschner F. *Antibiotika in der Praxis mit Hygieneratschlägen.* Berlin: Springer Medizin. 2011
- Frentzen M, Götz W, Ivanenko M, Afilal S, Werner M, Hering P. Osteotomy with 80-micros CO2 laser pulses--histological results. *Lasers Med Sci.* 2003. 18: 119–124
- Fyrestam J, Bjurshammar N, Paulsson E, Johannsen A, Östman C. Determination of porphyrins in oral bacteria by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2015. 407: 7013–7023
- Gaffar A, Scherl D, Afflitto J, Coleman EJ. The effect of triclosan on mediators of gingival inflammation. *J Clinical Periodontol.* 1995. 22: 480–484
- Gallauner S. THP-1 Zellen als Modell für Phagozytose. 2009. *Med.Dis.Wien.*
- Goldman L, Hornby P, Meyer R, Goldman B. Impact of the laser on dental caries. *Nature.* 1964a. 203: 417
- Halstead FD, Thwaite JE, Burt R, Laws TR, Raguse M, Moeller R, Webber MA, Oppenheim BA. Antibacterial Activity of Blue Light against Nosocomial Wound Pathogens Growing Planktonically and as Mature Biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2016. 82: 4006–4016
- Hamblin MR, Viveiros J, Yang C, Ahmadi A, Ganz RA, Tolkoff MJ. *Helicobacter pylori* accumulates photoactive porphyrins and is killed by visible light. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005. 49: 2822–2827

- Hannig C, Gaeding A, Basche S, Richter G, Helbig R, Hannig M. Effect of conventional mouthrinses on initial bioadhesion to enamel and dentin in situ. *Caries Res.* 2013. 47: 150–161
- Heidemann D. *Parodontologie*. München, Baltimore: Urban & Schwarzenberg. 1997
- Hellwig E, Klimek J, Attin T. *Einführung in die Zahnerhaltung*. Dt. Zahnärzte-Verl. 2013
- Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol.* 1992. 55: 145–157
- HOMD: Human Oral Microbiome Database. Verfügbar unter <http://www.homd.org/> (Zugriffsdatum: 04.11.2019)
- Hopp M, Biffar R. Die ICG-gestützte photothermische Therapie (PTT). *ZMK.* 2013; 9: 528–541
- Hoyle BD, Costerton JW. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Progress in drug research. Prog Drug Res.* 1991. 37: 91–105
- Huang R, Li M, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence.* 2011. 2: 435–444
- Ivanaga CA, Miessi DMJ, Nuernberg MAA, Claudio MM, Garcia VG, Theodoro LH. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) with curcumin and LED, as an enhancement to scaling and root planing in the treatment of residual pockets in diabetic patients: A randomized and controlled split-mouth clinical trial. *Photodiag Photodyn Ther.* 2019. 27: 388–395
- Jakubovics NS, Kolenbrander PE. The road to ruin: the formation of disease-associated oral biofilms. *Oral Dis.* 2010. 16: 729–739
- Jenkinson HF. Beyond the oral microbiome. *Environ Microb.* 2011. 13: 3077–3087
- Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodonol.* 2000. 15: 55–62
- Juffs H, Deeth H. *Scientific evaluation of pasteurisation for pathogen reduction in milk and milk products*. Canberra: Food Standards. 2007

- Kandaswamy D, Venkateshbabu N. Root canal irrigants. *J Conserv Dent*. 2010. 13: 256–264
- Kaper JB, Sperandio V. Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract. *Infect Immun*. 2005. 73: 3197–3209
- Kern WV, Fellhauer M, Hug M, Hoppe-Tichy T, Först G, Steib-Bauert M, With K de. Antibiotika-Anwendung 2012/13 in 109 deutschen Akutkrankenhäusern. *Deutsche medizinische Wochenschrift*. 2015. 140: e237-46
- Kikuchi T, Mogi M, Okabe I, Okada K, Goto H, Sasaki Y, Fujimura T, Fukuda M, Mitani A. Adjunctive Application of Antimicrobial Photodynamic Therapy in Nonsurgical Periodontal Treatment: A Review of Literature. *J Mol Sci*. 2015. 16: 24111–24126
- Kim S, Kim J, Lim W, Jeon S, Kim O, Koh J-T, Kim C-S, Choi H, Kim O. In vitro bactericidal effects of 625, 525, and 425 nm wavelength (red, green, and blue) light-emitting diode irradiation. *Photomed Laser Surg*. 2013. 31: 554–562
- Koçkapan C. *Curriculum Endodontie*. Berlin: Quintessenz Verl. 2003
- Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002. 66: 486-505, table of contents
- Koort HJ. Die Wirkung von Laserstrahlung auf Gewebe. *Dtsch Zahnärztl Z*. 1994. 49: 100105
- Krause F, Frentzen M. Dioden-Laser in der zahnmedizinischen Anwendung. *LaserZahnheilkunde*. 2007. 4: 151-158
- Kumar S, Tadakamadla J, Johnson NW. Effect of Toothbrushing Frequency on Incidence and Increment of Dental Caries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Dent Res*. 2016. 95: 1230–1236
- Lee S-H. Antimicrobial effects of herbal extracts on *Streptococcus mutans* and normal oral streptococci. *J Microbiol*. 2013. 51: 484–489
- Leonhardt A, Olsson J, Dahlén G. Bacterial colonization on titanium, hydroxyapatite, and amalgam surfaces in vivo. *J Dent Res*. 1995. 74: 1607–1612



- Lewis MJ, Deeth HC. Heat Treatment of Milk. In: Tamime AY, Hrsg. Milk processing and quality management. Soc Dairy Tech. 2009: 168–204
- Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986. 50: 353–380
- Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci.* 2007. 22: 83–91
- Maleki F, Khosravi A, Nasser A, Taghinejad H, Azizian M. Bacterial Heat Shock Protein Activity. *J Clin Diagn Res.* 2016. 10: BE01-3
- Marsh P, Martin MV. *Orale Mikrobiologie.* Stuttgart: Thieme. 2003
- Marshall MV, Cancro LP, Fischman SL. Hydrogen peroxide: a review of its use in dentistry. *J Periodontol.* 1995. 66: 786–796
- Meister J. Untersuchungen zum Einsatz von Blitzlampen- und diodengepumpten Erbiumlasern. Habilitationsschrift. Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen. 2011
- Meister J, Frentzen M, Apel C. Grundlagen der Laserzahnheilkunde - Die Licht-Gewebe-Wechselwirkung. *LaserZahnheilkunde.* 2004. 2004: 199–204
- Meister J, Hill G, Dehn C, Frentzen M, Hopp M. Die Photodynamik in der dentalen Anwendung – Definition und Wegweiser. *Laser J.* 2014. 2014: 14–16
- Michael CA, Dominey-Howes D, Labbate M. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. *Front Public Health.* 2014. 2: 145
- Moritz A, Blum R. *Orale Lasertherapie.* Berlin: Quintessenz-Verl. 2006
- Moritz A, Gutknecht N, Goharkhay K, Schoop U, Wernisch J, Sperr W. In vitro irradiation of infected root canals with a diode laser: results of microbiologic, infrared spectrometric, and stain penetration examinations. *Quintessence Int.* 1997a. 28: 205–209
- Moritz A, Gutknecht N, Schoop U, Goharkhay K, Doertbudak O, Sperr W. Irradiation of infected root canals with a diode laser in vivo: Results of microbiological examinations. *Lasers Surg Medicine.* 1997b. 21: 221–226

- Moritz A, Jakolitsch S, Goharkhay K, Schoop U, Kluger W, Mallinger R, Sperr W, Georgopoulos A. Morphologic changes correlating to different sensitivities of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* to Nd:YAG laser irradiation through dentin. *Lasers in Surg Med*. 2000. 26: 250–261
- Moritz A, Schoop U, Goharkhay K, Schauer P, Doertbudak O, Wernisch J, Sperr W. Treatment of periodontal pockets with a diode laser. *Lasers Surg Med*. 1998. 22: 302–311
- Müller H-P. *Checklisten der Zahnmedizin Parodontologie*. s.l.: Georg Thieme Verlag KG. 2012
- Nagahara A, Mitani A, Fukuda M, Yamamoto H, Tahara K, Morita I, Ting C-C, Watanabe T, Fujimura T, Osawa K, Sato S, Takahashi S, Iwamura Y, Kuroyanagi T, Kawashima Y, Noguchi T. Antimicrobial photodynamic therapy using a diode laser with a potential new photosensitizer, indocyanine green-loaded nanospheres, may be effective for the clearance of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodont Res*. 2013. 48: 591–599
- Neelakantan P, Cheng CQ, Ravichandran V, Mao T, Sriraman P, Sridharan S, Subbarao C, Sharma S, Kishen A. Photoactivation of curcumin and sodium hypochlorite to enhance antibiofilm efficacy in root canal dentin. *Photodiagn Photodyn Ther*. 2015. 12: 108–114
- Nevot A, Lafont P, Lafont Y. De la destruction des bacteries par la chaleur; etude de l'efficacite de la pasteurisation du lait. 1958
- Niemz MH. *Laser-Tissue Interactions*. Springer International Publishing. Springer, 2019
- Oberoi SS, Dhingra C, Sharma G, Sardana D. Antibiotics in dental practice: how justified are we. *Int Dent J*. 2015. 65: 4–10
- Oliveira NEM de, Abranches J, Gaca AO, Laport MS, Damaso CR, Bastos MdCdF, Lemos JA, Giambiagi-deMarval M. *clpB*, a class III heat-shock gene regulated by CtsR, is involved in thermotolerance and virulence of *Enterococcus faecalis*. *Microbiology (Reading)*. 2011. 157: 656–665
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Ann Rev Microbiol*. 2000. 54: 49–79

- Pichhardt K. Kultivierungsverfahren. In: Pichhardt K, Hrsg. *Lebensmittelmikrobiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1984: 36–43
- Pourhajibagher M, Chiniforush N, Monzavi A, Barikani H, Monzavi MM, Sobhani S, Shahabi S, Bahador A. Inhibitory Effects of Antimicrobial Photodynamic Therapy with Curcumin on Biofilm-Associated Gene Expression Profile of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Dent (Tehran, Iran)*. 2018. 15: 169–177
- Ramakrishnan P, Maclean M, MacGregor SJ, Anderson JG, Grant MH. Cytotoxic responses to 405nm light exposure in mammalian and bacterial cells: Involvement of reactive oxygen species. *Toxicol In Vitro*. 2016. 33: 54–62
- Read AF, Day T, Huijben S. The evolution of drug resistance and the curious orthodoxy of aggressive chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011. 108 Suppl 2: 10871–10877
- Reitemeier B, Schwenzer N, Ehrenfeld M, Biffar R. *Einführung in die Zahnmedizin*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 2006
- Salim N, Moore C, Silikas N, Satterthwaite J, Rautemaa R. Chlorhexidine is a highly effective topical broad-spectrum agent against *Candida* spp. *Int J Antimicrob Agents*. 2013. 41: 65–69
- Sampaio-Maia B, Monteiro-Silva F. Acquisition and maturation of oral microbiome throughout childhood: An update. *Dent Res J*. 2014. 11: 291–301
- Saydjari Y, Kuypers T, Gutknecht N. Laser Application in Dentistry: Irradiation Effects of Nd:YAG 1064 nm and Diode 810 nm and 980 nm in Infected Root Canals-A Literature Overview. *BioMed Res Int*. 2016. 2016: 8421656
- Scannapieco FA. Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1994. 5: 203–248
- Scheibler E, Garcia MCR, Medina da Silva R, Figueiredo MA, Salum FG, Cherubini K. Use of nystatin and chlorhexidine in oral medicine: Properties, indications and pitfalls with focus on geriatric patients. *Gerodontology*. 2017. 34: 291–298
- Schmidt I. *Dekontamination von oralen Oberflächen mit photonischen Technologien*. 2018. Masterarbeit. Bonn

- Seth A. Use of trimethoprim to prevent overgrowth by *Proteus* in the cultivation of *N. gonorrhoeae*. *Br J Vener Dis*. 1970. 46: 201–202
- Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000*. 1994. 5: 7–25
- Socransky SS, Manganiello AD, Propas D, Oram V, van Houte J. Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. *J Periodont Res*. 1977. 12: 90–106
- Song H-H, Lee J-K, Um H-S, Chang B-S, Lee S-Y, Lee M-K. Phototoxic effect of blue light on the planktonic and biofilm state of anaerobic periodontal pathogens. *J Periodont Impl Sci*. 2013. 43: 72–78
- Song X, Yaskell T, Klepac-Ceraj V, Lynch MC, Soukos NS. Antimicrobial action of minocycline microspheres versus 810-nm diode laser on human dental plaque microcosm biofilms. *J Periodontol*. 2014. 85: 335–342
- Soukos NS, Mulholland SE, Socransky SS, Doukas AG. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. *Lasers Surg Med*. 2003. 33: 161–168
- Suerbaum S, Hahn H, Burchard GD, Kaufmann SHE, Schulz TF. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin: Springer. 2012
- Suliaman M. An overview of the use of lasers in general dental practice: 1. Laser physics and tissue interactions. *Dent update*. 2005. 32: 228-30, 233-4, 236
- Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998. 85: 86–93
- Sutherland IW. The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol*. 2001. 9: 222–227
- Tamura S, Yonezawa H, Motegi M, Nakao R, Yoneda S, Watanabe H, Yamazaki T, Senpuku H. Inhibiting effects of *Streptococcus salivarius* on competence-stimulating peptide-dependent biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol*. 2009. 24: 152–161

- Tao S, Li L, Yuan H, Tao S, Cheng Y, He L, Li J. Erbium Laser Technology vs Traditional Drilling for Caries Removal: A Systematic Review with Meta-Analysis. *J Evid Based Dent Pract.* 2017. 17: 324–334
- Tomasiewicz DM, Hotchkiss DK, Reinbold GW, Read RB, Hartman PA. The Most Suitable Number of Colonies on Plates for Counting. *J Food Prot.* 1980. 43: 282–286
- Torres I, Gimenez E, Pascual T, Bueno F, Huntley D, Martínez M, Navarro D. Short-term incubation of positive blood cultures in brain-heart infusion broth accelerates identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry. *J Med Microbiol.* 2017. 66: 1752–1758
- Tsuji S, Kaneko K. Antibiotics Usage and Intestinal Microbiota. *J Pediatr Biochem.* 2015. 05: 51–54
- van den Berg F, Cabri J. *Das Bindegewebe des Bewegungsapparates verstehen und beeinflussen.* Stuttgart: Thieme. 2003
- van Steenberghe TJ, van Winkelhoff AJ, Graaff J de. Pathogenic synergy: mixed infections in the oral cavity. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1984. 50: 789–798
- Verkaik MJ, Busscher HJ, Jager D, Slomp AM, Abbas F, van der Mei, Henny C... Efficacy of natural antimicrobials in toothpaste formulations against oral biofilms in vitro. *J Dent.* 2011. 39: 218–224
- Verkaik MJ, Busscher HJ, Rustema-Abbing M, Slomp AM, Abbas F, van der Mei, Henny C. Oral biofilm models for mechanical plaque removal. *Clin Oral Investig.* 2010. 14: 403–409
- Wang Y, Wang Y, Wang Y, Murray CK, Hamblin MR, Hooper DC, Dai T. Antimicrobial blue light inactivation of pathogenic microbes: State of the art. *Drug Resist Updat.* 2017. 33-35: 1–22
- Whitmore SE, Lamont RJ. The pathogenic persona of community associated oral streptococci. *Mol Microbiol.* 2011. 81: 305–314
- Wills ME, Han VEM, Harris DA, Baum JD. Short-time low-temperature pasteurisation of human milk. *Early Hum Dev.* 1982. 7: 71–80

Wolf HF, Rateitschak EM, Rateitschak K-H, Schroeder HE. Parodontologie. Stuttgart: Thieme. 2012

Wright CJ, Burns LH, Jack AA, Back CR, Dutton LC, Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. Microbial interactions in building of communities. *Mol Oral Microbiol.* 2013. 28: 83–101

Xia HX, English L, Keane CT, O'Morain CA. Enhanced cultivation of *Helicobacter pylori* in liquid media. *J Clin Pathol.* 1993. 46: 750–753

Yaseen MA, Diagaradjane P, Pikkula BM, Yu J, Wong MS, Anvari B. Photothermal and photochemical effects of laser light absorption by indocyanine green (ICG). *Optical Interactions with Tissue and Cells XVI: SPIE.* 2005: 27

Yoshida A, Sasaki H, Toyama T, Araki M, Fujioka J, Tsukiyama K, Hamada N, Yoshino F. Antimicrobial effect of blue light using *Porphyromonas gingivalis* pigment. *Sci Rep.* 2017. 7: 5225

zur Wiesch PA, Kouyos R, Engelstädter J, Regoes RR, Bonhoeffer S. Population biological principles of drug-resistance evolution in infectious diseases. *Lancet Infect Dis.* 2011. 11: 236–247

## 9. Anhang

**Tab. 10:** Für die Thermoversuche und Laserapplikationen mit Mikroorganismen verwendeten Geräte und Hilfsmittel.

Geräte	Hersteller
Autoklav	HP Medizintechnik GmbH München
Diodenlaser mit Laserfasern (Bulb [Ø 300 µm] & Bare [Ø 320 µm]) Fox III, Fox IV	A. R. C. Laser GmbH, Nürnberg
Inkubator	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Laserleistungsenergiemessgerät (LabMax-Top) + dazugehörigen Leistungsmesskopf (PM10)	Coherent, Santa Clara (CA), USA
Linearmesstisch (3D [x,y,z])	Physik Instrumente (PI) GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sterile Werkbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Thermocycler TGradient	Biometra GmbH, Göttingen
Vortex	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Waage (NewClassic MF)	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Zelldichtemessgerät OD <sub>600</sub> (Photometer) Amersham Bioscience Ultrospec™ 10	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Laborzubehör	Hersteller
Bechergläser [200 mL]	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main
Falcon-Tubes [15mL]	Greiner bio-one, Frickenhausen
Glaskugeln (Ø 4 mm)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magnetrührfische und Angel	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Petrischalen (94 mm x 16 mm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipetten [10 µL; 20 µL; 200 µL; 1000 µL]	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim

Pipettierhilfe „Pipetus“	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Pipettenspitzen [200 µL; 1000 µL]	STARLABS INTERNATIONAL GmbH, Hamburg
Reagenzgläser	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main
Schottflaschen [500 mL]	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main
Tubes [0,2 mL; 1,5 mL; 2,0 mL]	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Substanz	Hersteller
Ampicillin [25 mg/mL]	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylalkohol [70%]	Werner Hofmann, Düsseldorf
SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)	Merck KGaA, Darmstadt

**Tab. 11:** Für die Versuche mit humanen Suspensionszellen (THP-1) zusätzlich verwendeten Geräte und Hilfsmittel.

Geräte	Hersteller
CO <sub>2</sub> – Inkubator Thermo Forma (37°C / 5% CO <sub>2</sub> )	Thermo-Fisher Scientific, Waltham (MA), USA
Handzählgerät	InFactory Solutions GmbH, Taufkirchen
Hämozytometer (Neubauer Zählkammer) Tiefe: 0,1 mm; Volumen: 0,0025 mm <sup>2</sup>	Marienfeld-Superior GmbH, Königshofen
Deckgläser f. Hämozytometer [20x26x0,4 mm]	
Mikroskop (Primovert)	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Zentrifuge (Biofuge stratus)	Heraeus Holding GmbH, Hanau



Laborzubehör	Hersteller
RPMI-Medium [1640 (1x), +10% FCS, +1% AB (Streptomycin, Penicillin)]	Life Technologies (Thermo-Fisher Scientific), Waltham (MA), USA
Zellkulturflaschen [250 mL]	Greiner bio-one, Frickenhausen
Substanzen	Hersteller
humane THP-1 Zellen	ATCC, Manassas (VA), USA
Trypanblau [0,4%]	Sigma GmbH, Osterode am Harz

**Tab. 12:** Tabellarische Darstellung der gewünschten und tatsächlich eingestellten optischen Dichten der entsprechenden Bakteriensuspensionen.

Teststamm	Versuch [n]	Gewünschte OD <sub>600</sub>	Gemessene OD <sub>600</sub>
<b><i>S. sobrinus</i></b>	n = 2	1,00	0,97
		0,50	0,47
		0,25	0,26
	n = 2	1,00	0,95
		0,50	0,48
		0,25	0,26
	n = 2	1,00	0,99
		0,50	0,51
		0,25	0,23
<b><i>S. salivarius</i></b>	n = 2	1,00	1,03
		0,50	0,43
		0,25	0,23
	n = 2	1,00	0,93
		0,50	0,56
		0,25	0,27
	n = 2	1,00	0,95
		0,50	0,51
		0,25	0,29
<b><i>E. faecalis</i></b>	n = 2	1,00	1,00
		0,50	0,52
		0,25	0,23
	n = 2	1,00	0,97
		0,50	0,47
		0,25	0,28
	n = 2	1,00	0,95
		0,50	0,45
		0,25	0,27

**Tab. 13:** Tabellarische Darstellung der gewünschten und jeweils tatsächlich eingestellten optischen Dichten der entsprechenden Bakteriensuspensionen (*S. sobrinus*, *S. salivarius*, *E. faecalis*) bei unterschiedlichen Wellenlängen (445 nm; 810 nm).

Teststamm	Wellenlänge / Faser	Versuch [n]	Gewünschte OD <sub>600</sub>	Gemessene OD <sub>600</sub>
<b><i>S. sobrinus</i></b>	445 nm -bare-	n = 2	1,00	0,99
			0,50	0,50
			0,25	0,25
		n = 2	1,00	1,04
			0,50	0,48
			0,25	0,25
	n = 2	1,00	0,98	
		0,50	0,47	
		0,25	0,26	
	445 nm -bulb-	n = 2	1,00	1,01
			0,50	0,55
			0,25	0,24
		n = 2	1,00	0,96
			0,50	0,50
			0,25	0,25
	810 nm -bare-	n = 2	1,00	0,96
			0,50	0,48
			0,25	0,24
n = 2		1,00	1,02	
		0,50	0,49	
		0,25	0,28	
445 nm -bare-	n = 2	1,00	1,00	
		0,50	0,51	
		0,25	0,25	
	n = 2	1,00	0,96	
		0,50	0,52	
		0,25	0,26	
445 nm -bulb-	n = 2	1,00	1,03	
		0,50	0,51	
		0,25	0,28	
	n = 2	1,00	1,01	
		0,50	0,49	
		0,25	0,27	
<b><i>S. salivarius</i></b>	445 nm -bare-	n = 2	1,00	1,04
			0,50	0,51
			0,25	0,25
	445 nm -bulb-	n = 2	1,00	0,99
			0,50	0,53
			0,25	0,25
n = 2	1,00	0,94		
	0,50	0,48		

			0,25	0,26
			1,00	1,05
		n = 2	0,50	0,53
	810 nm		0,25	0,28
	-bare-		1,00	1,03
		n = 2	0,50	0,53
			0,25	0,26
			1,00	0,96
		n = 2	0,50	0,52
			0,25	0,25
	445 nm		1,00	1,00
	-bare-	n = 2	0,50	0,50
			0,25	0,27
			1,00	1,05
		n = 2	0,50	0,50
			0,25	0,29
			1,00	0,94
		n = 2	0,50	0,49
			0,25	0,26
	445 nm		1,00	0,98
<b><i>E. faecalis</i></b>	-bulb-	n = 2	0,50	0,51
			0,25	0,23
			1,00	1,00
		n = 2	0,50	0,52
			0,25	0,26
	810 nm		1,00	0,95
	-bare-	n = 2	0,50	0,48
			0,25	0,26
			1,00	0,98
		n = 2	0,50	0,50
			0,25	0,24

**Tab. 14:** Kalibrierung beider Diodenlaser (FOX III / IV) vor jedem Versuchsansatz aller drei Teststämme (*S. sobrinus*; *S. salivarius*; *E. faecalis*) mittels Laserleistung- und Energiemessgerät. Aufgelistet sind die Soll-Werte der Laserleistung, die jeweils am Laserdisplay eingestellten Leistungswerte und die gemessenen Ist-Werte [W]. Aufgrund der Streuung der Laserstrahlen bei der Bulb-Faser entfällt eine Kalibrierung.

Teststamm	Wellenlänge / Faser	Versuch [n]	Soll [W]	Eingestellt [W]	Ist [W]
<b>S. sobrinus</b>	445 nm -bare-	n = 2	0,5	0,6	0,47
			1,0	1,2	0,98
			1,5	1,8	1,47
			2,0	2,4	1,96
		n = 2	0,5	0,6	0,47
			1,0	1,1	1,00
			1,5	1,7	1,49
			2,0	2,2	1,97
	n = 2	0,5	0,6	0,50	
		1,0	1,1	0,99	
		1,5	1,6	1,51	
		2,0	2,2	2,02	
	445 nm -bulb-	n = 2 (alle Ansätze)	0,5	0,6	-
			1,0	1,1	-
			1,5	1,6	-
			2,0	2,1	-
810 nm -bare-	n = 2	0,5	0,5	0,48	
		1,0	1,0	0,96	
		1,5	1,5	1,53	
		2,0	2,0	1,97	
	n = 2	0,5	0,5	0,54	
		1,0	1,0	1,00	
		1,5	1,5	1,56	
		2,0	2,0	2,12	
<b>S. salivarius</b>	445 nm -bare-	n = 2	0,5	0,6	0,48
			1,0	1,3	1,03
			1,5	1,9	1,49
			2,0	2,1	1,97
		n = 2	0,5	0,6	0,53
			1,0	1,2	1,03
			1,5	1,8	1,45
			2,0	2,4	2,01
	n = 2	0,5	0,6	0,49	
		1,0	1,2	1,02	
		1,5	1,7	1,51	
		2,0	2,2	2,03	
445 nm -bulb-	n = 2 (alle Ansätze)	0,5	0,6	-	
		1,0	1,1	-	
		1,5	1,6	-	

			2,0	2,1	-
		n = 2	0,5	0,5	0,51
			1,0	1,0	0,99
			1,5	1,5	1,50
			2,0	2,0	1,97
	810 nm		0,5	0,5	0,60
	-bare-	n = 2	1,0	1,0	0,99
			1,5	1,5	1,49
			2,0	2,0	2,01
		n = 2	0,5	0,5	0,52
			1,0	1,0	0,99
			1,5	1,5	1,48
			2,0	2,0	1,99
	445 nm		0,5	0,5	0,47
	-bare-	n = 2	1,0	1,0	1,02
			1,5	1,5	1,52
			2,0	2,0	1,95
		n = 2	0,5	0,5	0,48
			1,0	1,0	1,01
			1,5	1,6	1,51
			2,0	2,1	1,97
<b>E. faecalis</b>	445 nm	n = 2	0,5	0,6	-
	-bulb-	(alle Ansätze)	1,0	1,1	-
			1,5	1,6	-
			2,0	2,1	-
		n = 2	0,5	0,5	0,51
			1,0	1,1	1,01
			1,5	1,6	1,50
			2,0	2,1	1,98
	810 nm		0,5	0,5	0,51
	-bare-	n = 2	1,0	1,0	0,99
			1,5	1,6	1,50
			2,0	2,1	1,99

## 10. Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. dent. Matthias Frentzen für die Überlassung des Themas, sowie für die enge Betreuung und freundliche Unterstützung bei diversen Fragestellungen und die konstruktiven Ratschläge in den verschiedenen Phasen dieser Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt Frau Beate Schiermeyer - Dunkhase für die jahrelange Unterstützung und Betreuung bei der Planung und Durchführung der Versuche, sowie der fortwährenden Motivation während des Schreibprozesses. Ohne Deine stete Begleitung möchte ich mir die unzähligen Stunden und Tage im Labor nicht vorstellen.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. rer. nat. Jörg Meister für die Unterstützung bei der Arbeit im Laserlabor und der Beantwortung von fachlichen Fragen zur Lasertechnologie. Auch gilt mein Dank Herrn Dr. med. dent. Dominik Kraus für die Unterstützung im Rahmen der Konzeption der Versuche.

Ich danke ebenfalls Frau Isabel Schmidt, die mich bei der Durchführung der Versuchsreihen unterstützte.

Ich danke Frau Imke Bayer für die Hilfe und Unterstützung bei der Kultivierung der THP-1 Zellen.

Für die tolle Arbeitsatmosphäre im Labor bedanke ich mich bei: Inka Bay, Imke Bayer, Diana Lalaouni, Monika Butz und Anna Weber.

Ich danke Frau Annika Strömer für die statistische Beratung am Institut für medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie (IMBIE) der Universität Bonn

Mein Dank gilt insbesondere meinen Eltern für die fortwährende Motivation und Unterstützung während des Studiums und in allen Lebenslagen. Ohne Euch wäre all das nicht möglich gewesen.

Zudem danke ich meiner Freundin Lucy, die mich das gesamte Studium hinweg begleitet hat und in jeder Lebenslage durch ihr offenes Ohr und Verständnis für meine Sorgen meine wichtigste Stütze gewesen ist.