

Abschlussbericht

Ermittlung des Einflusses der Nanophotonentechnologie® auf *in vitro*-Zellkulturen

Adressat: Luxxamed GmbH
Patrick Walitschek
Fuldablick 3
34355 Staufenberg

Bearbeiter: Dr.-Ing. habil. Christiane Wetzel,
M.Sc. Anna Karutz
Fraunhofer-Institut für Elektronenstrahl- und Plasmatechnik
Medizinische Applikationen
Winterbergstraße 28
01277 Dresden

Dresden, den 6. März 2013

1. Einleitung

Die Nanophotonentechnologie® ist eine Methode der Lichttherapie. Sie wird in der Akupunktur, bei der Behandlung von Narben und Wunden sowie bei der Behandlung von Muskeln bzw. Triggerpunkten eingesetzt. Die Wirksamkeit resultiert aus der gleichzeitigen Stimulation vieler inter- und intrazellulärer Prozesse. Die applizierten Photonen sollen den Zellmetabolismus steigern, den Antioxidschutz erhöhen sowie die Bildung von DNA und RNA fördern.

In der Biomedizinischen Laboreinheit des Fraunhofer FEP sollte im Rahmen einer Masterarbeit der Einfluss der Nanophotonentechnologie® speziell auf zellbiologische Vorgänge untersucht werden. Realisiert wurde dies durch ***in vitro*-Tests mit Zellkulturen** und der Bestimmung definierter, zellbiologischer Parameter. Darüber hinaus sollten durch eine schwache Zellschädigung weitere Untersuchungen zur Optimierung der angewandten Nanophotonentechnologie® beitragen. Nach Absprache mit dem Auftraggeber wurden zusätzliche Untersuchungen bezüglich des Einsatzes der Nanophotonentechnologie® zur Entzündungshemmung durchgeführt.

Die Nanophotonentechnologie® ist äußere Anwendung. D.h. frequenzbelegte Lichtimpulse, sogenannte Nanophotonen, werden in der Praxis über LEDs¹ auf die Haut des Menschen appliziert. Aufgrund dessen wurden als *in vitro*-Modellsysteme für die Untersuchungen zwei Zellarten ausgewählt, die im Bereich der menschlichen Haut lokalisiert sind. Zum einen wurde der Einfluss des Lichtes bestimmter Wellenlängen und vorgegebener Frequenzen auf die **humanen Fibroblasten** (dermale Bindegewebszellen; Zelllinie: AG01522D) näher analysiert, zum anderen wurde der Effekt auf die **humanen Keratinocyten** (epitheliale Zellen; Zelllinie: HaCaT) eingehender betrachtet.

2. Vorgehensweise

2.1 Testzyklen und Versuchaufbau

Alle Untersuchungen wurden an *in vitro*-Kulturen von humanen Fibroblasten (AG01522D) und humanen Keratinocyten (HaCaT) durchgeführt. Diese *in vitro*-Kulturen wurden einmal ohne und einmal mit vorhergehender schwacher Zellschädigung durch Cycloheximid einer Nanophotonen-LED-Behandlung unterzogen. Alle verwendeten Analysemethoden sind ausgewählte sensitive Methoden, die dem Stand der Technik entsprechen.

Eine Matrix der Testzyklen wurde im Angebot unterbreitet und als Untersuchungsgrundlage akzeptiert. Tabelle 1 zeigt zusammenfassend einen Überblick über das Testregime und die Analysemethoden.

¹ Licht emittierende Dioden

Tabelle 1: Realisiertes Testregime

Versuchsgruppe	Zellen	Vorschädigung	Behandlung	Behandlungszahl und Testverfahren
Kontrolle ungeschädigt	Fibroblasten	ohne Vorschädigung	keine	- T1 – T7
	Keratinocyten			
Behandelt ungeschädigt	Fibroblasten	ohne Vorschädigung	rotes LED-Licht, blaues LED-Licht	10 Behandlungen je 20 min T1 – T7
	Keratinocyten			
Kontrolle vorgeschädigt	Fibroblasten	mit Vorschädigung (24 h 1 µM Cycloheximid)	keine	- T1 – T7
	Keratinocyten			
Behandelt vorgeschädigt	Fibroblasten	mit Vorschädigung (24 h 1 µM Cycloheximid)	rotes LED-Licht, blaues LED-Licht	10 Behandlungen je 20 min T1 – T7
	Keratinocyten			

Zellbiologisches Testverfahren (T1):

Analyse der Zellmorphologie mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Zellbiologisches Testverfahren (T2):

Analyse des intrazellulären ATP-Gehalts

Zellbiologisches Testverfahren (T3):

Analyse der Zellvitalität mit der Durchflusszytometrie (FACS)

Zellbiologisches Testverfahren (T4):

Analyse des Zellzyklus mit der Durchflusszytometrie (FACS)

Zellbiologisches Testverfahren (T5):

Analyse der Zellstoffwechselaktivität mittels Resazurin-Reduktionstest

Zellbiologisches Testverfahren (T6):

Analyse des Zellwachstums

Zellbiologisches Testverfahren (T7):

Analyse der Entzündungsparameter IL-6 und IL-8

Das Programm für die Nanophotonentechnologie® wurde so modifiziert, dass der Einfluss des roten und blauen LED-Lichtes separat voneinander untersucht werden konnte. Des Weiteren wurde die Programmdauer auf 3 h 20 min erhöht, was in der Praxis zehn Behandlungen je 20 min entspricht. Um einer gegenseitigen Beeinflussung sowie der Einwirkung äußerer ungewollter Einflüsse entgegenzuwirken, wurden die in den Experimentiergefäßen beinhalteten Zellen während der Nanophotonen-LED-Behandlung innerhalb des Brutschrankes durch lichtundurchlässige Platten voneinander abgeschirmt.

2.2 Theorie zum intrazellulären ATP-Gehalt und der Stoffwechselaktivität einer humanen Zelle

Die Gesamtheit der zur Aufrechterhaltung der Lebensvorgänge notwendigen Stoffwechselprozesse in einer Zelle wird als Zellstoffwechsel bzw. Zellmetabolismus bezeichnet. Eine Differenzierung der Stoffwechselreaktionen erfolgt in Katabolismus und Anabolismus. Katabole Stoffwechselwege sind charakterisiert durch den energieliefernden Abbau komplexer Moleküle, wohingegen bei anabolen Reaktionen unter Energieverbrauch körpereigene Stoffe aus einfachen Bausteinen aufgebaut werden.

Stoffwechselaktivität

Aufschluss über die metabolische Gesamtaktivität von Zellen gibt der häufig genutzte Resazurin-Reduktionstest. Dabei wird Resazurin in die Zelle aufgenommen und in Abhängigkeit der Stoffwechselaktivität irreversibel zum rosafarbenen, fluoreszierenden Resorufin reduziert. Als unmittelbare Reaktionsmediatoren dienen die bei zellmetabolischen Prozessen gebildeten Reduktionsäquivalente. Dabei ist jedoch noch nicht geklärt, ob der Umsatz nur in den Mitochondrien oder auch im Cytoplasma stattfindet.

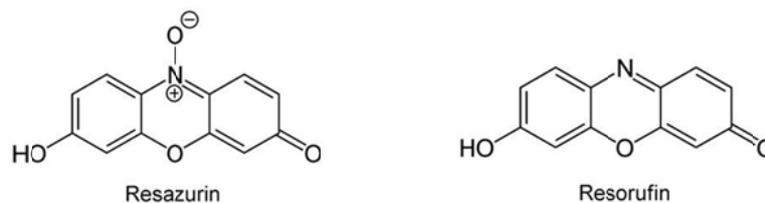


Abbildung 1: Chemische Struktur von Resazurin und Resorufin

Die Anregungswellenlänge für das Resorufin beträgt 560 nm, die Emissionswellenlänge 590 nm. Die ermittelten Fluoreszenzintensitäten wurden als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU) ausgegeben. Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit erfolgte die Auswertung der Probandaten als relative Stoffwechselaktivität prozentual bezogen auf die mitgeführte Kontrolle.

Adenosintri-phosphat

Eine zentrale Rolle im Zellmetabolismus spielt dabei das Adenosintri-phosphat (ATP). Es ist das energiereichste Molekül, was der menschliche Organismus selbst synthetisieren kann, und fungiert als Regulator bzw. Signalmolekül vieler energieliefernder Prozesse. Wie in Abbildung 2 dargestellt, setzt sich die Grundstruktur Moleküls zusammen aus einem Adeninrest, dem Zucker Ribose und drei Phosphatresten.

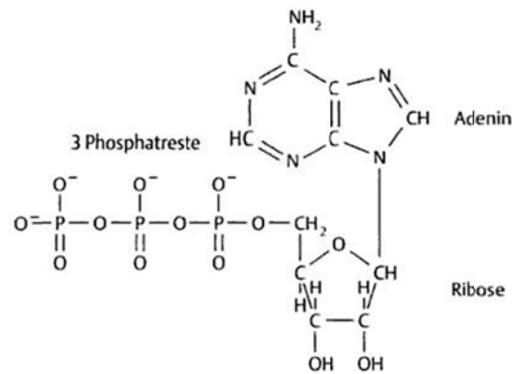


Abbildung 2: Chemische Struktur von Adenosintriphosphat

Fast die gesamte Zellarbeit hängt von der Aktivierung anderer Moleküle durch ATP ab. Zum Beispiel ist es als essentieller Faktor am aktiven Stofftransport durch semipermeable Biomembranen, der Synthese von organischen Molekülen und bei Muskelkontraktionen beteiligt. Eine etablierte Methode zur Ermittlung des ATP-Gehaltes innerhalb der Zelle ist das Luciferin-Luciferase-System. Dabei wird ATP über die Luciferase-katalysierte Oxidation von D-Luciferin nachgewiesen. Der Gehalt an ATP korreliert mit der Intensität des emittierten Lichtes, welches bei einer Wellenlänge von 560 nm vermessen wird.



Die Kenntnis der intrazellulären ATP-Konzentration gibt einen spezifischen und direkten Einblick in den Energiehaushalt der Zelle, der in Korrelation mit anderen zellbiologischen Parametern noch spezifiziert werden kann.

2.3 Theorie zur Analyse des Zellzyklus einer humanen Zelle

Der Zellzyklus beschreibt den periodischen Ablauf von Ereignissen in einer eukaryotischen Zelle von einer Zellteilung zur nächsten. Dieser zyklische Vorgang nimmt einen maximalen Zeitraum von 24 Stunden ein und wird dabei in verschiedene Phasen eingeteilt: der Mitosephase, in der die Kernteilung und die schlussendliche Zellteilung stattfindet, und der Interphase, die das Wachstum der Zelle an sich und die Synthese von essentiellen Zellbestandteilen umfasst. Der Zyklus beginnt mit der G1-Phase (Wachstumsphase). Die Zelle synthetisiert essentielle Proteine, Zellorganellen und RNA und nimmt an Größe zu. Darauf folgt die Synthesephase, in der unter hohem Energieaufwand die DNA repliziert wird. In der G2-Phase bereitet sich die Zelle auf die Zellteilung vor, indem sie sich durch Lösung der Zell-Zell-Kontakte von den Nachbarzellen abgrenzt und abrundet. Dann findet die eigentliche Zellteilungsphase, genauer die Mitosephase statt. In der G1-Phase befindet sich ein wichtiger Kontrollpunkt des Zellzyklus. An diesem wird entschieden, ob die Zelle sich ausdifferenziert, somit spezifische Aufgaben im Körper übernimmt und den Zellzyklus nicht mehr durchläuft, d.h. in der sogenannten G0-Phase (Ruhephase) verweilt, oder ob der Zellzyklus fortgesetzt wird. Eine Rückkehr in die G1-Phase ist aber für bestimmte Zelltypen möglich. Abbildung 3 zeigt den Ablauf eines Zellzyklus.

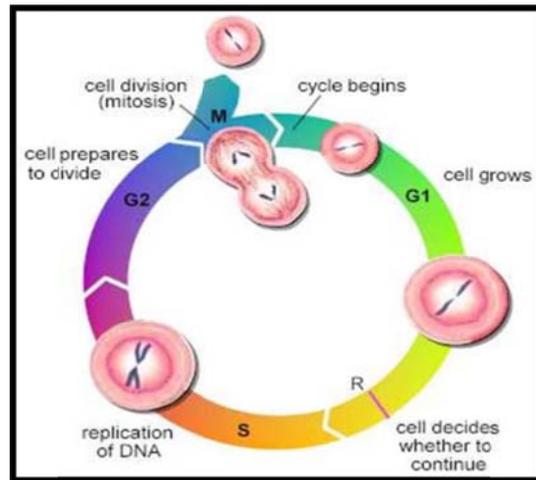


Abbildung 3: Zellzyklus² einer humanen Zelle

2.4 Theorie zur Entzündung

Eine Entzündung ist eine komplexe Antwort des menschlichen Organismus auf innere sowie äußere physikalische, biologische oder chemische Reize mit dem Sinn, diese zu beseitigen, zu unterbinden oder daraus resultierende Schäden zu reparieren. Als wichtige Signalmoleküle und Mediatoren stehen die Zytokine im Vordergrund. Für die Untersuchungen wurden zwei proinflammatorische³ Zytokine erwähnt, die an der Einleitung und Vermittlung von Entzündungen beteiligt sind: Interleukin-6 (kurz: IL-6) und Interleukin-8 (IL-8). Das IL-6 fungiert dabei als direkter Regulator einer Entzündungsreaktion und das IL-8 dient als Entzündungsmediator. Die Quantifizierung dieser Interleukine erfolgte mit dem solid phase sandwich ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), bei dem die Konzentration an IL-6 bzw. IL-8 im Zellkulturüberstand detektiert wurde.

² MURRAY, Andrew. *The cell cycle*. New York : Oxford University Press, 1993. S. 8.

³ Entzündungsreaktion einleitend

3. Diskussion der Ergebnisse

In Vorversuchen wurde untersucht, welche Zellkonzentration für die Folgeversuche und welche Substanz für eine schwache Zellschädigung geeignet waren. Diese Ergebnisse dienen als Grundlage für den weiteren Ablauf der Untersuchungen zur Nanophotonentechnologie®.

3.1 Reaktionsverhalten der humanen Hautzellen

3.1.1 Zellmorphologie

Sowohl bei der Lichtmikroskopie, als auch bei der Fluoreszenzmikroskopie (siehe **Abbildung 4** und **Abbildung 5**) konnten keine Unterschiede im Aussehen zwischen behandelten Zellen und den Kontrollgruppen festgestellt werden.

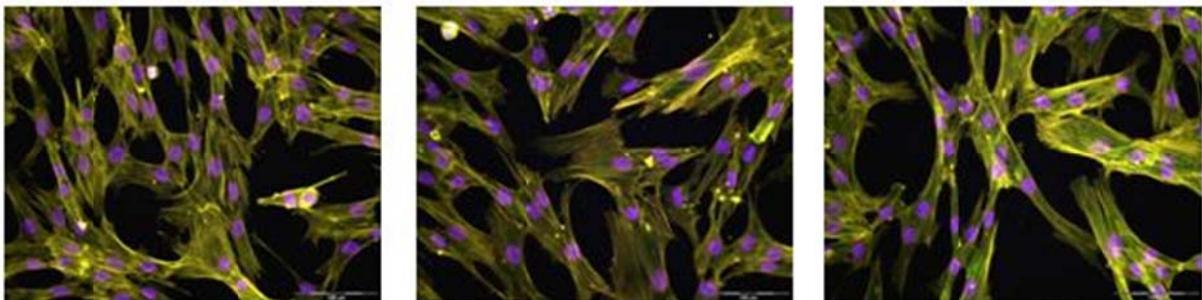


Abbildung 4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der unbehandelten Fibroblasten (links), der mit rotem Licht behandelten Fibroblasten (Mitte) und der mit blauem Licht behandelten Fibroblasten (rechts) in 200-facher Vergrößerung

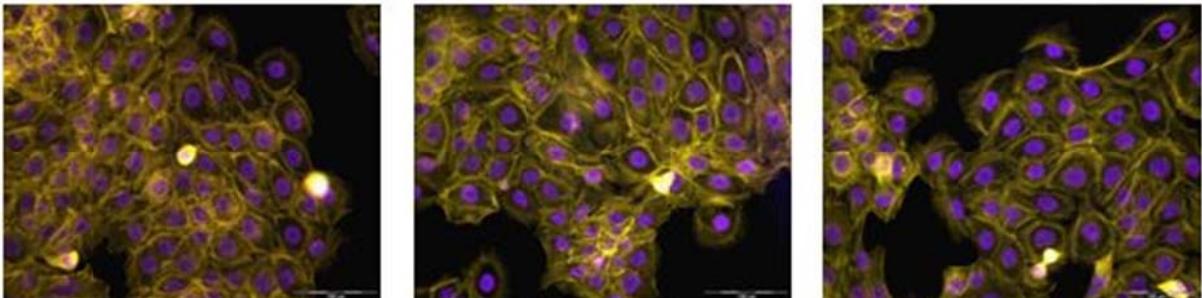


Abbildung 5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der unbehandelten Keratinocyten (links), der mit rotem Licht behandelten Keratinocyten (Mitte) und der mit blauem Licht behandelten Keratinocyten (rechts) in 200-facher Vergrößerung

Nicht behandelte sowie behandelte Zellen zeigten eine gute Anhaftung und Ausbreitung, was für eine gesunde Population spricht. Eine schädigende Wirkung der Nanophotonen-LED-Behandlung wird somit ausgeschlossen.

3.1.2 Intrazellulärer ATP-Gehalt und Stoffwechselaktivität

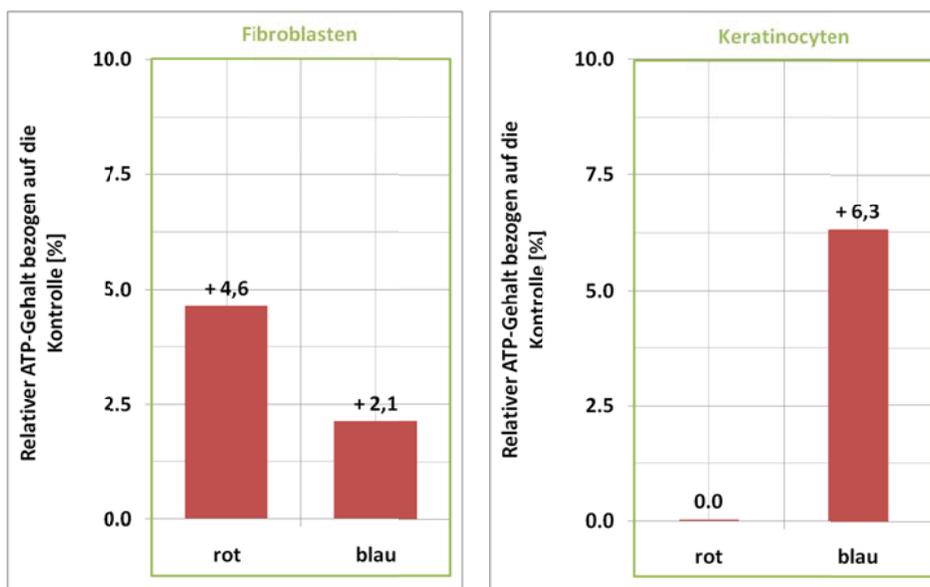


Abbildung 6: Relativer intrazellulärer ATP-Gehalt der Fibroblasten (links) und Keratinocyten (rechts) und nach der Nanophotonen-LED-Behandlung als prozentuale Abweichung von der unbehandelten Kontrolle

Bei den Fibroblasten führte die Anwendung der Nanophotonentechnologie® zu einer tendenziellen Zunahme der Konzentration an intrazellulärem ATP im Vergleich zur Kontrollgruppe. Vor allem die Applikation des roten Lichtes auf die Zellen regte die Produktion des wichtigsten zellulären Energielieferanten an. Die Keratinocyten zeigten ein abweichendes Reaktionsverhalten durch die Nanophotonen-LED-Behandlung. Hier führte die Bestrahlung mit blauem Licht zu einer tendenziellen Steigerung der ATP-Synthese um 6,3 % an. Der Einsatz der Nanophotonentechnologie® beeinflusst den intrazellulären ATP-Gehalt und somit den Energiehaushalt der Hautzellen positiv. D.h. es steht mehr Energie für energieverbrauchende wie die Zellteilung oder Synthese essentieller Bestandteile der menschlichen Zelle zur Verfügung.

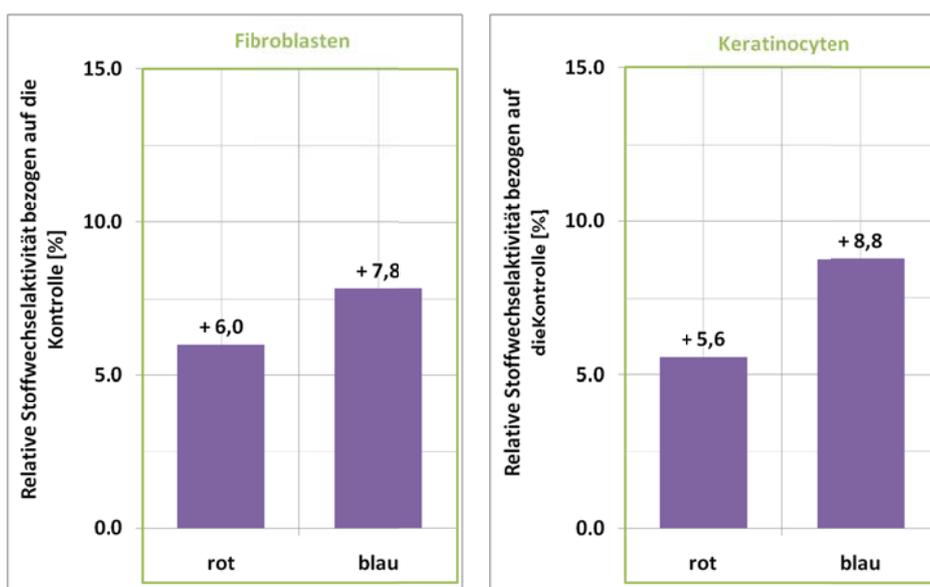


Abbildung 7: Relative Stoffwechselaktivität der Fibroblasten (links) und Keratinocyten (rechts) und nach der Nanophotonen-LED-Behandlung als prozentuale Abweichung von der unbehandelten Kontrolle

Durch die Applikation von rotem Licht auf die Hautzellen stieg die Gesamtstoffwechselaktivität um ca. 6 %. Eine deutlichere Erhöhung der Stoffwechselaktivität um 8 bis 9 % konnte nach der Behandlung der Fibroblasten sowie der Keratinocyten mit blauem Licht festgestellt werden. Demnach übt die Nanophotonentechnologie® einen positiven Einfluss auf die metabolische Aktivität der humanen Zellen aus. Eine gesteigerte Stoffwechselaktivität bedeutet, dass die gesunden, vitalen Zellen mehr Energie z.B. zur Zellteilung und –vermehrung zur Verfügung haben.

3.1.3 Zellzyklus

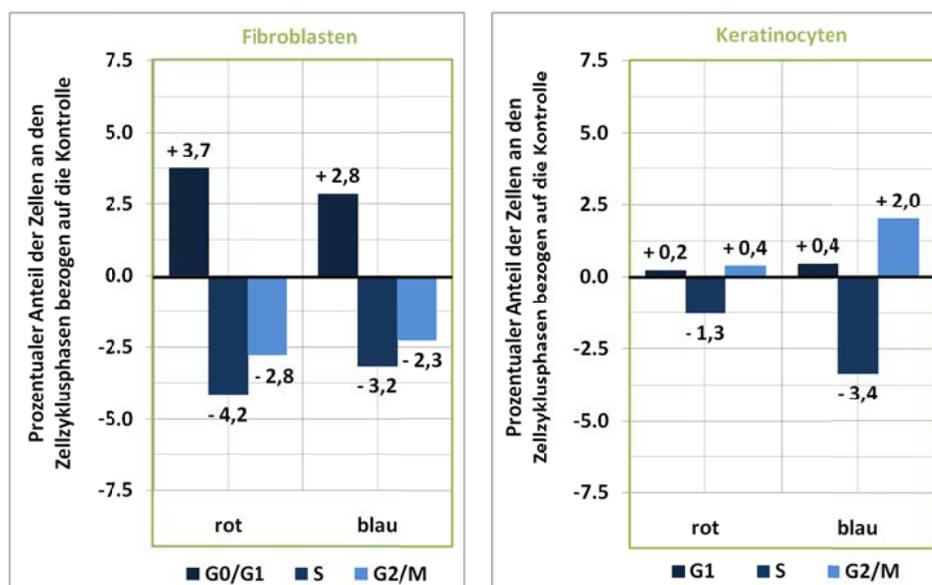


Abbildung 8: Anteile der Fibroblasten (links) und Keratinocyten (rechts) in den jeweiligen Zellzyklusphasen und nach der Nanophotonen-LED-Behandlung als prozentuale Abweichung von der unbehandelten Kontrolle

Die Fibroblasten tendierten nach der Nanophotonen-LED-Behandlung in Richtung Ruhephase, erkennbar an der prozentualen Zunahme in der G0/G1-Phase im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis war nach der Bestrahlung mit rotem Licht umso deutlicher ausgeprägt (+ 3,7 %). Bei den Keratinocyten hingegen kam es vor allem durch die Applikation des blauen Lichtes zur Erhöhung des prozentualen Anteils der Zellen in der G2/M-Phase (+ 2,0 %), was für eine Tendenz in Richtung Zellteilung spricht.

3.2 Modell des Ausheilereffektes

Die mit * gekennzeichneten Beschriftungen innerhalb der folgenden Abbildungen beziehen sich auf die schwache Vorschädigung der Zellen mit Cycloheximid.

3.2.1 Zellmorphologie der vorgeschädigten Hautzellen

Analog der Ergebnisse zu den ungeschädigten Hautzellen zeigten auch die mit Cycloheximid vorgeschädigten Zellen durch die Nanophotonen-LED-Behandlung keine zellmorphologischen Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die vorgeschädigten Zellen wiesen – wie zu erwarten - eine geringere Zelldichte als die ungeschädigten Zellen auf. Eine schädigende Wirkung der Nanophotonen-LED-Behandlung wird somit ausgeschlossen.

3.2.2 Intrazellulärer ATP-Gehalt und Stoffwechselaktivität der vorgeschädigten Hautzellen

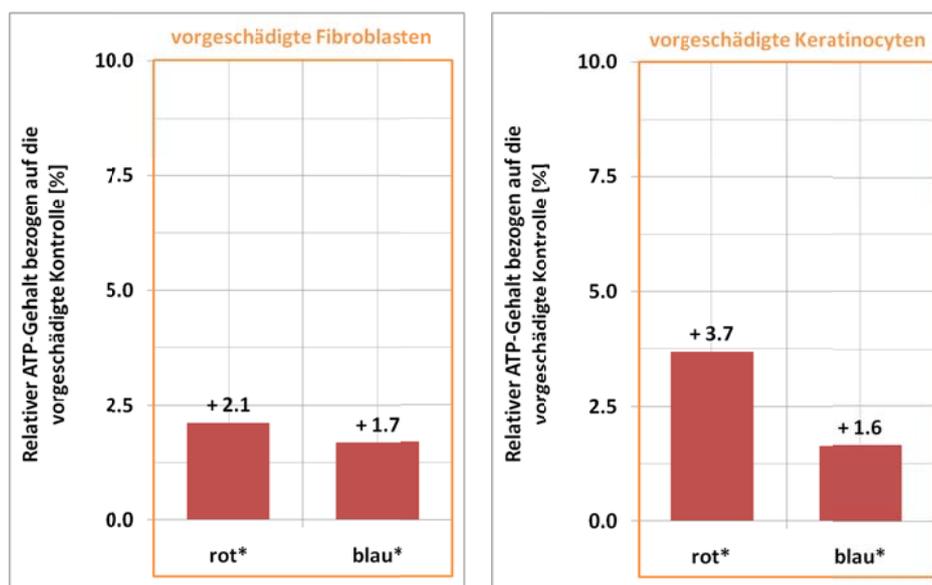


Abbildung 9: Relativer intrazellulärer ATP-Gehalt der vorgeschädigten Fibroblasten (links) und der vorgeschädigten Keratinocyten (rechts) und nach der Nanophotonen-LED-Behandlung als prozentuale Abweichung von der unbehandelten, vorgeschädigten Kontrolle

Sowohl bei den Fibroblasten, als auch den Keratinocyten resultierte die Nanophotonen-LED-Behandlung in einer tendenziellen Steigerung des intrazellulären ATP-Gehaltes. Die Applikation des roten Lichtes auf die Zellen führte bei beiden Zellarten zu einer deutlicheren Stimulation der ATP-Produktion. Der Einsatz der Nanophotonentechnologie® unterstützt den Ausheilereffekt der Zellen dahingehend, dass mehr Energie für den Regenerationsprozess zur Verfügung steht.

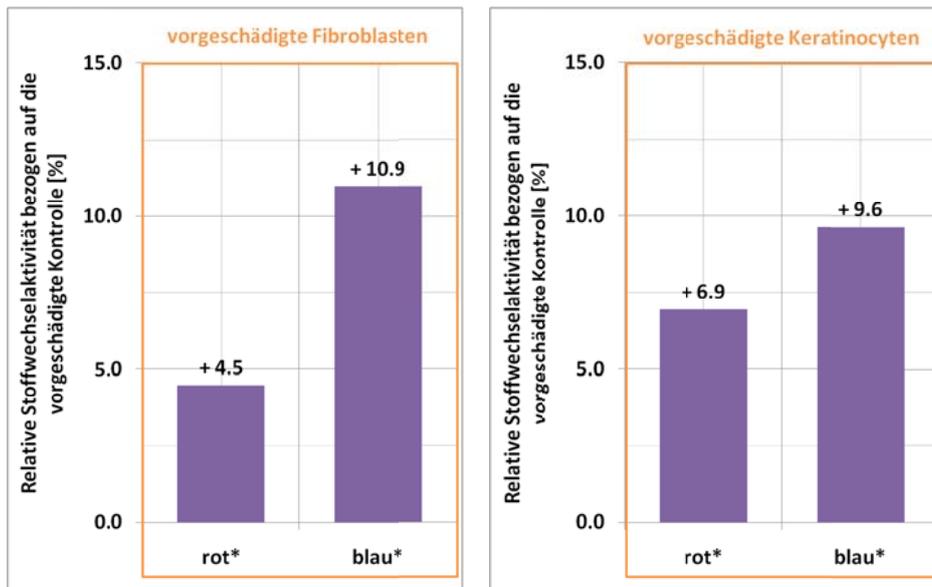


Abbildung 10: Relative Stoffwechselaktivität der vorgeschädigten Fibroblasten (links) und der vorgeschädigten Keratinocyten (rechts) und nach der Nanophotonen-LED-Behandlung als prozentuale Abweichung von der unbehandelten, vorgeschädigten Kontrolle

Durch die Bestrahlung mit rotem Licht ging eine Stimulation der Stoffwechselaktivität der Fibroblasten sowie der Keratinocyten hervor. Die Applikation von blauem Licht auf die Hautzellen steigerte die Gesamtstoffwechselaktivität signifikant um 10,9 % (Fibroblasten) bzw. 9,6 % (Keratinocyten). Die Nanophotonentechnologie® übt einen positiven Einfluss auf die metabolische Aktivität der humanen Zellen aus. Bei diesen vorgeschädigten Zellen bedeutet eine Zunahme der metabolischen Aktivität, dass mehr Energie für den Regenerationsprozess zur Verfügung.

3.2.3 Zellzyklus der vorgeschädigten Hautzellen

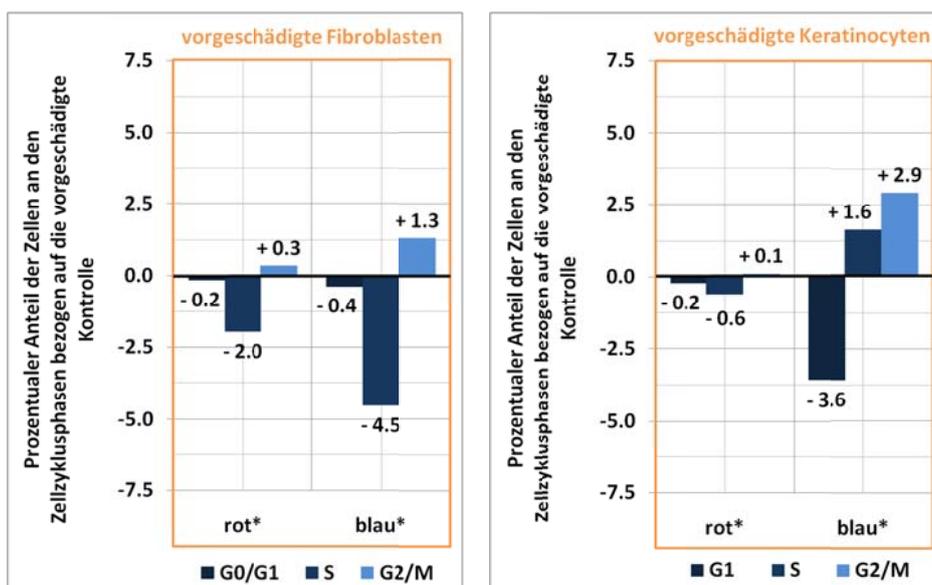


Abbildung 11: Prozentuale Anteile der jeweiligen Zellzyklusphasen der vorgeschädigten Fibroblasten (links) und der vorgeschädigten Keratinocyten (rechts) und nach der Nanophotonen-LED-Behandlung als prozentuale Abweichung von der unbehandelten vorgeschädigten Kontrolle

Die Fibroblasten sowie die Keratinocyten zeigten ein ähnliches Reaktionsverhalten auf die Nanophotonen-LED-Behandlung. Durch die Applikation des blauen Lichtes auf die humanen Hautzellen zeigte sich eine Erhöhung des prozentualen Anteils der Zellen in der G2/M-Phase (+ 1,3 % bei den Fibroblasten; + 2,9 % bei den Keratinocyten). Dies spricht bei beiden Zellarten für eine Tendenz in Richtung Zellteilung. Damit verbunden ist die Erkenntnis, dass der Ausheileffekt durch die stimulierte Zellteilungstendenz begünstigt wird. Ein positiver Effekt der Nanophotonentechnologie® auf die Regeneration der Zellen ist anhand dieses zellbiologischen Parameters auch somit erkennbar.

3.2.4 Zellvitalität der vorgeschädigten Hautzellen

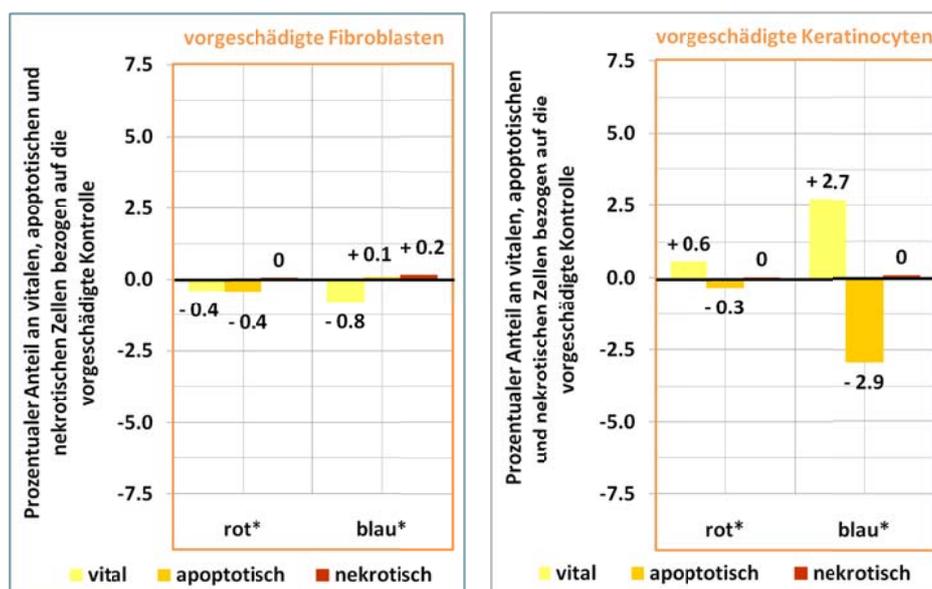


Abbildung 12: Prozentuale Anteile an vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen der vorgeschädigten Fibroblasten (links) und der vorgeschädigten Keratinocyten (rechts) und nach der Nanophotonen-LED-Behandlung als Abweichung von der unbehandelten, vorgeschädigten Kontrolle

Apoptose und Nekrose sind zwei Formen des Zelltodes. Eine Erhöhung der Anteile apoptotischer und/oder nekrotischer Zellen spräche für einen schädigenden Einfluss, eine Abnahme hingegen spricht für einen heilenden, stimulierenden Einfluss, welcher dem Zellstress entgegenwirkt. In den Versuchen konnten bei den Fibroblasten keine signifikanten Veränderungen der Anteile an vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen nach der Nanophotonen-LED-Behandlung festgestellt werden. Nach Applikation der Nanophotonen auf die Keratinocyten hingegen war durch rotes eine tendenzielle und durch blaues Licht eine signifikante Verbesserung der Zellvitalität erkennbar. Dies spiegelt sich in der prozentualen Zunahme der vitalen Keratinocyten (+ 2,7 %) und der Abnahme der apoptotischen Zellen (- 2,9 %) nach der Behandlung mit blauem Licht wider. Eine unterstützende Wirkung der Nanophotonentechnologie® bei der Verringerung des Zellstress und der Regeneration der Keratinocyten ist anhand dieses zellbiologischen Parameters auch somit absehbar.

3.3 Entzündungshemmung

Die mit # gekennzeichneten Beschriftungen innerhalb der folgenden Abbildungen beziehen sich auf die Modellierung einer Entzündungsreaktion der Zellen mit bakteriellem Lipopolysaccharid. Im Anhang befinden sich die dazugehörigen Daten für diese Versuche (Abbildung 16, Abbildung 17).

3.3.1 Humane Fibroblasten

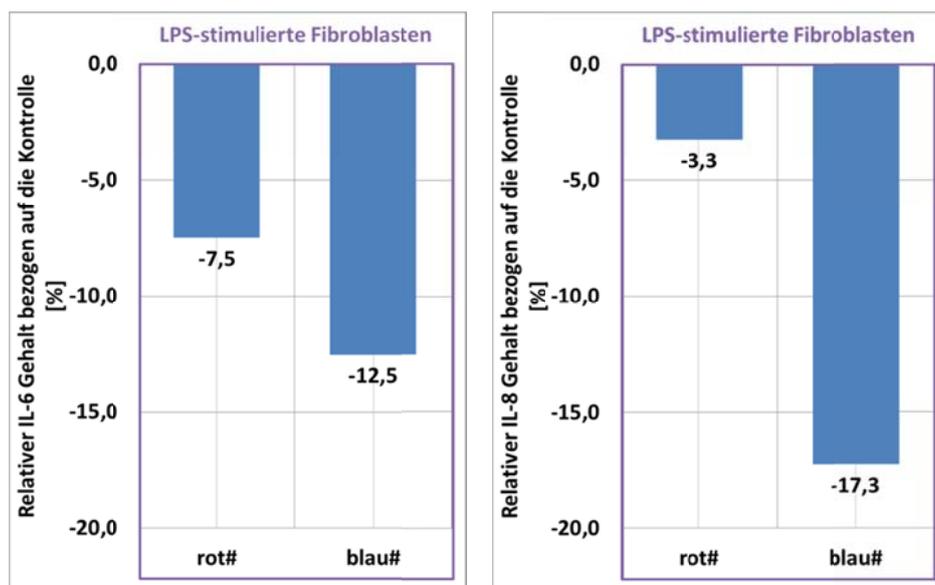


Abbildung 13: Relativer IL-6-Gehalt (links) und IL-8-Gehalt (rechts) der Fibroblasten nach LPS-Zugabe zur Modellierung einer Entzündungsreaktion und nach der Nanophotonen-LED-Behandlung als prozentuale Abweichung von der Kontrolle

Bei den Fibroblasten konnte die Nanophotonen-LED-Behandlung der Konzentrationserhöhung von IL-6 und IL-8 durch das bakterielle Toxin LPS entgegenwirken. Insbesondere die Bestrahlung mit blauem Licht führt zu einer Verringerung des Gehaltes an IL-6 um 12,5 % und des Gehaltes an IL-8 um 17,3 %. Da diese beiden Zytokine proinflammatorisch sind, bedeutet dies, dass die Entzündungsreaktion partiell unterbunden wird. Somit wurde eine entzündungshemmende Wirkung der Nanophotonentechnologie® auf die menschlichen Bindegewebszellen festgestellt.

3.3.2 Humane Keratinocyten

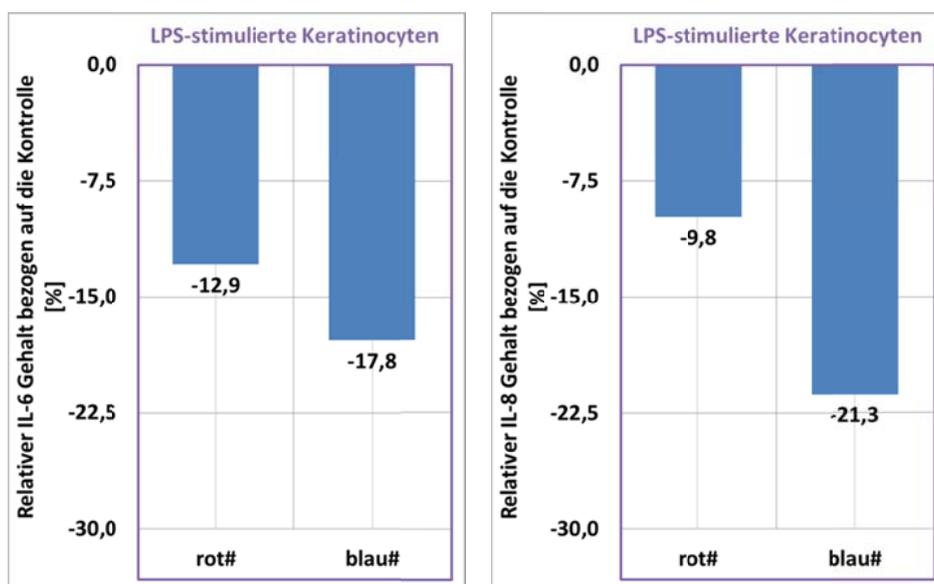


Abbildung 14: Relativer IL-6-Gehalt (links) und IL-8-Gehalt (rechts) der Keratinocyten nach LPS-Zugabe zur Modellierung einer Entzündungsreaktion und nach der Nanophotonen-LED-Behandlung als prozentuale Abweichung von der Kontrolle

Wie bei den Fibroblasten konnte auch bei den Keratinocyten die Nanophotonen-LED-Behandlung der Konzentrationserhöhung von IL-6 und IL-8 durch das bakterielle Toxin LPS (Lipopolysaccharide) entgegenwirken. Insbesondere die Bestrahlung mit blauem Licht führt zu einer Verringerung des Gehaltes an IL-6 um 17,8 % und des Gehaltes an IL-8 um 21,3 %. Da diese beiden Zytokine proinflammatorisch sind, bedeutet dies, dass die Entzündungsreaktion partiell unterbunden wird. Somit wurde eine entzündungshemmende Wirkung der Nanophotonentechnologie® auf die menschlichen Keratinocyten festgestellt.

4. Zusammenfassung und Ausblick

4.1 Wirkung der Nanophotonentechnologie® auf die humanen Hautzellen

- durch licht- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen keine Unterschiede im Aussehen der Zellen zwischen den mit rotem oder blauem Licht behandelten Hautzellen zu den Kontrollgruppen erkennbar
- keine signifikanten Veränderungen der Anteile an apoptotischen und nekrotischen Fibroblasten oder Keratinocyten nach der Nanophotonen-LED-Behandlung
- keine signifikante Abweichung des Zellwachstums im Vergleich zur Kontrolle

Fazit: Eine schädigende Wirkung der Nanophotonentechnologie® auf diese zellbiologischen Parameter wird somit ausgeschlossen

- Nanophotonen-LED-Behandlung der Fibroblasten mit rotem Licht führte zu einer tendenziellen Stimulation der intrazellulären ATP-Produktion (+ 4,6 %), des Stoffwechsels (+ 6,0 %) und der Erholung
- Bestrahlung der Keratinocyten mit rotem Licht regte nur den Stoffwechsel an (+ 5,6 %)
- Applikation des blauen Lichtes auf die Fibroblasten resultierte in einer tendenziell positiven Beeinflussung der ATP-Synthese (+ 2,1 %), der metabolischen Aktivität (+ 7,8 %) und der Erholung
- Behandlung der Keratinocyten mit blauem Licht spiegelte sich in einem erhöhten intrazellulären ATP-Gehalt (+ 6,3 %), der gesteigerten Stoffwechselaktivität (+ 8,8 %) und der Tendenz in Richtung Zellteilung wider

Fazit: Den gesunden, vitalen Zellen steht aufgrund der positiven Wirkung der Nanophotonen-LED-Behandlung mehr Energie z.B. zur Zellteilung und –vermehrung zur Verfügung.

4.2 Beurteilung des Ausheileffekt

- licht- und fluoreszenzmikroskopischen Analysen erbrachten keine Veränderungen im Aussehen der vorgeschädigten Zellen zwischen den mit rotem oder blauem Licht behandelten Hautzellen und der dazugehörigen Kontrollen
- Nanophotonen-LED-Behandlung der Zellen führte zu keinen signifikanten unterschieden des Zellwachstums im Vergleich zur Kontrolle

Fazit: Eine schädigende Wirkung der Nanophotonentechnologie® auf diese zellbiologischen Parameter wird somit ausgeschlossen

- Nanophotonen-LED-Behandlung mit rotem Licht führte bei den mit Cycloheximid vorgeschädigten Fibroblasten zu einer tendenziellen Stimulation der intrazellulären ATP-Produktion (+ 2,1 %), des Stoffwechsels (+ 4,5 %) und der Zellteilung
- Nach der Exposition der vorgeschädigten Keratinocyten gegenüber dem roten Licht zeigten diese ein ähnliches Reaktionsverhalten (ATP + 3,7 %; Stoffwechsel + 6,9 %, Stimulation der Zellteilung)
- Applikation des blauen Lichtes auf die Fibroblasten resultierte in einer tendenziell positiven Beeinflussung der ATP-Synthese (+ 1,7 %), der Zellteilung und der signifikanten Steigerung der metabolischen Aktivität (+ 10,9 %)
- Reaktion der Keratinocyten auf die Behandlung mit blauem Licht spiegelte sich in einem gesteigerten intrazellulären ATP-Konzentration (+ 1,6 %), der signifikant erhöhten Stoffwechselaktivität (+ 9,6 %) sowie Zellvitalität und der Tendenz in Richtung Zellteilung wider

Fazit: Zusammenfassend ist zu sagen, dass aufgrund der Stimulation der ATP-Synthese und der metabolischen Aktivität den Hautzellen mehr Energie für die Verringerung des Zellstress (ausgelöst durch Cycloheximid) und der daran gekoppelten Regeneration zur Verfügung steht. Des Weiteren wird die Zellteilungstendenz begünstigt, was auch dafür spricht, dass der Ausheileffekt durch die Nanophotonentechnologie® positiv beeinflusst wird.

4.3 Bewertung der Entzündungshemmung

- Eine Entzündungshemmung durch die Nanophotonentechnologie® konnte bezogen auf die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8, die für die Einleitung einer Entzündungsreaktion mitverantwortlich sind, bei den Fibroblasten und den Keratinocyten ermittelt werden
- Dabei führte vor allem die Bestrahlung der Hautzellen mit blauem Licht zu einer deutlichen Abnahme der Konzentrationen beider Zytokine (Fibroblasten: : - 12,5 % IL-6, - 17,3 % IL-8; Keratinocyten: - 17,8 % IL-6, - 21,3 % IL-8)

Fazit: Eine entzündungshemmende Wirkung der Nanophotonentechnologie® bezüglich dieser untersuchten Parameter ist hervorzuheben.

4.4 Zusammenfassung

Die gesammelten Ergebnisse zum Einfluss der Nanophotonentechnologie® auf die *in vitro*-Zellkulturen der humanen Fibroblasten und Keratinocyten sind in Abbildung 15 aufgeführt.

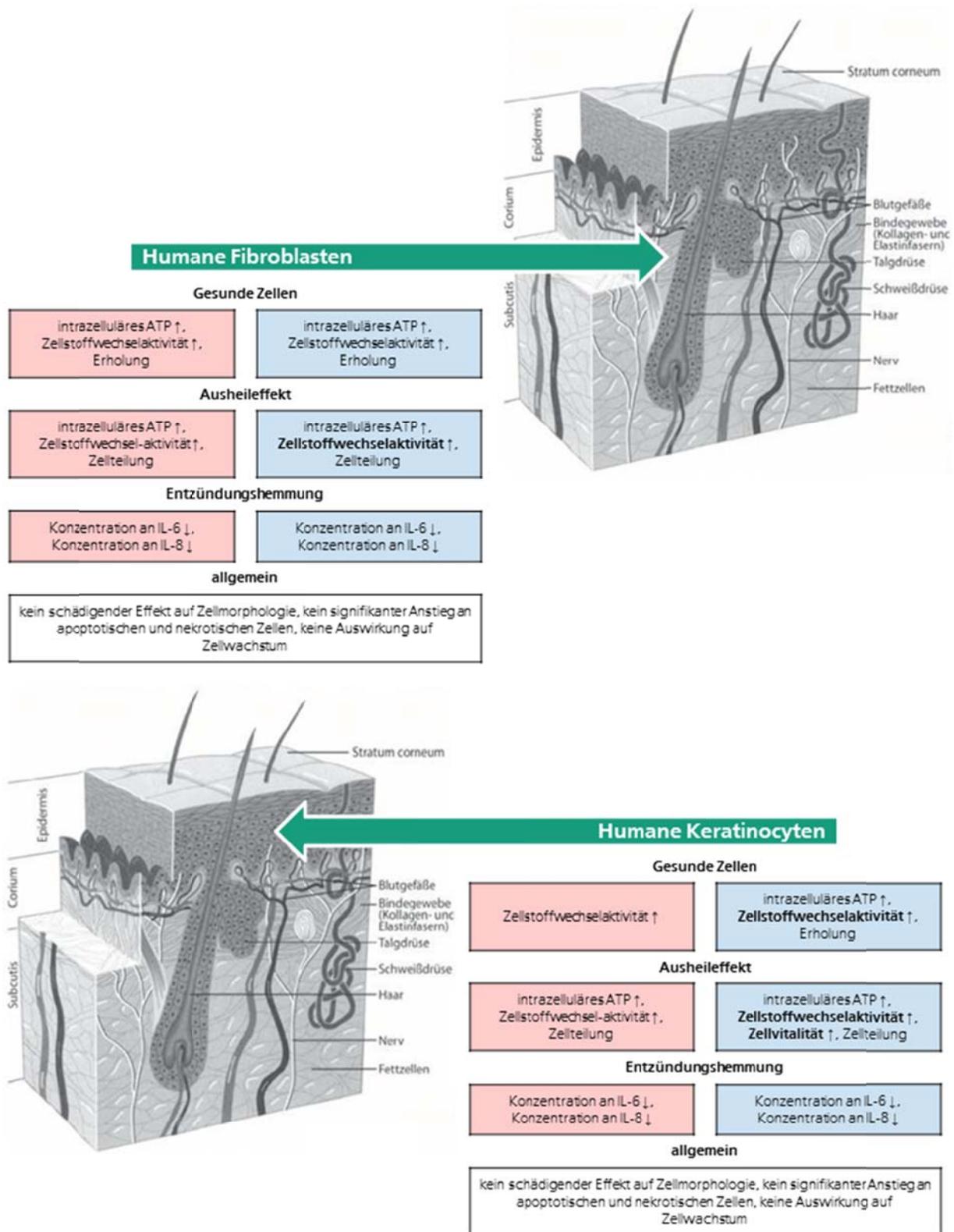


Abbildung 15: Übersicht der Ergebnisse (modifiziert nach: Bährle-Rapp, M., *Springer Lexikon - Kosmetik und Körperpflege* (3. Auflage). Springer, 2008)

4.5 Ausblick

Die Nanophotonentechnologie® hat als Form der Lichttherapie zukünftig großes Potential in der alternativmedizinischen und sanften Behandlung verschiedenster Krankheitsbilder noch anerkannter zu werden, da dieser eine positive Beeinflussung des Zellstoffwechsels bis hin zur Entzündungshemmung zugeschrieben werden kann.

Als Empfehlung zur Optimierung der Nanophotonentechnologie® ist die Untersuchung folgender Parameter möglich:

- Variation in der Beleuchtungsintensität des emittierten Lichtes
- Untersuchung der Effekte der einzelnen, in dem Programm vorgegebenen Frequenzen
- Variation der Behandlungsdauer bzw. Behandlung in zeitlichen Intervallen durchführen
- Erweiterung der Applikationsfelder

Anhang:

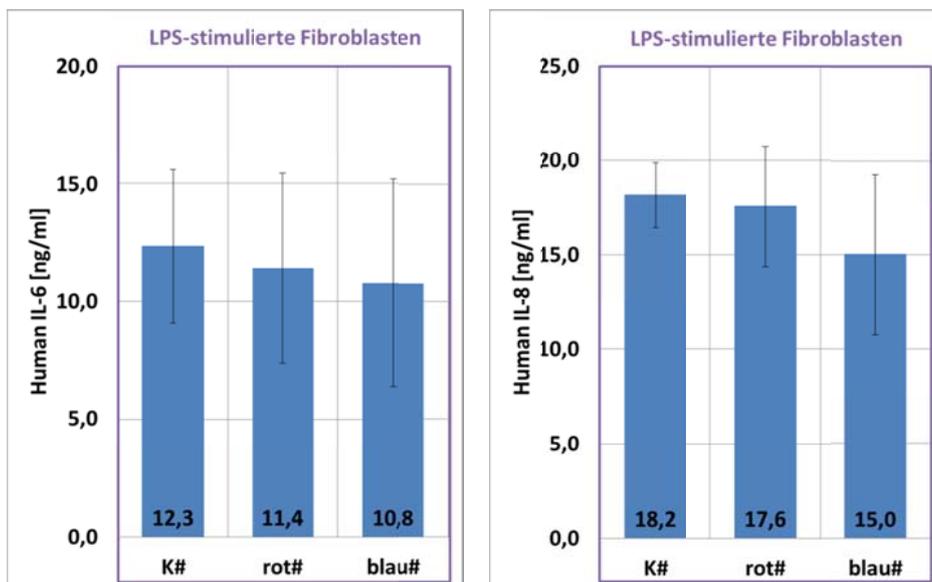


Abbildung 16: Konzentration an IL-6 (links) und IL-8 (rechts) der Fibroblasten nach LPS-Zugabe zur Modellierung einer Entzündungsreaktion und nach der Nanophotonen-LED-Behandlung (n = 3)

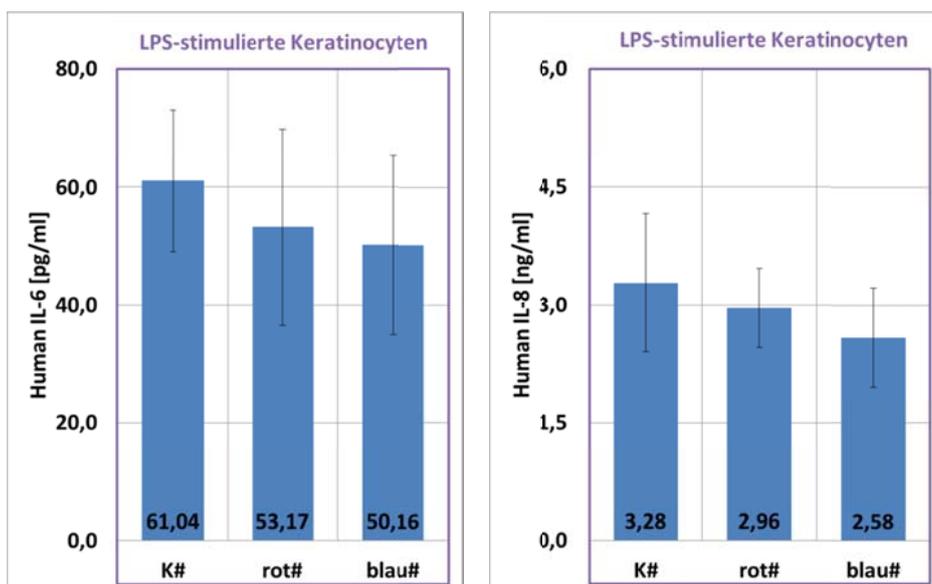


Abbildung 17: Konzentration an IL-6 (links) und IL-8 (rechts) der Keratinocyten nach LPS-Zugabe zur Modellierung einer Entzündungsreaktion und nach der Nanophotonen-LED-Behandlung (n = 3)