

Aus der Klinik für Unfall- und Handchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Einfluss elektromagnetischer Strahlung im sichtbaren Bereich
von 453 nm und 474 nm auf entzündungsrelevante Parameter
humaner Monozyten (THP-1)

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Max Pierchalla

2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Christoph V. Suschek

Zweitgutachter: PD Dr. Csaba Mahotka

Zusammenfassung

Die Lichttherapie ist in der modernen Medizin in der Behandlung diverser entzündlicher und proliferativer *Dermatosen* unter anderem der *Psoriasis vulgaris*, *atopischen Dermatitis*, *Lichen ruber planus* und dem *T-Zell Lymphom* erfolgreich etabliert. Als Ursache für entzündliche Hauterkrankungen werden vor allem pathologische Reaktionen des Immunsystems angesehen. Therapeutische Anwendung findet überwiegend ultraviolettes Licht aufgrund der zytotoxischen, antiproliferativen und antiinflammatorischen Wirkung auf diverse dermale Zellen. Überschießende Entzündungsreaktionen lassen sich lokal und systemisch eindämmen. Hautalterung, Hyperpigmentierung, vermehrte Faltenbildung und eine Erhöhung des Risikos der Hautkrebsgenese sind nur einige der Nebenwirkungen einer übermäßigen UV-Exposition.

Eine Alternative zur harten UV-Strahlung stellt blaues Licht einer Wellenlänge von 400 nm – 500 nm dar. Je nach Zelltyp entfaltet es unterschiedliche Wirkung auf diverse immunkompetente Zellen. Es werden antiproliferative, proliferationssteigernde, zytotoxische und antiinflammatorische Effekte auf Zellen wie Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen und T-Zellen beschrieben. In ersten klinischen Studien findet blaues Licht bereits Einzug in der Therapie der *Psoriasis*.

Die Wirkung von blauem Licht auf die Funktion von THP-1 Zellen ist bislang weitgehend ungeklärt. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob blaues Licht einer Wellenlänge von 453 nm und 474 nm das Potential besitzt, die Proliferation, die Aktivierung von THP-1 Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), sowie die Produktion entzündungsrelevanter Parameter wie der Zytokine zu beeinflussen.

Die Ergebnisse konnten zeigen, dass blaues Licht eine teils signifikante zytotoxische und antiproliferative Wirkung auf THP-1 Zellen entfaltet, und das in einem Wellenlängenbereich, der für diverse andere dermale Zellen wie Fibroblasten und Keratinozyten weitgehend ungefährlich ist. Mit steigender Dosis und fallender Wellenlänge steigt die Zytotoxizität des blauen Lichts. Höher energetisches Licht einer Wellenlänge von 453 nm erwies sich als toxischer, als blaues Licht eines Wellenlängenbereichs von 474 nm. Ebenso ging eine mehrfache Strahlenexposition mit erhöhter Zytotoxizität einher.

Ruhende THP-1 Zellen lassen sich mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) aktivieren, sodass diese von monozytären zu Makrophagen-ähnlichen Zellen differenzieren. Werden THP-1 Zellen vor dem Differenzierungsprozess mit blauem Licht bestrahlt, erniedrigte sich der Anteil aktivierter THP-1 Zellen signifikant. Der Versuchsaufbau ließ hier keine Unterscheidung zwischen nicht aktivierten und apoptotischen Zellen zu. Weitere Versuche konnten zeigen, dass differenzierte THP-1 Zellen deutlich resistenter gegenüber blauem Licht sind, als nicht aktivierte Zellen.

Bisherige Studien konnten belegen, dass Blaulichtexposition in Keratinozyten, T-Zellen und THP-1 Zellen zur Suppression der Expression proinflammatorischer Zytokine führte. Eine Beeinflussung entzündungsrelevanter Parameter durch blaues Licht konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Die Zytokin-Expression aktivierter und nicht-aktivierter THP-1 Zellen von IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α ließ sich durch Blaulichtbestrahlung nicht signifikant beeinflussen.

Blaues Licht könnte zukünftig eine nebenwirkungsärmere Alternative in der Behandlung überschießender Entzündungsreaktionen darstellen und somit Einzug in die Therapie zahlreicher chronisch entzündlicher *Dermatosen* oder auch im Rahmen der Behandlung von Wundheilungsstörungen finden.

Summary

Light therapy has been successfully established in modern medicine in the treatment of various inflammatory and proliferative dermatoses such as *psoriasis vulgaris*, *atopic dermatitis*, *lichen ruber planus* and *T-cell lymphoma*. Especially pathological reactions of the immune system are considered as a cause of inflammatory skin diseases. Mainly ultraviolet light finds therapeutic application due to its cytotoxic, antiproliferative and anti-inflammatory effect on various dermal cells. Excessive inflammatory reactions can be controlled locally and systemically. Skin aging, hyperpigmentation, increased wrinkling of the skin and increased risk of skin cancer are just a few of the side effects of excessive UV exposure.

Blue light with a wavelength of 400 nm - 500 nm represents an alternative to hard UV radiation. Depending on the cell type, it triggers different effects in various immunocompetent cells, for instance antiproliferative, proliferation-enhancing, cytotoxic and anti-inflammatory effects on fibroblasts, keratinocytes, endothelial cells and T cells. Initial clinical trials have already integrated blue light therapy into the treatment of *psoriasis*.

Hitherto the effect of blue light on the function of THP-1 cells has not been particularly studied. The aim of this work was to investigate whether blue light with a wavelength of 453 nm and 474 nm has the potential to manipulate proliferation of THP-1 cells, activation of THP-1 cells with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) and production of inflammatory parameters such as cytokines. The results showed that blue light has a significant cytotoxic and antiproliferative effect on THP-1 cells in a wavelength range, which seems to be harmless for various other dermal cells such as fibroblasts and keratinocytes. As the dose increases and the wavelength decreases, the cytotoxicity of the blue light increases. Blue light at a wavelength of 453 nm proved to be more toxic than blue light in a wavelength range of 474 nm. Moreover, multiple radiation exposures were associated with increased cytotoxicity.

Resting THP-1 cells can be activated with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) to differentiate from monocytic cells to macrophage-like cells. If THP-1 cells were irradiated with blue light before the differentiation process, the number of activated THP-1 cells decreased significantly. However, the experimental setup did not allow any discrimination between non-activated and apoptotic cells. Further experiments showed that differentiated THP-1 cells were significantly more resistant to blue light than non-activated cells.

Previous studies have shown that blue light exposure in keratinocytes, T-cells and THP-1 cells led to lower expression of proinflammatory cytokines. In the trials blue light irradiation did not significantly affect the expression of IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF α by activated and non-activated THP-1 cells.

In the future, blue light could become a less toxic alternative in the treatment of excessive inflammatory reactions and play an important role in the therapy of numerous chronic inflammatory dermatoses or in the treatment of wound healing disorders.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------------|---|
| % | Prozent |
| °C | Grad Celsius |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| Abb. | Abbildung |
| A. dest. | <i>Aqua destillata</i> |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CO₂ | Kohlenstoffdioxid |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| ELISA | enzymgekoppelter Immunadsorptionstest |
| FACS | <i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i> |
| FCS | <i>Fetal calf serum</i> |
| g | Gramm |
| h | Stunde |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| IFN | Interferon |
| <i>in vitro</i> | unter kontrollierten Bedingungen (hier: Zellkultur) |
| IL | Interleukin |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| MPS | mononukleäre Phagozytensystem |

| | |
|-------------------------------|--|
| NEAA | <i>Non - essential amino acids</i> |
| ng | Nanogramm |
| NK | natürliche Killerzellen |
| nm | Nanometer |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline</i> |
| PMA | Phorbol-12-myristat-13-acetat |
| P/S | Penicillin und Streptomycin |
| RIPA | <i>Radio - Immunoprecipitation Assay</i> |
| Sek. | Sekunde |
| Tab. | Tabelle |
| TNFα | Tumornekrosefaktor – alpha |
| TLR2 | <i>Toll-like</i> Rezeptor 2 |
| u.a. | unter anderem |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| W | Watt |
| z.B. | zum Beispiel |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Zusammenfassung..... | i |
| Summary..... | ii |
| Abkürzungsverzeichnis | iii |
| Einleitung..... | 1 |
| Immunsystem | 1 |
| Angeborenes (unspezifisches) Immunsystem..... | 1 |
| Adaptive/erworbene (spezifische) Immunsystem | 3 |
| Mononukleäre Phagozytensystem..... | 4 |
| Rolle der Monozyten | 4 |
| Rolle der Makrophagen | 5 |
| Auslösung einer Entzündungsreaktion | 6 |
| Zytokine | 8 |
| Proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 β , Interleukin-6 und TNF- α | 9 |
| Interleukin-8 | 11 |
| Interleukin-12 | 11 |
| THP-1 Zelllinie | 12 |
| Aktivierung der THP-1 Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat | 13 |
| Protein-Kinase C als Rezeptor für Phorbol-12-myristat-13-acetat..... | 13 |
| Licht | 14 |
| Wirkung von Licht auf menschliches Gewebe..... | 14 |
| Lichttherapie in der modernen Medizin | 15 |
| Antiinflammatorische Effekte der Lichttherapie | 16 |
| Blaues Licht als mögliche Alternative zur UV-Strahlung..... | 17 |
| Fragestellung der Arbeit..... | 18 |
| Material und Methoden..... | 19 |
| Geräte, Materialien, Substanzen, Kit-Systeme und ELISA-Kits..... | 19 |
| Medien und Puffer | 23 |
| Methoden der Zellkultur | 24 |

| | |
|--|----|
| Blaulichtbestrahlung (LED-Array) bei 474 nm und 453 nm | 26 |
| Bestimmung der Vitalität mittels CellTiter-Blue® | 27 |
| ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) | 28 |
| Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung | 30 |
| Durchflusszytometrie (FACS) | 30 |
| Propidiumiodid- und Hoechst-Färbung | 31 |
| Aktivierung THP-1 Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat | 31 |
| Ergebnisse | 33 |
| Einfluss einmaliger Bestrahlung auf die Aktivierung der THP-1 Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat..... | 33 |
| Einfluss einmaliger Bestrahlung unterschiedlicher Wellenlänge und Dosis auf aktivierte THP-1 Zellen | 39 |
| Einfluss dreimaliger Bestrahlung unterschiedlicher Wellenlängen und Dosen auf die Aktivierung der THP-1 Zellen..... | 45 |
| Einfluss einmaliger Bestrahlung unterschiedlicher Dosen und Wellenlänge auf die Aktivierung der THP-1 Zellen mit Entzug von Phorbol-12-myristat-13-acetat nach 4 Stunden | 52 |
| Proliferationsverlauf von THP-1 Zellen unter Einfluss täglicher Bestrahlung | 58 |
| Durchflusszytometrie | 63 |
| Hoechst- und Propidiumiodid - Färbung | 68 |
| Zytokin - Versuch..... | 70 |
| Interleukin-1 β | 72 |
| Interleukin - 6 | 74 |
| Interleukin - 8 | 74 |
| TNF α | 76 |
| TNF α – Versuch..... | 77 |
| Diskussion | 79 |
| Proliferationsverhalten von THP-1 Zellen unter blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm und 474 nm und dessen Zytotoxizität | 81 |

| | |
|--|-----|
| Ursache der zytotoxischen und antiproliferativen Wirkung des blauen Lichts | 83 |
| Einfluss von blauem Licht auf die Aktivierung der THP-1 Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat | 85 |
| Beeinflussung entzündungsrelevanter Parameter von THP-1 Zellen durch blaues Licht | 86 |
| Limitation der Studie | 87 |
| Perspektiven | 88 |
| Literatur- und Quellenverzeichnis | 91 |
| Abbildungsverzeichnis | 97 |
| Anhang | 100 |
| Danksagung | 10 |

Einleitung

Immunsystem

Aufgrund der ständigen Exposition des menschlichen Organismus gegenüber krankheitserregenden Mikroorganismen aus der Umwelt, sogenannten Pathogenen, kam es im Laufe der Evolution zur Entwicklung eines effektiven Abwehrsystems: das menschliche Immunsystem.

Das Immunsystem setzt sich aus diversen Molekülen, Zellen sowie Geweben und Organen zusammen. Um den Organismus vor Viren, Pilzen, Parasiten und anderen Schadstoffen zu schützen, greifen zum Teil unspezifische primäre Abwehrmechanismen, die unverzüglich einsatzbereit sind. Zusätzlich ist unser Immunsystem durch individuelle Adaptionsmechanismen in der Lage, nach Pathogenkontakt künftig mit spezifischen Abwehrreaktionen, wie zum Beispiel der Bildung von Antikörpern zu reagieren. Auch fehlregulierte oder entartete körpereigene Zellen können erkannt und eliminiert werden (Fearon & Locksley, 1996; Kabelitz & Medzhitov, 2007).

Grundlegend wird das angeborene (unspezifische) von dem adaptiven (spezifischen) Immunsystem unterschieden, die beide miteinander interagieren.

Angeborenes (unspezifisches) Immunsystem

Alle Abwehrmechanismen, die dem menschlichen Organismus von Geburt an zur Verfügung stehen, werden definitionsgemäß dem angeborenen Immunsystem zugerechnet. Da das adaptive Immunsystem mit einer Verzögerung von etwa 4 - 7 Tagen reagiert, nimmt das angeborene Immunsystem in dieser Phase eine entscheidende Rolle in der Abwehr von Krankheitserregern ein (Janeway CA Jr, 2001) (Seite 12). Genetisch determiniert greift so eine unmittelbare Primärantwort bei Exposition mit potentiellen Pathogenen, ohne dass im Vergleich zum adaptiven Immunsystem ein vorausgegangener Antigenkontakt erforderlich ist. Bereits Elie Metchnikoff (1845–1916) fand heraus, dass dafür eine große Anzahl unterschiedlicher Zellen erforderlich ist (Si-Tahar, Touqui, & Chignard, 2009). Vergleich Tabelle 1.

Neben Epithelzellen der äußeren Körperoberfläche, die eine erste mechanische Barriere bilden, spielen bei der Primärantwort die Zellen der myeloischen Reihe eine entscheidende Rolle. Vor allem Fresszellen wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten werden als erstes an den Ort der Infektion gelockt, um pathogene Mikroorganismen zu detektieren und anschließend zu phagozytieren. Bei der

Detektion charakteristischer Erregerbestandteile nehmen sogenannte *pattern recognition receptors* eine fundamentale Stellung ein. Diese sind sowohl in der Zellmembran als auch im Intrazellularraum vieler Zellen, wie der Fresszellen aber auch z. B. Endothelzellen, lokalisiert. Hiermit werden charakteristische Proteinstrukturen, sogenannte *Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)*, auf der Oberfläche vieler Prokaryonten, aber auch in viraler RNA erkannt. Über eine Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren und Hochregulierung verschiedener Gene innerhalb der immunkompetenten Zellen wird eine Immun- und Entzündungsreaktion induziert (Akira, Uematsu, & Takeuchi, 2006; Kaisho & Akira, 2001; Si-Tahar *et al.*, 2009).

Die durch diese Rezeptoren aktivierte Makrophagen und neutrophile Granulozyten nehmen die Erreger auf und zerstören diese in intrazellulären Vesikeln. Durch Produktion von Entzündungsmediatoren werden weitere Immunzellen rekrutiert und an den Ort der Infektion gelockt. Vor allem Makrophagen sowie später einwandernde dendritische Zellen können phagozytierte Erregerbestandteile auf ihrer Oberfläche den Zellen des adaptiven Immunsystems präsentieren und dadurch spezifische Immunantworten einleiten. Die antigenpräsentierenden Zellen stellen ein entscheidendes Bindeglied zwischen dem angeborenem und dem adaptiven Immunsystem dar (Kabelitz & Medzhitov, 2007; Si-Tahar *et al.*, 2009).

Als weitere Komponente des angeborenen Immunsystems ist das Komplementsystem zu nennen. Bestehend aus einer Vielzahl von in der Leber synthetisierten Glykoproteinen, können diese auf unterschiedliche Weise pathogene Bakterien markieren oder auch kaskadenartig aktiviert werden, was im weiteren Verlauf zur Eliminierung pathogener Mikroorganismen durch phagozytierende Zellen des Immunsystems führt. Zusätzlich dienen einige Komponenten des Komplementsystems als Lockstoffe, sogenannte Chemokine, wodurch weitere Leukozyten angeregt werden, aus den Blutgefäßen ins infizierte Gewebe einzuwandern (Iwasaki & Medzhitov, 2010).

Tabelle 1 Die myeloischen Zellen des angeborenen Immunsystems und ihre Funktionen

| | |
|--------------------------|---|
| Makrophagen | Detektion, Phagozytose und Elimination von Pathogenen Aktivierung antibakterieller Mechanismen Antigenpräsentation Gewebshämostase |
| Dendritische Zellen | Detektion, Phagozytose und Elimination von Pathogenen Antigenpräsentation in Lymphgewebe |
| Neutrophile Granulozyten | Phagozytose und Elimination von Pathogenen Aktivierung antibakterieller Mechanismen |
| Eosinophile Granulozyten | Elimination von Parasiten |
| Basophile Granulozyten | Elimination von Parasiten Steuerung allergischer Reaktionen |
| Natürliche Killerzellen | Elimination virusinfizierter und fehlerhafter körpereigener Zellen |
| Mastzellen | Steuerung allergischer Reaktion |

Tabelle 1 - Es werden die myeloischen Zellen des angeborenen Immunsystems in der linken Spalte der Tabelle dargestellt. In der rechten Spalte sind die Funktionen der Zellen aufgelistet.

Adaptive/erworbene (spezifische) Immunsystem

Neben dem angeborenen Immunsystem ist der menschliche Organismus zu weitaus spezifischeren Immunantworten in der Lage. Das adaptive Immunsystem ermöglicht die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, wodurch es in der Lage ist, eine lebenslange Immunität gegenüber Krankheitserregern auszubilden. Pathogene, die eine Antwort des adaptiven Immunsystems hervorrufen können, werden als Antigene (*antibody generator*) bezeichnet. Beispielhaft erwirbt eine Person mit einer durchgestandenen Maserninfektion eine hochspezifische Immunantwort gegen das Antigen „Masernvirus“, nicht jedoch gegen andere Viren (Alberts B, 2002).

Akteure der adaptiven Immunantwort sind humorale Komponenten und Zellen aus der Gruppe der Lymphozyten. Man unterscheidet zwei Arten von Lymphozyten. Zum einen B-Lymphozyten, die bei Aktivierung in Plasmazellen differenzieren und

antigenspezifische Antikörper, sogenannte Immunglobuline, produzieren können. Diese können zukünftig bei erneuter Exposition das antikörperspezifische Antigen opsonieren und somit eine schnellere und gezielte Immunantwort ermöglichen. Zum anderen existieren T-Lymphozyten, welche sich wiederum in zwei Klassen mit unterschiedlichen Effektorfunktionen unterteilen lassen. Einerseits die zytotoxischen T- Zellen, die von Viren oder Pathogene infizierte Zellen zerstören können. T-Helferzellen hingegen sind in der Lage Zellen wie B-Lymphozyten oder Makrophagen zu aktivieren (Janeway CA Jr, 2001).

B- und T-Lymphozyten bilden in ihrem Reifungsprozess individuell unterschiedliche und hochselektive Rezeptoren aus. Da so Millionen von Lymphozyten mit individuellen Rezeptoren unterschiedlicher Spezifität heranreifen, ergibt sich ein hohes Repertoire an unterschiedlichen spezifischen Antigenrezeptoren. Diese zirkulieren kontinuierlich durch den gesamten Organismus und können Antigene binden, die von antigenpräsentierenden Zellen, wie den dendritischen Zellen oder Makrophagen, präsentiert werden. Nach spezifischer Antigenerkennung, proliferieren und differenzieren die einzelnen und spezifischen Lymphozyten in Effektorzellen, die das antigenträgende Objekt gezielt bekämpfen und eliminieren können. Nach erfolgreicher Bekämpfung des Antigens wird eine streng regulierte Apoptose induziert. Ein kleiner Teil persistiert und bildet somit ein immunologisches Gedächtnis aus, das bei nächstem Antigenkontakt eine schnelle und effektive Immunantwort gewährleistet (Janeway CA Jr, 2001) (Seite 12-19).

Mononukleäre Phagozytensystem

Das mononukleäre Phagozytensystem repräsentiert eine Untergruppe der weißen Blutkörperchen, den Leukozyten. Es umfasst Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen, die alle denselben hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks entspringen. Bei einer Infektion oder einer Verletzung nehmen die zellulären Komponenten des MPS einerseits eine zentrale Rolle in der Immunantwort ein, andererseits fördern sie durch Reparatur und Regeneration den Wundheilungsprozess des betroffenen Gewebes (Lichtnekert, Kawakami, Parks, & Duffield, 2013).

Rolle der Monozyten

Als Komponente des MPS zirkulieren Monozyten kontinuierlich zwischen der Blutbahn, dem Knochenmark und der Milz und durchwandern so den gesamten Organismus. Im

Normalzustand des Organismus, dem sogenannten *steady-state*, können die Monozyten ins Gewebe migrieren, wo sie zu residenten Gewebsmakrophagen heranreifen und deren Population somit stetig ergänzen (Geissmann *et al.*, 2010).

Ausgestattet mit Chemokinrezeptoren und *pattern recognition receptors* können sie im Fall einer Infektion in das betroffene Gewebe einwandern. Hier sezernieren sie inflammatorische Zytokine und können pathogene Zellen und Moleküle phagozytieren. Im Rahmen einer Entzündungsreaktion können Monozyten zu Makrophagen differenzieren, die eine zentrale Rolle in der primären Immunantwort spielen. Darüber hinaus können die Monozyten auch zu dendritischen Zellen heranreifen, die durch Antigenpräsentation das adaptive Immunsystem aktivieren (Kratofil, Kubes, & Deniset, 2016; León, López-Bravo, & Ardavín, 2005; Serbina, Jia, Hohl, & Pamer, 2008).

Rolle der Makrophagen

Makrophagen sind residente Zellen des MPS, die im Gewebe des gesamten menschlichen Körpers anzutreffen sind. Insbesondere in der Haut, der Lunge als auch im Verdauungstrakt sind sie in hoher Anzahl lokalisiert. Hier stellen die Epithel- und Schleimhautzellen eine äußere Grenzfläche zur Umwelt dar, was mit häufiger Pathogenexposition einhergeht (Si-Tahar *et al.*, 2009).

Hinsichtlich der Aktivierung lassen sich zwei funktionelle Gruppen von Makrophagen unterscheiden, die M1- und M2- Makrophagen (Martinez & Gordon, 2014).

M1-Makrophagen repräsentieren die Gruppe der Makrophagen, die auf klassischem Wege aktiviert werden. Ausgestattet mit einem großen Repertoire an *pathogen recognition receptors* können sie krankheitserregende Mikroorganismen effizient detektieren und nehmen so eine zentrale Rolle in der Einleitung und Aufrechterhaltung entzündlicher Prozesse ein. Aktivierte M1-Makrophagen produzieren und sezernieren diverse immunmodulatorische Mediatoren, wie Zytokine und Chemokine, mit denen der weitere Verlauf der Immunantwort geprägt wird (Lichtnekert *et al.*, 2013).

Im *steady-state*, unter nicht-infektiösen Umständen, zeigen alternativ aktivierte M2-Makrophagen antiinflammatorische Funktionen und spielen eine zentrale Rolle in der Homöostase des Gewebes. Auch wenn sie weiterhin an der Immunabwehr beteiligt sind, liegt ihr Fokus auf der Beendigung inflammatorischer Zustände, der Zytoprotektion, der Förderung der Angiogenese, der Gewebsregeneration, der Resorption und Umgestaltung der zellulären Matrix (Geissmann *et al.*, 2010; Lichtnekert *et al.*, 2013).

Aufgrund von Signalen aus dem umliegenden Gewebe, können sich Makrophagen individuell weiter differenzieren, um den Aufgaben ihrer Mikroumwelt perfekt angepasst zu sein. Je nach Gewebslokalisation erhalten Makrophagen demnach unterschiedliche Bezeichnungen. Um einige zu nennen, finden sich Alveolarmakrophagen speziell in der Lunge, Kupfer-Sternzellen in der Leber, Osteoklasten im Knochen und Histiozyten im Bindegewebe (Geissmann *et al.*, 2010).

Auslösung einer Entzündungsreaktion

Aktiviert ein Pathogen das menschliche Immunsystem, kann das zur Auslösung einer lokalen oder systemischen Entzündungsreaktion führen.

Als wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems nehmen Makrophagen eine zentrale Rolle in der primären Abwehr von Pathogenen ein. Die Aktivierung von Makrophagen führt zur Produktion und Sekretion biologisch aktiver Moleküle wie Zytokinen, Chemokinen und chemotaktisch wirkender Lipide. Diese Proteine leiten einen Prozess ein, der im Allgemeinen als Entzündung bezeichnet wird (Akira *et al.*, 2006; Si-Tahar *et al.*, 2009).

Während Chemokine weitere Immunzellen aus der Blutbahn an den Ort der Infektion locken, regulieren Zytokine die Kommunikation zwischen den immunkompetenten Zellen. In Wechselwirkung mit Endothelzellen wird eine Weitstellung und Steigerung der Permeabilität der Blutgefäße induziert, wodurch die Passage rekrutierter inflammatorischer Zellen, Plasmaproteinen und Flüssigkeiten ins Gewebe erleichtert wird. Aktivierte Endothelzellen exprimieren Adhäsionsmoleküle, die bei herabgesetzter Blutflussgeschwindigkeit die Diapedese zirkulierender Leukozyten ins Gewebe erleichtern (Muller, 2013). Vergleich Abbildung 1.

Reaktive Sauerstoffspezies und Proteasen, die von infiltrierenden Leukozyten zur Elimination der Pathogene produziert werden, können in die extrazelluläre Umgebung gelangen und das Gewebe schädigen (Si-Tahar *et al.*, 2009).

Die Akkumulation von Entzündungszellen und entzündlichen Mediatoren sowie die gesteigerte Durchblutung mit erhöhter Permeabilität rufen die klassischen Zeichen einer lokalen Entzündung hervor: Rötung, Wärme, Schwellung, Schmerz sowie eingeschränkte Funktion (Janeway CA Jr, 2001)(Seite 12).

Abbildung 1 Einleitung einer Entzündungsreaktion durch aktivierte Makrophagen

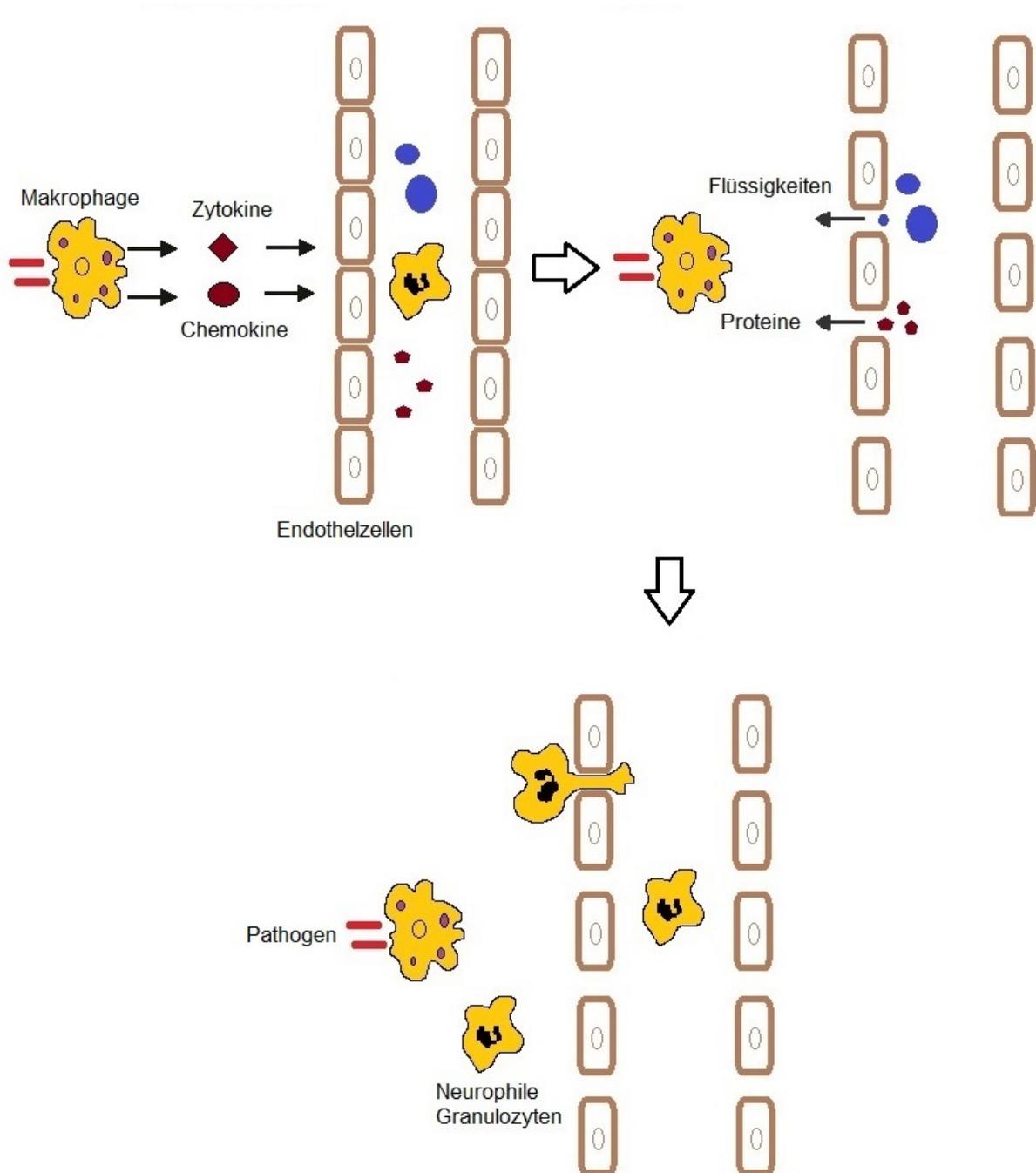


Abb. 1 - Schematische Darstellung der inflammatorischen Aktivierung von Makrophagen mit Einleitung einer Entzündungsreaktion. Pathogene triggern die Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen. Diese führen zur Vasodilatation und Steigerung der Permeabilität. Es kommt zur Rötung, Schwellung und Überwärmung des Gewebes. Mittels Chemotaxis wandern weitere immunkompetente Zellen, hier neutrophile Granulozyten, ein. Diese können wiederum Entzündungsmediatoren freisetzen. Es entwickelt sich das Gesamtbild einer Entzündung. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. Modifiziert in Anlehnung an Abbildung 1.12 auf Seite 12 in (Janeway CA Jr, 2001).

Unter den Leukozyten sind es in der ersten Phase der Entzündung überwiegend neutrophile Granulozyten, die in großer Anzahl aus den Blutgefäßen ins infizierte Gewebe einwandern. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Detektion, Phagozytose und

Zerstörung von Pathogenen. Außerdem bilden sie den Hauptbestandteil des Eiters (Butterfield, Best, & Merrick, 2006).

In einer zweiten Phase der Entzündung wandern Monozyten ein, die im Gewebe zu Makrophagen differenzieren und durch die Sekretion von Entzündungsmediatoren die Entzündung aufrecht erhalten (Janeway CA Jr, 2001).

Im weiteren Verlauf werden dendritische Zellen aus der Blutbahn rekrutiert, die Pathogene aufnehmen und damit in nahegelegenes Lymphgewebe wandern. Hier werden die phagozytierten Antigene auf Oberflächenmolekülen Zellen des adaptiven Immunsystems präsentieren. (Iwasaki & Medzhitov, 2010).

Zytokine

In der ersten Phase der Entzündung produzieren immunkompetente Zellen, an erster Stelle aktivierte Makrophagen, Entzündungsmediatoren, mit denen der weitere Verlauf der Entzündung und der Immunantwort koordiniert wird. Zytokine nehmen eine zentrale Rolle in der Kommunikation zwischen den Zellen ein. Sie fungieren als Botenstoffe und vermitteln ihre Wirkung über diverse Rezeptoren an der Oberfläche der Zielzelle. *Autokrin* kann das Verhalten der Produzentenzelle selbst moduliert werden und *parakrin* das Verhalten von Zellen in der unmittelbaren Umgebung. In einigen Fällen können Zytokine eine *endokrine* Wirkung entfalten. Chemokine können der Gruppe der Zytokine untergeordnet werden (Suzuki *et al.*, 2002).

Nachfolgend soll auf die wichtigen Zytokine eingegangen werden, die als Antwort auf Pathogenkontakt durch aktivierte Makrophagen sezerniert werden. Entscheidenden Einfluss auf den weiteren Verlauf der Immunantwort haben IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-12 und der Tumor-Nekrose-Faktor-alpha. Je nach Art des Pathogens und aktivierten Rezeptors kommt es zur spezifischen Freisetzung unterschiedlicher Zytokinkonzentrationen und -konstellationen, was zur Rekrutierung und Aktivierung zahlreicher Effektorzellen führt, mit denen sich der Krankheitserreger gezielt beseitigen lässt (Cavaillon, 2001; Janeway CA Jr, 2001)(Seite 70).

Einen Überblick über die Effekte der durch aktivierte Makrophagen sezernierten Zytokine sollen die Abbildung 2 und Abbildung 3 liefern.

Abbildung 2 Lokale und systemische Effekt der sezernierten Zytokine aktivierter Makrophagen

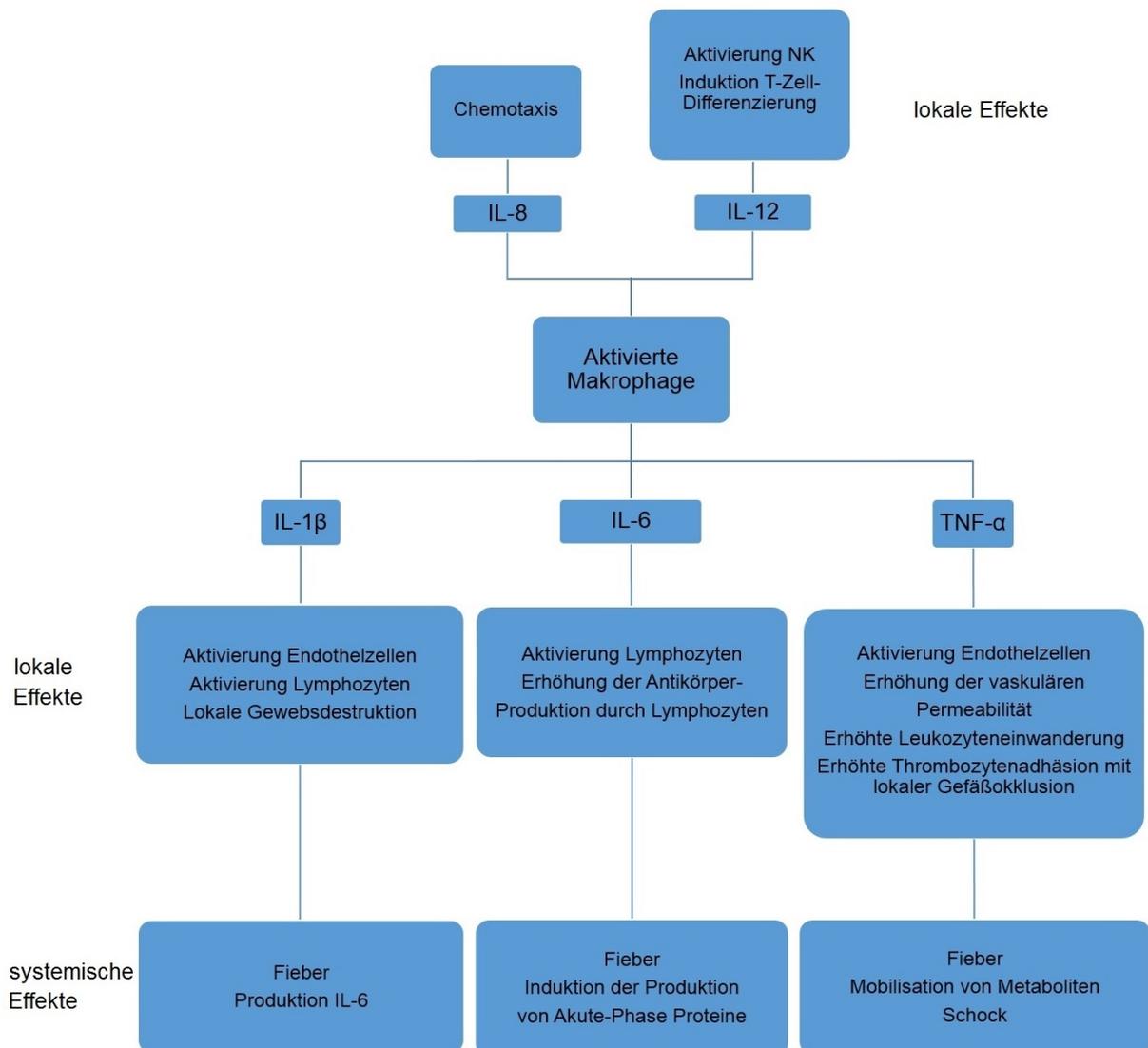


Abb. 2 – Es werden die von aktivierten Makrophagen sezernierten Zytokine mit ihren lokalen bzw. systemischen Effekten dargestellt. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. Modifiziert in Anlehnung an Abbildung 2.31 auf Seite 71 in (Janeway CA Jr, 2001).

Proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 β , Interleukin-6 und TNF- α

Zu den wichtigsten proinflammatorischen Zytokinen, die durch aktivierte Makrophagen als Antwort auf einen Pathogenkontakt produziert werden, zählen IL-1 β , IL-6 und TNF α . Sie können ihre Wirkung lokal als auch systemisch entfalten (Moller & Villiger, 2006). Vergleich Abbildung 2 und Abbildung 3.

Im Hypothalamus beeinflussen die drei Entzündungsmediatoren die Regelung der Körpertemperatur, was in der Ausbildung von Fieber resultieren kann. Auch durch Effekte der Zytokine auf den Stoffwechsel des Fett- und Muskelgewebes, kann die Temperatur angehoben werden, indem es hier zu Energie- und Proteinmobilisation

kommt. Die Replikationsrate und Lebensbedingungen der pathogenen Mikroorganismen sollen durch die Erhöhung der Körpertemperatur verschlechtert werden (Kluger, 1991).

In der Leber induziert vor allem IL-6 die Bildung von Akute-Phase-Proteinen, die bei einer Infektion in hohen Konzentrationen in der Blutbahn zirkulieren. Zu den Akute-Phase-Proteinen zählen unter anderem die Komplementfaktoren, Fibrinogen, Mannose-bindendes Lektin oder das C-reaktive Protein (CRP). Diese Proteine können direkt die Komplementkaskade aktivieren oder pathogene Mikroorganismen opsonieren, wodurch deren Elimination erleichtert wird (Castell *et al.*, 1989).

Die proinflammatorischen Zytokine führen darüber hinaus durch eine Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark zu einer Leukozytose. Eine Erhöhung der Blutgefäßpermeabilität, sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen an der Endotheloberfläche erleichtern die Migration der Leukozyten an den Ort der Infektion. Darüber hinaus wird die Migration dendritischer Zellen in nahegelegenes Lymphgewebe und deren Reifung zu antigen-präsentierenden Zellen durch TNF α stimuliert, wodurch eine adaptive Immunantwort initialisiert werden kann (Moller & Villiger, 2006).

Um die Infektion lokal einzudämmen, steuert TNF α die Thrombozytenaggregation. Die zusätzliche Erleichterung der Adhäsion durch an der Zelloberfläche von Endothelzellen exprimierte Moleküle, ermöglicht somit eine Verschließung kleinerer Blutgefäße, wodurch eine systemische Erregeraussaat verhindert werden soll (Janeway CA Jr, 2001) (Seite 78).

Kommt es zu einer systemischen Verbreitung des Erregers über den Blutstrom, kann eine Aktivierung von Makrophagen in der Leber, der Milz und anderen Geweben lebensbedrohliche Folgen für den menschlichen Organismus haben. Systemisch kann TNF α über eine Vasodilatation und einen Volumenmangel aufgrund erhöhter Gefäßpermeabilität zu den Symptomen einer Sepsis führen. In schweren Fällen droht im weiteren Verlauf ein septischer Schock, mit disseminierter intravasaler Koagulation, was über Minderdurchblutung zu multiplen Organversagen und dem Tod führen kann (Bendzen, 1988).

Interleukin-8

Interleukin-8 wird nach Pathogenkontakt in hohem Maße vorwiegend durch Makrophagen, aber ebenfalls durch Monozyten, Fibroblasten, Keratinozyten oder Endothelzellen produziert (M. Baggiolini, Loetscher, & Moser, 1995). In der Chemotaxis nimmt es eine wichtige Rolle ein. Es lockt vor allem in der frühen Phase einer Entzündung neutrophile Granulozyten an den Ort der Infektion, aber auch Leukozyten wie T-Zellen und Monozyten werden aus der Blutbahn rekrutiert. Darüber hinaus induziert Interleukin-8 einen Konformationswechsel von Adhäsionsmolekülen an der Oberfläche von Endothelzellen, sodass neu exprimierte Proteinstrukturen eine Migration von Leukozyten in das infizierte Gewebe erleichtern (Marco Baggiolini & Clark-Lewis, 1992; Harada *et al.*, 1994).

Interleukin-12

Interleukin-12 spielt eine Schlüsselrolle in der Kommunikation des angeborenen mit dem adaptiven Immunsystems. Es wird vor allem durch Fresszellen und B-Zellen sezerniert. Zum einen aktiviert es in Kombination mit TNF α natürliche Killerzellen und T-Zellen. Zum anderen fördert es die Differenzierung naiver T-Zellen in Th1-Zellen, die weitere immunregulatorische Funktionen des adaptiven Immunsystems steuern (Trinchieri & Scott, 1994).

Abbildung 3 Effekte der Zytokine IL-1, IL-6 und TNF α auf ihre Zielorgane

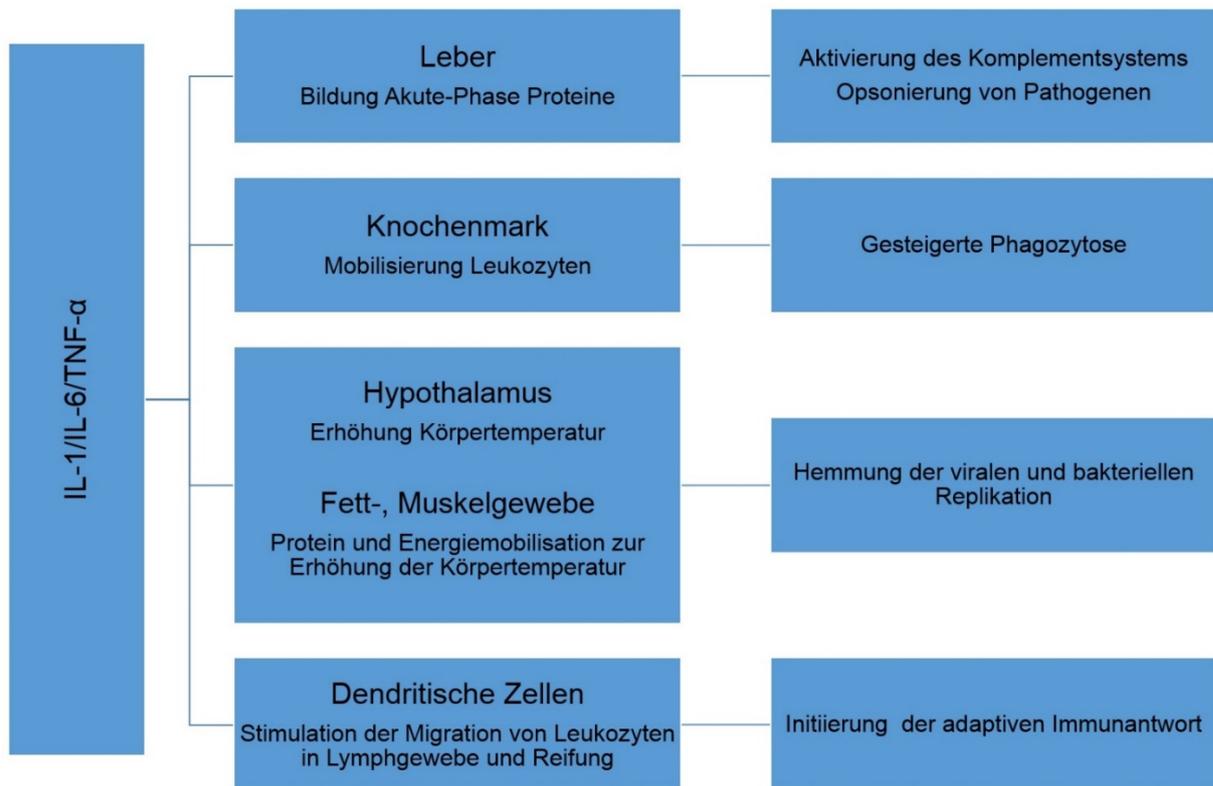


Abb. 3 – Es werden die Effekte der Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- α auf ihre Zielorgane dargestellt. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. Modifiziert in Anlehnung an Abbildung 2.38 auf Seite 80 in (Janeway CA Jr., 2001).

THP-1 Zelllinie

Die erstmalig im Jahre 1980 von Tsuchiya *et al.* isolierte und etablierte Zelllinie THP-1 entstammt dem Blut eines einjährigen Jungen, der an einer akuten monozytären Leukämie litt. Es handelt sich um runde, einzelne oder in Verbänden vorkommende nicht-adhärenente Zellen mit charakteristischen Eigenschaften und Merkmalen, die denen humaner Monozyten ähneln (Tsuchiya *et al.*, 1980).

Aus diesem Grund stellen die THP-1 Zellen eine am weitesten verbreitete Zelllinie dar, um beispielhaft die Regulation und Funktion von Monozyten im Blut und Makrophagen im Gewebe zu erforschen (Qin, 2012). Darunter fallen unter anderem die Detektion, Phagozytose und Elimination von Pathogenen, die Aktivierung antibakterieller Mechanismen, die Regulation des Immunsystems durch Antigenpräsentation und die Produktion und Sezernierung biologisch aktiver Moleküle, so auch der Zytokine (Chanput, Mes, & Wichers, 2014; Tsuchiya *et al.*, 1980).

Aktivierung der THP-1 Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat

Durch eine Behandlung mit der Chemikalie Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) lassen sich *in vitro* expandierte monozytäre THP-1 Zellen aktivieren, die daraufhin zu Makrophagen-ähnlichen Zellen differenzieren (Tsuchiya *et al.*, 1982).

PMA gehört zu der Gruppe der Phorbol-ester, welche unter anderem als natürliche pflanzliche Produkte aus dem Crotonölbaum (*Croton tiglium*), der Quelle von Crotonöl, aber auch aus anderen Pflanzen der Familie der *Euphorbiaceae* gewonnen werden können. (Blumberg, 1988; Wang, Wang, Liu, Qin, & Kang, 2015). Einige Phorbol-ester können über unterschiedliche Rezeptoren diverse molekularbiologische und biochemische Prozesse in Zellen induzieren, die biologischen Mechanismen solcher Zellen ähneln, die durch chemische Karzinogene oder tumorinduzierende Viren ausgelöst werden. Diese potentiell tumorinduzierende Fähigkeit (*tumor-promoting ability*), ohne dass wie bei anderen Karzinogenen DNA-Schäden oder Mutationen ausgelöst werden, lässt Phorbol-ester heutzutage eine zentrale Rolle in der zellbiologischen Forschung einnehmen (Weinstein, Lee, Fisher, Mufson, & Yamasaki, 1979).

Protein-Kinase C als Rezeptor für Phorbol-12-myristat-13-acetat

In vitro zeigt PMA das Potential die Zellteilung diverser Zellen, wie auch die der THP-1 Zellen, zu hemmen und deren Zelldifferenzierung zu induzieren (Rovera, Santoli, & Damsky, 1979). Die Differenzierung der THP-1 Zellen beginnt mit der Bindung von PMA an einen Membranrezeptor, der Calcium- und Phospholipid-abhängigen Protein-Kinase C. Die Aktivierung dieser Protein-Kinase C wird physiologisch durch unterschiedliche Moleküle wie zum Beispiel Hormone vermittelt. Anschließend wird die Phosphoinositid-Phospholipase C (Phospholipase C) induziert, welche membranständiges Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert. DAG reguliert entscheidend die Aktivität der Protein-Kinase C. Aufgrund der Ähnlichkeit von Phorbol-ester zum natürlich Aktivator DAG, kann PMA direkt an die Protein-Kinase C binden und diese aktivieren (Castagna *et al.*, 1982; Homma, Henning-Chubb, & Huberman, 1986; Niedel, Kuhn, & Vandenbark, 1983).

Die durch die Protein-Kinase C vermittelte Signaltransduktion führt letztendlich zu zahlreichen molekularbiologischen Veränderungen innerhalb der Zelle, die das Wachstum und die Differenzierung der Zielzelle steuern. PMA behandelte THP-1

Zellen bilden morphologisch und funktionelle Charakteristika aus, die denen aktivierter nativer Makrophagen ähneln. Verglichen mit nicht-aktivierten THP-1 Zellen, adhären die morphologisch veränderten THP-1 Zellen nach der PMA-Behandlung am Boden der Kulturflasche. Zusätzlich wird die Proliferation gehemmt. Lichtmikroskopisch präsentieren sie sich nun in einer flachen, amöboiden Form. Für eine gesteigerte Proteinbiosynthese sprechen ausgeprägt entwickelte Golgi-Apparate, zahlreiche Ribosomen und ein deutlich erhöhter Anteil an rauem Endoplasmatischem Retikulum. Während der Differenzierung von THP-1 Zellen zu aktivierten Zellen kommt es zu Herunterregulierung von monozytären Oberflächenmarkern CD14 und TLR2 (Daigneault, Preston, Marriott, Whyte, & Dockrell, 2010) und zusätzlich zur gesteigerten Expression von Fc-Rezeptoren, mit denen IgG-Antikörper gebunden werden können. Darüber hinaus zeigte sich eine gesteigerte Phagozytose von Hefe und IgG-beschichteten Erythrozyten von Schafen (*sheep red blood cells*). (Jiang, Lu, Choy, & Hatch, 2003; Schwende, Fitzke, Ambs, & Dieter, 1996; Tsuchiya *et al.*, 1982).

Licht

Hinsichtlich der Wellenlänge wird das elektromagnetische Spektrum in verschiedene Bereiche unterteilt. Es werden Radiowellen, Mikrowellen, Infrarotstrahlung, sichtbares Licht, UV-Strahlung, Röntgenstrahlung und Gammastrahlung unterschieden. Die die Erde erreichende elektromagnetische Strahlung besteht zu 5% aus UV-Strahlung, 45% Infrarotstrahlung und 50% sichtbarem Licht. Das für das menschliche Auge sichtbare Licht liegt in einem Wellenlängenbereich von etwa 400 nm - 700 nm.

Die UV-Strahlung kann in drei weitere Wellenlängenbereiche, die UVA- (320nm-400nm), UVB- (280nm - 320nm) und UVC-Strahlung (100nm - 280nm), unterteilt werden. Die kurzwellige und energiereiche UVC-Strahlung wird von der Erdatmosphäre vollständig resorbiert, wobei UVB-Strahlung zu 5% und UVA-Strahlung nahezu komplett die Erdoberfläche erreicht (Mahmoud, Hexsel, Hamzavi, & Lim, 2008; Mahmoud *et al.*, 2010).

Wirkung von Licht auf menschliches Gewebe

Die Energie ist umgekehrt proportional zur Wellenlänge der Lichtstrahlung. Auf der anderen Seite ist die Fähigkeit optischer Strahlung in die Haut einzudringen proportional zur Wellenlänge, sodass länger-welliger Strahlung tiefen exponierte Hautschichten penetrieren kann als kürzer-welliges Licht (Maverakis *et al.*, 2010).

Sogenannte Chromophore können die Energie eines Photons absorbieren, und in einen angeregten Zustand versetzt werden. Angeregte Chromophore geben Energie unter anderem in Form von Wärme oder Phosphoreszenz ab und induzieren zellbiologische Prozesse des umliegenden Gewebes. Neben der Wellenlänge, spielen hinsichtlich des Einflusses der Strahlung auch die Dicke der exponierten Gewebsschicht und die Verteilung und Konzentration der Chromophore eine entscheidende Rolle (Mahmoud *et al.*, 2008). Über die Induktion photochemischer Reaktion durch angeregte Chromophore können Mutationen innerhalb des Genoms der betroffenen Zelle ausgelöst werden. Ein Mechanismus ist die Bildung von Dimeren zwischen benachbarten Pyrimidinbasen der DNA bei UVB-Exposition. Diese typische Angriffsstelle für UV-Strahlung findet sich ebenfalls im p53-Protein, das als Tumorsuppressorgen eine zentrale Rolle in der DNA-Reparatur und zum anderen in der Steuerung der Zell-Apoptose einnimmt. Gehäuft auftretende Genmutationen von Tumorsuppressorgen wie p53-Mutationen, stellen einen ersten Schritt in der Genese von Hautkarzinomen dar (de Gruijl, 1999).

Lichttherapie in der modernen Medizin

Ausreichende Sonnenexposition hat zahlreiche positive Auswirkungen auf den menschlichen Organismus. Insbesondere durch die Produktion von Vitamin D in der Haut und eine dadurch erhöhte Konzentration an *25-hydroxyvitamin D*, soll das Risiko für zahlreiche chronische Erkrankungen, Krebs, kardiovaskuläre Erkrankungen wie Bluthochdruck, Autoimmunerkrankungen, sowie bakterielle und virale Infektionen reduzieren (Brennan, Greenberg, Miall, & Thompson, 1982; Moan, Porojnicu, Dahlback, & Setlow, 2008).

Darüber hinaus kann UVA-Strahlung über eine Erhöhung der intrakutanen Konzentration an Stickstoffmonoxid (NO), welches so vermehrt systemisch zirkuliert, über eine Vasodilatation antihypertensive Effekte induzieren (Oplander *et al.*, 2009). Die so herbeiführte Vasodilatation führt zu einer gesteigerten Perfusion der oberen Hautschichten. Hinsichtlich dieses Effektes der in tiefere Gewebsschichten dringenden UVA-Strahlung, macht den Einsatz der Lichttherapie auch in der Thromboseprophylaxe und -therapie diskussionswürdig (Oplander *et al.*, 2013).

Der Einsatz von Lichttherapie ist in der heutigen Medizin vor allem bei diversen entzündlichen Hauterkrankungen wie der *Psoriasis*, *atopischen Dermatitis* oder auch dem kutanen T-Zell Lymphom erfolgreich etabliert. So kommen UVA- und UVB-

Strahlung, oder gemischte UVA/UVB-Strahlung als Ganzkörper- oder Lokalbestrahlung zum Einsatz. Kombiniert mit lokal oder systemisch einsetzbaren, lichtsensibilisierenden Substanzen, kann der Effekt der Lichttherapie in Form von Photochemotherapie weiter moduliert werden (Gambichler, Breuckmann, Boms, Altmeyer, & Kreuter, 2005; Lapolla, Yentzer, Bagel, Halvorson, & Feldman, 2011).

Die Lichttherapie bietet jenen Patienten eine Option, für die eine systemische Medikamententherapie aus diversen Gründen nicht in Frage kommt. Ungünstiges Nebenwirkungsprofil, unerwünschte Medikamenteninteraktion, ineffektive Medikamentenwirkung, aber auch Kosteneffektivität spielen hier eine entscheidende Rolle (Lim *et al.*, 2015).

Antiinflammatorische Effekte der Lichttherapie

Als Ursache für entzündliche Hauterkrankungen werden vor allem pathologische Reaktionen des Immunsystems angesehen. Bei der multifaktoriellen Ätiologie der *Psoriasis* spielen beispielsweise überschießende T-Zell-vermittelte Immunreaktionen eine entscheidende Rolle (Prinz, 2003).

Lokal als auch systemisch aktiviert die Lichttherapie biologische Prozesse, die die Immunantwort modulieren und somit Entzündungsreaktionen hemmen können. Die vielseitigen Effekte der Lichttherapie und die molekularen Mechanismen der exponierten Zellen sind bis heute nicht vollends verstanden. UV-Strahlung zeigt unmittelbare und verzögerte Effekte. So kommt es zur direkten Schädigung der Zellmembran oder der DNA von immunologisch kompetenten Zellen wie u.a. Keratinozyten, T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und natürlichen Killerzellen. Bei der Ursache für diese letztendlich zur Apoptose oder zum Zellzyklusarrest der Zelle führenden Schädigungsmechanismen spielt die UV-Strahlung induzierte Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) eine entscheidende Rolle. Diese führen durch oxidativen Stress zu DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen und schließlich zur Induktion des apoptotischen Zelltods (von Thaler, Kamenisch, & Berneburg, 2010).

Verzögert entfaltet die Lichttherapie eine entzündungshemmende Wirkung, indem sie die Expression diverser Zytokine und Prostaglandine moduliert. Die Produktion proinflammatorischer Mediatoren kann gehemmt, wohingegen die der antiinflammatorischen Mediatoren gesteigert werden kann. Dies ist durch eine Hoch- und Herunterregulierung zuständiger Genabschnitte zu erklären (Karolina Malinowska, 2011; Situm, Bulat, Majcen, Dzapo, & Jezovita, 2014).

So sezernierten *in vitro* aktivierte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes von *Psoriasis*-Patienten nach UVB-Therapie mehr antiinflammatorisch wirkendes IL-10 und weniger proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-2, IL-6 und IL-8 und TNF α (Batycka-Baran, Besgen, Wolf, Szepietowski, & Prinz, 2016; Jones, Guckian, el-Ghorr, Gibbs, & Norval, 1996; Sigmundsdottir, Johnston, Gudjonsson, & Valdimarsson, 2005).

Blaues Licht als mögliche Alternative zur UV-Strahlung

Die Exposition gegenüber UV-Strahlung hat nicht nur positive Effekte auf die Gesundheit des menschlichen Organismus. Neben einem erhöhtem Risiko der Hautkrebsgenese (Rigel, 2008), zeigt sich auch eine Zusammenhang mit vorzeitiger Hautalterung, die sich durch vermehrte Faltenbildung, Trockenheit und Veränderung der Pigmentierung präsentiert (Helfrich, Sachs, & Voorhees, 2008).

Bereits publizierte Studien und Erkenntnisse aus Arbeiten unseres Forschungslabors geben Hinweise darauf, dass alternative UV-freie Lichtquellen außerhalb des Bereichs der harten UV-Strahlung ebenfalls antiproliferative oder immunmodulatorische Effekte auf diverse Zellen zeigen.

Eine alternative UV-freie Strahlungsquelle bietet der Einsatz von blauem Licht. Sein Spektrum umfasst einen Wellenlängenbereich von 400 nm - 500 nm. Ergebnisse einzelner Studien weisen auf eine toxische Wirkung von blauem Licht auf dermale Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen hin. Je nach Wellenlänge und Dosis der Bestrahlung variiert diese toxische Wirkung. So beobachtet man bei Bestrahlung von Zellkulturen mit blauem Licht der Wellenlängen von 410 nm bis 430 nm bei höheren Strahlungsdosen eine verringerte Proliferationsrate humaner Fibroblasten und Keratinozyten, wohingegen der Einsatz elektromagnetischer Strahlung einer Wellenlänge von 453 nm zu keiner signifikanten Veränderung der Zellzahl führte. Eine Bestrahlung mit 480 nm hatte hingegen eine Erhöhung der Proliferationsrate der Zellen zur Folge (Liebmann, 2010; Oplander *et al.*, 2011).

Eine mögliche zytotoxische Wirkung von blauem Licht ist unter anderem durch Generierung reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu erklären, die zu oxidativen Stress und zur Schädigung von Membranbestandteilen und der DNA von Zellen führen (Lee *et al.*, 2014; Lockwood *et al.*, 2005).

Bei der Behandlung von Hauterkrankungen wie der *Psoriasis* mit UV-freiem blauem Licht mit einer Wellenlänge von 453 nm, zeigten erste klinische Studien im Vergleich

zur Kontrollgruppe eine signifikante Verbesserung der Symptome. Dies ist durch eine Inhibition der Proliferation von Keratinozyten zu erklären (Pfaff, Liebmann, Born, Merk, & von Felbert, 2015). Darüber hinaus scheinen auch immunpotente Zellen durch blaues Licht beeinflussbar zu sein. So zeigte sich unter dem Einfluss von blauem Licht eine Inhibition der Aktivierung dendritischer Zellen, sowie ein Effekt auf deren Zytokinproduktion (Fischer *et al.*, 2013). Auch auf T-Zell-Kulturen wirkt blaues Licht einer Wellenlänge von 420 nm - 490 nm zytotoxisch und entzündungshemmend (Patalag, 2014).

Fragestellung der Arbeit

Sichtbares blaues Licht in dem Wellenlängenbereich von 400 nm - 500 nm stellt eine alternative UV-freie Strahlungsquelle in der Licht-basierten Therapie der modernen Medizin dar. Mit der Hemmung der Proliferation oder auch der zytotoxischen Wirkung auf diverse immunkompetente Zellen, stellt blaues Licht eine interessante Therapieoption in der Behandlung chronisch-entzündlicher Erkrankungen dar. Ein scheinbar günstigeres Nebenwirkungsprofil lässt den therapeutischen Einsatz von blauem Licht sinnvoll erscheinen.

Ziel dieser Arbeit ist es, anhand der THP-1 Zelllinie erstmals die Wirkung von blauem Licht mit einer Wellenlänge von 453 nm und 474 nm auf die Proliferation, den Aktivierungszustand, sowie entzündungsrelevante Parameter humaner Monozyten und Makrophagen zu untersuchen.

Die Ergebnisse dieser Experimente sollten helfen, eine Prognose zu wagen, ob eine durch blaues Licht induzierte Modulation von Monozytenfunktionen in Zukunft eine therapeutische Maßnahme zur Behandlung entzündlicher Prozesse darstellen könnte.

Material und Methoden

Geräte, Materialien, Substanzen, Kit-Systeme und ELISA-Kits

Tabelle 2 Geräte

| | |
|----------------------|---|
| Abzug | Waldner |
| Brutschrank | Thermo Electron Corporation HERAcell® 150 |
| FACS | FACS Calibur BD Bioscience |
| Heizbad | Fisher Scientific drybath |
| Homogenisator | UP50H Hielscher – ultrasound technology |
| Kryo - Einfriergerät | Schmidt Laborgeräte und Umweltsimulationen |
| LED - Array | 453 nm, 474 nm Philips Technologie GmbH |
| Magnetrührer | IKA®RET control/t IKAMAG® safety control |
| Mikroskop | Zeiss Axiovert 40 |
| Multipipette | Eppendorf Multipipette® plus |
| Photospektrometer | Victor 3™ 1420 Multilabel Counter |
| Pipetboy | Brand accu-jet® pro |
| Pipetten | Eppendorf Research® fix 0,5 - 10 µl Eppendorf Research® fix 10 - 20 µl Eppendorf Research® fix 10 - 100 µl Eppendorf Research® fix 100 - 1000 µl |
| Vortex - Mischer | IKA® MS3 basic SIGMA-ALDRICH |
| Waage | KenABJ LogNoA01 Electronic Balance Typ ABJ2204 NO WB1150494 |
| Werkbank | Thermo Electron Corporation HERAsafe® |
| Zentrifugen | Thermo Scientific Heraeus Pico 17 Microcentrifuge Thermo Scientific Heraeus Megafuge 16 R |

Tabelle 2 - Auflistung der verwendeten Geräte

Tabelle 3 Materialien

| | |
|--------------------------|--|
| 0,5 ml Reaktionsgefäße | Eppendorf Sicherheitsverschluss Röhrchen™ 0,5 ml |
| 1,5 ml Reaktionsgefäße | Eppendorf Sicherheitsverschluss Röhrchen™ 1,5 ml |
| 2 ml Reaktionsgefäße | Eppendorf Sicherheitsverschluss Röhrchen™ 2 ml |
| 5 ml Rundbodenröhrchen | FALCON®, Polystyrol |
| 15 ml Falcons | GREINER bio-one Art.-Nr. 188171, Frickenhausen |
| 50 ml Falcons | GREINER bio-one Art.-Nr. 227261 |
| 6 - Well Platten | GREINER bio-one CELLSTAR® Zell Kultur Platten, Art.-Nr. 657160 |
| 96 - Well Platten | GREINER bio-one CELLSTAR® Zell Kultur Platten, U-Boden, Art.-Nr. 650185 |
| ELISA 96 - Well Platte | GREINER bio-one, PS, U-Boden, MICROLON® 200, Art.-Nr. 650 001 |
| Einfrierröhrchen | GREINER bio-one Cryo.s™ Einfrierröhrchen 2 ml™ |
| Handschuhe | Ansell Micro-Touch Nitra-Tex® L |
| Pasteurpipetten aus Glas | BRAND GmbH + CO KG Pasteurpipetten ISO 7712 |
| Stripetten, 2 ml | Costar® 2 ml Stripetten® Serologische Pipetten, Frickenhausen |
| Stripetten, 5 ml | Costar® 5 ml Stripetten® Serologische Pipetten |
| Stripetten, 10 ml | Costar® 10 ml Stripetten® Serologische Pipetten |
| Stripetten, 25 ml | Costar® 25 ml Stripetten® Serologische Pipetten |
| T25 - Flaschen | CELLSTAR® Zell Kulturflaschen 25 cm ² rote Filterkappe |
| T75 - Flaschen | CELLSTAR® Zell Kulturflaschen 75 cm ² rote Filterkappe |

| | |
|-------------|--|
| Zählkammer | Neubauer Zählkammer |
| Zellschaber | GREINER BioOne Zell Schaber, blau, 40 cm |

Tabelle 3 – Auflistung der verwendeten Materialien

Tabelle 4 Substanzen

| | |
|---|--|
| Aqua dest. (steril) | Ampuwa® Spüllösung Plastipur®, 1000 ml |
| Bovine Serum Albumine | PAA BSA Fraction V pH 7,0 |
| CellTiter-Blue | Promega CellTiter-Blue® Cell Viability Assay, 100 ml |
| DMEM, 4,5 g/l Glucose (mit Phenolrot) | Gibco™ by lifetechnologies™, Medium, 500 ml, SKU Nr. 41965-062 |
| DMEM, 4,5 g/l Glucose, HEPES (ohne Phenolrot) | Gibco™ by lifetechnologies™, Medium, 500 ml, SKU Nr. 21063-045 |
| Dimethylsulfoxide | SIGMA-ALDRICH® Dimethylsulfoxide D2650-Hybri-Max™ <i>sterile-filtered, BioReagent, suitable for hybridoma, ≥99.7 %</i> |
| Dulbecco's Phosphate Buffered Saline | SIGMA-ALDRICH® Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, ohne Calciumchlorid und Magnesiumchlorid, 500 ml, SKU Nr. D8537 |
| Ethanol zur Desinfektion | Merck KGaA 100974 <i>Ethanol denatured with about 1 % methyl ethyl ketone for analysis</i> EMSURE® |
| Fetal Bovine Serum | PAA Fetal Bovine Serum Gold |
| HEPES | SIGMA-ALDRICH® HEPES H3375 ≥99.5 % (Titration) |
| Hoechst 33342 | SIGMA-ALDRICH® |
| Interleukin-1β human | SIGMA-ALDRICH®, SKU Nr. I9401 |
| Interleukin-6 human | Immuno Tools, Art. Nr. 11340060 |
| Interleukin-8 human | SIGMA-ALDRICH®, SKU Nr. I1645 |
| L-Glutamin | Gibco® by Life Technologies, L-Glutamine 200 mM (100 x) |

| | |
|---------------------------|--|
| Natrium-Pyruvat | Gibco® by Life Technologies, Natrium-Pyruvate 100 mM |
| Non-Essential Amino Acid | Gibco® by Life Technologies, MEM NEAA Nicht-essentielle Aminosäure Lösung (100 x) |
| Phosphate Buffered Saline | Biochrom AG PBS Phosphate Buffered Saline (Dulbecco) mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺ |
| Penicillin/Streptomycin | Gibco® by Life Technologies, Penicillin-Streptomycin 100 X Solution |
| Propidiumiodid | SIGMA-ALDRICH® |
| Salzsäure | Salzsäure rauchend 37 % ROTIPURAN®, 37 %, p.a., ACS, ISO |
| TNF α | Recombinant Human TNF- α , 50 μ g Catalog Number: 300-01A |
| Trypanblaulösung | SIGMA-ALDRICH® |
| Tween 20 | SIGMA -ALDRICH® |

Tabelle 4 – Auflistung der verwendeten Substanzen

Tabelle 5 BCA Protein Assay Kit

| | |
|-----------------------|---|
| BCA Protein Assay Kit | Thermo Scientific Pierce™, Lot: #QE216986 |
|-----------------------|---|

Tabelle 5 - verwendetes BCA Protein Assay Kit-System

Tabelle 6 ELISA-Kits

| | |
|------------------------------------|-------------|
| DuoSet® human IL-1 β /IL-1F2 | R&D Systems |
| DuoSet® human IL-6 | R&D Systems |
| DuoSet® human CXCL8/IL-8 | R&D Systems |
| DuoSet® human TNF- α | R&D Systems |

Tabelle 6 – Auflistung der verwendeten ELISA-Kits

Reagent Diluent (0,1 % BSA, 0,05 % Tween® 20 in Tris-gepufferten Saline)

Waschpuffer (0,05 % Tween® 20 in PBS, pH 7,2-7,4)

Block - Puffer (1 % BSA, in PBS mit 0,05 % NaN₃)

Substratlösung (1:1 Mischung von Farbreagenz A (H₂O₂) und Farbreagenz B (Teramethylbenzidine))

Stopp-Lösung (2N H₂SO₄)

Streptavidin -HRP (Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat)

Medien und Puffer

Wachstumsmedium für die THP-1 Zellen

DMEM, 4,5 g/l Glucose (mit Phenolrot), 500 ml

+ 10 % FCS

+ 1 % Penicillin/Streptomycin

+ 1 % NEAA

+ 1 % HEPES

+ 1 % Natrium-Pyruvat

Medium für die Bestrahlung

DMEM, 4,5 g/l Glucose, HEPES (ohne Phenolrot), 500 ml

+ 10 % FCS (50 ml)

+ 1 % Penicillin/Streptomycin (5 ml)

+ 1 % NEAA (5 ml)

+ 1 % Natrium-Pyruvat (5 ml)

Einfriermedium

10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)

90 % fötales Kälberserum (FCS)

RIPA-Puffer nach Abcam:

+ 50 mM Tris pH = 8

+ 150 mM NaCl

+ 1 % NP-40

+0,5 % Na-deoxycholat

+ 0,1 % SDS

Working Reagenz (Lösung A und B im Verhältnis 50:1)

+ Lösung A = Biocinonsäure

+ Lösung B = 4 % Kupfersulfat

DNA - Farblösung

+ 70 % Ethanol

+ 200 µg Propidiumiodid in 10 ml PBS (20 µg/ml)

Methoden der Zellkultur

Kulturbedingungen

Die Kultivierung der THP-1 Zellen erfolgte in einem Brutschrank mit einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und einer Temperatur von 37 °C bei einem CO₂/Luftgemisch von 5 %. Unter diesen Bedingungen wuchsen die Zellen in T75-Zellkulturflaschen.

Mediumwechsel

Um eine ausreichende Versorgung der Zellen mit frischem Medium zu gewährleisten, wurde alle drei Tage ein Mediumwechsel der kultivierten THP-1 Zellen durchgeführt, die in T75 - Zellkulturflaschen angezüchtet wurden. Hierfür wurde die Zellsuspension in 50 ml Flacons überführt und mit 1200 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen, das zurückbleibende Zell-Pellet mit auf 37 °C vorgewärmten Medium resuspendiert und in frische T75 - Kulturflaschen überführt.

Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wird mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierfür wird ein angefeuchtetes und dadurch anhaftendes Deckgläschen auf die Zählkammer geschoben. Als nächstes werden der Zellsuspension 50 µl entnommen und in einem Well einer 96-Well Platte mit Trypanblaulösung im Verhältnis 1:1 gemischt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der durch die Zellmembran in die Zellen eindringt. Vitale Zellen transportieren diesen aktiv aus dem Zellinnern hinaus, wodurch diese im Lichtmikroskop weiß erscheinen. Tote oder geschädigte Zellen hingegen erscheinen ohne aktive Transportprozesse blau. Somit lässt sich bei der Zellzahlbestimmung zwischen vitalen und toten Zellen differenzieren.

Das Gemisch wird nun an den Rand des Deckgläschens seitlich auf-pipettiert, wodurch die Suspension aufgrund von Kapillarkräften in die Kammer hineingesaugt wird.

Unter dem Lichtmikroskop werden dann die vitalen Zellen der vier Großquadrate der Neubauer Zählkammer gezählt und daraus der Mittelwert gebildet. Dieser wird mit dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor multipliziert. Hieraus lässt sich die Zellzahl pro Milliliter der Zellsuspension ermitteln.

Berechnung: $\text{Lebendzellzahl} \div \text{ml} = n \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$
der Zellsuspension

$n =$ Mittelwert der Großquadrate

$10^4 =$ Verdünnungsfaktor der Kammer

Kryokonservierung der THP-1 Zellen

Um eine zeitlich unbefristete Lagerung der THP-1 Zellen zu gewährleisten, können diese bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren werden. Bei diesem Vorgang der sogenannten Kryokonservierung wird vorab das Einfriermedium hergestellt, bestehend aus 90 % FCS und 10 % DMSO. Da DMSO über $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ zytotoxisch wirkt, wird das Einfriermedium für die nachfolgenden Arbeitsschritte kühl auf Eis gelagert. So wird eine toxische Wirkung des Einfriermediums auf die Zellen minimiert.

Nun wird die Zellsuspension der T75 - Kulturflaschen in 50 ml Falcons überführt. Vor der Zentrifugation bei 1200 U/min für 5 Minuten, erfolgt die Zellzahlbestimmung (s. 2.2.3 Zellzahlbestimmung). Pro Einfrier Röhrchen werden 1×10^6 THP-1 Zellen in 1 ml Einfriermedium eingefroren. Nach der Zentrifugation des Falcons wird der Überstand verworfen, das zurückbleibende Zell-Pellet mit 1 ml Einfriermedium pro 1×10^6 Zellen resuspendiert und mit Hilfe einer Pipette in die Einfrier Röhrchen überführt.

Um ein schonendes Einfrieren zu gewährleisten, werden die Einfrier Röhrchen in einem Kryo-Einfriergerät mit 100 % Isopropanol für 24 Stunden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Anschließend können die Einfrier Röhrchen dem Kryo-Einfriergerät entnommen und für lange Zeit in Stickstoff bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

Auftauen und Inkulturnahme der THP-1 Zellen

Zum Auftauen der Zellen werden die Einfrier Röhrchen der $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ Kühltruhe entnommen und in einem Wasserbad unter Sichtkontrolle bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt. In einem 50 ml Falcon wird auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgewärmtes Medium vorgelegt. Bei nur noch geringem Anteil an

eingefrorener Zellsuspension im Einfrierröhrchen, wird mit einer Pipette Medium aus dem Falcon in das Einfrierröhrchen mit der noch teilweise gefrorenen Zellsuspension überführt. So soll die zytotoxische Wirkung des im Einfriermedium enthaltene DMSO so gering wie möglich gehalten werden. Es folgt die Überführung in das mit Medium gefüllte Falcon. An eine anschließende Zentrifugation bei 1200 U/min für 5 Minuten wird der Überstand abgesaugt, die Zellen mit vorgewärmtem Medium resuspendiert und in T75 - Kulturflaschen ausgesät. Die Kultivierung findet bei normalen Kulturbedingungen mit regelmäßigem Mediumwechsel statt.

Blaulichtbestrahlung (LED-Array) bei 474 nm und 453 nm

Die Bestrahlung der THP-1 Zellen erfolgt durch LED-Lampen der Firma Philips, wobei eine Lampe blaues Licht einer Wellenlänge von 474 nm und die andere blaues Licht einer Wellenlänge von 453 nm emittiert. Die Blaulichtexposition erfolgt in geschlossenen 6-Well Platten. Für die Dauer der Bestrahlung sind die Zellen in Wachstumsmedium ohne Phenolrot kultiviert, um möglichst normale Kulturbedingungen zu bewahren und eine Austrocknung der Zellen zu verhindern.

Anhand der bekannten Strahlflussdichte (Irradianz) der Lampen bei unterschiedlichen Abständen der Lampe zum bestrahlten Objekt, kann mit der Dauer der Bestrahlung die Dosis reguliert werden. Es fanden Bestrahlungen der Dosen 5 J/cm², 10 J/cm², 20 J/cm², 40 J/cm² und 80 J/cm² statt. Für die LED-Lampen ergeben sich anhand der nachfolgenden Formel unterschiedliche Bestrahlungszeiten, die in Tabelle 7 aufgelistet sind.

$$\text{Zeit (Sek.)} = \text{Dosis (J/cm}^2\text{)} \div [\text{Intensität (mW/cm}^2\text{)} \div 1000]$$

Tabelle 7 Bestrahlungszeiten der LED - Lampen in Abhängigkeit der Dosis

| Dosis (J/cm ²) | Bestrahlungszeiten (Sek.) | |
|----------------------------|---------------------------|--------|
| | 474 nm | 453 nm |
| 5 | 62,5 | 210 |
| 10 | 125 | 420 |
| 20 | 250 | 840 |
| 40 | 500 | 1680 |
| 80 | 1000 | 3360 |

Tabelle 7 – Es werden die Bestrahlungszeiten der LED – Lampen in Abhängigkeit der Dosis (J/cm²) aufgelistet

Je nach Versuch werden die Zellen einmalig oder mehrmalig mit blauem Licht der beiden Wellenlängen unterschiedlicher Dosen in einer abgedunkelten Umgebung bestrahlt. Abbildung 4.

Abbildung 4 Bestrahlung in abgedunkelter Umgebung

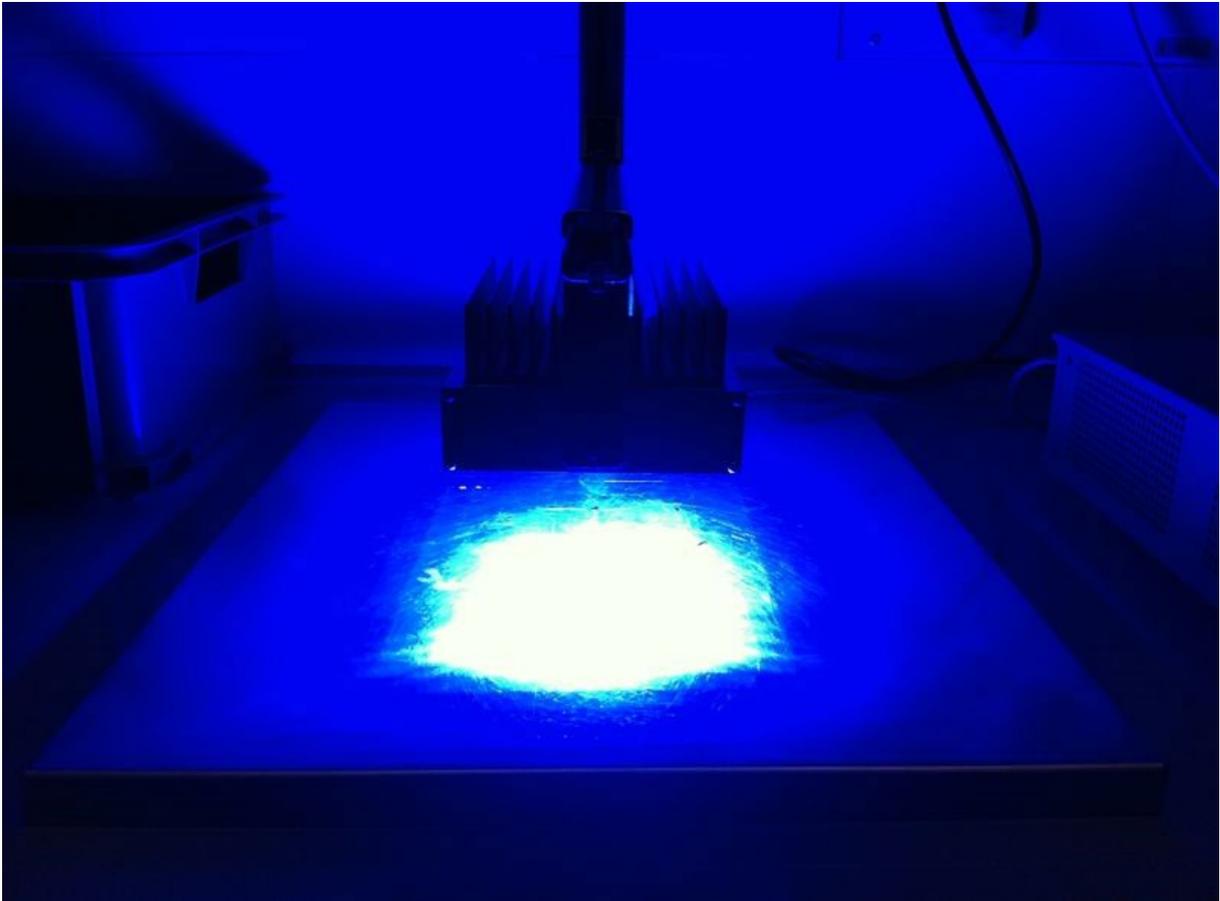


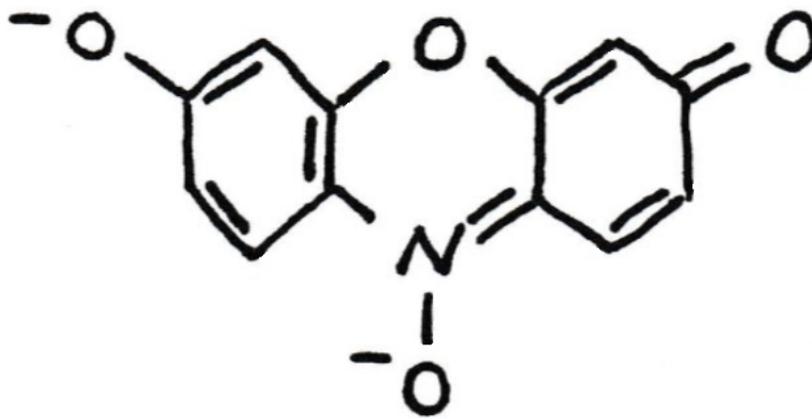
Abb. 4 – Eigene Fotografie der Bestrahlung mit blauem Licht in abgedunkelter Umgebung. Hier kommt eine LED-Lampe einer Wellenlänge von 453 nm zum Einsatz.

Bestimmung der Vitalität mittels CellTiter-Blue®

Zur Validierung der Zellvitalität eignet sich der CellTiter-Blue® Zellproliferationsassay, womit die Stoffwechselaktivität metabolisch aktiver Zellen gemessen werden kann. Hierbei wird der blaue Indikatorfarbstoff Resazurin durch vitale Zellen in das pinke, fluoreszierende Produkt Resorufin reduziert. Vergleich Abbildung 5. Bei Zugabe des CellTiter-Blue® Reagenz bei toten oder sich in der Apoptose befindlichen Zellen, zeigt sich kein Farbumschlag.

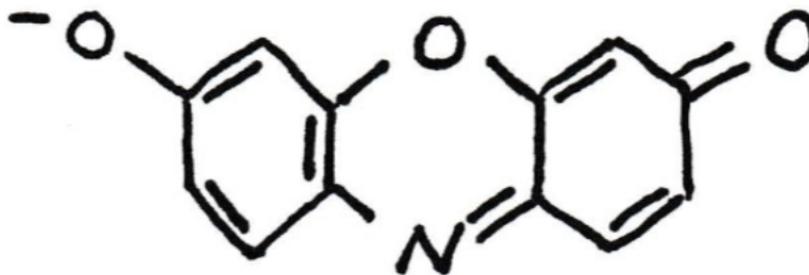
Die Stärke der Fluoreszenz kann mit Hilfe des Spektralphotometers photometrisch detektiert werden. Die Anzahl der Zellen ist proportional zur produzierten Fluoreszenz.

Abbildung 5 Reduktion von Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin



Resazurin

Reduktion zu



Resorufin

Abb. 5 – Schematische Darstellung der Reduktion von Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. Eigene Zeichnung.

Im Rahmen der Experimente wurde der CellTiter-Blue® *Cell Viability Assay* dazu eingesetzt, eine potentielle zytotoxische Wirkung der Blaulichtbestrahlung auf die THP-1 Zellen zu erfassen.

Der CellTiter-Blue® Reagenz wurde jedem Well in einer Konzentration von 100 µl/ml beigefügt. Im Anschluss an eine Inkubationszeit von einer Stunde unter standardmäßigen Kulturbedingungen, erfolgte die Fluoreszenzmessung mit dem Photospektrometer. Resorufin emittiert ein starkes Fluoreszenzsignal, wobei das Fluoreszenzmaximum bei 590 nm liegt.

ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest dient dem Nachweis von Antigenen, wie beispielsweise Zytokinen aus einem Zellüberstand. Im Rahmen der Experimente dieser Arbeit sollen die Zellüberstände sowohl von aktivierten als auch nicht-aktivierten

THP-1 Zellen unter dem Einfluss von Blaulichtexposition auf die Konzentration unterschiedlicher Zytokine untersucht werden. Bestimmt werden die Konzentrationen der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α , die mit den jeweiligen ELISA-Kits. Jeder verwendete ELISA funktioniert nach dem gleichen Prinzip. Für detaillierte Informationen sind die Protokolle der verwendeten ELISA-Kits einzusehen.

Es wurde eine Sandwich-ELISA-Technik angewandt, bei der zwei Antikörper nacheinander spezifisch an das nachzuweisende Antigen, in diesem Fall das jeweilige Zytokin, binden. Der primäre Antikörper („*capture antibody*“) inkubiert über Nacht bei Raumtemperatur in einer abgedichteten 96-Well-Mikrotiter Platte, sodass dieser in den Vertiefungen der Wells an die Platte gebunden wird. Am nächsten Tag werden die Platten nach einem dreimaligen Waschvorgang mit einem Waschpuffer für eine Stunde mit einem Blockpuffer geblockt. Nach erneutem Waschvorgang werden nun die Proben mit dem zu untersuchenden Antigen zusammen mit einer Standardreihe mit bekannter Antigenkonzentration für den Vergleich, auf die 96-Well-Mikrotiter Platten gegeben. Während der folgenden zwei Stunden bindet der an die Platte gebundene *capture antibody* das in der Probe vorhandene Antigen. Nach wiederholtem Waschvorgang wird nun für eine Inkubationszeit von 2 Stunden ein Sekundärantikörper („*detection antibody*“) hinzugefügt, der ebenfalls an das Antigen bindet. Ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entsteht (Sandwich-Technik). Der *detection antibody* ist zusätzlich an ein Enzym (Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat) gebunden, welches eine passende Substratlösung in ein Reaktionsprodukt umsetzen kann, was einen blauen Farbumschlag hervorruft. Vor der Zugabe der Substratlösung erfolgt zuvor eine 20-minütige Behandlung der Platten mit Streptavidin-HRP, mit sowohl vorausgegangenem, als auch nachfolgendem Waschvorgang.

Nach deutlich sichtbarem Farbumschlag der Standardreihe und der Proben, spätestens jedoch nach 20 Minuten, wird die Farbreaktion mit der Stopp-Lösung gestoppt, was zu einem gelben Farbumschlag führt. Mittels einer photometrischen Messung bei einer Wellenlänge von 450 nm mit dem Photospektrometer, können nun anhand der Standardkurven die Zytokinkonzentrationen quantifiziert werden.

Die ermittelten Zytokinkonzentrationen werden dann in Bezug zu der Zellzahl der jeweiligen Probe gesetzt, die mittels Proteinkonzentrationsbestimmung quantifiziert wird. Im ersten Schritt werden die Probe und der Standard auf eine mit dem Primärantikörper beschichtete Mikrotiter-Platte gegeben. Das Antigen wird gebunden. Im zweiten Schritt wird der Sekundärantikörper hinzugegeben, der danach

zugegebenes Streptavidin-HRP bindet. Die im dritten Schritt beigefügte Substratlösung wird umgesetzt. Der blaue Farbumschlag wird im letzten Schritt mit der Stopp-Lösung gestoppt. Es folgt die photometrische Messung.

Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung

Zeitgleich zur Gewinnung des Zellüberstandes im Zytokinversuch, wurden die zurückbleibenden Proteine der zugehörigen Probe in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Gewonnene Proteinproben wurden mit 30 µl RIPA-Puffer versetzt, um eine Proteinauflösung durch Proteaseaktivität zu verhindern. Der Einsatz eines Vortexmischers ermöglicht das sorgfältige Vermischen von Zellpellet und RIPA-Puffer. Für eine spätere Bestimmung können die Proteine so auch bei -80 °C eingefroren werden. Mithilfe des BCA Protein Assay Kit ist im Anschluss eine Bestimmung der Proteinkonzentration noch Tage später möglich.

Zuerst wurden die mit RIPA-Puffer versetzten Proben aufgetaut und mehrfach (mindestens 10x) sonifiziert, um die Proteine zu isolieren. Es folgte eine Mischung der einzelnen Proben in einem Verhältnis von 1:6 mit PBS in neuen beschrifteten 1,5 ml Reaktionsgefäßen. In eine 96-Well Platte werden nun je 10 µl der Proben in Doppelbestimmung pipettiert. Ebenfalls 10 µl eines nach Protokoll angesetzten Proteinstandards wird in steigender Konzentration in die 96-Well Platte pipettiert, wodurch eine Standardreihe zum Vergleich erstellt wird. Anschließend werden sowohl der Standard, als auch die Proben mit 200 µl des Working Reagenzes versetzt. Mit einer Folie abgedeckt, wird die Platte für wenige Sekunden auf einen Schüttler platziert, um eine Durchmischung der Reagenzien zu gewährleisten.

Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37 °C kann durch die Messung der Absorption mit Hilfe des Photospektrometers bei 562 nm die Proteinkonzentration der einzelnen Proben quantifiziert werden.

Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie wurde angewandt, um neben der gemessenen Stoffwechselaktivität durch das CellTiter-Blue® Zellproliferationsassay, eine genauere Aussage über die Zytotoxizität der Blaulichtbestrahlung zu ermöglichen.

Mithilfe der Durchflusszytometrie lässt sich die Apoptoserate adhärenter und nicht-adhärenter Zellen evaluieren. Während der Apoptose wird die nukleäre DNA der Zelle durch spezifische Enzyme aufgespalten und abgebaut (Arends, Morris, & Wyllie,

1990). Es kommt zu einem DNA-Verlust des Zellkerns der jeweiligen Zelle. Der DNA-Gehalt kann mittels der Durchflusszytometrie quantitativ detektiert werden, nachdem ein fluoreszierender Stoff an die DNA der einzelnen Zellen gebunden hat (Nunez, 2001). In diesem Fall wurde Propidiumiodid (PI) eingesetzt, welches an die Nukleinsäuren der DNA bindet (Pollack & Ciancio, 1990; Wallen, Higashikubo, & Dethlefsen, 1982).

Die emittierte Fluoreszenz ist proportional zum DNA-Gehalt des Zellkerns einer Zelle. Die Durchflusszytometrie detektiert spezifische Fluoreszenzsignale, anhand denen es sich eindeutig zwischen hypoploiden, also apoptotischen Zellen mit DNA-Verlust, und normalen diploiden Zellen differenzieren lässt (Riccardi & Nicoletti, 2006).

Neben der Bestimmung der Apoptoserate behandelter (blaulichtexponierter) Zellen wird zum Vergleich auch immer der Apoptoserate unbehandelter (nicht-exponierte) Zellen evaluiert.

Propidiumiodid- und Hoechst-Färbung

Mithilfe des DNA-Fluorochroms Hoechst 33342, oder auch bisBenzimid, lässt sich der Zellkern von THP-1 Zellen anfärben. Der Farbstoff kann die Zellmembran lebender und toter Zellen durchdringen und die intranukleären Nukleinsäuren Adenin und Thymin binden und somit anfärben. Angeregt durch UV-Licht emittiert an DNA gebundenes bisBenzimid Licht einer Wellenlänge von bis zu 465 nm. Mit dem Fluoreszenzmikroskop lässt sich auf die Zellzahl schließen.

Um dann noch die die vitalen von toten Zellen zu unterscheiden, wird die Chemikalie Propidiumiodid hinzugegeben. Im Gegensatz zu Hoechst 33342 durchdringt der DNA-Farbstoff Propidiumiodid lediglich die Zellmembran apoptotischer THP-1 Zellen, wodurch geschädigte Zellen visualisiert werden können. Die Emissionswellenlänge liegt bei 617 nm.

Aktivierung THP-1 Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat

Es gibt zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten, die die Aktivierung von THP-1 Zellen thematisieren. Neben Phorbol-12-myristat-13-acetat gibt es einige weitere Substanzen wie beispielsweise 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ (VD₃), mit denen die Zellen zur Differenzierung angeregt werden können. PMA zeigt hier hervorragende Ergebnisse hinsichtlich der Differenzierung von THP-1 Zellen und seine Anwendung setzte sich im Vergleich zu anderen Substanzen durch (Schwende, 1996).

In dieser experimentellen Arbeit wurde sich an dem Protokoll von Park *et al.* von 2007 orientiert. Dieser ermittelte die optimale Konzentration an PMA, die für eine erfolgreiche Differenzierung der THP-1 Zellen notwendig ist. Für die Induktion einer suffizienten Differenzierung ist PMA in einer Konzentration von 5 ng/ml für einen Inkubationszeitraum von 48 Stunden ausreichend (Park *et al.*, 2007).

Ergebnisse

Einfluss einmaliger Bestrahlung auf die Aktivierung der THP-1 Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat

In dieser Versuchsreihe wurden 1×10^6 THP-1 Zellen in 2 ml Medium zur Bestrahlung in 6-Well Platten ausgesät. Die Zellen wurden einmalig mit Dosen von 5 J/cm^2 – 80 J/cm^2 jeweils einer Wellenlänge von 453 nm und 474 nm bestrahlt. Die Kontrolle wurde nicht bestrahlt. Unmittelbar nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit PMA aktiviert. Nach 48 Stunden der Kultivierung, wurde das Zellmedium aus den Wells abgesaugt. In einem Waschschrift mit auf 37°C erwärmten PBS, wurden nicht aktivierte und somit auch nicht an dem Boden der Platten adhärierende Zellen entfernt. Mittels CellTiter-Blue® Assay wurde auf die Zellzahl der aktivierten und adhärenen THP-1 Zellen geschlossen.

Abbildung 6 Einfluss einmaliger Bestrahlung auf die Aktivierung von THP-1 Zellen

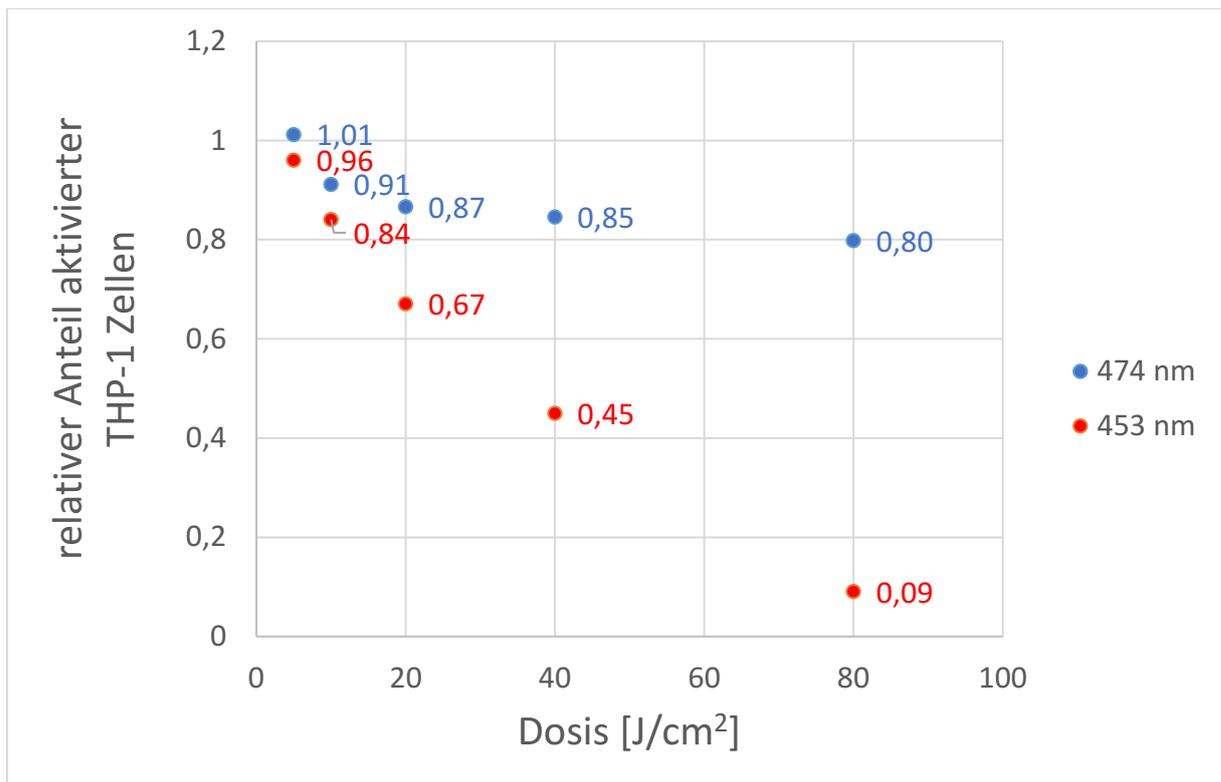


Abb. 6 - Einfluss einmaliger Bestrahlung unterschiedlicher Dosen von 5 J/cm^2 – 80 J/cm^2 mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm und 453 nm auf die Aktivierung von THP-1 Zellen. Es wurde der relative Anteil aktivierter THP-1 Zellen in Relation zur auf 1 normierten Kontrolle dargestellt. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. 474 nm $n=9$, 453 nm $n = 7$.

Sowohl bei Exposition gegenüber blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm als auch 453 nm sinkt der relative Anteil aktivierter Zellen mit steigender Dosis. Bei einer Dosis

von 80 J/cm² und 474 nm reduziert sich die Zellzahl bei 474 um etwa 20 % im Vergleich zur Kontrolle. Bei einer Wellenlänge von 453 nm und 80 J/cm² kommt es zu einer Reduktion des relativen Anteils aktivierter THP-1 Zellen um circa 91 %. Vergleich Abbildung 6.

Abbildung 7 Boxplot - Darstellung des Einflusses einmaliger Bestrahlung mit 474 auf die Aktivierung von THP-1 Zellen

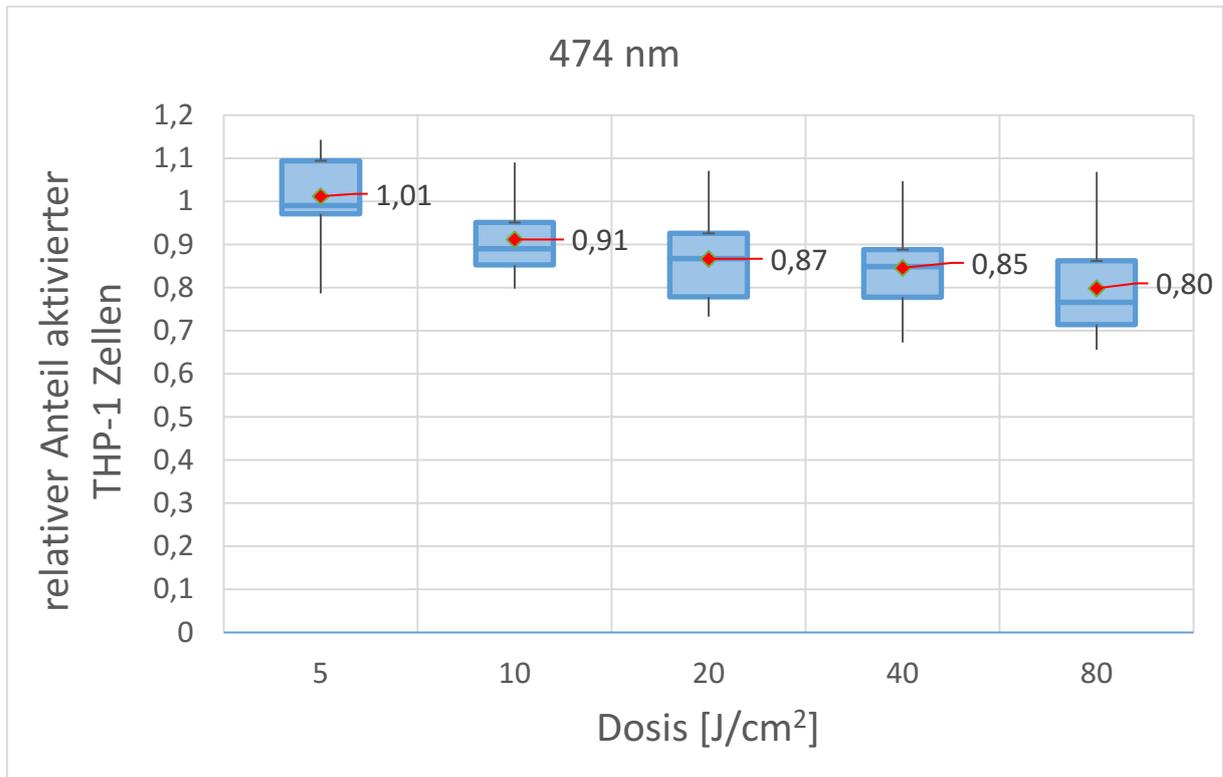


Abb. 7 - Es wird der Einfluss einmaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 474 nm und Dosen von 5 J/cm² - 80 J/cm² auf die Aktivierung von THP-1 Zellen in einem Boxplot – Diagramm dargestellt. Die Box umfasst die mittleren 50 % der Daten, die durch das obere und das untere Quartil begrenzt werden. Sie stellt ein Maß für die Streuung der Daten dar. Die unterteilende Linie in der Box repräsentiert den Medianwert. Die Antennen umfassen die ausreißenden Werte. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. n=9.

Abbildung 8 Boxplot - Darstellung des Einflusses einmaliger Bestrahlung mit 453 nm auf die Aktivierung von THP-1 Zellen

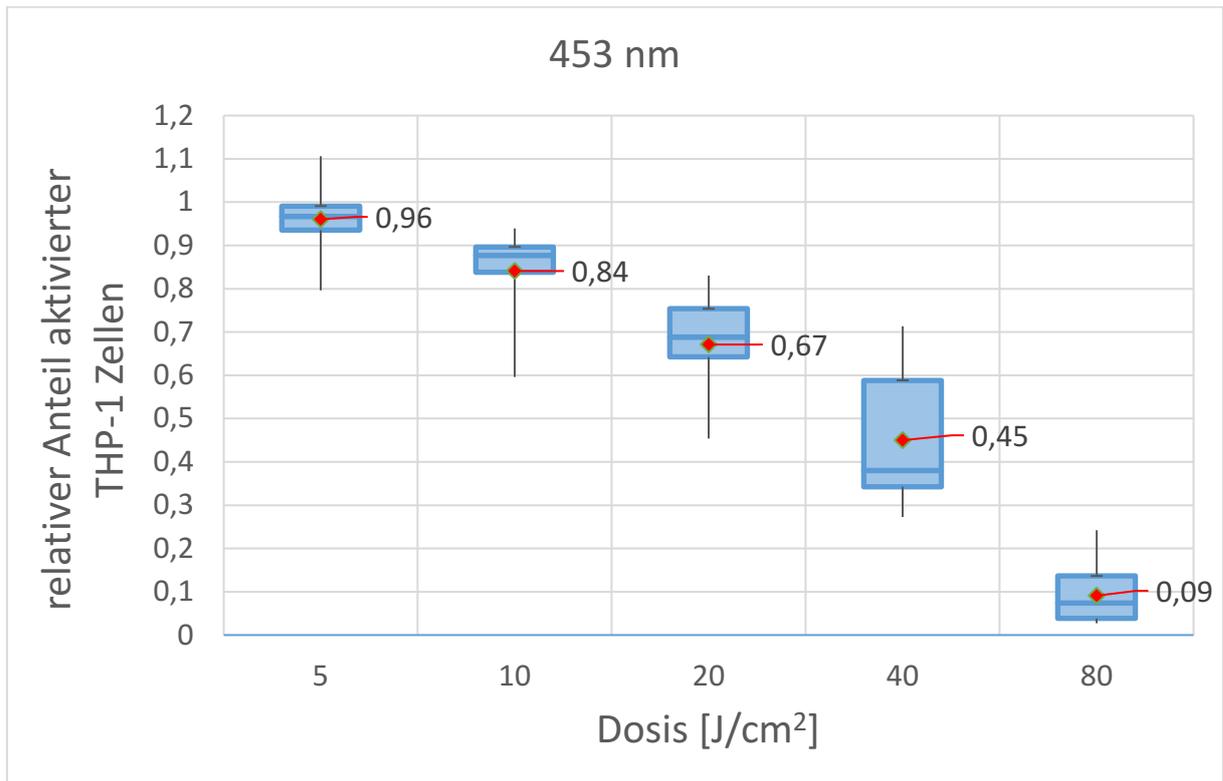


Abb. 8 - Es wird der Einfluss einmaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 453 nm und Dosen von 5 J/cm^2 - 80 J/cm^2 auf die Aktivierung von THP-1 Zellen in einem Boxplot – Diagramm dargestellt. Die Box umfasst die mittleren 50 % der Daten, die durch das obere und das untere Quartil begrenzt werden. Sie stellt ein Maß für die Streuung der Daten dar. Die unterteilende Linie in der Box repräsentiert den Medianwert. Die Antennen umfassen die ausreißenden Werte. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. $n=7$.

Abbildung 7 und Abbildung 8 zeigen eine alternative Boxplot Darstellung des Einflusses einmaliger Bestrahlung blauen Lichts unterschiedlicher Wellenlänge und Dosis auf die Aktivierung von THP-1 Zellen. Sowohl bei Exposition gegenüber blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm als auch 453 nm sinkt der relative Anteil aktivierter Zellen mit steigender Dosis, wobei dieser Effekt bei einer Wellenlänge von 453 nm größer ist. Die Verteilung der Werte in den Grafiken zeigt keinen groben systematischen Fehler zu erkennen.

Abbildung 9 Einfluss einmaliger Bestrahlung mit 474 nm auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit grafischer Darstellung einer Regressionsanalyse

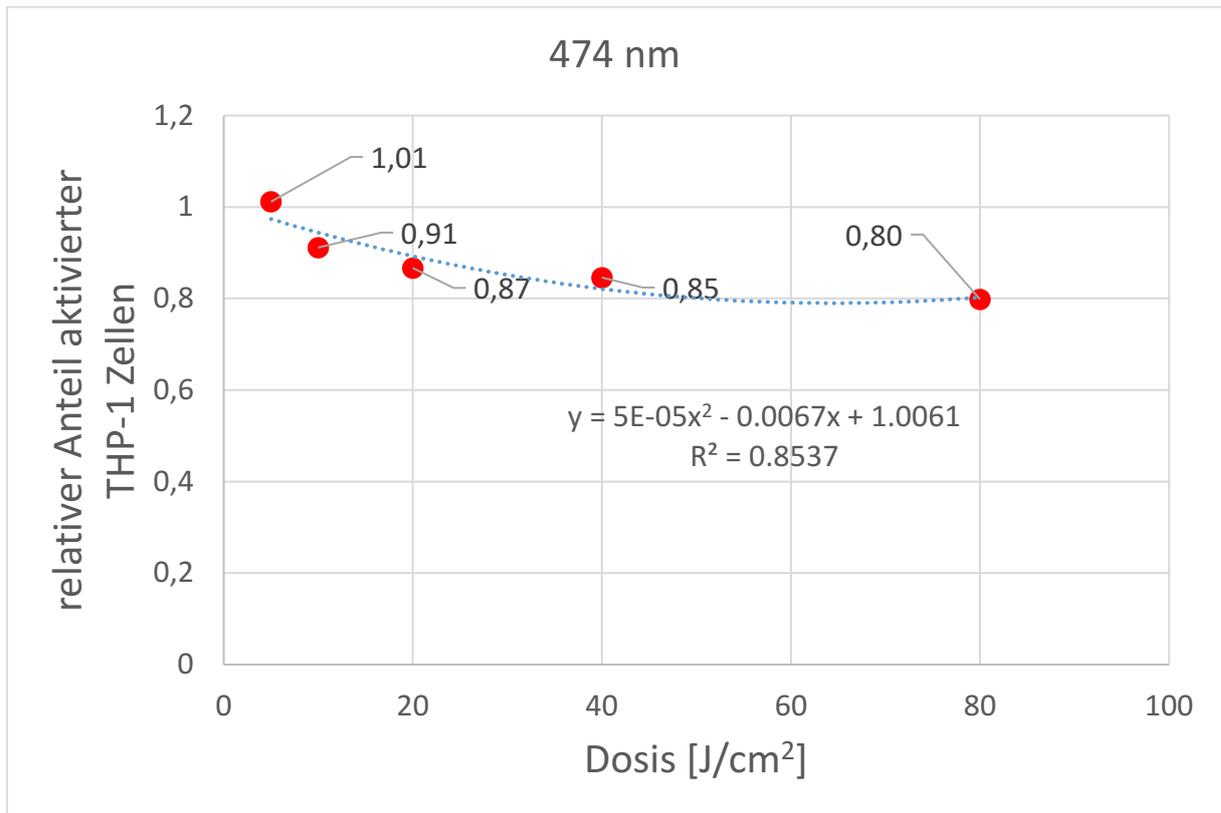


Abb. 9 - Einfluss einmaliger Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm und Dosen von 5 J/cm² - 80 J/cm² auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit grafischer Darstellung einer Regressionsanalyse mit der o.g. Formel $y=5E-05x^2 - 0.0067x + 1.0061$ und dem Bestimmtheitsmaß $R^2=0,8537$. Anhand der Regressionsanalyse kann ein Zusammenhang zwischen Dosis und dem relativen Anteil aktivierter THP-1 Zellen approximiert werden. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. $n=9$.

Abbildung 10 Einfluss einmaliger Bestrahlung mit 453nm auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit grafischer Darstellung einer Regressionsanalyse

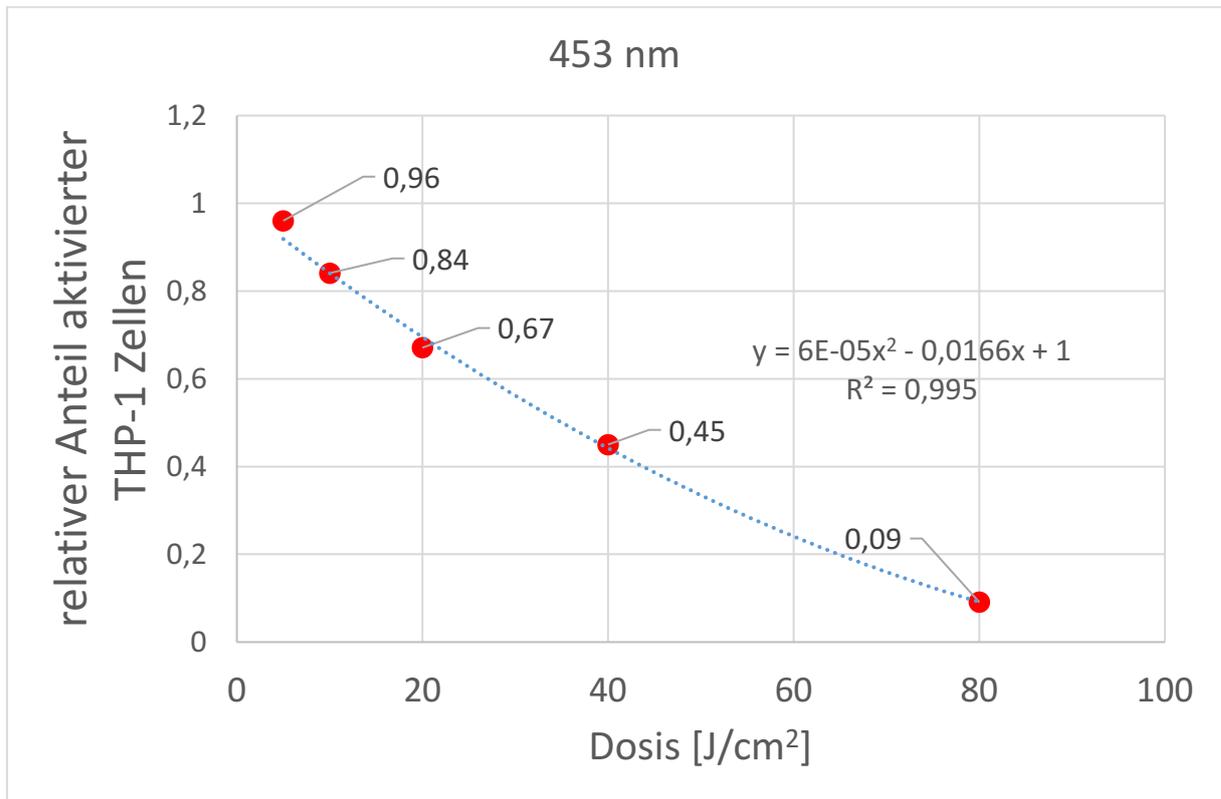


Abb. 10 - Einfluss einmaliger Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm und Dosen von 5 J/cm^2 - 80 J/cm^2 auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit grafischer Darstellung einer Regressionsanalyse mit der o.g. Formel $y = 6\text{E}-05x^2 - 0.0166x + 1$ und dem Bestimmtheitsmaß $R^2=0,995$. Anhand der Regressionsanalyse kann ein Zusammenhang zwischen Dosis und dem relativen Anteil aktivierter THP-1 Zellen approximiert werden. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. $n=7$.

Mithilfe der Regressionsanalyse kann ein Modell an die Daten angepasst werden, das den Zusammenhang zwischen Dosis und relativem Anteil aktivierter THP-1 Zellen erklärt. Somit lässt sich ein allgemeiner Zusammenhang approximieren, anhand dessen man weitere Abschätzungen durchführen kann. Anhand von Abbildung 9 und Abbildung 10 lässt sich beispielsweise der Einfluss einer Dosis von 30 J/cm^2 auf den relativen Anteil aktivierter THP-1 Zellen ablesen. Als Gütemaß zeigt ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,8537$ für 474 nm und $R^2 = 0,995$ für 453 nm, dass die Abhängigkeit der Aktivierung der THP-1 Zellen gut durch dieses Regressionsmodell dargestellt werden kann.

Anhand der oben gezeigten Grafiken lässt sich optisch erkennen, dass sowohl der Faktor Dosis einen signifikanten Einfluss auf die Aktivierung von THP-1 Zellen hat, als auch die Wellenlänge. Weiterführend wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Dosis generell einen signifikanten Einfluss auf die Aktivierung der THP-1 Zellen hat. Für eine Wellenlänge von 474 nm ergibt sich

ein p-Wert von $7,18E-12$ und für 453 nm ein p-Wert von $2,63E-51$. Der Faktor Dosis hat also einen signifikanten Einfluss, wobei höher energetische Bestrahlung einer Wellenlänge von 453 nm mit einem deutlich niedrigeren p-Wert einen signifikant höheren Einfluss zeigt.

Zur Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen den einzelnen Dosen beider Wellenlängen, wurde bei den Versuchen ein zweiseitiger, gepaarter t-Test durchgeführt. Tabelle 8 im Anhang sind die Ergebnisse der t-Tests zu entnehmen. Im Vergleich zur Kontrolle kommt es bei einer Dosis von 5 J/cm^2 einer Wellenlänge von 453 nm mit einem p-Wert von 0,01 zu einer signifikanten Reduktion der relativen Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle. Bei einer Wellenlänge von 474 nm und einer Dosis von 5 J/cm^2 zeigt sich mit einem p-Wert von 0,49 kein signifikanter Einfluss im Vergleich zur Kontrolle. Erhöht man die Dosis auf 10 J/cm^2 zeigt sich bei einer Wellenlänge von 474 nm im Vergleich ein signifikanter Einfluss mit einem p-Wert von $7,87E-06$. Bei einer Wellenlänge von 474 nm und einer Dosis von 80 J/cm^2 im Vergleich zur Kontrolle ergibt sich ein p-Wert von $2,36E-09$ und für 453 nm ein p-Wert von $4,34E-25$. Höher energetische Strahlung einer Wellenlänge mit 453 nm hat einen höher signifikanten Einfluss auf die Aktivierung der THP-1 Zellen hat, als blaues Licht einer Wellenlänge von 474 nm.

Einfluss einmaliger Bestrahlung unterschiedlicher Wellenlänge und Dosis auf aktivierte THP-1 Zellen

1x10⁶ THP-1 Zellen pro Well wurden mit 2 ml Medium zur Bestrahlung in 6-Well Platten ausgesät und mit PMA aktiviert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurden die Zellen mit aufgewärmten PBS gewaschen, um abgestorbene oder nicht differenzierte Zellen zu eliminieren. Es folgte die Bestrahlung mit unterschiedlicher Wellenlänge und Bestrahlungsdosis analog zum Versuch „Einfluss einmaliger Bestrahlung auf die Aktivierung der THP-1 Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat“. Nach 24 Stunden und einem erneuten Waschgang mit PBS, wurde mittels CellTiter-Blue® Assay auf die Zellzahl der aktivierten und adhärenen THP-1 Zellen geschlossen.

Abbildung 11 Einfluss einmaliger Bestrahlung auf aktivierte THP-1 Zellen

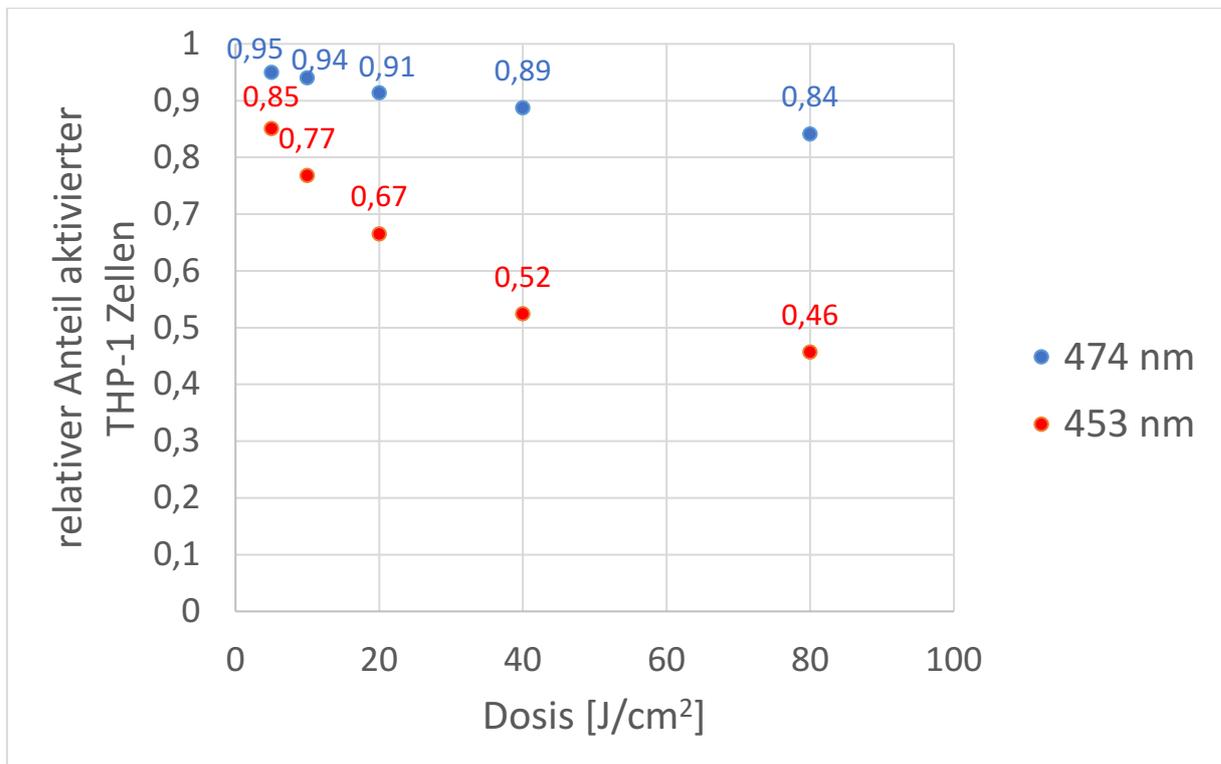


Abb. 11 - Einfluss einmaliger Bestrahlung unterschiedlicher Dosen von 5 J/cm² – 80 J/cm² mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm und 453 nm auf aktivierte THP-1 Zellen. Es wurde der relative Anteil der THP-1 Zellen in Relation zur auf 1 normierten Kontrolle dargestellt. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. 474 nm n=5, 453 nm n = 4.

Es wurden die Mittelwerte in Relation zur Kontrolle errechnet und grafisch dargestellt. Sowohl blaues Licht einer Wellenlänge von 474 nm als auch 453 nm führt zu einer Reduktion der relativen Zellzahl. Bei einer Dosis von 80 J/cm² sinkt die Zellzahl um etwa 16 % im Vergleich zur Kontrolle. Beim Einsatz von Strahlung einer Wellenlänge

von 453 nm ist diese Tendenz stärker ausgeprägt, bei 80 J/cm² mit einer Zellzahlreduktion um 54 %.

Abbildung 12 Boxplot - Darstellung des Einflusses einmaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 474 nm auf aktivierte THP-1 Zellen

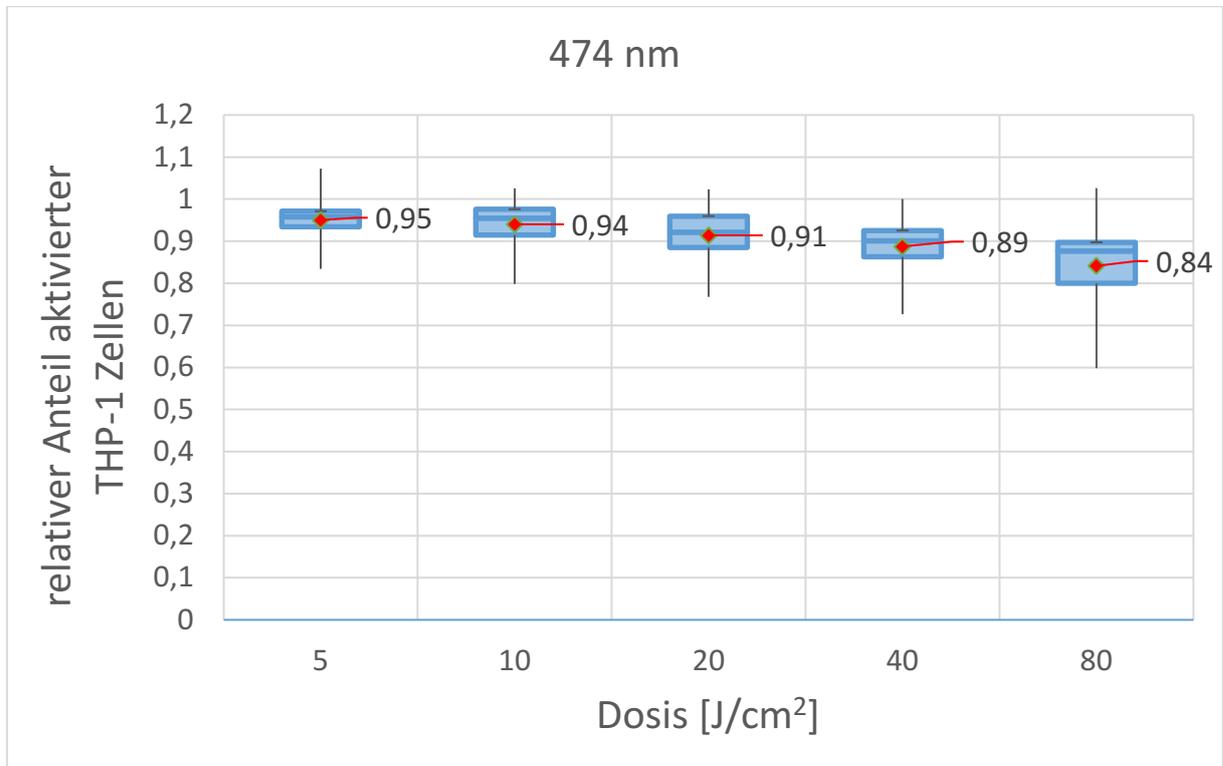


Abb. 12 - Es wird der Einfluss einmaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 474 nm und Dosen von 5 J/cm² - 80 J/cm² auf aktivierte THP-1 Zellen in einem Boxplot – Diagramm dargestellt. Die Box umfasst die mittleren 50 % der Daten, die durch das obere und das untere Quartil begrenzt werden. Sie stellt ein Maß für die Streuung der Daten dar. Die unterteilende Linie in der Box repräsentiert den Medianwert. Die Antennen umfassen die ausreißenden Werte. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. n=5.

Abbildung 13 Boxplot - Darstellung des Einflusses einmaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 453 nm auf aktivierte THP-1 Zellen

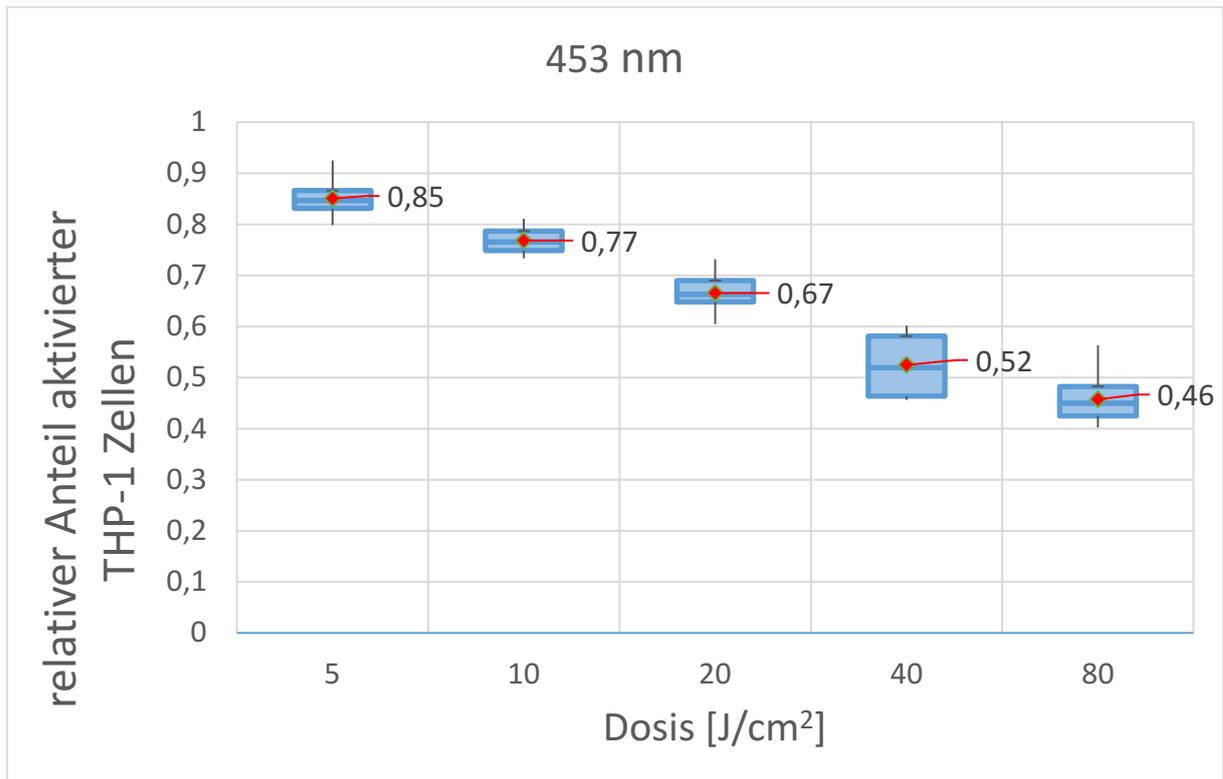


Abb. 13 - Es wird der Einfluss einmaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 453 nm und Dosen von 5 J/cm² - 80 J/cm² auf aktivierte THP-1 Zellen in einem Boxplot – Diagramm dargestellt. Die Box umfasst die mittleren 50 % der Daten, die durch das obere und das untere Quartil begrenzt werden. Sie stellt ein Maß für die Streuung der Daten dar. Die unterteilende Linie in der Box repräsentiert den Medianwert. Die Antennen umfassen die ausreißenden Werte. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. n=4.

Abbildung 12 und Abbildung 13 zeigen die Boxplot Darstellung des Einflusses einmaliger Bestrahlung blauen Lichts unterschiedlicher Wellenlänge und Dosis auf aktivierte THP-1 Zellen. Sowohl bei Exposition gegenüber blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm als auch 453 nm sinkt der relative Anteil aktivierter Zellen mit steigender Dosis, wobei dieser Effekt bei einer Wellenlänge von 453 nm größer ist. Die Verteilung der Werte in den Grafiken zeigt keinen groben systematischen Fehler. Im Vergleich zur Abbildung 11 und Abbildung 12 zeigt sich bei aktivierten THP-1 Zellen eine geringere Zellzahlreduktion.

Abbildung 14 Einfluss einmaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 474 nm auf aktivierte THP-1 Zellen mit grafischer Darstellung einer Regressionsanalyse

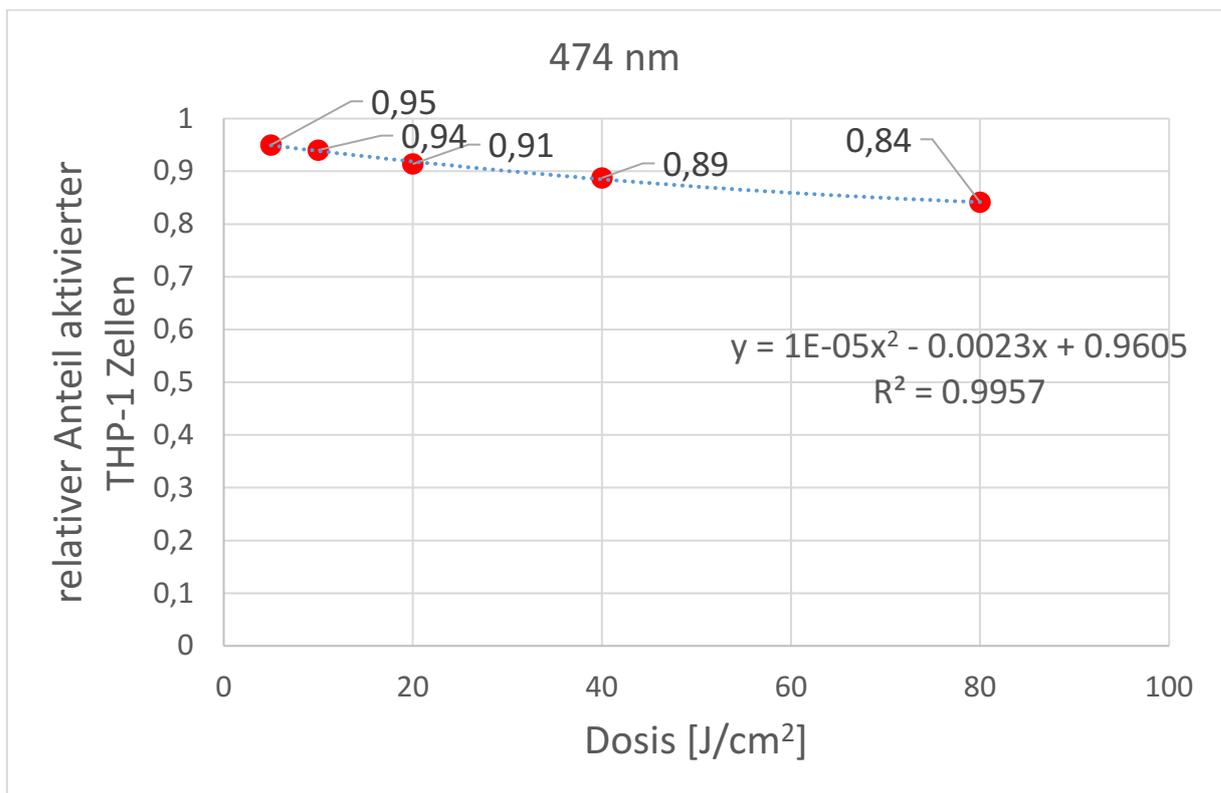


Abb. 14 - Einfluss einmaliger Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm mit unterschiedlichen Dosen von 5 J/cm² - 80 J/cm² auf aktivierte THP-1 Zellen mit grafischer Darstellung einer Regressionsanalyse mit der o.g. Formel $y = 1E-05x^2 - 0.0023x + 0.9605$ und einem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0.9957$. Anhand der Regressionsanalyse kann ein Zusammenhang zwischen Dosis und dem relativen Anteil aktivierter THP-1 Zellen approximiert werden. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. $n=5$.

Abbildung 15 Einfluss einmaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 453 nm auf aktivierte THP-1 Zellen mit grafischer Darstellung einer Regressionsanalyse

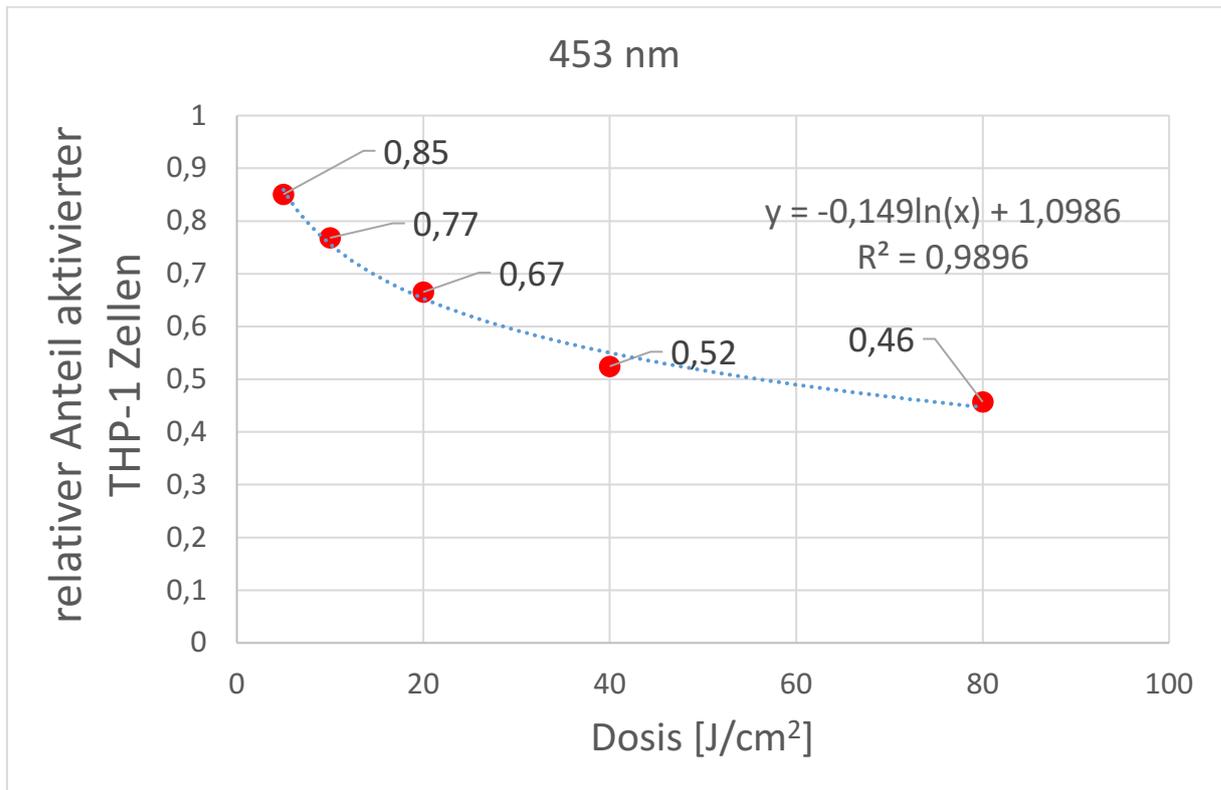


Abb. 15 - Einfluss einmaliger Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm mit unterschiedlichen Dosen von 5 J/cm² - 80 J/cm² auf aktivierte THP-1 Zellen mit grafischer Darstellung einer Regressionsanalyse mit der o.g. Formel $y = -0,149\ln(x) + 1,0986$ und dem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9896$. Anhand der Regressionsanalyse kann ein Zusammenhang zwischen Dosis und dem relativen Anteil aktivierter THP-1 Zellen approximiert werden. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. $n=4$.

Mithilfe der Regressionsanalyse kann ein Modell an die Daten angepasst werden, das den Zusammenhang zwischen Dosis und relativem Anteil aktivierter THP-1 Zellen nach einmaliger Bestrahlung erklärt. Somit lässt sich ein allgemeiner Zusammenhang approximieren, anhand dessen man weitere Abschätzungen durchführen kann, wie beispielsweise den Einfluss einer Dosis von 50 J/cm² auf die relative Zellzahl. Als Gütemaß zeigt ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9957$ für 474 nm und $R^2 = 0,9896$ für 453 nm, dass der Zusammenhang adäquat durch dieses Regressionsmodell dargestellt werden kann.

Anhand der oben gezeigten Grafiken lässt sich optisch erkennen, dass sowohl der Faktor Dosis als auch die Wellenlänge einen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität aktivierter THP-1 Zellen hat. Hierfür wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, um generell zu schauen, ob die Dosis einen signifikanten Einfluss auf die Zellzahl aktivierter THP-1 Zellen hat. Für eine Wellenlänge von 474 nm ergibt sich ein p-Wert von 2,06E-7 und für 453 nm ein p-Wert von 4,09E-46. Der Faktor Dosis hat

also einen signifikanten Einfluss auf die die Zellzahl aktivierter THP-1 Zellen, wobei höher energetische Bestrahlung einer Wellenlänge von 453 nm mit einem niedrigeren p-Wert einen signifikant höheren Einfluss zeigt.

Zur Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen den einzelnen Dosen beider Wellenlängen, wurde bei den Versuchen ein zweiseitiger, gepaarter t-Test durchgeführt. Die einzelnen Werte wurden in Tabelle 9 aufgelistet. Bei Bestrahlung von aktivierten THP-1 Zellen mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm und Dosis von 5 J/cm^2 zeigt sich mit einem p-Wert von 0,005 eine signifikante Zellzahlreduktion im Vergleich zur Kontrolle. Mit einem p-Wert von $8,57\text{E-}09$ zeigt sich bei einer Wellenlänge von 453 nm und einer Dosis von 5 J/cm^2 eine signifikantere Erniedrigung. Sowohl bei einer Wellenlänge von 474 nm, als auch 453 nm zeigt sich mit steigender Dosis im Vergleich zur Kontrolle sowohl grafisch als auch anhand der p-Werte eine zunehmende Zellzahlreduktion. Blaues Licht einer Wellenlänge von 453 nm hat einen signifikanteren Einfluss auf die Zellzahlreduktion. Bei einer Wellenlänge von 453 nm und einer Dosis von 80 J/cm^2 ergibt sich im Vergleich zur Kontrolle ein p-Wert von $2,04\text{E-}13$, bei einer Wellenlänge von 474nm und einer Dosis von 80 J/cm^2 ein p-Wert von $4,51\text{E-}05$. Weiterhin ist Tabelle 9 zu entnehmen, dass eine Dosiserhöhung von 40 J/cm^2 auf 80 J/cm^2 bei einer Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 474 nm im zwar zu einer weiteren Zellzahlreduktion führt, welche mit einem p-Wert von 0,17 jedoch nicht signifikant höher ist.

Einfluss dreimaliger Bestrahlung unterschiedlicher Wellenlängen und Dosen auf die Aktivierung der THP-1 Zellen

1x10⁶ THP-1 Zellen pro Well wurden mit 2 ml Medium zur Bestrahlung in 6-Well Platten ausgesät und mit PMA aktiviert. Direkt im Anschluss an die Zugabe von PMA folgt eine 3-malig aufeinanderfolgende Bestrahlungen mit unterschiedlichen Dosen der Wellenlängen 474 nm und 453 nm in einem jeweiligen Zeitabstand von 4 Stunden zwischen den jeweiligen Bestrahlungen. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden im Brutschrank wurden die Zellen mit aufgewärmten PBS gewaschen, um abgestorbene oder nicht differenzierte Zellen zu entfernen. Mittels CellTiter-Blue® Assay wird auf die Zellzahl der aktivierten und adhärenen THP-1 Zellen geschlossen.

Abbildung 16 Einfluss dreimaliger Bestrahlung auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit PMA

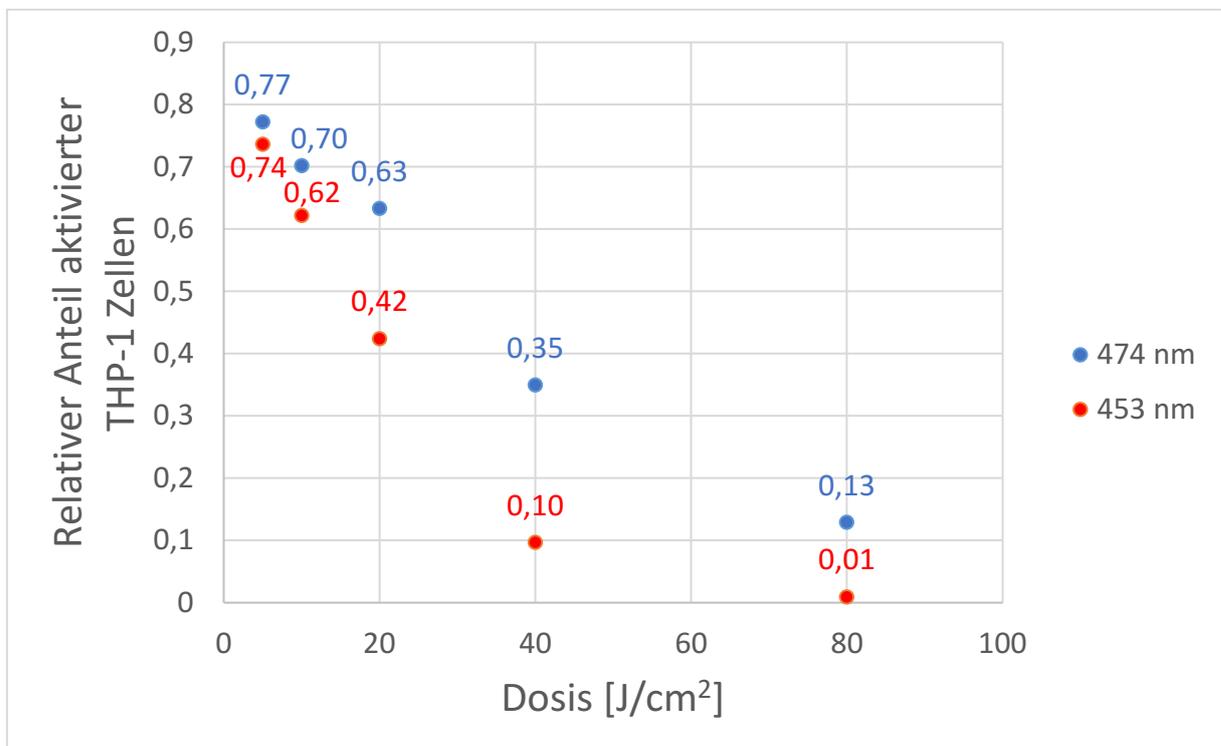


Abb. 16 - Einfluss dreimaliger Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm und 453 nm unterschiedlicher Dosen von 5 J/cm² – 80 J/cm² auf die Aktivierung von THP-1 Zellen. Es wurde der relative Anteil der THP-1 Zellen in Relation zur auf 1 normierten Kontrolle dargestellt. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. 474 nm n=4, 453 nm n = 4.

Sowohl bei der Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm als auch 453 nm kommt es mit steigender Dosis zu einer signifikanten Reduktion der relativen Anzahl der aktivierten THP-1 Zellen. In einem Wellenlängenbereich von 453 nm ist dieser Effekt ausgeprägter verglichen mit dem Einsatz einer Wellenlänge von 474 nm. Diese führt bei einer Dosis von 80 J/cm² zu einer Reduktion der relativen Zellzahl um

87 % im Vergleich zur Kontrolle. Bei einer Wellenlänge von 453 nm reduziert sich der relative Anteil aktivierter THP-1 Zellen mit 99 % nahezu vollständig.

Abbildung 17 Einfluss dreimaliger Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm auf die Aktivierung von THP-1 Zellen

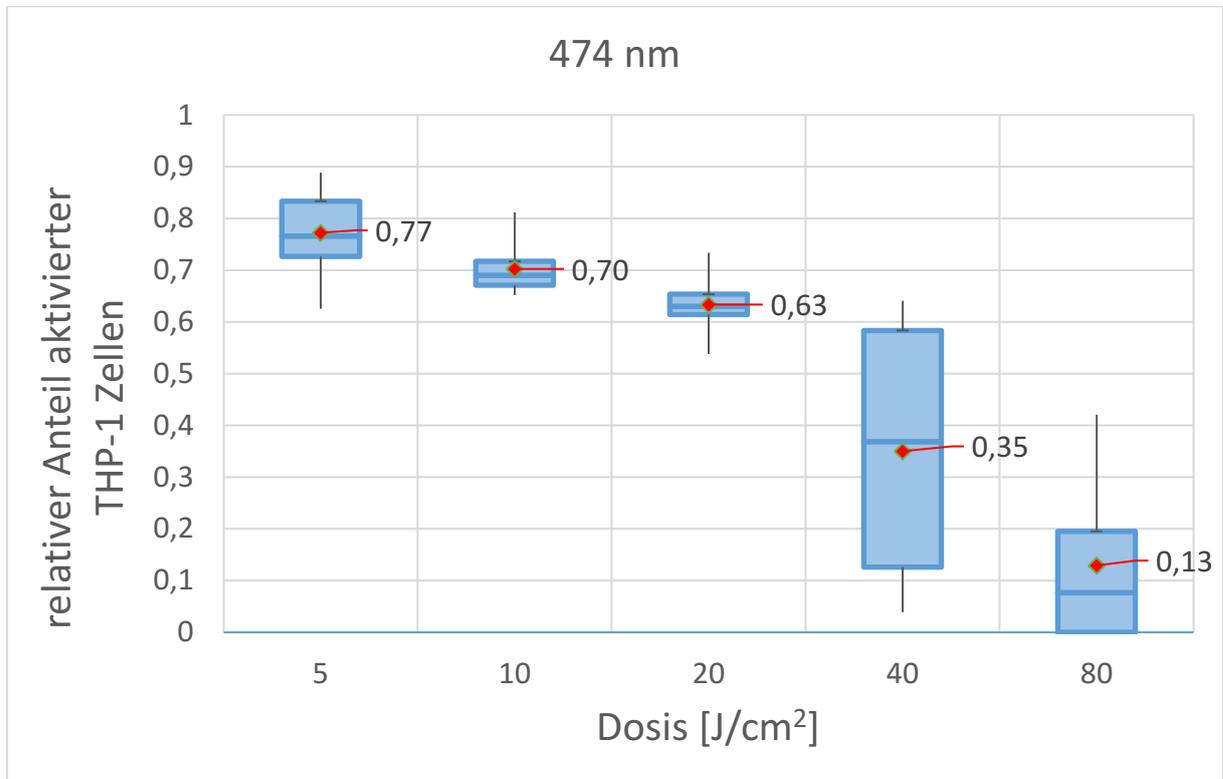


Abb. 17 - Es wird der Einfluss dreimaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 474 nm und Dosen von 5 J/cm² - 80 J/cm² auf die Aktivierung von THP-1 Zellen in einem Boxplot – Diagramm dargestellt. Die Box umfasst die mittleren 50 % der Daten, die durch das obere und das untere Quartil begrenzt werden. Sie stellt ein Maß für die Streuung der Daten dar. Die unterteilende Linie in der Box repräsentiert den Medianwert. Die Antennen umfassen die ausreißenden Werte. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. n=4.

Auch in der Boxplot – Darstellung ist zu erkennen, dass eine dreimalige Blaulichtexposition einer Wellenlänge von 474 nm mit steigender Dosis eine signifikante Reduktion des relativen Anteils aktivierter THP-1 Zellen induziert. Die Verteilung der Werte in den Grafiken ist zufriedenstellend. Im Dosisbereich von 40 J/cm² und 80 J/cm² zeigen sich größere Boxen, was für eine größere Streuung der Daten spricht.

Abbildung 18 Einfluss dreimaliger Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm auf die Aktivierung von THP-1 Zellen

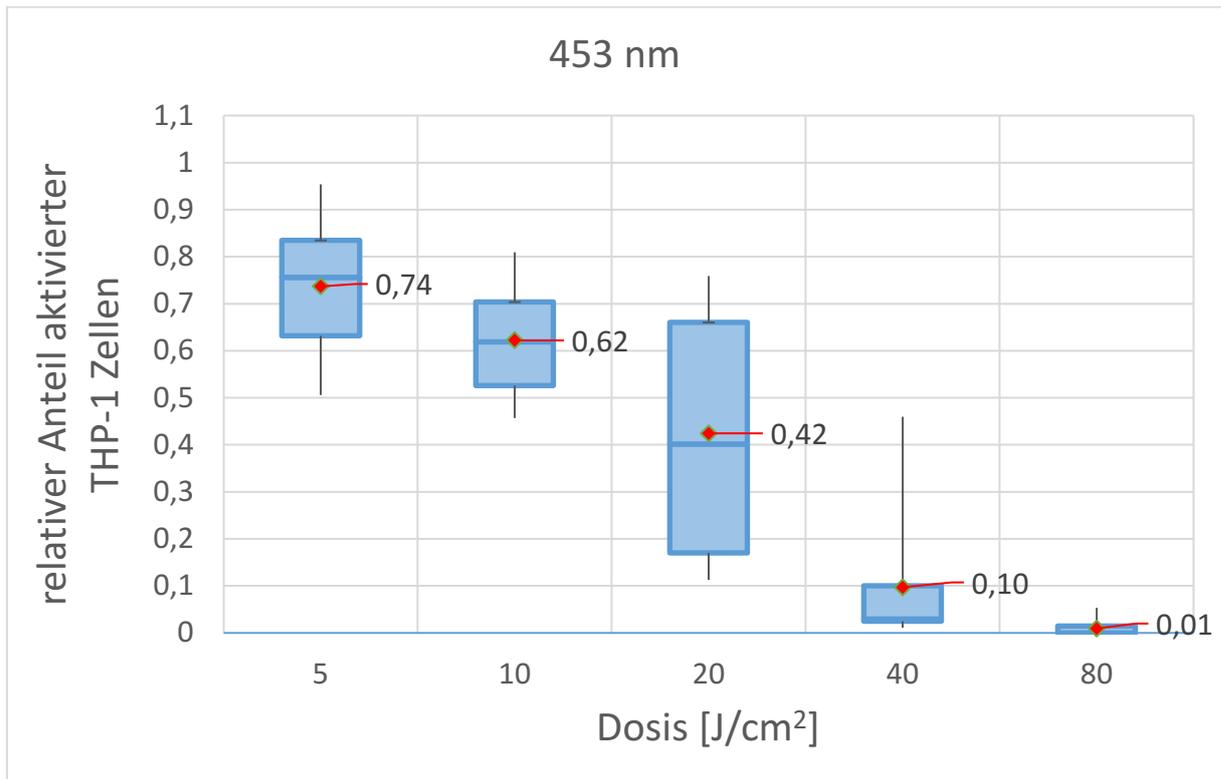


Abb. 18 - Es wird der Einfluss dreimaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 474 nm und Dosen von 5 J/cm² - 80 J/cm² auf die Aktivierung von THP-1 Zellen in einem Boxplot - Diagramm dargestellt. Die Box umfasst die mittleren 50 % der Daten, die durch das obere und das untere Quartil begrenzt werden. Sie stellt ein Maß für die Streuung der Daten dar. Die unterteilende Linie in der Box repräsentiert den Medianwert. Die Antennen umfassen die ausreißerischen Werte. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. n=4.

Auch in dieser Grafik zeigt sich, dass eine dreimalige Blaulichtexposition einer Wellenlänge von 453 nm mit steigender Dosis eine signifikante Reduktion des relativen Anteils aktivierter THP-1 Zellen induziert. Die Verteilung der Werte in den Grafiken ist zufriedenstellend. Bei einer Dosis von 20 J/cm² zeigt sich eine große Box, was für eine größere Streuung der Daten spricht.

Abbildung 19 Einfluss dreimaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 474 nm auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit grafischer Darstellung einer Regressionsanalyse

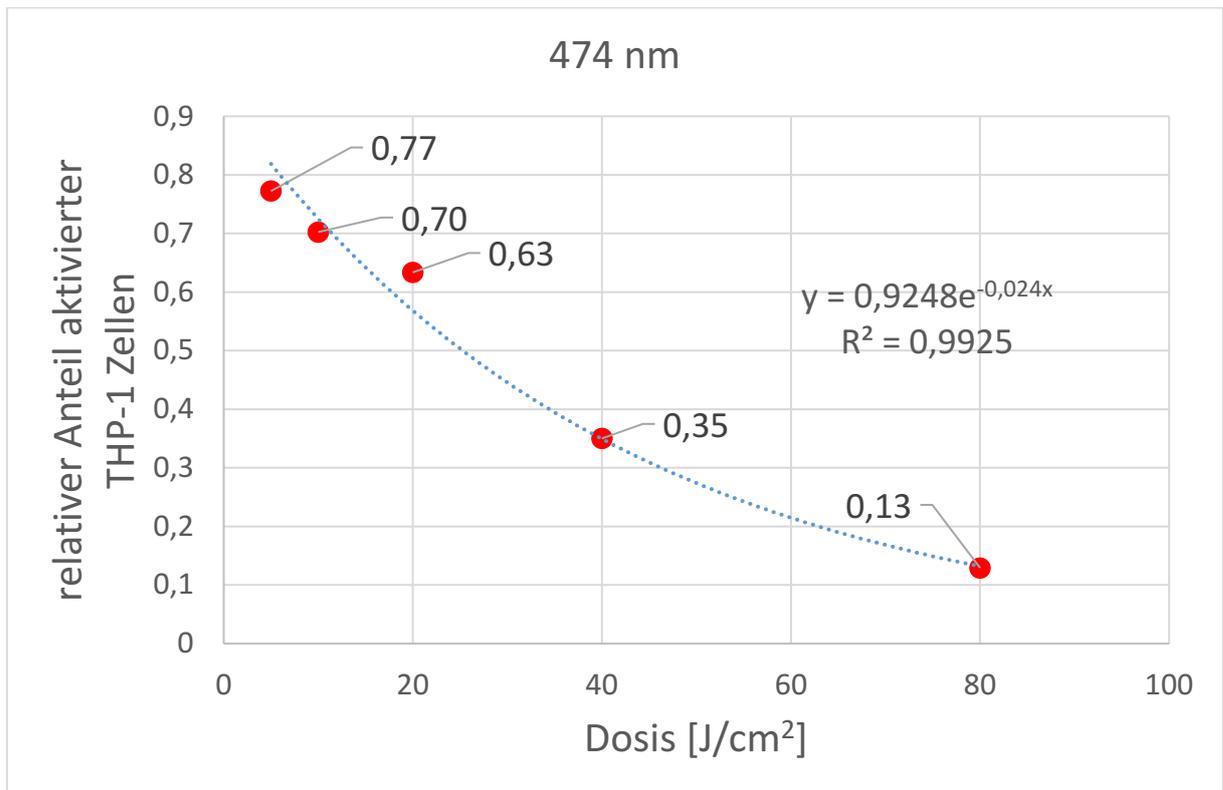


Abb. 19 - Einfluss dreimaliger Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm mit unterschiedlichen Dosen von 5 J/cm² - 80 J/cm² auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit grafischer Darstellung einer Regressionsanalyse mit der o.g. Formel $y = 0,9248e^{-0,024x}$ und dem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9925$. Anhand der Regressionsanalyse kann ein Zusammenhang zwischen Dosis und dem relativen Anteil aktivierter THP-1 Zellen approximiert werden. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. $n=4$

Mithilfe der Regressionsanalyse kann ein Modell an die Daten angepasst werden, das den Zusammenhang zwischen Dosis und relativem Anteil aktivierter THP-1 Zellen nach dreimaliger Bestrahlung erklärt. Anhand der Funktion lassen sich weitere Abschätzungen durchführen, wie beispielsweise den Einfluss einer Dosis von 30 J/cm² auf die relative Zellzahl. Als Gütemaß zeigt ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9925$ für 474 nm, dass der Zusammenhang gut durch dieses Regressionsmodell dargestellt werden kann.

Abbildung 20 Einfluss dreimaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 453 nm auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit grafischer Darstellung einer Regressionsanalyse

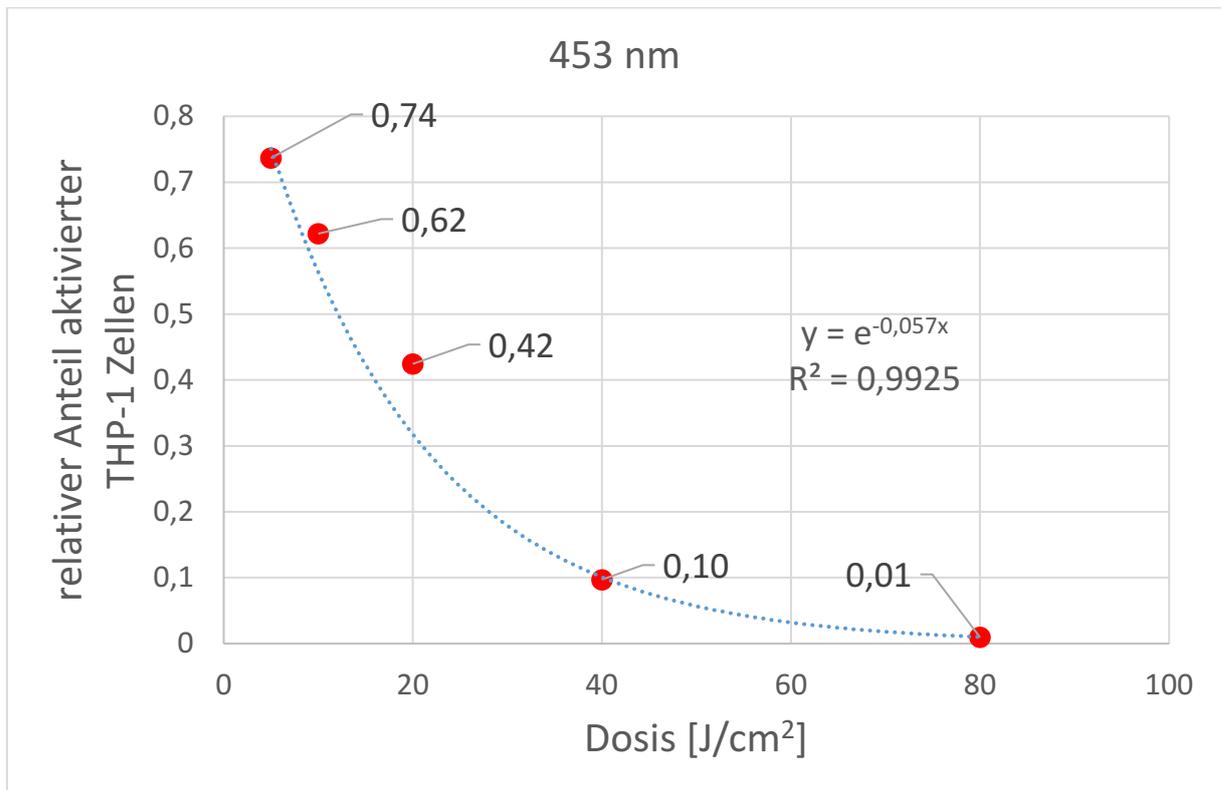


Abb. 20 - Einfluss dreimaliger Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm mit unterschiedlichen Dosen von 5 J/cm² - 80 J/cm² auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit grafischer Darstellung einer Regressionsanalyse mit der o.g. Formel $y = e^{-0,057x}$ und dem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9925$. Anhand der Regressionsanalyse kann ein Zusammenhang zwischen Dosis und dem relativen Anteil aktivierter THP-1 Zellen approximiert werden. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. $n=4$

Mithilfe der Regressionsanalyse kann ein Modell an die Daten angepasst werden, das den Zusammenhang zwischen Dosis und relativem Anteil aktivierter THP-1 Zellen nach dreimaliger Bestrahlung erklärt. Anhand der Funktion lassen sich weitere Abschätzungen durchführen, wie beispielsweise den Einfluss einer Dosis von 30 J/cm² auf die relative Zellzahl. Als Gütemaß zeigt ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9925$ für 453 nm, dass der Zusammenhang gut durch dieses Regressionsmodell dargestellt werden kann.

Zur Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen den einzelnen Dosen beider Wellenlängen, wurde bei den Versuchen ein zweiseitiger, gepaarter t-Test durchgeführt. Tabelle 10 ist zu entnehmen, dass es bei einer Wellenlänge von 474 nm und einer Dosis von 5 J/cm² mit einem p-Wert von 8.00E-07 zu einer signifikanten Erniedrigung der relativen Anzahl aktivierter THP-1 Zellen im Vergleich zur Kontrolle kommt. Mit einem p-Wert von 0.000104 zeigt auch Licht einer Wellenlänge von 453

nm und einer Dosis von 5 J/cm² ebenfalls eine signifikante Erniedrigung. Mit steigender Dosis kommt es in beiden Wellenlängenbereichen zu einer signifikanten Zellzahlreduktion. Bei einer Dosis von 80 J/cm² und einer Wellenlänge von 453 nm ergibt sich ein p-Wert von 3.18E-21 im Vergleich zur Kontrolle, bei einer Wellenlänge von 474 nm und einer Dosis von 80 J/cm² ergibt sich ein p-Wert von 7.94E-10. Höher energetisches Licht einer Wellenlänge von 453 nm induziert eine größere Zellzahlreduktion als 474 nm.

Abbildung 21 Vergleich der Wirkung einmaliger mit dreimaliger Bestrahlung auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm

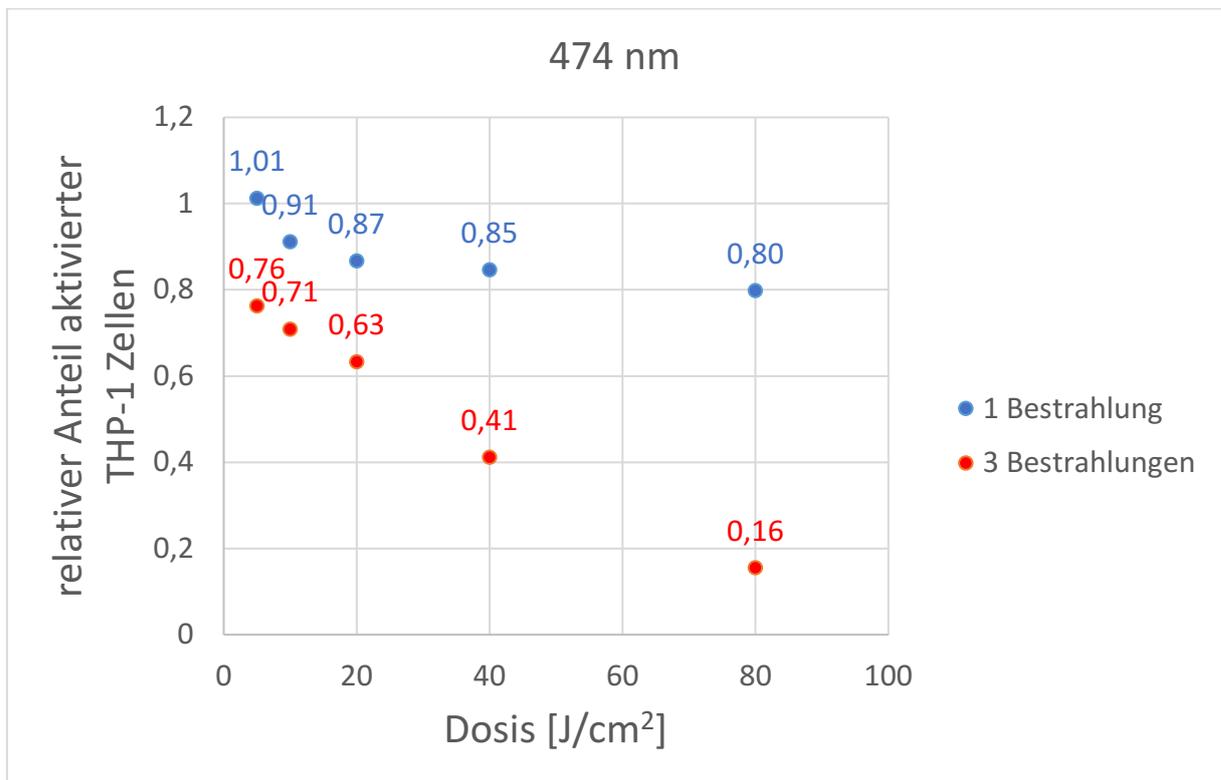


Abb. 21 – In dieser Grafik erfolgt der Vergleich des Einflusses blauen Lichts einer Wellenlänge von 474 nm in Dosen von 5 J/cm² - 80 J/cm² auf die Aktivierung der THP-1 Zellen nach einmaliger und nach dreimaliger Bestrahlung. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen.

Abbildung 21 zeigt, neben der Dosis auch die Anzahl der Bestrahlung einen Einfluss auf die Aktivierung von THP-Zellen hat. So induziert eine mehrfache Bestrahlung eine signifikantere Zellzahlreduktion als eine einmalige Bestrahlung. Bei der einmaligen Bestrahlung kommt es zu einer ca. um 20 % Reduktion der relativen Zellzahl. Werden 3 Bestrahlung durchgeführt so kommt es zu einer Reduktion um 84 %.

Abbildung 22 Vergleich der Wirkung einmaliger mit dreimaliger Bestrahlung auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm

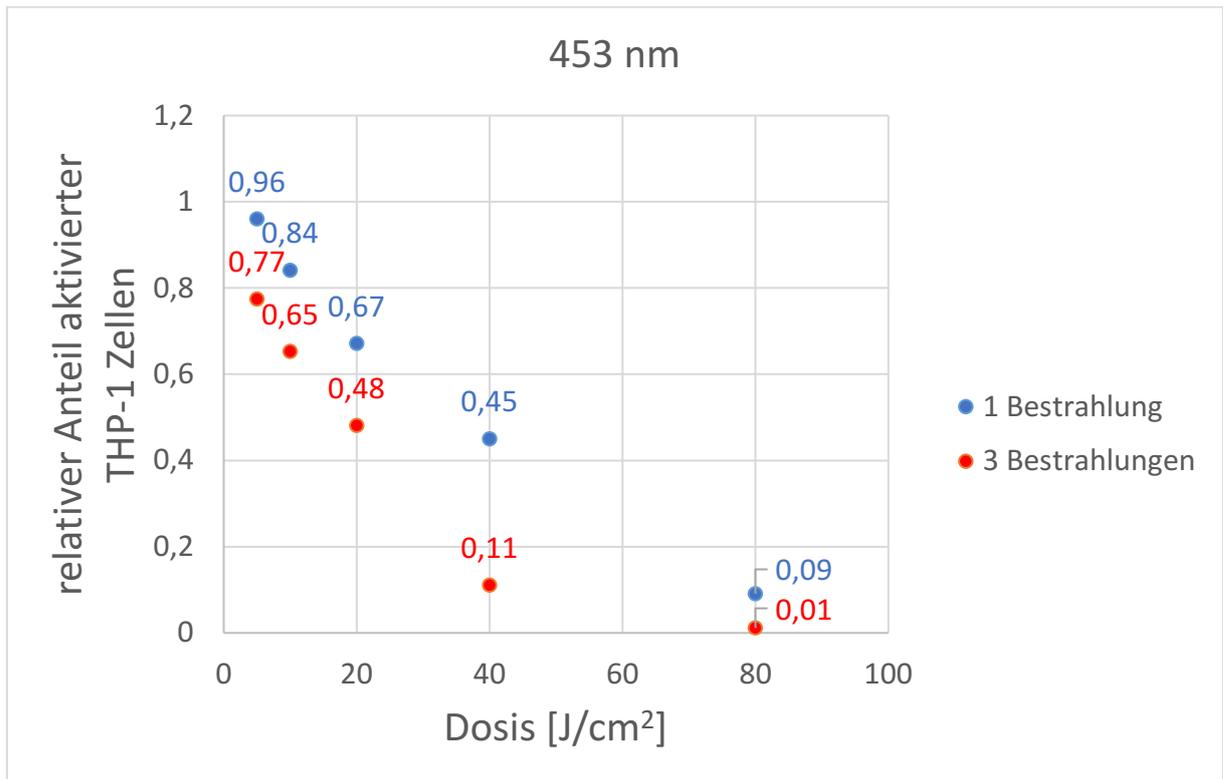


Abb. 22 - in dieser Grafik erfolgt der Vergleich des Einflusses blauen Lichts einer Wellenlänge von 453 nm in Dosen von 5 J/cm² - 80 J/cm² auf die Aktivierung der THP-1 Zellen nach einmaliger und nach dreimaliger Bestrahlung. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen.

Abbildung 22 verdeutlicht, dass eine mehrfache Strahlenexposition zu einer höheren Reduktion der relativen Zellzahl kommt und somit einen größeren Einfluss auf die Aktivierung von THP-1 aufweist. Neben der Dosis und der Wellenlänge hat auch die Anzahl der Bestrahlungen einen Einfluss auf die Hemmung der Aktivierung der THP-1 Zellen.

Einfluss einmaliger Bestrahlung unterschiedlicher Dosen und Wellenlänge auf die Aktivierung der THP-1 Zellen mit Entzug von Phorbol-12-myristat-13-acetat nach 4 Stunden

Vor der Bestrahlung werden die Zellen in 6-Well Platten ausgesät und mit PMA aktiviert. Direkt im Anschluss an die Aktivierung folgt eine einmalige Bestrahlung der bekannten Dosen der Wellenlängen 474 nm und 453 nm. Nach 4 Stunden Inkubation unter Kulturbedingungen wird der Aktivierungs-Stimulus PMA entzogen. Hierzu wird die Zellsuspension der einzelnen Wells in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Reaktionsgefäße werden zentrifugiert, der Überstand mit PMA wird abgesaugt. Nach einem Waschvorgang mit aufgewärmten PBS zur Entfernung des restlichen PMA wurden die Zellen wieder auf 6-Well Platten überführt. Die Platten werden zur Differenzierung für 48 Stunden unter normalen Kulturbedingungen im Brutschrank aufbewahrt. Nach 48 Stunden wurde das Zellmedium aus den Wells der 6-Well Platten abgesaugt. In einem Waschschrift mit PBS, wurden nicht aktivierte und somit nicht an dem Boden der Platten adhärierende Zellen entfernt. Mittels CellTiter-Blue® Assay soll auf die Zellzahl der aktivierten und adhärenen THP-1 Zellen geschlossen werden.

Abbildung 23 Einfluss einmaliger Bestrahlung auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit Entzug von PMA nach 4 Stunden

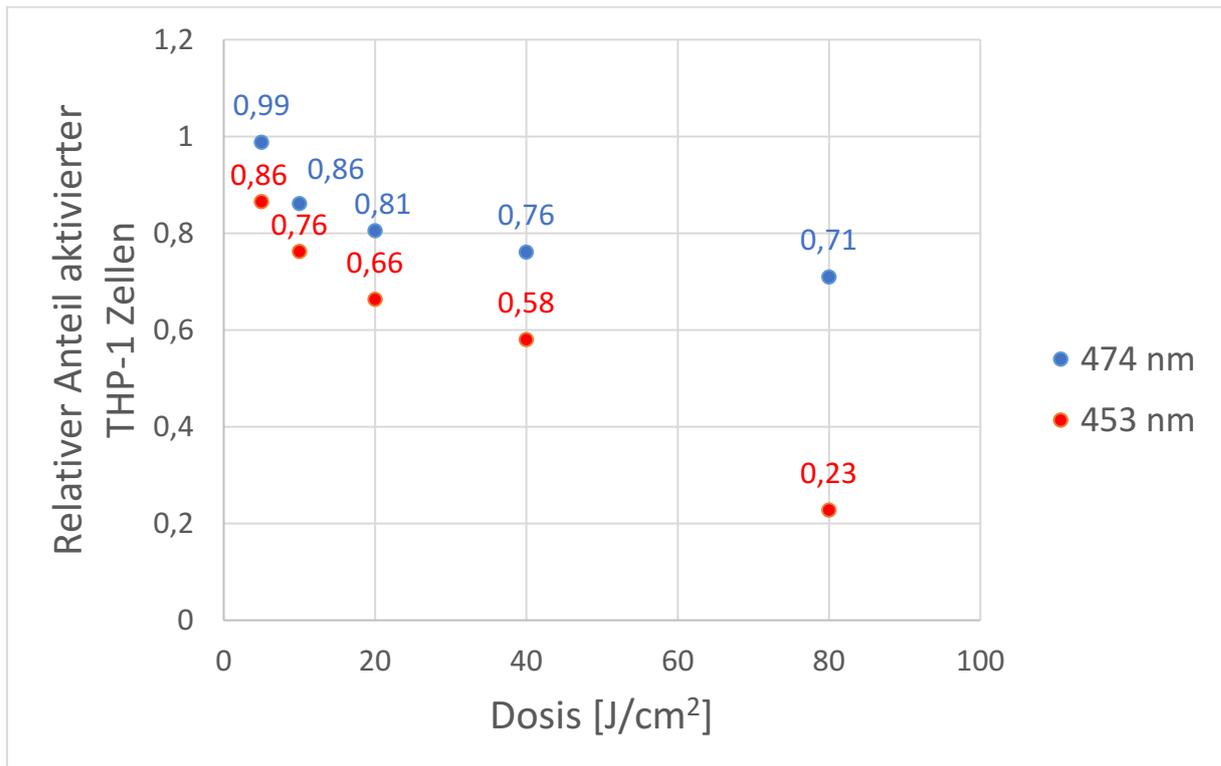


Abb. 23 - Einfluss einmaliger Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm und 453 nm und unterschiedlichen Dosen von 5 J/cm² – 80 J/cm² auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit Entzug von PMA nach 4 Stunden. Es wurde der relative Anteil der THP-1 Zellen in Relation zur auf 1 normierten Kontrolle dargestellt. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. 474 nm n=5, 453 nm n = 4.

Sowohl im Wellenlängenbereich von 474 nm also auch 453 nm kommt es mit steigender Dosis zur Reduktion des relativen Anteils aktivierter THP-1 Zellen. Bei Blaulichtexposition einer Wellenlänge von 474 nm und Dosis von 80 J/cm² sinkt der Anteil um etwa 29 %. Bei einer Wellenlänge von 453 nm zeigt sich diese Tendenz mit einer Reduktion um 77 % deutlicher. Vergleich Abbildung 23.

Abbildung 24 Boxplot - Darstellung des Einflusses einmaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 474 nm auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit Entzug von PMA nach 4 Stunden

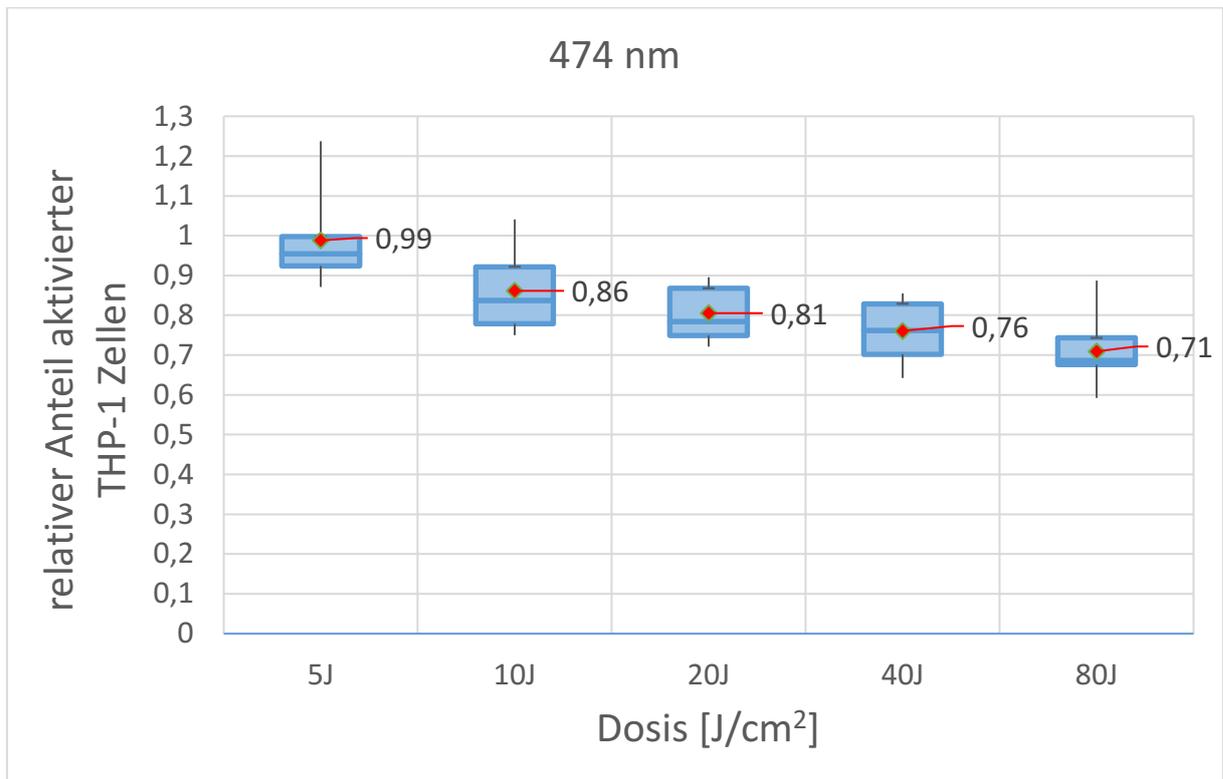


Abb. 24 - Es wird der Einfluss einmaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 474 nm und Dosen von 5 J/cm² - 80 J/cm² auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit Entzug von PMA nach 4 Stunden in einem Boxplot – Diagramm dargestellt. Die Box umfasst die mittleren 50 % der Daten, die durch das obere und das untere Quartil begrenzt werden. Sie stellt ein Maß für die Streuung der Daten dar. Die unterteilende Linie in der Box repräsentiert den Medianwert. Die Antennen umfassen die ausreißenden Werte. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. n=5.

Der Boxplot – Darstellung ist zu entnehmen, dass eine einmalige Blaulichtexposition einer Wellenlänge von 474 nm und PMA-Entzug nach 4 Stunden mit steigender Dosis eine signifikante Reduktion des relativen Anteils aktivierter THP-1 Zellen induziert. Bei der Verteilung der Werte zeigen sich keine groben Fehler oder ausreißende Werte. Vergleich Abbildung 24.

Abbildung 25 Boxplot - Darstellung des Einflusses einmaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 453 nm auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit Entzug von PMA nach 4 Stunden

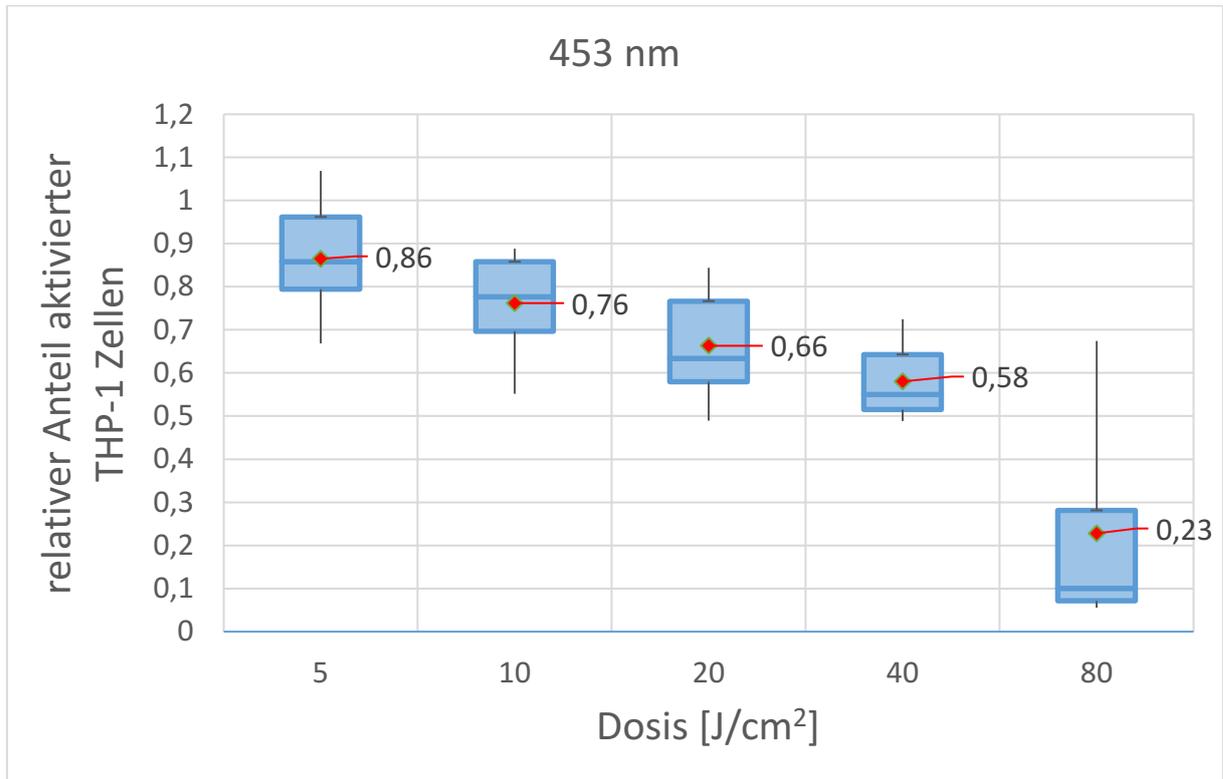


Abb. 25 - Es wird der Einfluss einmaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 453 nm und Dosen von 5 J/cm² - 80 J/cm² auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit Entzug von PMA nach 4 Stunden in einem Boxplot – Diagramm dargestellt. Die Box umfasst die mittleren 50 % der Daten, die durch das obere und das untere Quartil begrenzt werden. Sie stellt ein Maß für die Streuung der Daten dar. Die unterteilende Linie in der Box repräsentiert den Medianwert. Die Antennen umfassen die ausreißenden Werte. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. n=4.

Der Boxplot – Darstellung ist zu entnehmen, dass eine einmalige Blaulichtexposition einer Wellenlänge von 474 nm und PMA-Entzug nach 4 Stunden mit steigender Dosis eine signifikante Reduktion des relativen Anteils aktivierter THP-1 Zellen induziert. Bei einer Dosis von 80 J/cm² zeigt sich eine größere Streuung der Daten, sowie ausreißende Werte nach „oben“. Vergleich Abbildung 25.

Abbildung 26 Einfluss einmaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 474 nm auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit Entzug von PMA nach 4 Stunden mit grafischer Darstellung einer Regressionsanalyse

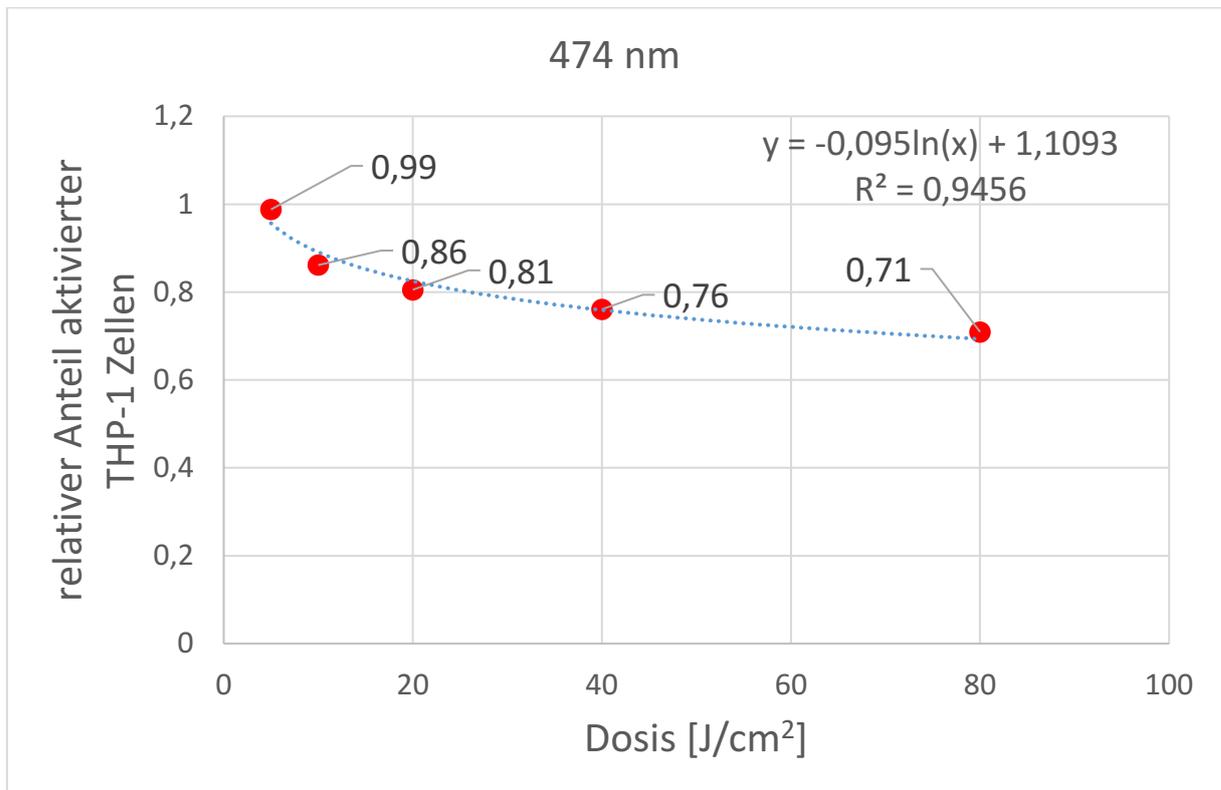


Abb. 26 - Einfluss dreimaliger Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm mit unterschiedlichen Dosen von 5 J/cm² - 80 J/cm² auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit PMA – Entzug nach 4 Stunden und mit grafischer Darstellung einer Regressionsanalyse mit der o.g. Formel $y = -0,095\ln(x) + 1,1093$ und dem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9456$. Anhand der Regressionsanalyse kann ein Zusammenhang zwischen Dosis und dem relativen Anteil aktivierter THP-1 Zellen approximiert werden. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. $n=5$.

Mithilfe der Regressionsanalyse kann ein Modell an die Daten angepasst werden, das den Zusammenhang zwischen Dosis und relativem Anteil aktivierter THP-1 Zellen bei Entzug des Stimulus PMA nach 4 Stunden sowie einmaliger Bestrahlung erklärt. Somit lässt sich ein allgemeiner Zusammenhang approximieren, anhand dessen man weitere Abschätzungen durchführen kann, wie beispielsweise den Einfluss einer Dosis von 30 J/cm² auf die relative Zellzahl. Als Gütemaß zeigt ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9456$ für 474 nm, dass der Zusammenhang durch dieses Regressionsmodell dargestellt werden kann.

Abbildung 27 Einfluss einmaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 453 nm auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit Entzug von PMA nach 4 Stunden mit grafischer Darstellung einer Regressionsanalyse

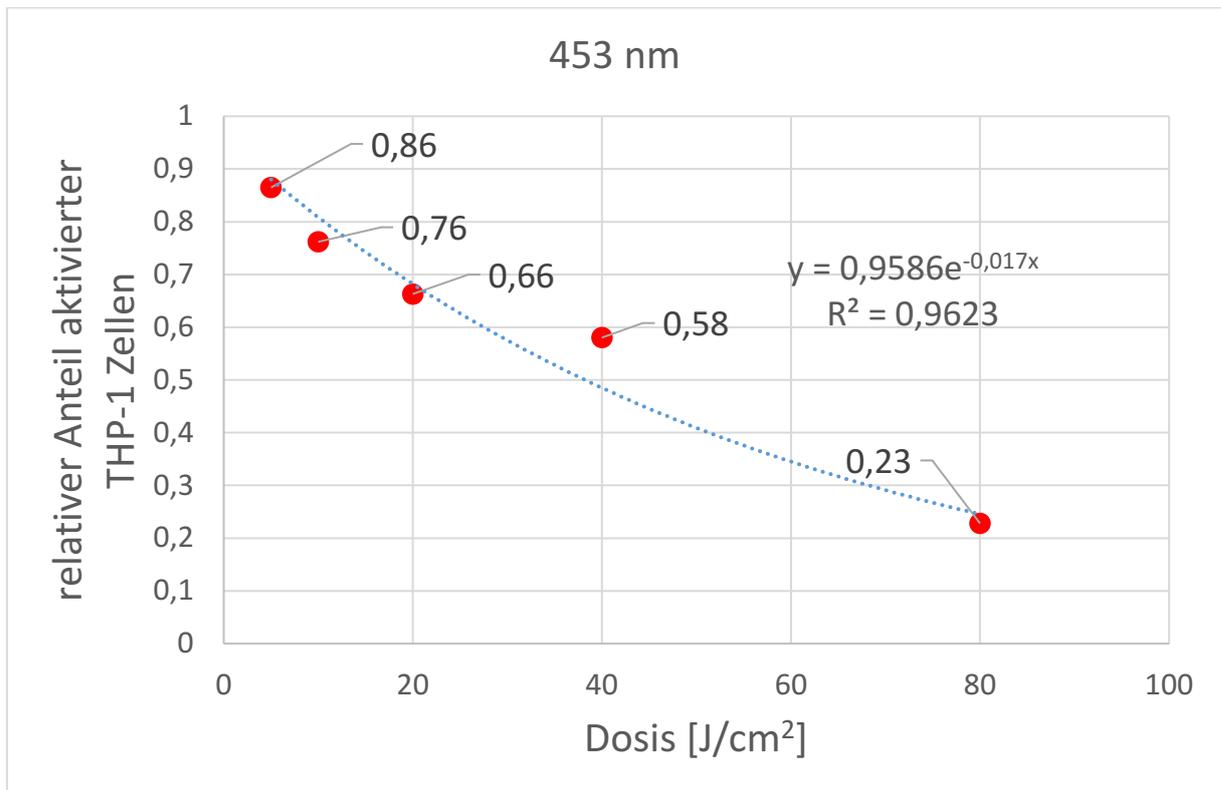


Abb. 27 - Einfluss dreimaliger Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm mit unterschiedlichen Dosen von 5 J/cm² - 80 J/cm² auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit PMA – Entzug nach 4 Stunden und mit grafischer Darstellung einer Regressionsanalyse mit der o.g. Formel $y = 0,9586e^{-0,017x}$ und dem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9623$. Anhand der Regressionsanalyse kann ein Zusammenhang zwischen Dosis und dem relativen Anteil aktivierter THP-1 Zellen approximiert werden. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. $n=4$.

Mithilfe der Regressionsanalyse kann ein Modell an die Daten angepasst werden, das den Zusammenhang zwischen Dosis und relativem Anteil aktivierter THP-1 Zellen bei Entzug des Stimulus PMA nach 4 Stunden sowie einmaliger Bestrahlung erklärt. Somit lässt sich ein allgemeiner Zusammenhang approximieren, anhand dessen man weitere Abschätzungen durchführen kann, wie beispielsweise den Einfluss einer Dosis von 30 J/cm² auf die relative Zellzahl. Als Gütemaß zeigt ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9623$ für 453 nm, dass der Zusammenhang durch dieses Regressionsmodell dargestellt werden kann.

Proliferationsverlauf von THP-1 Zellen unter Einfluss täglicher Bestrahlung

Die THP-1 Zellen wurden an Tag 0 in einer Zellzahl von 1×10^5 pro Well ausgesät. Es folgt die tägliche Bestrahlung mit Dosen von 5 J/cm^2 bis 80 J/cm^2 der Wellenlängen 474 nm und 453 nm . Jeweils 24 Stunden nach der Bestrahlung erfolgte die Messung der Stoffwechselaktivität der THP-1 Zellen mittels CellTiter-Blue® - Verfahren. Anschließend erfolgt die nächste Bestrahlung mit analogem Vorgehen. So ergab sich ein Proliferationsverlauf über einen Zeitraum von 5 Tagen mit insgesamt 5 Bestrahlungen.

Abbildung 28 Proliferationsverlauf unter dem Einfluss täglicher Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 474 nm

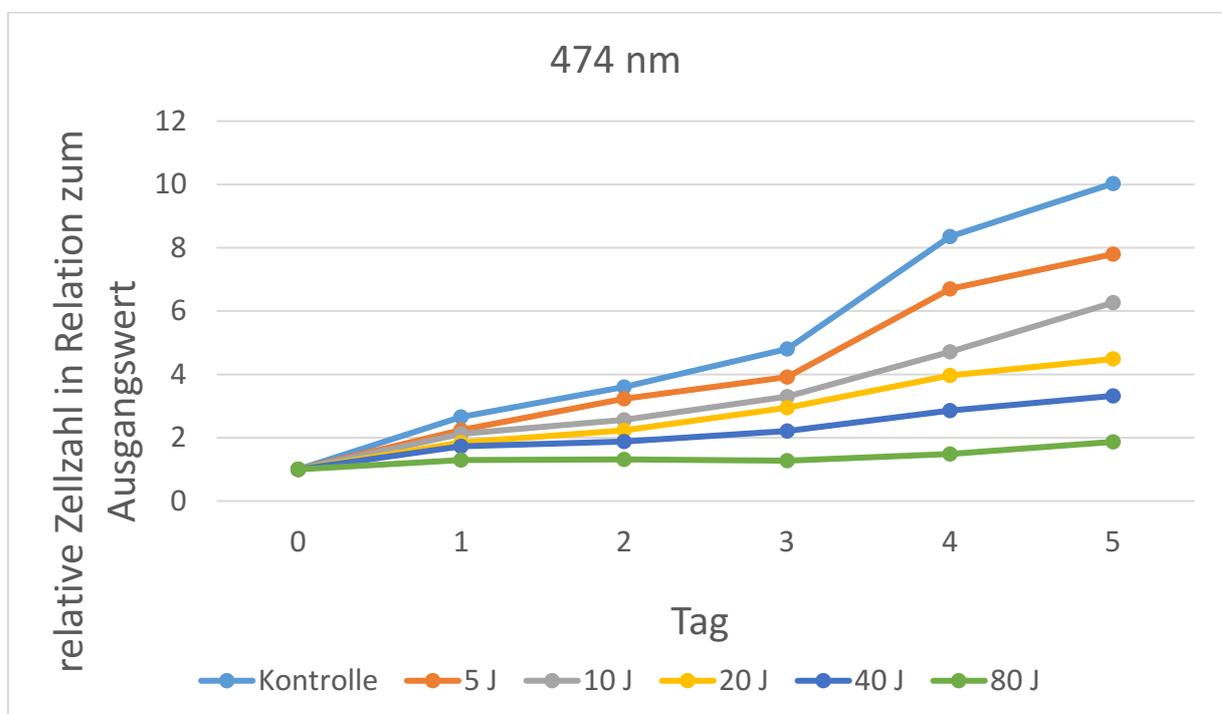


Abb. 28 - Proliferationsverlauf der THP-1 Zellen unter dem Einfluss täglicher Bestrahlung blauen Lichts einer Wellenlänge von 474 nm und Dosen von 5 J/cm^2 - 80 J/cm^2 über insgesamt 5 Tage. Der Wert an Tag 0 spiegelt die initial ausgesäte Zellzahl wieder die auf 1 normiert wurde. An Tag 0 erfolgt die erste Bestrahlung mit Messung der Stoffwechselaktivität mittels CellTiter-Blue® - Verfahren 24 Stunden später, was indirekt auf die Zellzahl schließen lässt. Anschließend erfolgte die nächste Bestrahlung. Die gemessenen Werte stehen in Relation zum Ausgangswert. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen $n=6$

Bei der Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 474 nm steigt die Zellzahl über den Verlauf der 5 Tage unabhängig von der Dosis kontinuierlich an, wobei blaues Licht eine Proliferationshemmung induziert. So kommt es dosisabhängig mit Erhöhung der Dosis zur verstärkten Inhibierung der Proliferation und Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Bei einer Dosis von 5 J/cm^2 wird nach 5 Tagen das 7,8fache der

Ausgangszellzahl erreicht. Bei dem Einsatz von 40 J/cm^2 das 3,32fache, bei 80 J/cm^2 das 1,87fache. Zu einer Stagnierung der Proliferation oder einer Zellzahlerniedrigung kommt es bei einer Bestrahlung mit hohen Dosen einer Wellenlänge von 474 nm auch nach der 5. Bestrahlung nicht. Die unbestrahlte Kontrolle erreichte das 10,03fache der Ausgangszellzahl.

Abbildung 29 Proliferationsverlauf unter dem Einfluss täglicher Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 474 nm

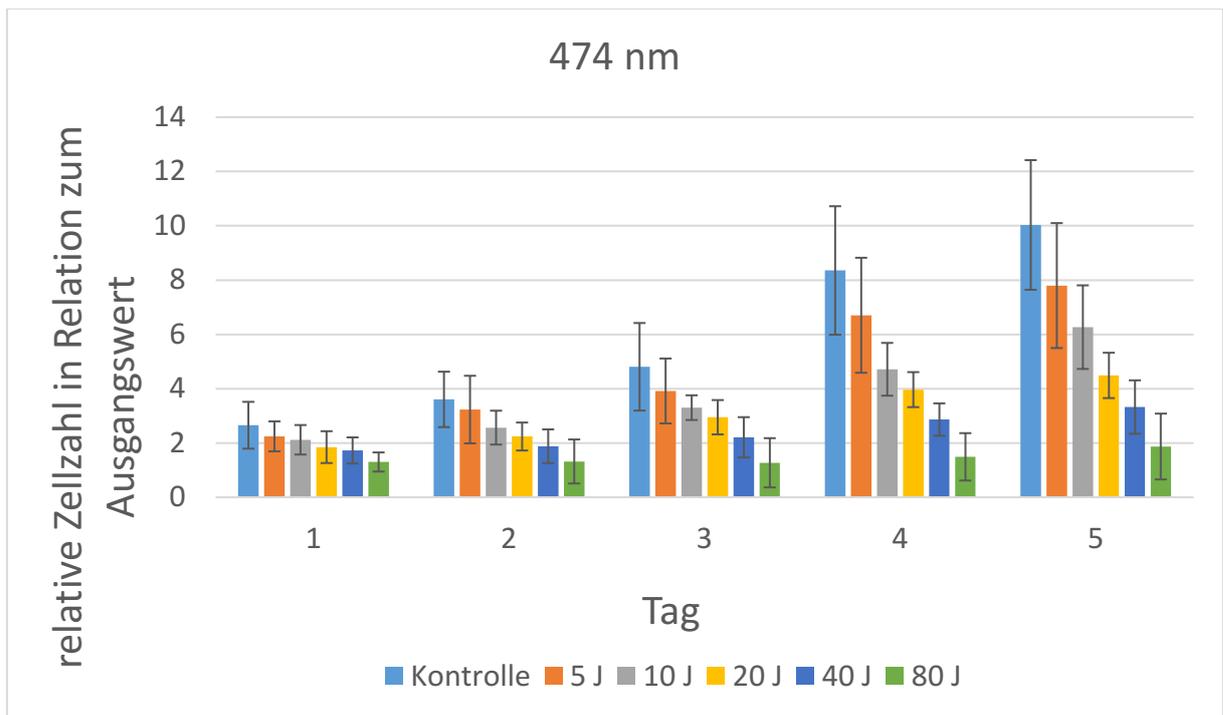


Abb. 29 - Darstellung des Proliferationsverlaufs der THP-1 Zellen unter dem Einfluss täglicher Bestrahlung blauen Lichts einer Wellenlänge von 474 nm und Dosen von 5 J/cm^2 - 80 J/cm^2 über insgesamt 5 Tage anhand eines Balkendiagramms und zusätzlicher Darstellung der Balkendiagramme. Der Wert an Tag 0 spiegelt die initial ausgesäte Zellzahl wieder die auf 1 normiert wurde. An Tag 0 erfolgt die erste Bestrahlung mit Messung der Stoffwechselaktivität mittels CellTiter-Blue® - Verfahren 24 Stunden später, was indirekt auf die Zellzahl schließen lässt. Anschließend erfolgte die nächste Bestrahlung. Die gemessenen Werte stehen in Relation zum Ausgangswert. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. $n=6$.

Das Balkendiagramm veranschaulicht die Inhibierung der Proliferation durch blaues Licht einer Wellenlänge von 474 nm mit steigender Dosis im Vergleich zur Kontrolle mit gleichzeitiger Darstellung der Standardabweichungen.

Abbildung 30 Proliferationsverlauf unter dem Einfluss täglicher Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 453 nm

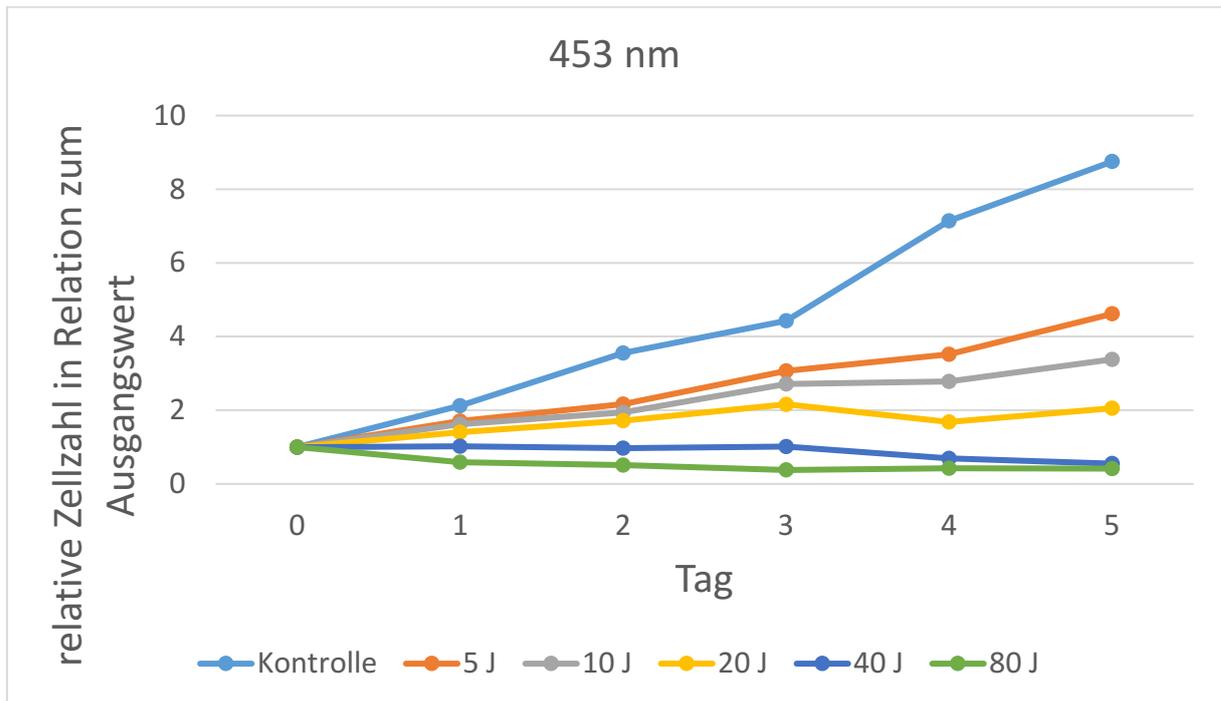


Abb. 30 - Proliferationsverlauf der THP-1 Zellen unter dem Einfluss täglicher Bestrahlung blauen Lichts einer Wellenlänge von 453 nm und Dosen von 5 J/cm² - 80 J/cm² über insgesamt 5 Tage. Der Wert an Tag 0 spiegelt die initial ausgesäte Zellzahl wieder die auf 1 normiert wurde. An Tag 0 erfolgt die erste Bestrahlung mit Messung der Stoffwechselaktivität mittels CellTiter-Blue® - Verfahren 24 Stunden später, was indirekt auf die Zellzahl schließen lässt. Anschließend erfolgte die nächste Bestrahlung. Die gemessenen Werte stehen in Relation zum Ausgangswert. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. n=4.

Blaues Licht einer Wellenlänge von 453 nm induziert ähnlich wie bei einer Wellenlänge von 474 nm eine dosisabhängige Inhibierung der Proliferation der THP-1 Zellen. Dieser Effekt der Proliferationshemmung ist ausgeprägter, vor allem bei dem Einsatz höherer Dosen von 40 J/cm² und 80 J/cm². Bei 80 J/cm² zeigt sich bereits nach der ersten Bestrahlung eine Erniedrigung der Zellzahl auf das 0,59fache. Im weiteren Verlauf stagniert die Proliferation und erreicht nach der 5. Bestrahlung das 0,42fache des Ausgangswertes. Auch bei dem Einsatz von 40 J/cm² stagniert die Proliferation, jedoch erst nach der 2. Bestrahlung. Im Verlauf reduziert sich die Zellzahl auf 0,55fache des Ausgangswertes. Höher energetisches Licht hemmt die Proliferation in einem größeren Ausmaß als Strahlung in einem Wellenlängenbereich von 474 nm. Hohe Dosen von 40 J/cm² und 80 J/cm² zeigen toxische Wirkung mit Erniedrigung der initial ausgesäten Zellzahl.

Abbildung 31 Proliferationsverlauf unter dem Einfluss täglicher Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 453 nm

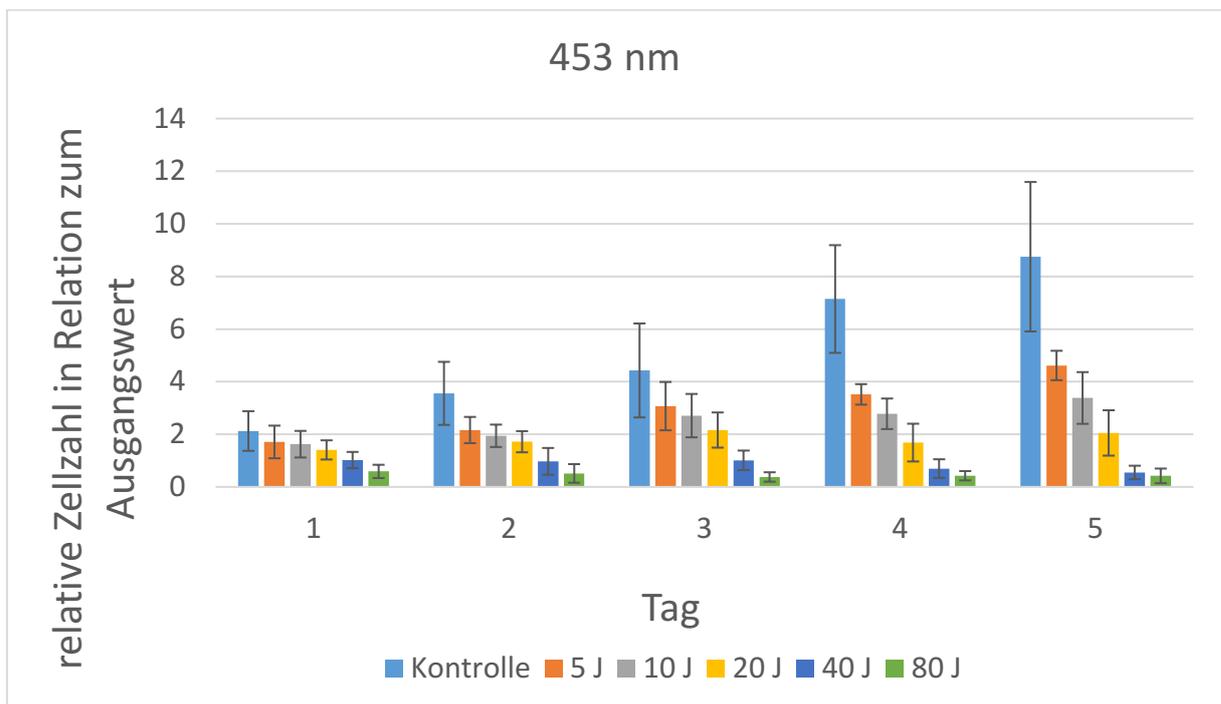


Abb. 31 - Darstellung des Proliferationsverlaufs der THP-1 Zellen unter dem Einfluss täglicher Bestrahlung blauen Lichts einer Wellenlänge von 453 nm und Dosen von 5 J/cm² - 80 J/cm² über insgesamt 5 Tage anhand eines Balkendiagramms und zusätzlicher Darstellung der Balkendiagramme. Der Wert an Tag 0 spiegelt die initial ausgesäte Zellzahl wieder die auf 1 normiert wurde. An Tag 0 erfolgt die erste Bestrahlung mit Messung der Stoffwechselaktivität mittels CellTiter-Blue® - Verfahren 24 Stunden später, was indirekt auf die Zellzahl schließen lässt. Anschließend erfolgte die nächste Bestrahlung. Die gemessenen Werte stehen in Relation zum Ausgangswert. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. n=4.

Das Balkendiagramm veranschaulicht die Inhibierung der Proliferation durch blaues Licht einer Wellenlänge von 453 nm mit steigender Dosis im Vergleich zur Kontrolle mit gleichzeitiger Darstellung der Standardabweichungen.

Die nachfolgende Grafik soll den unterschiedlichen Effekt elektromagnetischer Strahlung beider Wellenlängen von 474 nm und 453 nm auf die Proliferation im direkten Vergleich weiter verdeutlichen, indem die relativen Zellzahlen nach der fünften Bestrahlung direkt miteinander verglichen werden.

Abbildung 32 Isolierter Darstellung der relativen Zellzahl nach der 5. Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 474 nm und 453 nm

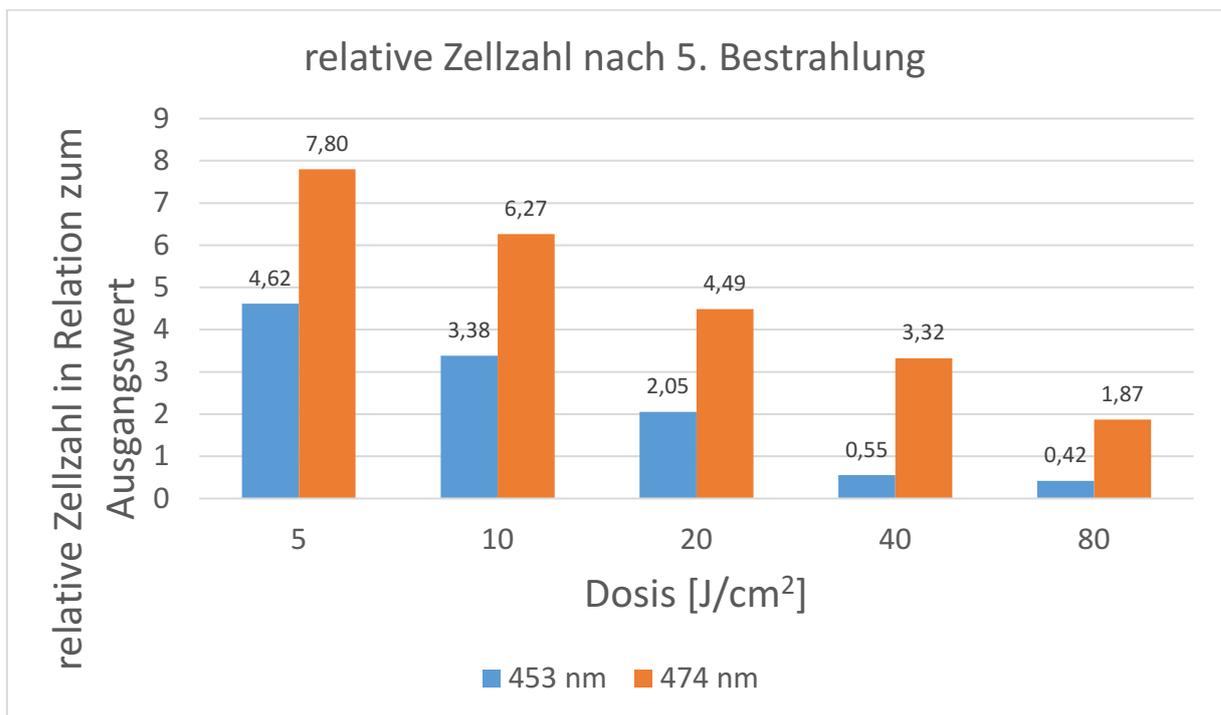


Abb. 32 – In Anlehnung an Abbildung 29 und Abbildung 31 erfolgt die isolierte Darstellung der relativen Zellzahl in Bezug auf die initial ausgesäte Zellzahl nach der 5. Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 474 nm und 453 nm. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen.

Der Abbildung 32 verdeutlicht, dass höher energetisches Licht einer Wellenlänge von 453 nm eine stärkere Inhibierung auf den Proliferationsverlauf induziert als blaues Licht einer Wellenlänge von 474 nm. Bei Blaulichtexposition einer Wellenlänge von 453 nm mit Dosen von 40 J/cm² und 80 J/cm² kommt es zu einer Erniedrigung der Zellzahl im Vergleich zur initial ausgesäten Zellzahl. Bei einer Wellenlänge von 474 nm ist dieser Effekt nicht zu beobachten.

Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie wurde die Apoptoserate ruhender THP-1 Zellen nach mehrmaliger Bestrahlung ermittelt. So ließ sich indirekt auf die Zytotoxizität des blauen Lichts unterschiedlicher Wellenlänge schließen. Mit der Durchflusszytometrie konnte der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen am Gesamtzellanteil evaluiert werden.

Hier wurden 1×10^6 ruhende THP-1 Zellen pro Well in 6-Well Platten mit 2 ml Medium zur Bestrahlung ausgesät und zweimalig über einen Zeitraum von 48 Stunden bestrahlt. Es wurde erneut blaues Licht einer Wellenlänge von 474 nm und 453 nm mit jeweiligen Dosen von 5 J/cm^2 , 10 J/cm^2 , 20 J/cm^2 , 40 J/cm^2 und 80 J/cm^2 bestrahlt. 24 Stunden nach der 1. Bestrahlung wurde die Apoptoserate nach einmaliger Bestrahlung ermittelt. Es erfolgt daraufhin eine erneute Bestrahlung. Eine Messung der Apoptoserate nach erneuten 24 Stunden nach der 2. Bestrahlung folgte im Anschluss.

Für die Durchflusszytometrie wurde die zu messende Zellsuspension aus den 6-Well Platten in 5 ml Rundbodenröhrchen überführt und anschließend für 5 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellpellets mit $300 \mu\text{l}$ DNA-Färbelösung versetzt, mit dem Vortex-Mischer sorgfältig vermischt und für eine Stunde zur Inkubation in den Brutschrank positioniert.

Nach einer Stunde erfolgt die Quantifizierung der apoptotischen Zellen mit Hilfe des FACS-Gerätes.

Abbildung 33 Ergebnisse der Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Apoptoserate von THP-1 Zellen nach Blaulichtexposition mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm

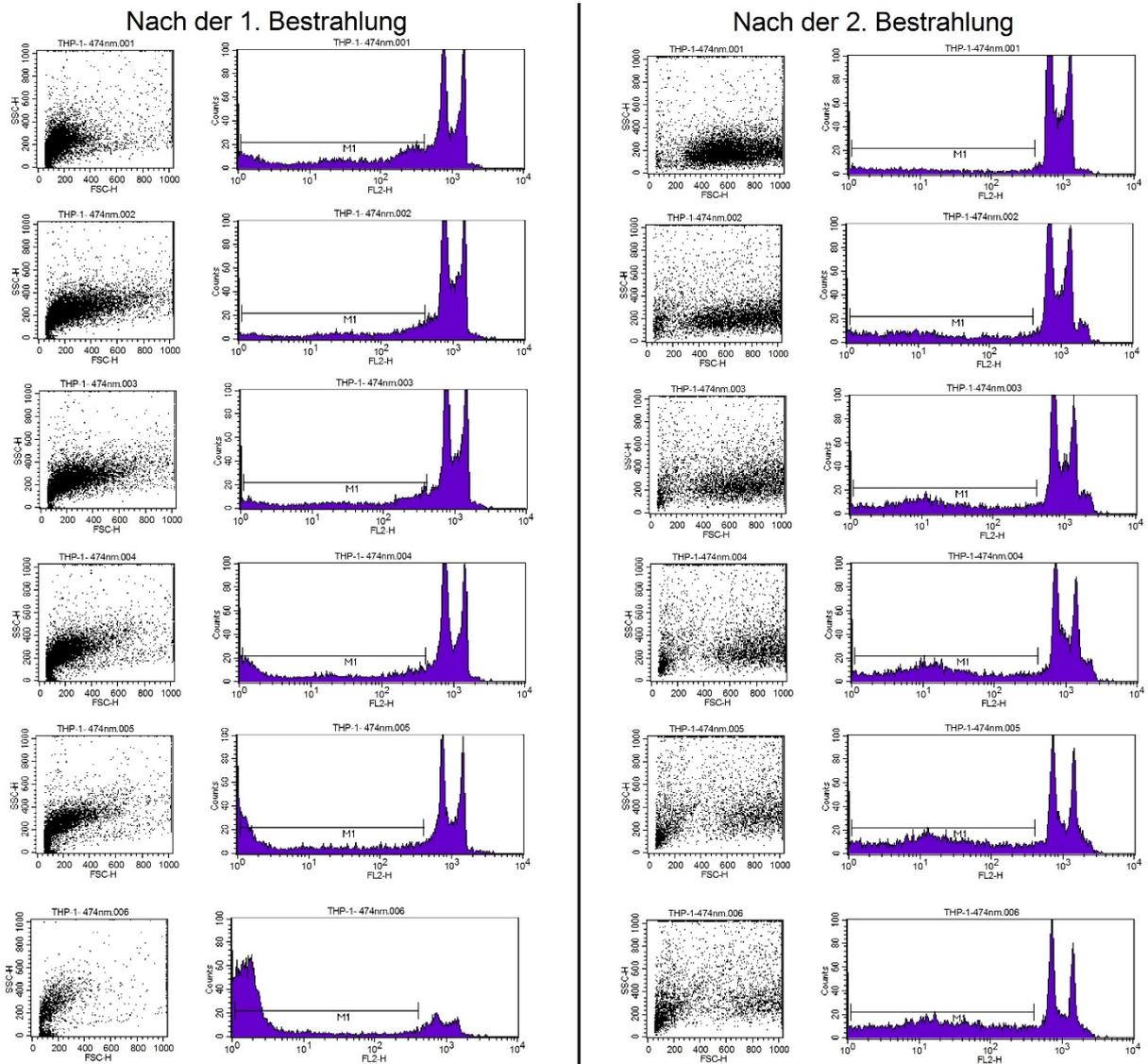


Abb. 33 - Ergebnisse der Durchflusszytometrie bei Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm und Dosen von 5 J/cm² - 80 J/cm² nach der 1. und 2. Bestrahlung, wobei die Messungen 24 Stunden nach der jeweiligen Bestrahlung erfolgten. Der mit „M1“ gekennzeichnete Bereich umfasst die sich in der Apoptose befindlichen haploiden Zellen. Die beiden Peaks rechtsseitig repräsentieren die normalen diploiden Zellen. Es ist zu erkennen, dass sich die beiden Peaks mit steigender Dosis verringern und in den „M1“ Bereich wandern. Dosisabhängig steigt die Apoptoserate der ruhenden THP-1 Zellen.

Abbildung 33 zeigt die grafischen Ergebnisse der Durchflusszytometrie bei Bestrahlung von THP-1 Zellen mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm und Dosen von 5 J/cm² - 80 J/cm² nach der 1. und 2. Bestrahlung. Genauere Details sind der Erklärung der Grafik zu entnehmen.

Abbildung 34 Ergebnisse der Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Apoptoserate von THP-1 Zellen nach Blaulichtexposition mit blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm

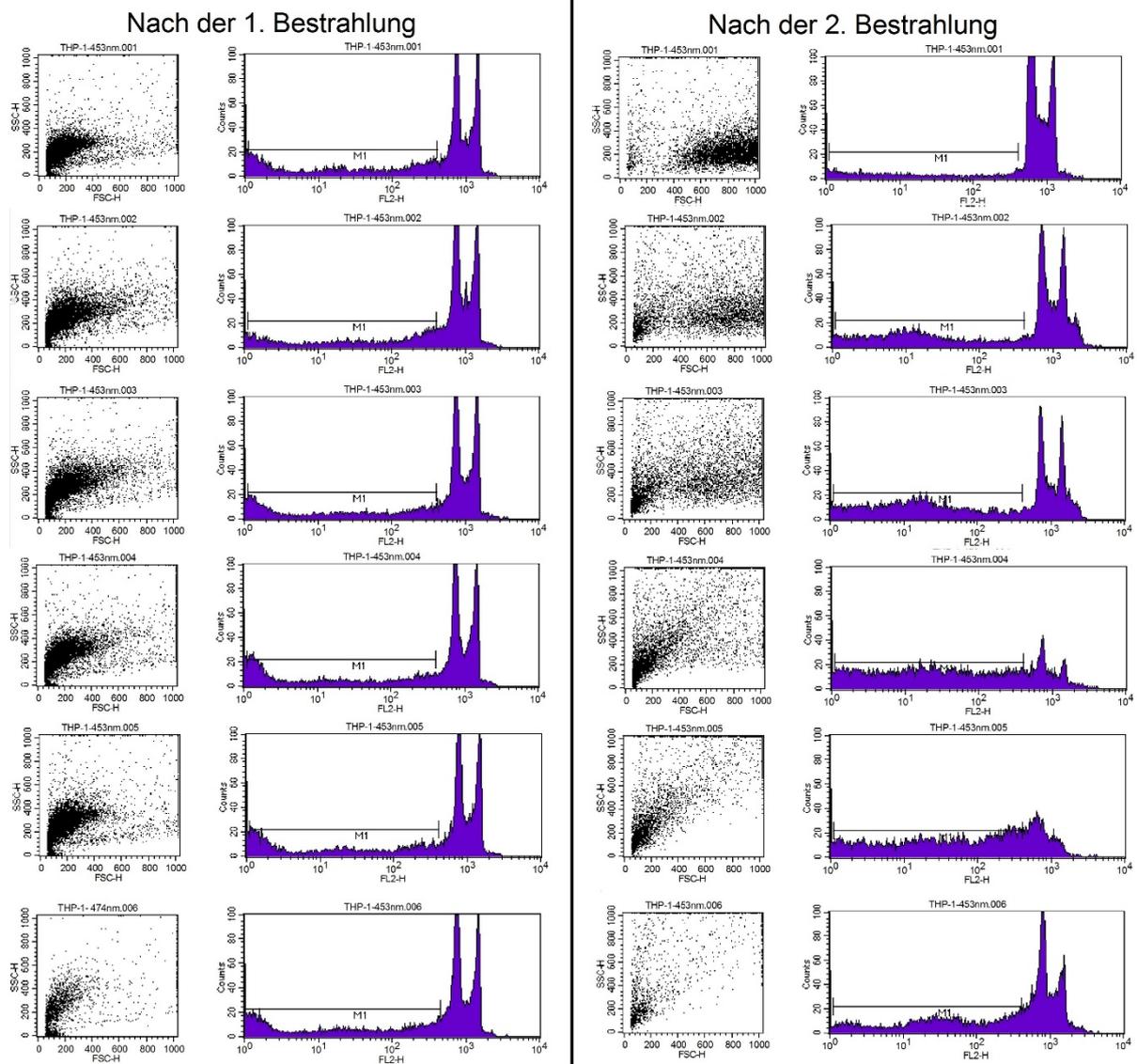


Abb. 34 - Ergebnisse der Durchflusszytometrie bei Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm und Dosen von 5 J/cm² - 80 J/cm² nach der 1. und 2. Bestrahlung, wobei die Messungen 24 Stunden nach der jeweiligen Bestrahlung erfolgten. Der mit „M1“ gekennzeichnete Bereich umfasst die sich in der Apoptose befindlichen haploiden Zellen. Die beiden Peaks rechtsseitig repräsentieren die normalen diploiden Zellen. Es ist zu erkennen, dass sich die beiden Peaks mit steigender Dosis verringern und in den „M1“ Bereich wandern. Dosisabhängig steigt die Apoptoserate der ruhenden THP-1 Zellen.

Abbildung 34 zeigt die grafischen Ergebnisse der Durchflusszytometrie bei Bestrahlung von THP-1 Zellen mit blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm und Dosen von 5 J/cm² - 80 J/cm² nach der 1. und 2. Bestrahlung. Genauere Details sind der Erklärung der Grafik zu entnehmen.

Abbildung 35 Apoptoserate in % nicht aktivierter THP-1 Zellen nach einmaliger Bestrahlung

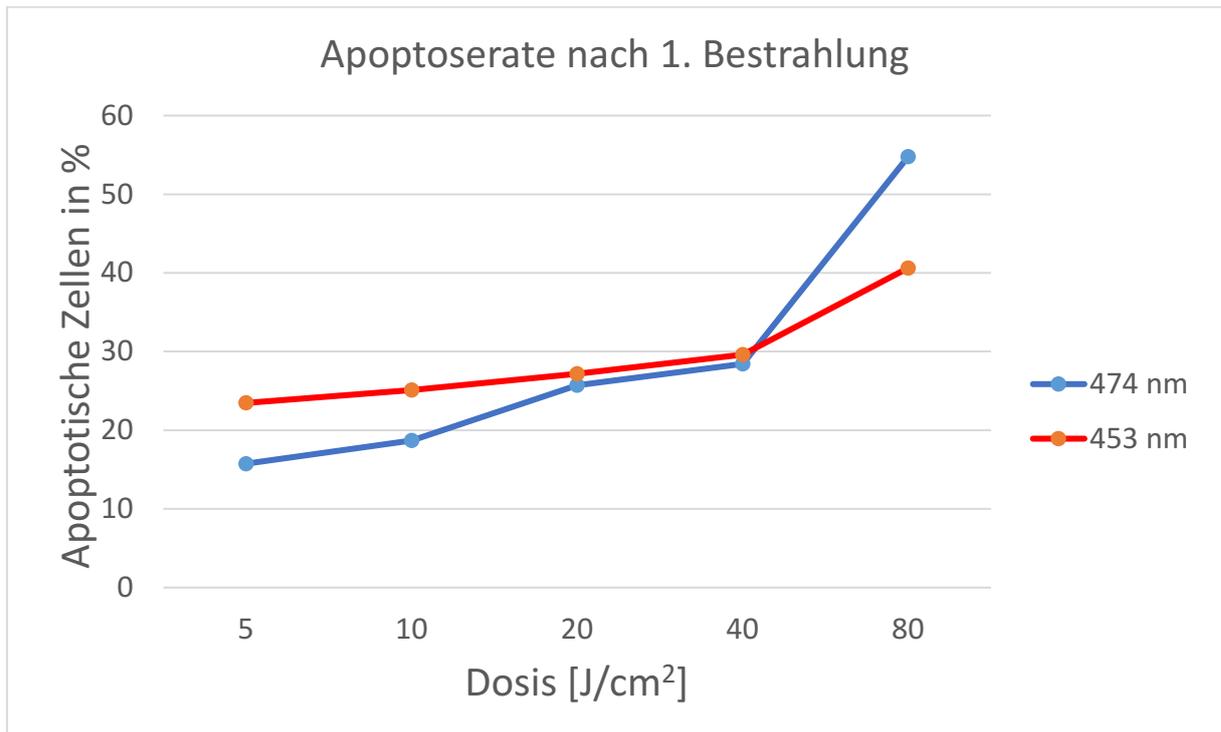


Abb. 35 – Darstellung der Apoptoserate in % nicht aktivierter THP-1 Zellen 24 Stunden nach einmaliger Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm und 453 nm und Dosen von 5 J/cm² - 80 J/cm². Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. n = 1.

Bei ruhenden THP-1 Zellen induziert blaues nach einmaliger Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm und einer Dosis von 5 J/cm² die Apoptose der Zellen mit einer Apoptoserate von 15,75 %. Höher energetisches Licht einer Wellenlänge von 453 nm und einer Dosis von 5 J/cm² weist eine höhere Apoptoserate von 23,69 % auf. Apoptoserate steigt dosisabhängig. Bei einer Dosis von 80 J/cm² ergibt sich jedoch bei einer Wellenlänge von 474 nm eine höherer Apoptoserate von 50,72 %, als bei einer Wellenlänge von 453 nm mit 40,63 %. Vergleich Abbildung 35.

Abbildung 36 Apoptoserate in % nicht aktivierter THP-1 Zellen nach der 2. Bestrahlung

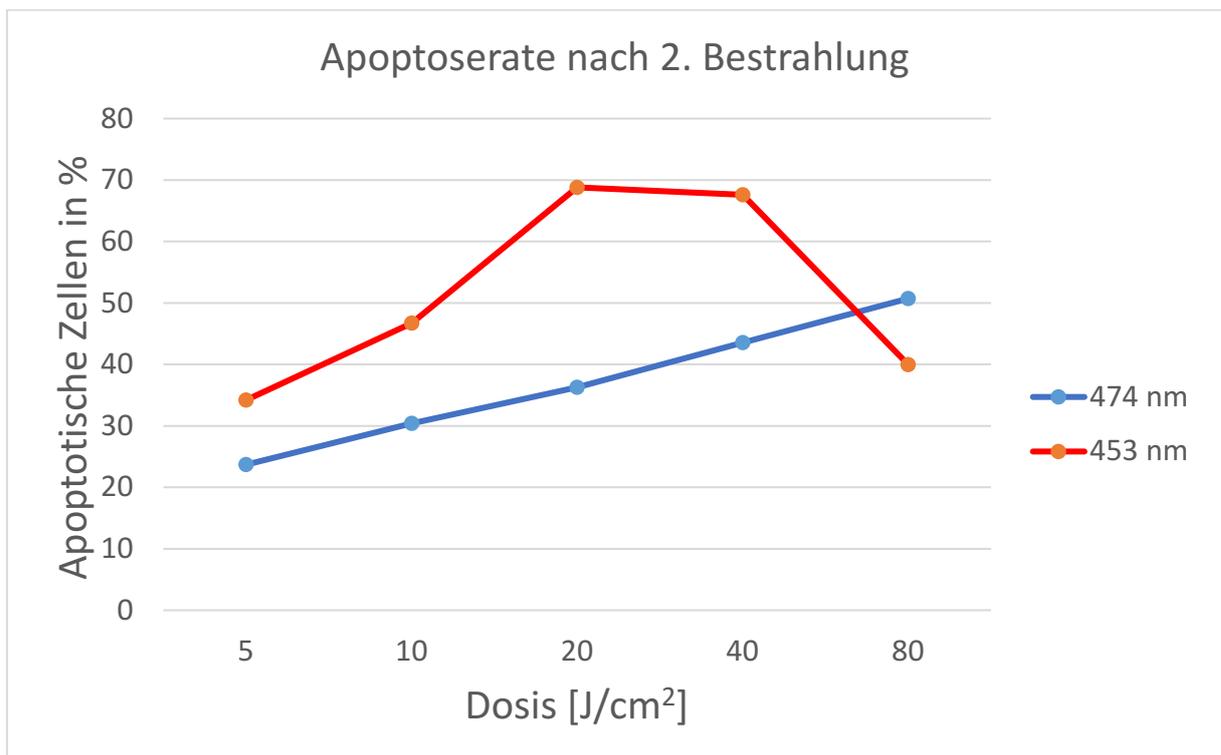


Abb. 36 - Darstellung der Apoptoserate in % nicht aktivierter THP-1 Zellen 24 Stunden nach der 2. Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm und 453 nm und Dosen von 5 J/cm² - 80 J/cm². Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. n = 1.

Nach der zweiten Bestrahlung zeigt sich bei einer Wellenlänge von 474 nm ein nahezu linearer Anstieg der Apoptoserate in Bezug auf die Dosis. So zeigt sich bei einer Dosis von 5 J/cm² eine Apoptoserate von 23,69 % die sich mit steigender Dosis auf 50,72 % für 80 J/cm² erhöht.

Im Wellenlängenbereich von 453 nm sind dosisabhängig höhere Apoptoseraten im Vergleich zu 474 nm zu verzeichnen. So zeigt sich bei einer Dosis von 5 J/cm² bereits eine Apoptoserate von 34,2 %. Bei einer Dosis von 20 J/cm² beträgt die Apoptoserate 68,81 %. Nach einem Plateau-artigen Verlauf sinkt die Apoptoserate daraufhin ab einer Dosis von 40 J/cm² mit 67,61 % auf 39,94 % bei einer Dosis von 80 J/cm². Vergleich Abbildung 36.

Hoechst- und Propidiumiodid - Färbung

Abbildung 37 Fluoreszenzfärbung der THP-1 Zellen mit Hoechst und Propidiumiodid

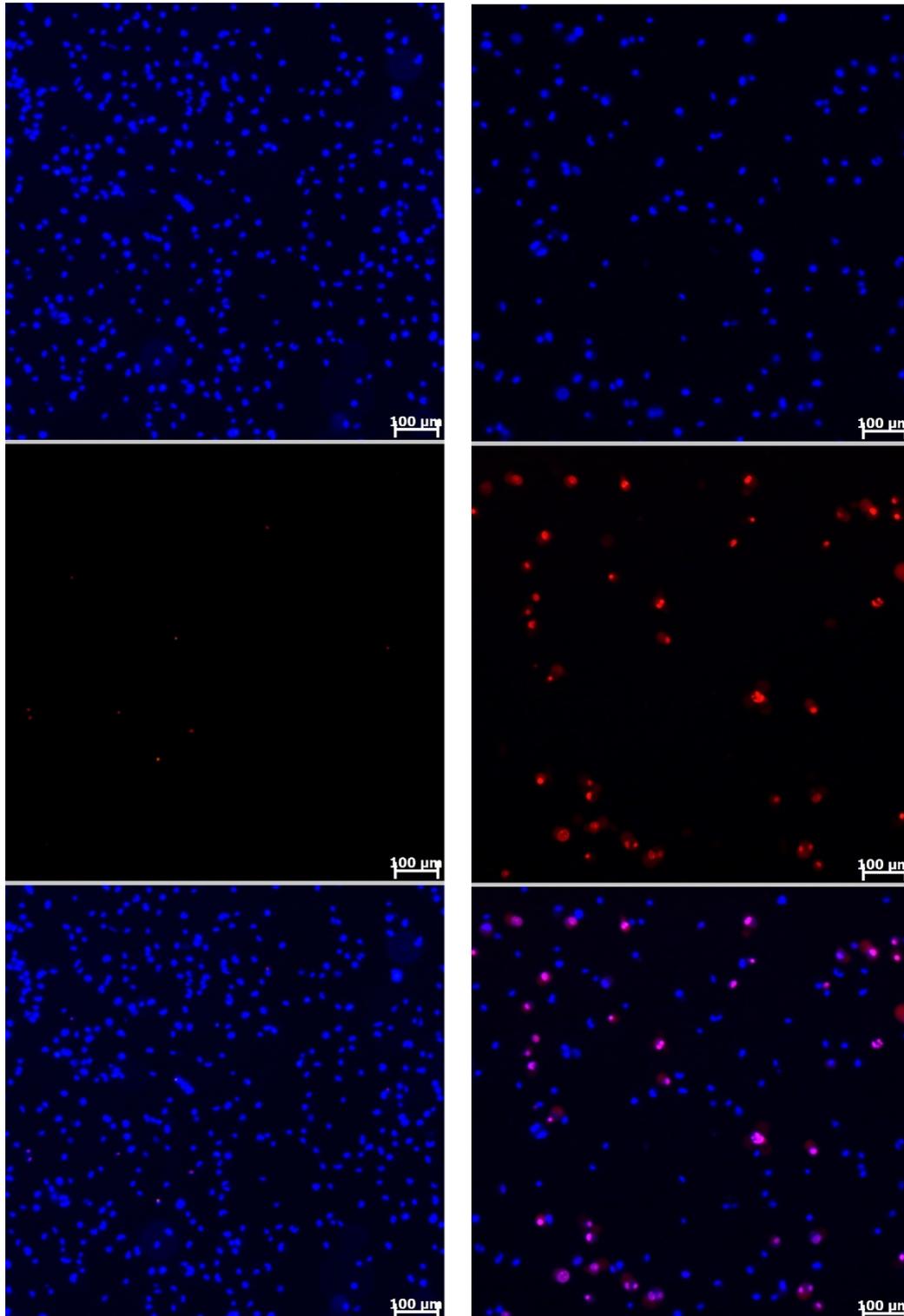


Abb. 37 - Fluoreszenzfärbung der THP-1 Zellen mit Propidiumiodid und Hoechst 33342. In der linken Spalte werden unbestrahlte THP-1 Zellen dargestellt (Kontrolle). Das oberste Bild repräsentiert mit Hoechst 33342 angefärbte THP-1 Zellen, darunter werden isoliert die apoptotischen Zellen visualisiert durch Propidiumiodid dargestellt. Im untersten Bild werden die beiden Aufnahmen übereinandergelegt dargestellt. Rechts Darstellung von THP-1 Zellen nach einmaliger Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm mit 40 J/cm². Maßstab 1:100.

Abbildung 37 visualisiert anhand der Propidiumiodid - und Hoechst - Färbung die zytotoxische Wirkung blauen Lichts einer Wellenlänge von 474 nm auf die THP-1 Zellen. Diese Abbildungen zeigen zusammen mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie die toxische Wirkung des blauen Licht auf THP-1 Zellen.

Zytokin - Versuch

Bei diesem Versuch wurde zwischen Versuchsreihe A und B unterschieden. Bei Versuchsreihe A wurden THP-1 Zellen mit einer Zellzahl von 1×10^6 pro Well in 6-Well Platten mit Wachstumsmedium ohne Phenolrot ausgesät. Anschließend erfolgt die Stimulation mit den Zytokinen IL-1 β (500 U/ml), IL-6 (500 U/ml), IL-8 (500 U/ml) und TNF α (500 U/ml). Den Kontrollen 1 und 2 wurden keine Zytokine zugesetzt. Vergleich Abbildung 38. An die Zugabe der Zytokine schloss sich die Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlängen 474 nm und 453 nm mit unterschiedlichen Bestrahlungsdosen von 5 J/cm^2 – 80 J/cm^2 an. 48 Stunden nach der Bestrahlung wurden die Überstände jedes einzelnen Wells auf die Zytokinkonzentrationen von IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF α mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) untersucht. Zusätzlich wurde die Proteinkonzentration jedes einzelnen Wells ermittelt, sodass die gemessenen Zytokinkonzentrationen in Relation zur Proteinkonzentration gesetzt werden konnte. Die Proteinkonzentration repräsentiert indirekt die Anzahl der THP-1 Zellen.

Bei der Versuchsreihe B wurden die ausgesäten THP-1 Zellen in einem vorangehenden Schritt mit PMA aktiviert. Es erfolgt analog zu Versuchsreihe A die Zugabe der Zytokine und Bestrahlung mit anschließender Bestimmung der Zytokinkonzentrationen. Vergleich Abbildung 38.

Es sollen die einzelnen Zytokinkonzentrationen aktivierter und nicht-aktivierter THP-1 Zellen unter dem Einfluss von blauem Licht unterschiedlicher Wellenlänge und Dosis, sowie unter dem Einfluss stimulierender Zytokine untersucht werden.

Abbildung 38 Versuchsaufbau des Zytokin - Versuchs

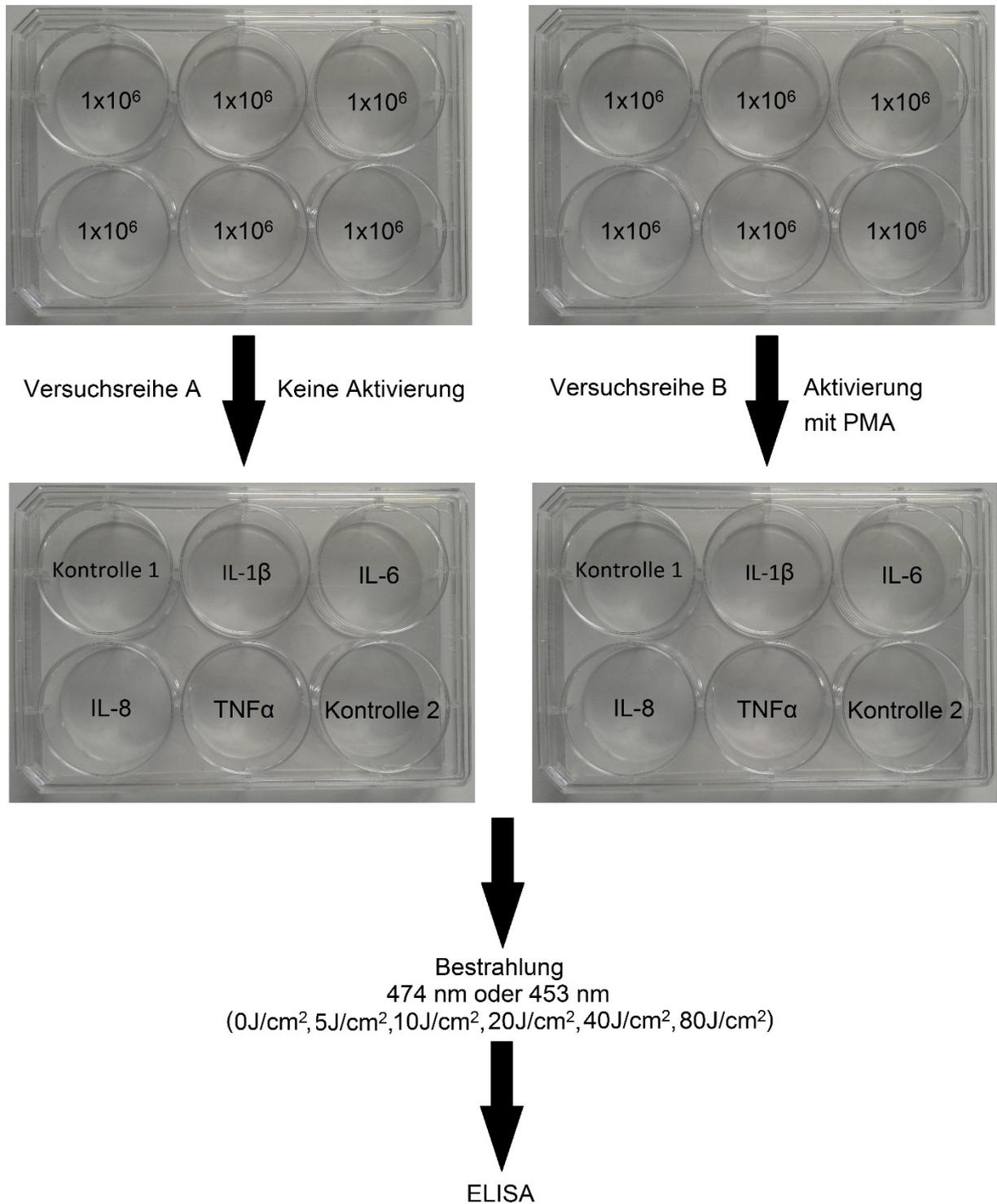


Abb. 38 – Hier wird schematisch der Aufbau des Zytokin-Versuchs beschrieben. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen

In diesen Versuchsreihen zur Messung der Zytokine zeigten sich häufig geringe Konzentrationen, die mit den hier verwendeten ELISA-Kits teilweise nicht zu detektieren waren. Dementsprechend ließ sich bei zu geringen Konzentrationen was

eine grafische Darstellung nicht möglich machte. Es werden die gemessenen Zytokinkonzentrationen grafisch dargestellt.

Interleukin-1 β

In der Versuchsreihe A fallen die IL-1 β Konzentrationen aus den Zellüberständen bei nicht-aktivierten THP-1 Zellen bei beiden Wellenlängen und allen Bestrahlungsdosen so gering aus, sodass keine Aussagen über ein IL-1 β Zytokinmuster zu treffen sind.

Verglichen dazu, fallen die in der Versuchsreihe B gemessenen IL-1 β Konzentrationen aus den Zellüberständen vorher aktivierter THP-1 Zellen deutlich aus. Vergleich Abbildung 39.

Abbildung 39 IL-1 β Produktion aktivierter und mit Zytokinen stimulierter THP-1 Zellen nach Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm

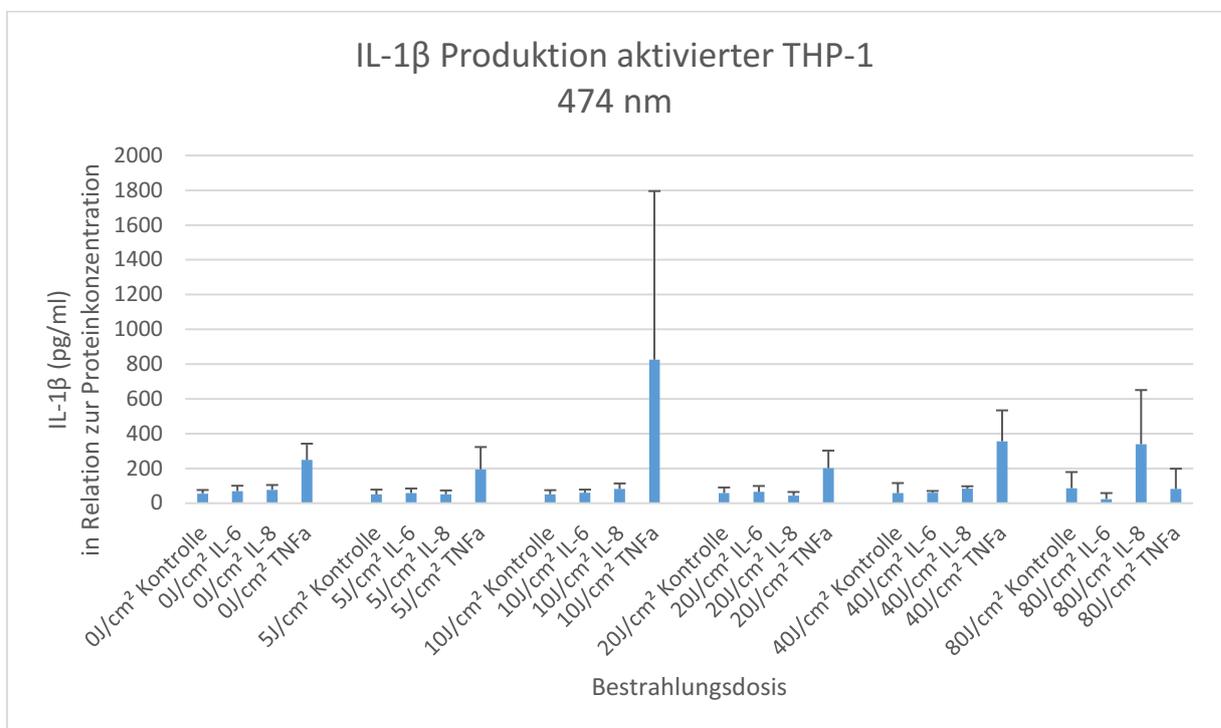


Abb. 39 - IL-1 β Produktion aktivierter und mit IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF α stimulierter THP-1 Zellen nach Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm und Dosen von 5 J/cm 2 – 80 J/cm 2 . Die y-Achse zeigt die IL-1 β in pg/ml in Relation zur Proteinkonzentration, welche indirekt Aufschluss über die Anzahl der THP-1 Zellen gibt. Auf der x-Achse repräsentiert die Fraktion „0 J/cm 2 “ die unbestrahlten Kontrollen. Die Bezeichnung „Kontrolle, IL-6, IL-8 und TNF α “ hinter „0 J/cm 2 “ zeigen, mit welcher Zytokin die THP-1 Zellen stimuliert wurden. Vergleich Abbildung 38. Dann folgt die Darstellung der IL-1 β Konzentrationen der einzelnen Wells unter Einfluss einer Bestrahlung mit 5 J/cm 2 – 80 J/cm 2 . Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. n=3.

Es zeigt sich kein eindeutiger Einfluss des blauen Lichts einer Wellenlänge von 474 nm auf die IL-1 β Konzentration. Auch die Dosis hat keinen signifikanten Einfluss auf die Zytokinproduktion. Unter dem Stimulus TNF α lassen sich bei aktivierten THP-1

Zellen höhere IL-1 β Konzentrationen messen, als unter dem Einfluss der anderen Zytokine, bei deutlich ausreißenden Werten bei einer Bestrahlungsdosis von 10 J/cm².

Abbildung 40 IL-1 β Produktion aktivierter und mit Zytokinen stimulierter THP-1 Zellen nach Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm

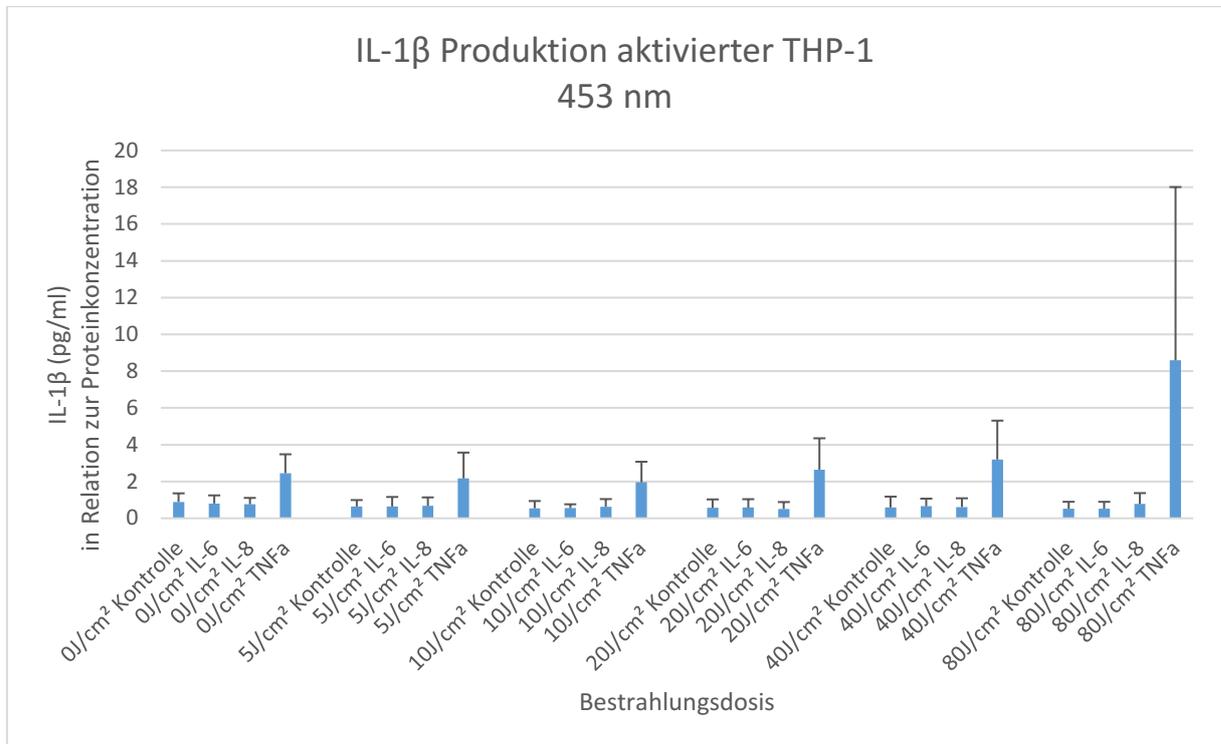


Abb. 40 - IL-1 β Produktion aktivierter und mit IL-6, IL-8 und TNF α stimulierter THP-1 Zellen nach Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm und Dosen von 5 J/cm² – 80 J/cm². Die y-Achse zeigt die IL-1 β in pg/ml in Relation zur Proteinkonzentration, welche indirekt Aufschluss über die Anzahl der THP-1 Zellen gibt. Auf der x-Achse repräsentiert die Fraktion „0 J/cm²“ die unbestrahlten Kontrollen. Die Bezeichnung „Kontrolle, IL-6, IL-8 und TNF α “ hinter „0 J/cm²“ zeigen, mit welchen Zytokine die THP-1 Zellen stimuliert wurden. Vergleich Abbildung 38. Dann folgt die Darstellung der IL-1 β Konzentrationen der einzelnen Wells unter Einfluss einer Bestrahlung mit 5 J/cm² – 80 J/cm². Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. n=3.

Für die Kontrolle sowie die mit IL-6 und IL-8 stimulierten THP-1 Zellen zeigt sich kein eindeutiger Einfluss des blauen Lichts einer Wellenlänge von 474 nm auf die IL-1 β Konzentration. Analog zur Exposition gegenüber blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm fallen auch bei einer Wellenlänge von 453 nm unter dem Einfluss von TNF α höhere IL-1 β Konzentrationen an. Optisch lässt sich hier mit steigender Bestrahlungsdosis ein Anstieg der IL-1 β Konzentration beobachten. Die gemessenen IL-1 β Konzentrationen von 0-20 pg/ml fallen im Vergleich zur Exposition gegenüber blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm deutlich geringer aus. Vergleich Abbildung 39.

Interleukin - 6

Sowohl in der Versuchsreihe A, als auch in der Versuchsreihe B fallen die gemessenen IL-6 Konzentrationen aus den Zellüberständen der THP-1 Zellen bei Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 474 nm und 453 nm so gering aus, dass diese nicht zu detektieren waren. Auf eine grafische Darstellung verzichtet wurde.

Interleukin - 8

In der Versuchsreihe A fallen die IL-8 Konzentrationen aus den Zellüberständen nicht-aktivierter THP-1 Zellen bei Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 474 nm so gering aus, dass auf eine grafische Darstellung verzichtet wurde.

Abbildung 41 IL-8 Produktion nicht-aktivierter und mit Zytokinen stimulierter THP-1 Zellen nach Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm

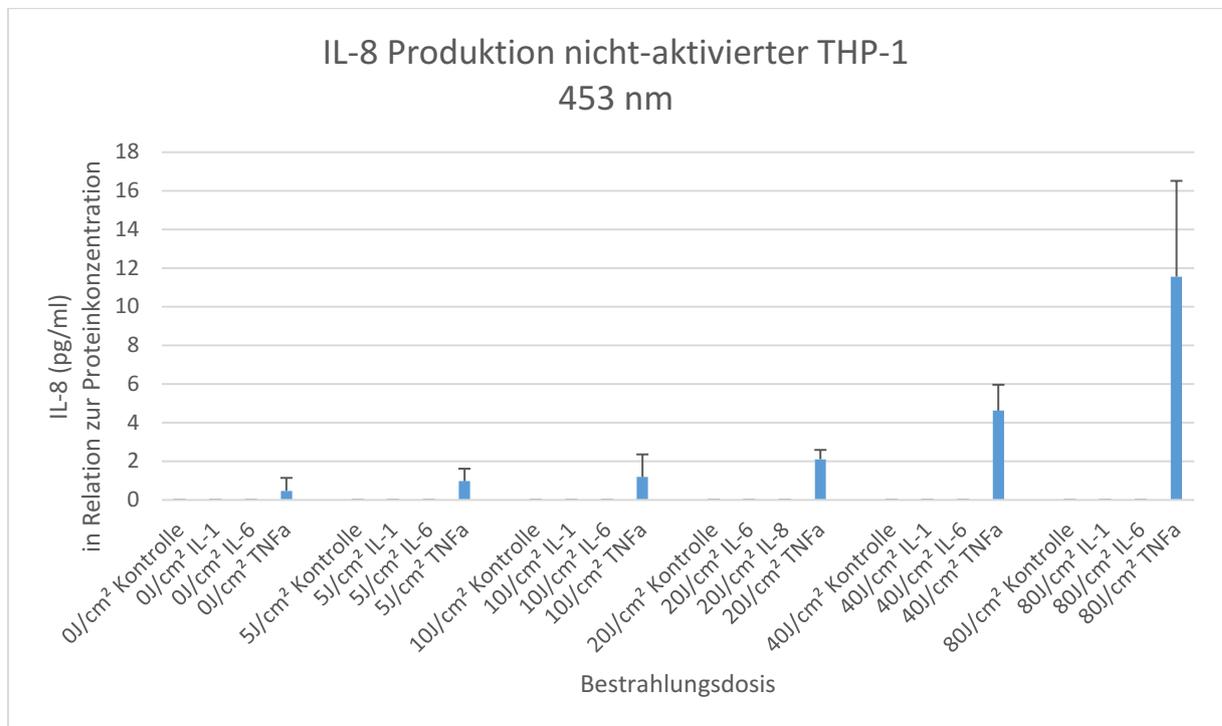


Abb. 41 - IL-8 Produktion nicht-aktivierter und mit IL-1 β , IL-6 und TNF α stimulierter THP-1 Zellen nach Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm und Dosen von 5 J/cm²– 80 J/cm². Die y-Achse zeigt die IL-1 β in pg/ml in Relation zur Proteinkonzentration, welche indirekt Aufschluss über die Anzahl der THP-1 Zellen gibt. Auf der x-Achse repräsentiert die Fraktion „0 J/cm²“ die unbestrahlten Kontrollen. Die Bezeichnung „Kontrolle, IL-1 β , IL-6 und TNF α “ hinter „0 J/cm²“ zeigen, mit welchen Zytokin die THP-1 Zellen stimuliert wurden. Vergleich Abbildung 38. Dann folgt die Darstellung der IL-8 Konzentrationen der einzelnen Wells unter Einfluss einer Bestrahlung mit 5 J/cm²– 80 J/cm². Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. n=3.

Bei dem Einsatz von 453 nm ist in der Versuchsreihe A unter dem Einfluss des Stimulus TNF α optisch ein Anstieg der gemessenen IL-8 Konzentration mit steigender Dosis festzustellen. Vergleich Abbildung 41.

Abbildung 42 IL-8 Produktion aktivierter und mit Zytokinen stimulierter THP-1 Zellen nach Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm

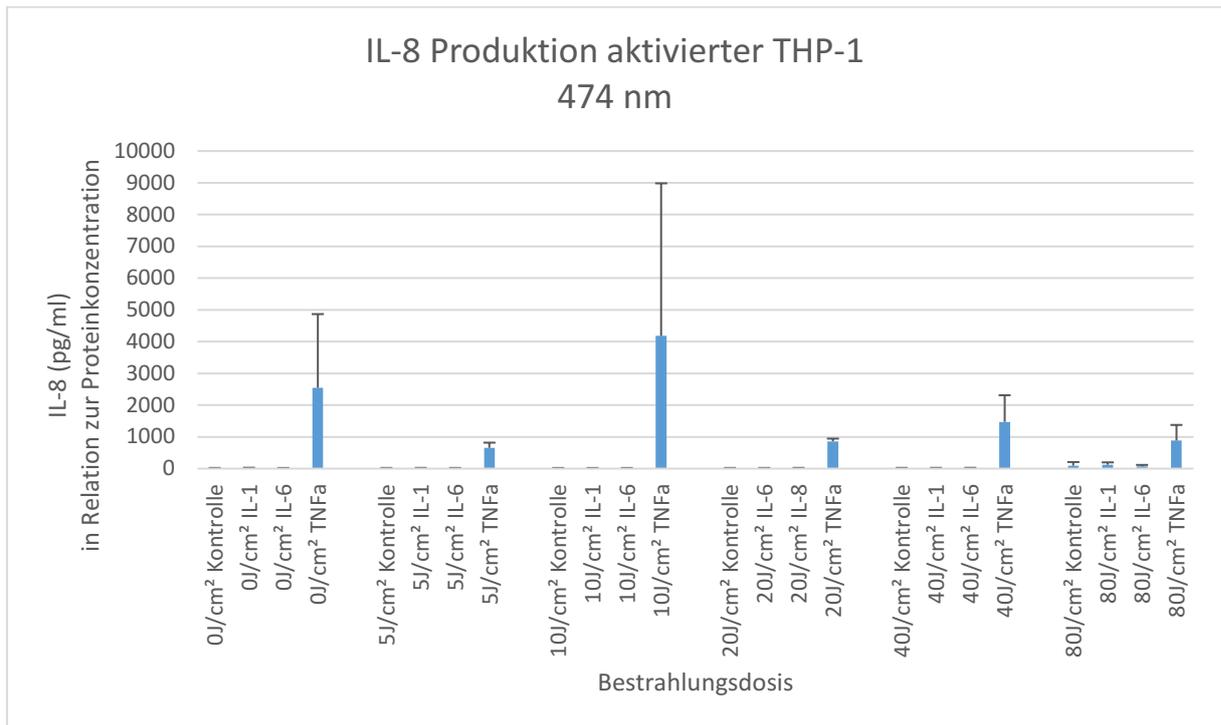


Abb. 42 - IL-8 Produktion aktivierter und mit IL-1 β , IL-6 und TNF α stimulierter THP-1 Zellen nach Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm und Dosen von 5 J/cm²– 80 J/cm². Die y-Achse zeigt die IL-1 β in pg/ml in Relation zur Proteinkonzentration, welche indirekt Aufschluss über die Anzahl der THP-1 Zellen gibt. Auf der x-Achse repräsentiert die Fraktion „0 J/cm²“ die unbestrahlten Kontrollen. Die Bezeichnung „Kontrolle, IL-1 β , IL-6 und TNF α “ hinter „0 J/cm²“ zeigen, mit welcher Zytokin die THP-1 Zellen stimuliert wurden. Vergleich Abbildung 38. Dann folgt die Darstellung der IL-8 Konzentrationen der einzelnen Wells unter Einfluss einer Bestrahlung mit 5 J/cm²– 80 J/cm². Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. n=3.

In der Versuchsreihe B lässt sich bei aktivierten THP-1 Zellen unter dem Einfluss von blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm eine deutlich höhere IL-8 Konzentration nachweisen, als bei nicht-aktivierten THP-1 Zellen. Vor allem unter dem Stimulus TNF α wird eine hohe IL-8 Produktion induziert. Die Wellenlänge, sowie die Dosis des blauen Lichts hat keinen signifikanten Einfluss auf die IL-8 Produktion. Vergleich Abbildung 42.

Abbildung 43 IL-8 Produktion aktivierter und mit Zytokinen stimulierter THP-1 Zellen nach Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm

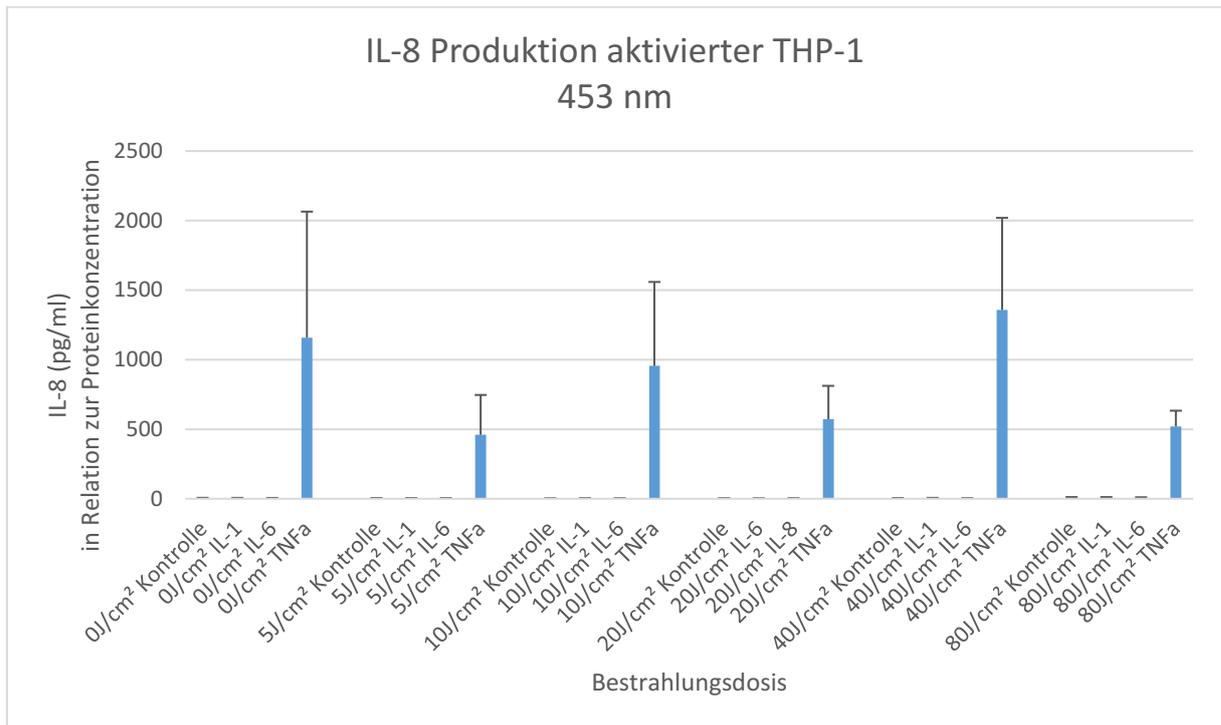


Abb. 43 - IL-8 Produktion aktivierter und mit IL-1 β , IL-6 und TNF α stimulierter THP-1 Zellen nach Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm und Dosen von 5 J/cm² – 80 J/cm². Die y-Achse zeigt die IL-1 β in pg/ml in Relation zur Proteinkonzentration, welche indirekt Aufschluss über die Anzahl der THP-1 Zellen gibt. Auf der x-Achse repräsentiert die Fraktion „0 J/cm²“ die unbestrahlten Kontrollen. Die Bezeichnung „Kontrolle, IL-1 β , IL-6 und TNF α “ hinter „0 J/cm²“ zeigen, mit welcher Zytokin die THP-1 Zellen stimuliert wurden. Vergleich Abbildung 38. Dann folgt die Darstellung der IL-8 Konzentrationen der einzelnen Wells unter Einfluss einer Bestrahlung mit 5 J/cm² – 80 J/cm². Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. n=3.

In der Versuchsreihe B lassen sich bei aktivierten THP-1 Zellen unter dem Einfluss von blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm nach TNF α – Stimulation IL-8 Konzentrationen nachweisen. Die Wellenlänge, sowie die Dosis des blauen Lichts hat keinen signifikanten Einfluss auf die IL-8 Produktion

TNF α

Sowohl in der Versuchsreihe A, als auch in der Versuchsreihe B fallen die gemessenen TNF α Konzentrationen aus den Zellüberständen der THP-1 Zellen bei Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 474 nm und 453 nm so gering aus, sodass diese kaum detektierbar waren. Es wurde auf eine grafische Darstellung verzichtet.

TNF α – Versuch

Die durchgeführten Versuche zeigten, dass vor allem aktivierte THP-Zellen unter dem Stimulus TNF α größere Mengen an IL-1 β und IL-8 bilden.

In dieser Versuchsreihe wurden THP-1 Zellen mit PMA aktiviert. Daraufhin erfolgte die Zugabe des Zytokins TNF α in einer Konzentration von 500 U/ml. Nach 24 Stunden der Inkubation wurde der Stimulus durch einen Waschvorgang mit PBS entfernt. Es folgte die erste Bestrahlung mit einer Dosis von 80 J/cm², jeweils bei einer Wellenlänge von 474 nm und 453 nm. Wiederum 24 Stunden nach der 1. Bestrahlung wurden die Konzentrationen von IL-1 β und IL-8 der Proben mittels ELISA ermittelt. Die Konzentrationen wurden in Relation zur gemessenen Proteinkonzentration gesetzt. Es folgte die 2. Und 3. Bestrahlung mit analogem Vorgehen wie oben beschrieben. Es ergab sich ein Verlauf der Zytokinexpression unter dem Einfluss dreimaliger Strahlenexposition über einen Zeitraum von 72 Stunden.

Abbildung 44 IL-1 β Produktion aktivierter und mit TNF α stimulierter THP-1 Zellen unter dem Einfluss der Blaulichtexposition einer Wellenlänge von 474 nm und 453 nm

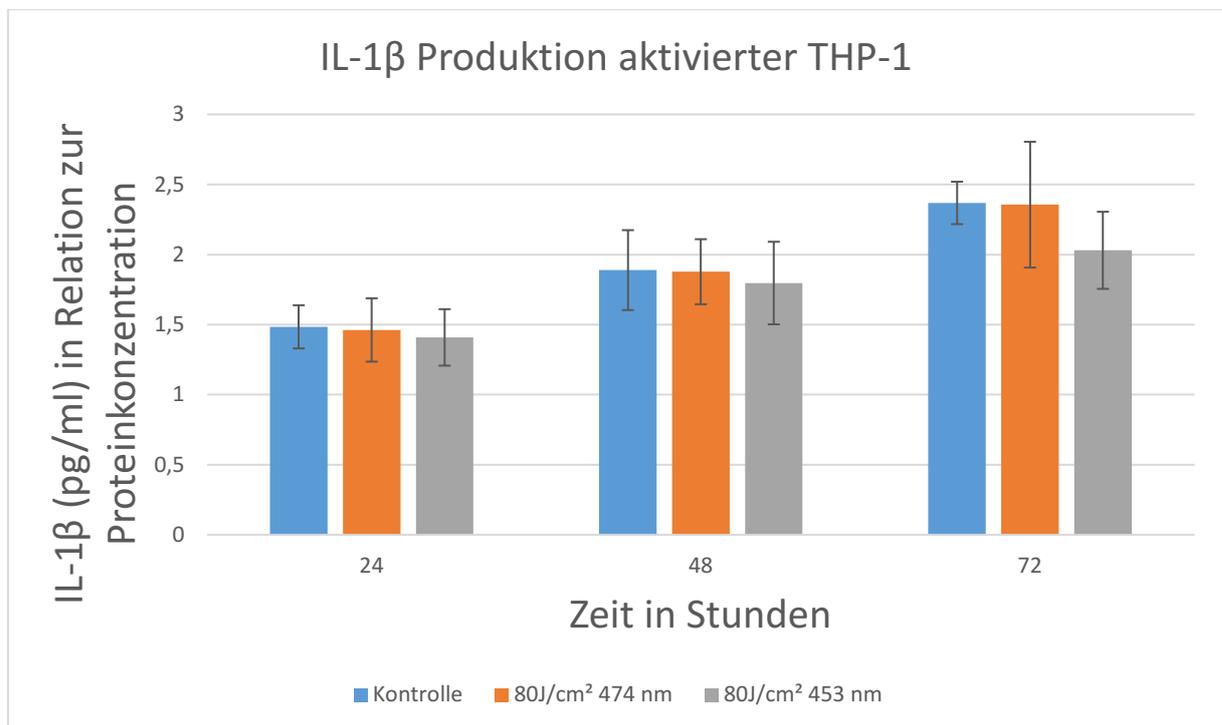


Abb. 44 - IL-1 β Produktion aktivierter und mit TNF α stimulierter THP-1 Zellen unter dem Einfluss von drei Bestrahlungen einer Wellenlänge von 474 nm und 453 nm einer Dosis von 80 J/cm² im zeitlichen Abstand von jeweils 24 Stunden. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. n=4.

Es ist eine geringe Produktion von IL-1 β durch aktivierte und mit TNF α induzierte THP-1 Zellen gemessen worden. Die gemessenen Konzentrationen umfassen einen Bereich von 0 - 3 pg/ml. Der Einsatz von blauem Licht von 474 nm und 453 nm einer

Dosis von 80 J/cm² hat zu keiner signifikanten Änderung der Zytokinkonzentration im Vergleich zur Kontrolle geführt. Vergleich Abbildung 44.

Abbildung 45 IL-8 Produktion aktivierter und mit TNF α stimulierter THP-1 Zellen unter dem Einfluss der Blaulichtexposition einer Wellenlänge von 474 nm und 453 nm

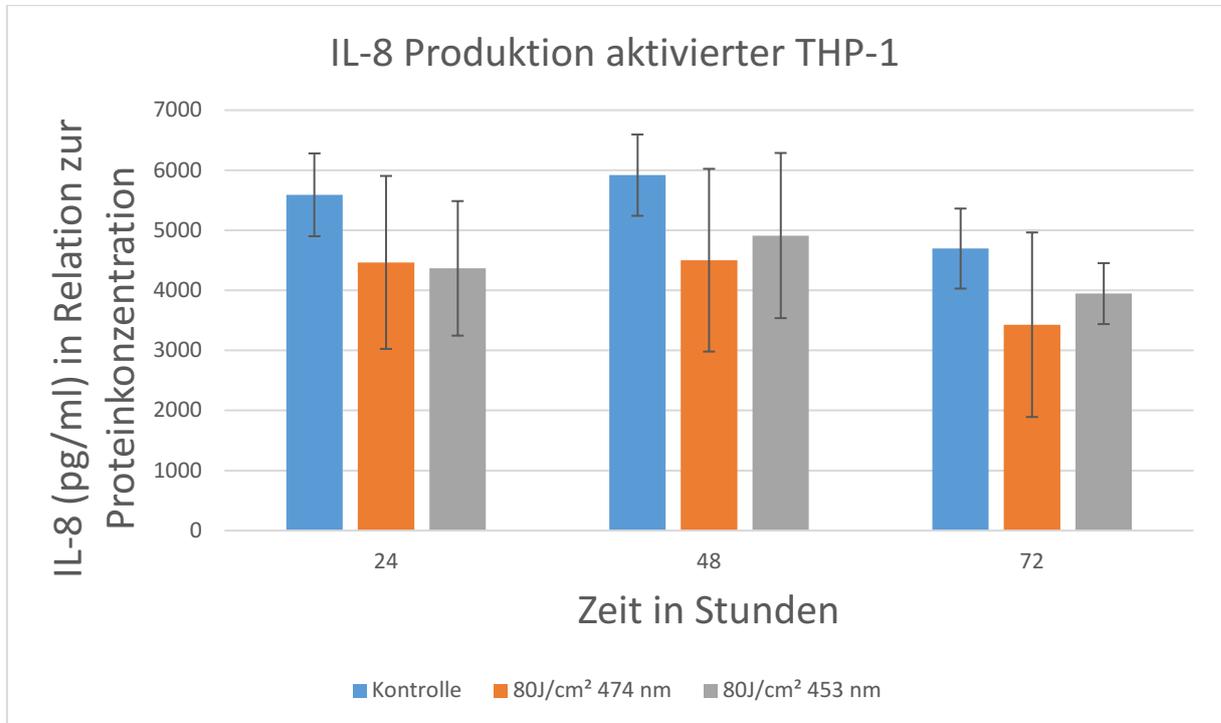


Abb. 45 - IL-8 Produktion aktivierter und mit TNF α stimulierter THP-1 Zellen unter dem Einfluss von drei Bestrahlungen einer Wellenlänge von 474 nm und 453 nm einer Dosis von 80 J/cm² im zeitlichen Abstand von jeweils 24 Stunden. Detaillierte Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen. n=4.

Abbildung 45 ist zu entnehmen, dass es zu einer deutlichen Produktion von IL-8 durch die aktivierten und mit TNF α stimulierten THP-1 Zellen gekommen ist. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der gemessenen Zytokinkonzentration der Kontrolle im Vergleich zu den Konzentrationen strahlenexponierten Zellen. Optisch zeigt sich bei den bestrahlten Zellen eine geringere IL-8 Konzentration im Vergleich zur Kontrolle. Der Mittelwert der gemessenen Zytokinkonzentrationen der unbestrahlten Kontrollen ergab 24 Stunden nach der ersten Bestrahlung eine ergab einen Wert von 5590,73 pg/ml. Zum gleichen Zeitpunkt ergaben sich für die bestrahlten Zellen Mittelwerte von 4465,22 pg/ml für Licht einer Wellenlänge von 474 nm und 4366,43 für 453 nm bei einer Dosis von 80 J/cm². Insgesamt zeigen sich hohe Standardabweichungen.

Diskussion

Die Lichttherapie ist in der modernen Medizin fest etabliert. Sie wird bei diversen chronisch-entzündlichen Hauterkrankungen wie der *Psoriasis*, *atopischen Dermatitis* oder dem kutanen T-Zell Lymphom erfolgreich eingesetzt. Bei der multifaktoriellen Ätiologie chronisch-entzündlicher Hauterkrankungen spielen pathologische Reaktionen des Immunsystems eine entscheidende Rolle. Ursächlich für die *Psoriasis* ist eine überschießende T-Zell-vermittelte Immunreaktionen (Prinz, 2003). Der elementare Grundgedanke der Lichttherapie ist eine Modulation des menschlichen Immunsystems durch elektromagnetische Strahlung zur gezielten Steuerung überschießender Entzündungsreaktionen. In der Klinik finden vor allem UVA- und UVB-Strahlung, oder gemischte UVA/UVB-Strahlung als Ganzkörper- oder Lokalbestrahlung Anwendung. Kombiniert mit lichtsensibilisierenden Substanzen, sogenannten Psoralen, kann der Effekt der Lichttherapie in Form einer Photochemotherapie weiter moduliert werden. Lokal als auch systemisch aktiviert die Lichttherapie antiinflammatorische und antiproliferative Prozesse, wodurch letztendlich überschießende Entzündungsreaktion eingedämmt werden können (Lapolla *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2015; Mahmoud *et al.*, 2008).

Die auf UV-Strahlung basierte Lichttherapie birgt ein Nebenwirkungsprofil mit entsprechenden Risiken. Eine übermäßige UV-Exposition geht mit einer vorzeitigen Hautalterung, Hyperpigmentierung, vermehrter Faltenbildung und einer Erhöhung des Risikos der Hautkrebsgenese einher. (Day, Marchalik, Merlino, & Michael, 2017; Helfrich *et al.*, 2008; Rigel, 2008). UV-freies blaues Licht einer Wellenlänge von 400 nm - 500 nm stellt hier eine alternative, nebenwirkungsärmere Strahlungsquelle dar. Zahlreiche Studien zeigen, dass neben der harten UV-Strahlung auch blaues Licht in der Lage ist, die Zellphysiologie diverser Zellen entscheidend zu beeinflussen. So lassen sich proliferationshemmende/ -steigernde, toxische und immunmodulatorische Effekte in dermalen Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen und T-Lymphozyten induzieren (Liebmann, 2010; Oplander *et al.*, 2011; Patalag, 2014). Auch klinisch findet blaues Licht in ersten Studien bereits erfolgreich Einzug in der Therapie der *Psoriasis* (Felix Garza, Liebmann, Born, Hilbers, & van Riel, 2017)

Die genaue Wirkung von blauem Licht auf THP-1 Zellen ist weitgehend ungeklärt. THP-1 Zellen sind beispielhaft um das Verhalten und die Funktion von Monozyten im Blut und Makrophagen im Gewebe zu erforschen, da sie sich in ihren charakteristischen Eigenschaften und Merkmalen denen humaner Monozyten und

Makrophagen sehr ähneln (Qin, 2012). Als wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems leiten Makrophagen bei einer Infektion einen Prozess ein, der im Allgemeinen als Entzündung bekannt ist. Durch Produktion und Sekretion biologisch aktiver Moleküle, wie den Zytokinen, steuern sie den weiteren Verlauf einer Immunreaktion maßgeblich und stellen ein wichtiges Bindeglied zum adaptiven Immunsystem dar (Lichtnekert *et al.*, 2013; Si-Tahar *et al.*, 2009).

Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob blaues Licht einer Wellenlänge von 453 nm und 474 nm das Potential besitzt, *in vitro* das Verhalten monozytärer THP-1 Zellen hinsichtlich der Proliferation, des Aktivierungszustandes und der Produktion entzündungsrelevanter Parameter zu beeinflussen. Als zentrales Steuerelement der Entzündungsreaktion könnten somit überschießende Reaktionen des Immunsystems durch blaues Licht gezielt moduliert werden.

Proliferationsverhalten von THP-1 Zellen unter blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm und 474 nm und dessen Zytotoxizität

Die Versuche zeigen, dass blaues Licht einer Wellenlänge von 453 nm und 474 nm einen proliferationshemmenden und toxischen Effekt auf THP-1 Zellen ausübt. Das Ausmaß dieses Effekts variiert in Abhängigkeit von der Wellenlänge und Dosis der Bestrahlung. Die Energie des Lichtstrahls ist umgekehrt proportional zur Wellenlänge (Maverakis *et al.*, 2010). Energiereiches Licht einer Wellenlänge von 453 nm erwies sich somit als toxischer, als Licht einer Wellenlänge von 474 nm. Mit Erhöhung der Dosis konnte dieser proliferationshemmende und zytotoxische Effekt gesteigert werden.

Die Abbildung 28 - Abbildung 31 zeigen optisch die zunehmende Proliferationshemmung mit steigender Dosis abhängig von der Wellenlänge. Weiterführende Versuche dieser Studie konnten zeigen, dass der proliferationshemmende Effekt zu einem großen Teil auf die zytotoxische Wirkung des blauen Lichts zurück zu führen ist. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie Abbildung 33 - Abbildung 36 verdeutlichen das Ausmaß der Zytotoxizität des blauen Lichts anhand der Apoptoserate der THP-1 Zellen. Zusätzlich konnte die Zytotoxizität anhand der Hoechst- und Propidiumiodid-Färbung weiter visualisiert werden. Vergleich Abbildung 37. Die antiproliferative Wirkung des blauen Licht ist somit zu einem großen Teil durch die zytotoxische Wirkung zu erklären.

Betrachtet man die Ergebnisse dieser Arbeit im Zusammenhang mit anderen Studien, so wird deutlich, dass die Effekte des blaues Licht einer Wellenlänge von 400 nm – 500 nm erheblich vom exponierten Zelltyp abhängig sind. Eine Arbeitsgruppe um Oplander *et al.* 2011 konnte zeigen, dass Blaulichtexposition durch Auslösung von intrazellulärem oxidativen Stress sowohl proliferationshemmende, - fördernde als auch toxische Effekte auf humane dermale Fibroblasten ausübt. Ähnlich wie in dieser Arbeit variierte die Toxizität je nach Wellenlänge und Dosis der Bestrahlung. Licht einer Wellenlänge von 410 nm und 420 nm mit einer jeweiligen Dosis von 60 J/cm² und 90 J/cm² führte zu einer signifikanten Verringerung der Zellzahl, wohingegen blaues Licht einer Wellenlänge von 453 nm keine signifikante Veränderung der Zellzahl verursachte. Blaues Licht einer Wellenlänge von 480 nm und einer Dosis von 30 J/cm² und 60 J/cm² induzierte hingegen eine Proliferationssteigerung (Oplander *et al.*, 2011). Auch Krassovka 2013 konnte nachweisen, dass Blaulichtexposition humaner, dermalen Fibroblasten in Dosen von 5 J/cm² – 10 J/cm² zu einer Zellzahlerhöhung

führte (Krassovka, 2013). Im Zusammenhang mit dieser Studie führte blaues Licht zu einer teils signifikanten Zellzahlreduktion, und das in einem Wellenlängenbereich, der keine toxische oder proliferationshemmende Wirkung auf humane Fibroblasten zeigte.

Liebmann 2010 konnte in seinen Studien zeigen, dass die dreimalige Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 412 nm, 419 nm, 426 nm und Dosen von 33 J/cm², 66 J/cm² und 100 J/cm² toxische Wirkung auf Keratinozyten und Endothelzellen hat, mit teils signifikanter Reduktion der Zellzahl. Die Apoptoserate erhöhte sich mit steigender Dosis und abnehmender Wellenlänge. Endothelzellen reagierten auf das blaue Licht deutlich sensibler als Keratinozyten. Demgegenüber konnte bei einer Wellenlänge von 453 nm und Dosen von 66 J/cm² und 100 J/cm² eine Proliferationshemmung der Endothelzellen und Keratinozyten beobachtet werden, es zeigten sich jedoch keine toxischen Effekte des blauen Lichts. Erst höhere Dosen von 500 J/cm² wirkten zytotoxisch auf Endothelzellen. Ab einer Dosis von 750 J/cm² konnte dieser toxische Effekt auch bei Keratinozyten (Liebmann, 2010) nachgewiesen werden. Diese dosis- und wellenlängenabhängige Toxizität und Proliferationshemmung sind auch in dieser Arbeit zu beobachten.

Weitere Studien konnten den zytotoxischen Effekt blauen Lichts einer Wellenlänge von 420 nm - 490 nm in geringen Dosen auf T-Zell-Kulturen nachweisen. Zusätzlich zeigte sich eine Reduktion der Expression entzündungsrelevanter Parameter wie IL-12 und TNF- α (Patalag, 2014).

Die Ergebnisse dieser Arbeit in Zusammenschau mit den Ergebnissen der oben genannten Studien lassen vermuten, dass THP-1 Zellen sensibler auf blaues Licht reagieren, und das in Wellenlängenbereichen und Dosen, die für diverse andere dermale Zellen scheinbar ungefährlich sind.

Ursache der zytotoxischen und antiproliferativen Wirkung des blauen Lichts

Die UV-Strahlung entfaltet ihre antiproliferative Wirkung durch direkte DNA-Schädigung exponierter Zellen. Sie induziert zwischen benachbarten, auf einem DNA-Strang liegenden Pyrimidinbasen wie Thymidin und Cytosin, die Bildung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren. Dadurch kommt es zur Aufhebung der Doppel-Helix-Struktur der DNA (Goodsell, 2001). Die meisten dieser DNA-Läsionen können innerhalb weniger Sekunden durch ein komplexes DNA-Reparatursystem behoben werden, um permanente DNA-Schäden zu verhindern. Neben dieser Photodimerisation können DNA-Mutationen einzelner Basen ausgelöst werden (Pattison & Davies, 2006; Schreier *et al.*, 2009). Zusätzlich induziert UV-Strahlung eine vermehrte, endogene Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Zu diesen Sauerstoffradikalen gehören das Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), Superoxidationradikale ($\cdot\text{O}_2^-$), Hydroxylradikal ($\text{HO}\cdot$) und weitere. Aufgrund ungepaarter Elektronen im äußeren Orbit sind diese Radikale hochreaktiv. Zu einem gewissen Ausmaß können die ROS durch Gewebsantioxidantien oder oxidative Abbauewege eliminiert werden. Unkontrollierte ROS-Generierung durch UV-Strahlung führt hingegen über oxidativen Stress zu DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen, was letztlich zur Apoptose oder zum Zellzyklusarrest der exponierten Zellen führt (Bickers & Athar, 2006; von Thaler *et al.*, 2010).

Auch bei Erklärung der toxischen Wirkung des blauen Lichts nimmt die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) eine entscheidende Rolle ein. In Pigmentepithelzellen der Retina führt blaues Licht über oxidativen Stress zur Schädigung von Membranbestandteilen und der DNA, bis hin zur Induktion der Apoptose (Lee *et al.*, 2014; Lockwood *et al.*, 2005). Neben der ROS – Generierung sind auch direkte DNA – Schäden beschrieben (Godley *et al.*, 2005). In humanen dermalen Fibroblasten induziert blaues Licht in toxischen Wellenlängenbereichen von 410 nm und 430 nm ebenfalls die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (Oplander *et al.*, 2011). Ein Vergleich der einzelnen Studien ist aufgrund der verschiedenen Zelltypen, sowie der unterschiedlich eingesetzten Wellenlänge und Dosis des blauen Lichts schwierig. Wahrscheinlich spielt jedoch auch in den THP-1 Zellen eine übermäßige Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Zytotoxizität des blauen Lichts. Weiterführende Experimente sollten THP-1 Zellen auf ihre ROS – Generierung unter Blaulichtexposition untersuchen.

Bei der THP-1 Zelllinie handelt es sich um sich schnell teilende und immortalisierte Zellen (Chanput *et al.*, 2014). Schnell teilende Zellen reagieren empfindlicher auf die Exposition gegenüber oxidativen Stress (Liebmann, 2010). Dies kann ein Erklärungsansatz für die erhöhte Sensibilität der THP-1 Zellen gegenüber dem blauen Lichts sein.

Grundsätzlich ist die Induktion der Apoptose humaner Zellen als Reaktion auf Exposition gegenüber übermäßiger elektromagnetischer Strahlung ein natürlicher Schutzmechanismus zur Prävention einer malignen Entartung der Zelle. Evolutionär bedingt haben vor allem lichtexponierte Zellen der Haut, wie Keratinozyten und Fibroblasten, Abwehrmechanismen gegenüber optischen Lichts entwickelt. Enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien im Zytoplasma dermalen Zellen dienen der Abwehr generierter ROS. Enzyme wie die Kupfer-Zink-enthaltende Superoxiddismutase (Cu/Zn-SOD), Mangan-Superoxiddismutase (Mn-SOD) und Katalase (CAT), aber auch nicht-enzymatische Antioxidantien wie β -Carotin und Vitamin A, Vitamin-C, Vitamin-D oder das Glutathion (GSH) im Zytoplasma dermalen Zellen bestimmen das Ausmaß der Fähigkeit zur Neutralisierung von ROS. So zeigten Fibroblasten und Keratinozyten nach UV-Exposition eine erniedrigte Menge an Cu/Zn-SOD, Mn-SOD und CAT, sowie eine erhöhte Proteinoxidation (Sander *et al.*, 2002).

In weiterführenden Studien könnte untersucht werden, ob sich THP-1 Zellen hinsichtlich der oben genannten antioxidativen Zellbestandteile im Vergleich zu anderen weniger sensiblen Zellen unterscheiden. Dies könnte weitere Erklärungsansätze für eine erhöhte Sensibilität der THP-1 Zellen gegenüber oxidativen Stress erbringen.

Einfluss von blauem Licht auf die Aktivierung der THP-1 Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat

In vitro lassen sich monozytäre THP-1 Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) innerhalb von 48 Stunden aktivieren, sodass diese zu Makrophagen-ähnlichen Zellen differenzieren. Es bilden sich morphologische und funktionelle Charakteristika aus, die denen nativer Makrophagen ähneln. Verglichen mit nicht-aktivierten THP-1 Zellen, adhären die morphologisch veränderten THP-1 Zellen nach der Differenzierung am Boden der Kulturflasche und es kommt zu einer Hemmung der Proliferation der differenzierten Zellen (Schwende *et al.*, 1996; Tsuchiya *et al.*, 1982). Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurden THP-1 Zellen vor der Aktivierung durch PMA mit blauem Licht bestrahlt, um den Einfluss auf die Aktivierung zu beurteilen. Die Ergebnisse zeigen im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Zellzahlreduktion unter der Blaulichtbestrahlung. Die Zellzahl sinkt mit steigender Dosis und abnehmender Wellenlänge. Abbildung 21 und Abbildung 22 verdeutlichen, dass neben den beiden Faktoren „Dosis und Wellenlänge“ auch die Anzahl der Bestrahlungen einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivierung von THP-1 Zellen hat.

In der Zusammenschau der Ergebnisse der Durchflusszytometrie und der Proliferationsversuche sind diese Ergebnisse kritisch zu betrachten. Eine Differenzierung zwischen einer Hemmung der Aktivierung und dem Untergang der Zellen ist nicht möglich. Es lässt sich nicht zwischen apoptotischen und nicht-aktivierten THP-1 Zellen unterscheiden, wobei die Ergebnisse vermuten lassen, dass die zytotoxische Wirkung des blauen Lichts die entscheidende Variabel im Hinblick auf die Proliferationshemmung darstellt.

Weiterführende Versuche mit Analyse der Zellen könnten Auskunft über den Aktivierungszustand der THP-1 Zellen erbringen. Während der Differenzierung von THP-1 Zellen kommt es zu Herunterregulierung von monozytären Oberflächenmarkern CD14 und TLR2 (Daigneault *et al.*, 2010). Zusätzlich steigern aktivierte THP-1 Zellen die Expression von Fc-Rezeptoren, mit denen IgG-Antikörper gebunden werden können, was eine erhöhte Phagozytose von Hefe und IgG-beschichteten Erythrozyten von Schafen (*sheep red blood cells*) ermöglicht (Tsuchiya *et al.*, 1982). Auch eine erhöhte Aktivität und Expression von Phospholipase A₂ ist bei aktivierten THP-1 Zellen zu beobachten (Schwende *et al.*, 1996). In weiterführenden Versuchen könnte eine Quantifizierung dieser charakteristischen Veränderungen genauere Erkenntnisse über den Aktivierungszustand der THP-1 Zellen unter dem Einfluss von blauem Licht liefern.

Des Weiteren geht aus den Ergebnissen dieser Arbeit hervor, dass aktivierte THP-1 Zellen deutlich weniger anfällig gegenüber blauem Licht sind als nicht-aktivierte monozytäre Zellen. Dieses Phänomen konnte bereits bei Bestrahlung von THP-1 Zellen mit UV-Strahlen beobachtet werden. Hier zeigten sich aktivierte THP-1 Zellen deutlich weniger apoptotisch als nicht-aktivierte Zellen (Daigneault *et al.*, 2010)

Beeinflussung entzündungsrelevanter Parameter von THP-1 Zellen durch blaues Licht

Anhand der durchgeführten Versuche sollte untersucht werden, ob blaues Licht außerhalb des Bereichs der harten UV-Strahlung in der Lage ist, entzündungsrelevante Parameter von THP-1 Zellen zu beeinflussen.

Allgemein bekannt ist, dass UV-Strahlung über die Regulation der Zytokinexpression einen antiinflammatorischen Einfluss auf immunkompetente Zellen der Haut ausüben kann. Hier reagieren die einzelnen Zelltypen unterschiedlich auf UV-Exposition. *In vitro* exponierte dermale Keratinozyten zeigen neben einer Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-8, TNF α und G-CSF, vor allem eine erhöhte Sekretion immunsuppressiver Faktoren wie TGF β (Schwarz & Luger, 1989). *In vitro* aktivierte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes von *Psoriasis*-Patienten reagierten auf UVB-Strahlung mit einer erhöhten Produktion des antiinflammatorisch wirkenden IL-10, wohingegen deutlich weniger proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-2, IL-6 und IL-8 und TNF α gebildet wurden (Batycka-Baran *et al.*, 2016; Jones *et al.*, 1996; Sigmundsdottir *et al.*, 2005).

Auch blaues Licht ist in der Lage entzündungsrelevante Parameter diverser immunkompetenter Zellen zu beeinflussen. Patalag 2014 konnte neben einer zytotoxischen Wirkung des blauen Lichts einer Wellenlänge von 453 nm zeigen, dass aktivierte T-Zellen nach Blaulichtexposition weniger proinflammatorisches IL-12 und TNF α produzierten (Patalag, 2014). In Keratinozyten induziert blaues Licht antiinflammatorische Effekte durch Suppression der Zytokinproduktion von proinflammatorischen IL-1 α und des Oberflächenmarkers ICAM-1 (Shnitkind, Yaping, Geen, Shalita, & Lee, 2006). Studien mit THP-1 Zellen zeigten, dass Blaulichtbestrahlung nicht zu einer Erhöhung der Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-8 und TNF α führte. Bestrahlte THP-1 Zellen, die anschließend mit zytotoxischem Lipopolysaccharid stimuliert wurden, wiesen jedoch eine deutlich geringere Expression von IL-8 und TNF α auf als unbestrahlte Zellen (Trotter *et al.*, 2017).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass vor allem aktivierte THP-Zellen Zytokine produzieren. Bei nicht aktivierten THP-1 Zellen zeigte sich insgesamt eine geringe Zytokinproduktion. Ein signifikanter Einfluss des blauen Lichts einer Wellenlänge von 453 nm und 474 nm auf die Zytokinproduktion der THP-1 Zellen konnte in dieser Versuchsreihe nicht gezeigt werden. Abbildung 45 verdeutlicht die Produktion von IL-8 durch aktivierte und mit TNF α stimulierte THP-1 Zellen. Die Zytokinkonzentrationen der strahlenexponierten Zellen unterscheiden sich jedoch nicht signifikant zu denen der Kontrolle. Auch die variierende Dosis scheint keinen eindeutigen Einfluss auf die Zytokinproduktion zu haben. Optisch lässt sich bei den bestrahlten Zellen eine geringere IL-8 Produktion im Vergleich zur Kontrolle nachweisen.

Limitation der Studie

Die Versuche zur Messung der Zytokine zeigten häufig zu geringe Konzentrationen, die mit denen in dieser Studie verwendeten ELISA-Kits nicht detektiert werden konnten. Hier könnten zukünftig sensiblere ELISA-Kits eingesetzt werden. Eine höhere initial ausgesäte Zellzahl könnte zudem zur Generierung höherer Zytokinkonzentrationen führen. Zusätzlich zeigen sich teils hohe Standardabweichungen, sodass trotz sorgfältiger Versuchsdurchführung und Wiederholung der Versuche Variablen wie Artefakte, Messfehler und Ungenauigkeiten nicht auszuschließen sind. Eine höhere Versuchsanzahl kann etwaige Schwankungen minimieren. Dies hätte sowohl den finanziellen als auch den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit gesprengt. In diesen Versuchen wurden die gemessenen Zytokinkonzentrationen in Relation zur ausgesäten Proteinkonzentration setzen. Dieser Proteinsatz beinhaltet jedoch auch die apoptotischen THP-1 Zellen. Insgesamt ist somit davon auszugehen, dass die gemessenen Zytokinkonzentrationen der bestrahlten Zellen auf insgesamt weniger vitale Zellen zurückzuführen ist, was die Ergebnisse dieser Arbeit verzehrt. Eine genauere Differenzierung zwischen vitalen und toten Zellen ließ der Versuchsaufbau nicht zu. Als Alternative könnten in weiterführenden Versuchen die Zytokinkonzentrationen in Relation zur gemessenen, relativen Zellzahl durch das CellTiter-Blue® Zellproliferationsassay gesetzt werden.

Eine weitere Variable stellt der Umstand dar, dass die Zellen für den Zeitraum der Bestrahlung den optimalen Inkubationsbedingungen entzogen werden. Mit steigender Dosis verweilen die THP-1 Zellen für längere Zeit unter der LED-Lampe. Schwankende Temperaturverhältnisse und geringere CO₂-Konzentrationen können mitunter Faktoren zur Induktion der Apoptose sein, weshalb die Zytotoxizität nicht vollständig

durch das blaue Licht zu erklären ist. Auch das Hin- und Her-Pipettieren der THP-1 Zellen, sowie der Mediumwechsel können Faktoren für weitere Messungenauigkeiten sein.

Weiterhin ist anzumerken, dass es sich bei der THP-1-Zelllinie um immortalisierte Tumorzellen handelt, die spezifische Charakteristika aufweisen, die denen gesunder humaner Monozyten und Makrophagen ähneln, jedoch nicht gleichen. In zukünftigen Studien könnten „gesunde“ humane Zellen isoliert werden, um den Einfluss blauen Lichts auf die Zellfunktion zu untersuchen.

Perspektiven

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass blaues Licht einer Wellenlänge von 453 nm und 474 nm bereits in geringen Dosen antiproliferative und toxische Wirkung auf THP-1 Zellen erzielt. Der eingesetzte Wellenlängenbereich und die Bestrahlungsdosen scheinen für diverse andere dermale Zellen, wie beispielsweise Fibroblasten und Keratinozyten ungefährlich zu sein. Ein nebenwirkungsärmeres Nebenwirkungsprofil im Vergleich zur harten UV-Strahlung lässt blaues Licht als Alternative in der Lichttherapie sinnvoll erscheinen. So ließe sich zukünftig das Immunsystem schonend modulieren. Als wichtige Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind Monozyten und Makrophagen maßgeblich für den weiteren Verlauf einer Entzündungs- und Immunreaktion verantwortlich und stellen ein wichtiges Bindeglied zum adaptiven Immunsystem dar (Lichtnekert *et al.*, 2013; Si-Tahar *et al.*, 2009). Die gezielte Induktion der Apoptose von monozytären Zellen, Makrophagen und T-Zellen durch blaues Licht könnten überschießende, pathologische Reaktionen des Immunsystems, beispielsweise bei chronisch-entzündlichen Dermatosen, jedoch auch bei entzündlichen Wundheilungsstörungen reduzieren.

Weiterführende Experimente könnten zeigen, ob blaues Licht einer höheren Wellenlänge als 474 nm ähnliche antiproliferative Effekte aufweist. Etwaige Nebenwirkungen könnten so durch den Einsatz „weicherer“ Strahlung minimiert werden. Eine weitere Möglichkeit zur Erweiterung des Spektrums der modernen Lichttherapie wäre der kombinierte Einsatz von blauem Licht und UV-Strahlung. Möglicherweise ließen sich über eine Reduktion des Anteils der „harten“ UV-Strahlung die Risiken und Nebenwirkungen einer Lichttherapie weiter mindern.

Blaues Licht einer Wellenlänge von 453 nm findet bereits Einzug in die Therapie der *Psoriasis vulgaris*. Klinische Studien konnten eine signifikante Verbesserung der

Symptome mit erhöhter Patientenzufriedenheit im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen. Der therapeutische Effekt sei unter anderem durch eine Proliferationshemmung von Keratinozyten und die Modulation der T-Zell-Funktion zu erklären (Pfaff *et al.*, 2015). Die Rolle der Monozyten und Makrophagen im Zusammenhang des therapeutischen Effektes von blauem Licht auf chronisch entzündliche Hauterkrankungen oder überschießende Entzündungsreaktionen bei Wundheilungsstörungen müssen geklärt werden.

Die Fähigkeit optischer Strahlung in die Haut einzudringen, ist proportional zur Wellenlänge, sodass länger-wellige Strahlung tiefere Hautschichten penetrieren kann, als kürzer-welliges Licht (Maverakis *et al.*, 2010). Dementsprechend sind ähnliche Effekte bei weniger toxischem blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm auf biologische Prozesse in den tieferen Hautschichten zu erwarten. Diese Erkenntnisse sollten bei dem klinischen Einsatz von blauem Licht zusätzlich in Betracht gezogen werden.

In der modernen Lichttherapie wird UV-Strahlung mit lichtsensibilisierenden Substanzen kombiniert, sogenannten Psoralen. Der Effekt der Lichttherapie kann in Form von Photochemotherapie (PUVA) weiter moduliert werden. Kombiniert eingesetzt wird UVA-Strahlung mit beispielsweise Methoxsalen, das aus ätherischen Ölen unterschiedlicher Pflanzen extrahiert wird. Dadurch lässt sich die Wirkung der UV-Strahlung effektiver gestalten (Gambichler *et al.*, 2005; Lapolla *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2015; Tobin, Maguire, Enright, & Kirby, 2009; Wolff, 1990). Eine Forschungsgruppe um Lee *et al.* konnte 2004 *in vitro* einen toxischen Effekt blauem Lichts einer Wellenlänge zwischen 410 nm - 480 nm auf humane Epithelzellen der Kornea nachweisen. Jedoch konnte gezeigt werden, dass der gleichzeitige Zusatz von Ethylalkohol, gewonnen aus verschiedenen Pflanzenextrakten, die Generierung von ROS durch Blaulichtbestrahlung verringert und somit die Zytotoxizität minimiert (Lee *et al.*, 2014). Ähnlich wie bei dem Einsatz von Psoralen in der UV-Lichttherapie könnten auch bei der Blaulichtbestrahlung Phytoextrakte zum Einsatz kommen, um diese weiter zu modulieren. Die Langzeitwirkung durch den Einsatz von Psoralen im Rahmen der Photochemotherapie auf humanes Gewebe ist nicht vollständig erforscht, weshalb der Einsatz von Phytoextrakten in der Lichttherapie vorerst kritisch betrachtet werden sollte (Helfrich *et al.*, 2008).

Derzeit liegen keine Langzeitstudien über einen längerfristigen und regelmäßigen therapeutischen Einsatz von blauem Licht vor. Folglich können zum jetzigen Zeitpunkt

keine Aussagen über mögliche Spätfolgen und Nebenwirkungen gemacht werden. Insgesamt erscheint der Einsatz von blauem Licht als nebenwirkungsärmere Alternative zur harten UV-Strahlung als sinnvolle Therapieoption in der Behandlung von chronisch entzündlichen Hauterkrankungen oder Wundheilungsstörungen.

Literatur- und Quellenverzeichnis

- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, 124(4), 783-801. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Alberts B, J. A., Lewis J, et al. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4th edition ed.). New York: Garland Science.
- Arends, M. J., Morris, R. G., & Wyllie, A. H. (1990). Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol*, 136(3), 593-608.
- Baggiolini, M., & Clark-Lewis, I. (1992). Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Letters*, 307(1), 97-101. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80909-Z](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(92)80909-Z)
- Baggiolini, M., Loetscher, P., & Moser, B. (1995). Interleukin-8 and the chemokine family. *Int J Immunopharmacol*, 17(2), 103-108.
- Batycka-Baran, A., Besgen, P., Wolf, R., Szepietowski, J. C., & Prinz, J. C. (2016). The effect of phototherapy on systemic inflammatory process in patients with plaque psoriasis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 161, 396-401. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.05.023>
- Bendtsen, K. (1988). Interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity. *Immunol Lett*, 19(3), 183-191.
- Bickers, D. R., & Athar, M. (2006). Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J Invest Dermatol*, 126(12), 2565-2575. doi:10.1038/sj.jid.5700340
- Blumberg, P. M. (1988). Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: sixth Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res*, 48(1), 1-8.
- Brennan, P. J., Greenberg, G., Miall, W. E., & Thompson, S. G. (1982). Seasonal variation in arterial blood pressure. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 285(6346), 919-923.
- Butterfield, T. A., Best, T. M., & Merrick, M. A. (2006). The Dual Roles of Neutrophils and Macrophages in Inflammation: A Critical Balance Between Tissue Damage and Repair. *Journal of Athletic Training*, 41(4), 457-465.
- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., & Nishizuka, Y. (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem*, 257(13), 7847-7851.
- Castell, J. V., Gomez-Lechon, M. J., David, M., Andus, T., Geiger, T., Trullenque, R., . . . Heinrich, P. C. (1989). Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett*, 242(2), 237-239.
- Cavaillon, J. M. (2001). Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 47(4), 695-702.
- Chanput, W., Mes, J. J., & Wichers, H. J. (2014). THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol*, 23(1), 37-45. doi:10.1016/j.intimp.2014.08.002
- Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K., & Dockrell, D. H. (2010). The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One*, 5(1), e8668. doi:10.1371/journal.pone.0008668
- Day, C. P., Marchalik, R., Merlino, G., & Michael, H. (2017). Mouse models of UV-induced melanoma: genetics, pathology, and clinical relevance. *Lab Invest*. doi:10.1038/labinvest.2016.155
- de Grujil, F. R. (1999). Skin cancer and solar UV radiation. *Eur J Cancer*, 35(14), 2003-2009.
- Fearon, D. T., & Locksley, R. M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*, 272(5258), 50-53.

- Felix Garza, Z. C., Liebmann, J., Born, M., Hilbers, P. A., & van Riel, N. A. (2017). A Dynamic Model for Prediction of Psoriasis Management by Blue Light Irradiation. *Front Physiol*, 8, 28. doi:10.3389/fphys.2017.00028
- Fischer, M. R., Abel, M., Lopez Kostka, S., Rudolph, B., Becker, D., & von Stebut, E. (2013). Blue light irradiation suppresses dendritic cells activation in vitro. *Exp Dermatol*, 22(8), 558-560. doi:10.1111/exd.12193
- Gambichler, T., Breuckmann, F., Boms, S., Altmeyer, P., & Kreuter, A. (2005). Narrowband UVB phototherapy in skin conditions beyond psoriasis. *J Am Acad Dermatol*, 52(4), 660-670. doi:10.1016/j.jaad.2004.08.047
- Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., & Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 327(5966), 656-661. doi:10.1126/science.1178331
- Godley, B. F., Shamsi, F. A., Liang, F. Q., Jarrett, S. G., Davies, S., & Boulton, M. (2005). Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells. *J Biol Chem*, 280(22), 21061-21066. doi:10.1074/jbc.M502194200
- Goodsell, D. S. (2001). The molecular perspective: ultraviolet light and pyrimidine dimers. *Stem Cells*, 19(4), 348-349. doi:10.1634/stemcells.19-4-348
- Harada, A., Sekido, N., Akahoshi, T., Wada, T., Mukaida, N., & Matsushima, K. (1994). Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol*, 56(5), 559-564.
- Helfrich, Y. R., Sachs, D. L., & Voorhees, J. J. (2008). Overview of skin aging and photoaging. *Dermatol Nurs*, 20(3), 177-183; quiz 184.
- Homma, Y., Henning-Chubb, C. B., & Huberman, E. (1986). Translocation of protein kinase C in human leukemia cells susceptible or resistant to differentiation induced by phorbol 12-myristate 13-acetate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(19), 7316-7319.
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*, 327(5963), 291-295. doi:10.1126/science.1183021
- Janeway CA Jr, T. P., Walport M, et al. (2001). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* (5th Edition ed.). New York: Garland Publishing.
- Jiang, Y. J., Lu, B., Choy, P. C., & Hatch, G. M. (2003). Regulation of cytosolic phospholipase A2, cyclooxygenase-1 and -2 expression by PMA, TNFalpha, LPS and M-CSF in human monocytes and macrophages. *Mol Cell Biochem*, 246(1-2), 31-38.
- Jones, C. D., Guckian, M., el-Ghorr, A. A., Gibbs, N. K., & Norval, M. (1996). Effects of phototherapy on the production of cytokines by peripheral blood mononuclear cells and on systemic antibody responses in patients with psoriasis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 12(5), 204-210.
- Kabelitz, D., & Medzhitov, R. (2007). Innate immunity — cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. *Current Opinion in Immunology*, 19(1), 1-3. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2006.11.018>
- Kaisho, T., & Akira, S. (2001). Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity. *Acta Odontol Scand*, 59(3), 124-130.
- Karolina Malinowska, A. S.-J., Anna Woźniacka. (2011). UVA1 phototherapy in dermatological treatment. *Post Dermatol Alergo*, XXVIII, 53–58.
- Kluger, M. J. (1991). Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol Rev*, 71(1), 93-127.
- Krassovka. (2013). Modulation der induzierten Fibroblastendifferenzierung durch blaues Licht.

- Kratofil, R. M., Kubes, P., & Deniset, J. F. (2016). Monocyte Conversion During Inflammation and Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. doi:10.1161/ATVBAHA.116.308198
- Lapolla, W., Yentzer, B. A., Bagel, J., Halvorson, C. R., & Feldman, S. R. (2011). A review of phototherapy protocols for psoriasis treatment. *J Am Acad Dermatol*, 64(5), 936-949. doi:10.1016/j.jaad.2009.12.054
- Lee, J. B., Kim, S. H., Lee, S. C., Kim, H. G., Ahn, H. G., Li, Z., & Yoon, K. C. (2014). Blue light-induced oxidative stress in human corneal epithelial cells: protective effects of ethanol extracts of various medicinal plant mixtures. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55(7), 4119-4127. doi:10.1167/iovs.13-13441
- León, B., López-Bravo, M., & Ardavín, C. (2005). Monocyte-derived dendritic cells. *Seminars in Immunology*, 17(4), 313-318. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2005.05.013>
- Lichtnekert, J., Kawakami, T., Parks, W. C., & Duffield, J. S. (2013). Changes in macrophage phenotype as the immune response evolves. *Curr Opin Pharmacol*, 13(4), 555-564. doi:10.1016/j.coph.2013.05.013
- Liebmann, J. B., M.; Kolb-Bachofen, V. (2010). Blue-light irradiation regulates proliferation and differentiation in human skin cells. *J Invest Dermatol* 130, 130, 259-269. doi:10.1038/jid.2009.194
- Lim, H. W., Silpa-archa, N., Amadi, U., Menter, A., Van Voorhees, A. S., & Lebwohl, M. (2015). Phototherapy in dermatology: A call for action. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 72(6), 1078-1080. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2015.03.017>
- Lockwood, D. B., Wataha, J. C., Lewis, J. B., Tseng, W. Y., Messer, R. L., & Hsu, S. D. (2005). Blue light generates reactive oxygen species (ROS) differentially in tumor vs. normal epithelial cells. *Dent Mater*, 21(7), 683-688. doi:10.1016/j.dental.2004.07.022
- Mahmoud, B. H., Hexsel, C. L., Hamzavi, I. H., & Lim, H. W. (2008). Effects of visible light on the skin. *Photochem Photobiol*, 84(2), 450-462. doi:10.1111/j.1751-1097.2007.00286.x
- Mahmoud, B. H., Ruvolo, E., Hexsel, C. L., Liu, Y., Owen, M. R., Kollias, N., . . . Hamzavi, I. H. (2010). Impact of long-wavelength UVA and visible light on melanocompetent skin. *J Invest Dermatol*, 130(8), 2092-2097. doi:10.1038/jid.2010.95
- Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*, 6, 13. doi:10.12703/P6-13
- Maverakis, E., Miyamura, Y., Bowen, M. P., Correa, G., Ono, Y., & Goodarzi, H. (2010). Light, including ultraviolet. *J Autoimmun*, 34(3), J247-257. doi:10.1016/j.jaut.2009.11.011
- Moan, J., Porojnicu, A. C., Dahlback, A., & Setlow, R. B. (2008). Addressing the health benefits and risks, involving vitamin D or skin cancer, of increased sun exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(2), 668-673. doi:10.1073/pnas.0710615105
- Moller, B., & Villiger, P. M. (2006). Inhibition of IL-1, IL-6, and TNF-alpha in immune-mediated inflammatory diseases. *Springer Semin Immunopathol*, 27(4), 391-408. doi:10.1007/s00281-006-0012-9
- Muller, W. A. (2013). Getting leukocytes to the site of inflammation. *Vet Pathol*, 50(1), 7-22. doi:10.1177/0300985812469883
- Niedel, J. E., Kuhn, L. J., & Vandenbark, G. R. (1983). Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(1), 36-40.
- Nunez, R. (2001). DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Curr Issues Mol Biol*, 3(3), 67-70.

- Oplander, C., Deck, A., Volkmar, C. M., Kirsch, M., Liebmann, J., Born, M., . . . Suschek, C. V. (2013). Mechanism and biological relevance of blue-light (420-453 nm)-induced nonenzymatic nitric oxide generation from photolabile nitric oxide derivatives in human skin in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*, *65*, 1363-1377. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.022
- Oplander, C., Hidding, S., Werners, F. B., Born, M., Pallua, N., & Suschek, C. V. (2011). Effects of blue light irradiation on human dermal fibroblasts. *J Photochem Photobiol B*, *103*(2), 118-125. doi:10.1016/j.jphotobiol.2011.02.018
- Oplander, C., Volkmar, C. M., Paunel-Gorgulu, A., van Faassen, E. E., Heiss, C., Kelm, M., . . . Suschek, C. V. (2009). Whole body UVA irradiation lowers systemic blood pressure by release of nitric oxide from intracutaneous photolabile nitric oxide derivatives. *Circ Res*, *105*(10), 1031-1040. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.207019
- Park, E. K., Jung, H. S., Yang, H. I., Yoo, M. C., Kim, C., & Kim, K. S. (2007). Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflammation Research*, *56*(1), 45-50. doi:10.1007/s00011-007-6115-5
- Patalag, N. (2014). Die molekularen Grundlagen der Entzündungsantwort von immunkompetenten Zellen im speziellen humane T-Lymphozyten nach Blaulichtbestrahlung (453 nm-LED-Array).
- Pattison, D. I., & Davies, M. J. (2006). Actions of ultraviolet light on cellular structures. *EXS*(96), 131-157.
- Pfaff, S., Liebmann, J., Born, M., Merk, H. F., & von Felbert, V. (2015). Prospective Randomized Long-Term Study on the Efficacy and Safety of UV-Free Blue Light for Treating Mild Psoriasis Vulgaris. *Dermatology*, *231*(1), 24-34. doi:10.1159/000430495
- Pollack, A., & Ciancio, G. (1990). Cell cycle phase-specific analysis of cell viability using Hoechst 33342 and propidium iodide after ethanol preservation. *Methods Cell Biol*, *33*, 19-24.
- Prinz, J. C. (2003). Neueste Aspekte in der Pathogenese der Psoriasis. *Der Hautarzt*, *54*(3), 209-214. doi:10.1007/s00105-003-0490-9
- Qin, Z. (2012). The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis*, *221*(1), 2-11. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.003>
- Riccardi, C., & Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc*, *1*(3), 1458-1461. doi:10.1038/nprot.2006.238
- Rigel, D. S. (2008). Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the development of skin cancer. *J Am Acad Dermatol*, *58*(5 Suppl 2), S129-132. doi:10.1016/j.jaad.2007.04.034
- Rovera, G., Santoli, D., & Damsky, C. (1979). Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *76*(6), 2779-2783.
- Sander, C. S., Chang, H., Salzmann, S., Müller, C. S. L., Ekanayake-Mudiyanselage, S., Elsner, P., & Thiele, J. J. (2002). Photoaging is Associated with Protein Oxidation in Human Skin In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, *118*(4), 618-625. doi:<http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.01708.x>
- Schreier, W. J., Kubon, J., Regner, N., Haiser, K., Schrader, T. E., Zinth, W., . . . Gilch, P. (2009). Thymine dimerization in DNA model systems: cyclobutane photolesion is predominantly formed via the singlet channel. *J Am Chem Soc*, *131*(14), 5038-5039. doi:10.1021/ja900436t
- Schwarz, T., & Luger, T. A. (1989). New trends in photobiology. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *4*(1), 1-13. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/1011-1344\(89\)80097-1](http://dx.doi.org/10.1016/1011-1344(89)80097-1)

- Schwende, H., Fitzke, E., Ambs, P., & Dieter, P. (1996). Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Journal of Leukocyte Biology*, 59(4), 555-561.
- Serbina, N. V., Jia, T., Hohl, T. M., & Pamer, E. G. (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol*, 26, 421-452. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326
- Shnitkind, E., Yaping, E., Geen, S., Shalita, A. R., & Lee, W. L. (2006). Anti-inflammatory properties of narrow-band blue light. *J Drugs Dermatol*, 5(7), 605-610.
- Si-Tahar, M., Touqui, L., & Chignard, M. (2009). Innate immunity and inflammation--two facets of the same anti-infectious reaction. *Clin Exp Immunol*, 156(2), 194-198. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03893.x
- Sigmundsdottir, H., Johnston, A., Gudjonsson, J. E., & Valdimarsson, H. (2005). Narrowband-UVB irradiation decreases the production of pro-inflammatory cytokines by stimulated T cells. *Arch Dermatol Res*, 297(1), 39-42. doi:10.1007/s00403-005-0565-9
- Situm, M., Bulat, V., Majcen, K., Dzapo, A., & Jezovita, J. (2014). Benefits of controlled ultraviolet radiation in the treatment of dermatological diseases. *Coll Antropol*, 38(4), 1249-1253.
- Suzuki, K., Nakaji, S., Yamada, M., Totsuka, M., Sato, K., & Sugawara, K. (2002). Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. Cytokine kinetics. *Exerc Immunol Rev*, 8, 6-48.
- Tobin, A. M., Maguire, B., Enright, H., & Kirby, B. (2009). The effects of phototherapy on the numbers of circulating natural killer cells and T lymphocytes in psoriasis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 25(2), 109-110. doi:10.1111/j.1600-0781.2009.00409.x
- Trinchieri, G., & Scott, P. (1994). The role of interleukin 12 in the immune response, disease and therapy. *Immunol Today*, 15(10), 460-463. doi:10.1016/0167-5699(94)90189-9
- Trotter, L. A., Patel, D., Dubin, S., Guerra, C., McCloud, V., Lockwood, P., . . . Lewis, J. B. (2017). Violet/blue light activates Nrf2 signaling and modulates the inflammatory response of THP-1 monocytes. *Photochem Photobiol Sci*, 16(6), 883-889. doi:10.1039/c6pp00299d
- Tsuchiya, S., Gota, Y., Okumura, H., Nakae, S., Konno, T., Tada, K., & Kobayashi, Y. (1982). Induction of Maturation in Cultured Human Monocytic Leukemia Cells by a Phorbol Diester. *Cancer Research*, 42(4), 1530-1536.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., & Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*, 26(2), 171-176.
- von Thaler, A. K., Kamenisch, Y., & Berneburg, M. (2010). The role of ultraviolet radiation in melanomagenesis. *Exp Dermatol*, 19(2), 81-88. doi:10.1111/j.1600-0625.2009.01025.x
- Wallen, C. A., Higashikubo, R., & Dethlefsen, L. A. (1982). Comparison of two flow cytometric assays for cellular RNA--acridine orange and propidium iodide. *Cytometry*, 3(3), 155-160. doi:10.1002/cyto.990030303
- Wang, H. B., Wang, X. Y., Liu, L. P., Qin, G. W., & Kang, T. G. (2015). Tiglane diterpenoids from the Euphorbiaceae and Thymelaeaceae families. *Chem Rev*, 115(9), 2975-3011. doi:10.1021/cr200397n
- Weinstein, I. B., Lee, L. S., Fisher, P. B., Mufson, A., & Yamasaki, H. (1979). Action of phorbol esters in cell culture: mimicry of transformation, altered differentiation, and effects on cell membranes. *J Supramol Struct*, 12(2), 195-208. doi:10.1002/jss.400120206

Wolff, K. (1990). Side-effects of psoralen photochemotherapy (PUVA). *Br J Dermatol*, 122 Suppl 36, 117-125.

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1 Einleitung einer Entzündungsreaktion durch aktivierte Makrophagen | 7 |
| Abbildung 2 Lokale und systemische Effekt der sezernierten Zytokine aktivierter Makrophagen | 9 |
| Abbildung 3 Effekte der Zytokine IL-1, IL-6 und TNF α auf ihre Zielorgane | 12 |
| Abbildung 4 Bestrahlung in abgedunkelter Umgebung..... | 27 |
| Abbildung 5 Reduktion von Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin | 28 |
| Abbildung 6 Einfluss einmaliger Bestrahlung auf die Aktivierung von THP-1 Zellen | 33 |
| Abbildung 7 Boxplot - Darstellung des Einflusses einmaliger Bestrahlung mit 474 auf die Aktivierung von THP-1 Zellen | 34 |
| Abbildung 8 Boxplot - Darstellung des Einflusses einmaliger Bestrahlung mit 453 nm auf die Aktivierung von THP-1 Zellen..... | 35 |
| Abbildung 9 Einfluss einmaliger Bestrahlung mit 474 nm auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit grafischer Darstellung einer Regressionsanalyse | 36 |
| Abbildung 10 Einfluss einmaliger Bestrahlung mit 453nm auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit grafischer Darstellung einer Regressionsanalyse | 37 |
| Abbildung 11 Einfluss einmaliger Bestrahlung auf aktivierte THP-1 Zellen | 39 |
| Abbildung 12 Boxplot - Darstellung des Einflusses einmaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 474 nm auf aktivierte THP-1 Zellen | 40 |
| Abbildung 13 Boxplot - Darstellung des Einflusses einmaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 453 nm auf aktivierte THP-1 Zellen | 41 |
| Abbildung 14 Einfluss einmaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 474 nm auf aktivierte THP-1 Zellen mit grafischer Darstellung einer Regressionsanalyse.. | 42 |
| Abbildung 15 Einfluss einmaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 453 nm auf aktivierte THP-1 Zellen mit grafischer Darstellung einer Regressionsanalyse.. | 43 |
| Abbildung 16 Einfluss dreimaliger Bestrahlung auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit PMA..... | 45 |
| Abbildung 17 Einfluss dreimaliger Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm auf die Aktivierung von THP-1 Zellen..... | 46 |
| Abbildung 18 Einfluss dreimaliger Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm auf die Aktivierung von THP-1 Zellen..... | 47 |

| | |
|---|-----------|
| Abbildung 19 Einfluss dreimaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 474 nm auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit grafischer Darstellung einer Regressionsanalyse | 48 |
| Abbildung 20 Einfluss dreimaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 453 nm auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit grafischer Darstellung einer Regressionsanalyse | 49 |
| Abbildung 21 Vergleich der Wirkung einmaliger mit dreimaliger Bestrahlung auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm | 50 |
| Abbildung 22 Vergleich der Wirkung einmaliger mit dreimaliger Bestrahlung auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm | 51 |
| Abbildung 23 Einfluss einmaliger Bestrahlung auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit Entzug von PMA nach 4 Stunden | 53 |
| Abbildung 24 Boxplot - Darstellung des Einflusses einmaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 474 nm auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit Entzug von PMA nach 4 Stunden | 54 |
| Abbildung 25 Boxplot - Darstellung des Einflusses einmaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 453 nm auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit Entzug von PMA nach 4 Stunden | 55 |
| Abbildung 26 Einfluss einmaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 474 nm auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit Entzug von PMA nach 4 Stunden mit grafischer Darstellung einer Regressionsanalyse | 56 |
| Abbildung 27 Einfluss einmaliger Bestrahlung einer Wellenlänge von 453 nm auf die Aktivierung von THP-1 Zellen mit Entzug von PMA nach 4 Stunden mit grafischer Darstellung einer Regressionsanalyse | 57 |
| Abbildung 28 Proliferationsverlauf unter dem Einfluss täglicher Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 474 nm | 58 |
| Abbildung 29 Proliferationsverlauf unter dem Einfluss täglicher Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 474 nm | 59 |
| Abbildung 30 Proliferationsverlauf unter dem Einfluss täglicher Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 453 nm | 60 |
| Abbildung 31 Proliferationsverlauf unter dem Einfluss täglicher Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 453 nm | 61 |

| | |
|--|-----------|
| Abbildung 32 Isolierter Darstellung der relativen Zellzahl nach der 5. Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 474 nm und 453 nm | 62 |
| Abbildung 33 Ergebnisse der Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Apoptoserate von THP-1 Zellen nach Blaulichtexposition mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm..... | 64 |
| Abbildung 34 Ergebnisse der Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Apoptoserate von THP-1 Zellen nach Blaulichtexposition mit blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm..... | 65 |
| Abbildung 35 Apoptoserate in % nicht aktivierter THP-1 Zellen nach einmaliger Bestrahlung | 66 |
| Abbildung 36 Apoptoserate in % nicht aktivierter THP-1 Zellen nach der 2. Bestrahlung | 67 |
| Abbildung 37 Fluoreszenzfärbung der THP-1 Zellen mit Hoechst und Propidiumiodid..... | 68 |
| Abbildung 38 Versuchsaufbau des Zytokin - Versuchs..... | 71 |
| Abbildung 39 IL-1β Produktion aktivierter und mit Zytokinen stimulierter THP-1 Zellen nach Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm | 72 |
| Abbildung 40 IL-1β Produktion aktivierter und mit Zytokinen stimulierter THP-1 Zellen nach Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm | 73 |
| Abbildung 41 IL-8 Produktion nicht-aktivierter und mit Zytokinen stimulierter THP-1 Zellen nach Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm | 74 |
| Abbildung 42 IL-8 Produktion aktivierter und mit Zytokinen stimulierter THP-1 Zellen nach Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 474 nm | 75 |
| Abbildung 43 IL-8 Produktion aktivierter und mit Zytokinen stimulierter THP-1 Zellen nach Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm | 76 |
| Abbildung 44 IL-1β Produktion aktivierter und mit TNFα stimulierter THP-1 Zellen unter dem Einfluss der Blaulichtexposition einer Wellenlänge von 474 nm und 453 nm..... | 77 |
| Abbildung 45 IL-8 Produktion aktivierter und mit TNFα stimulierter THP-1 Zellen unter dem Einfluss der Blaulichtexposition einer Wellenlänge von 474 nm und 453 nm..... | 78 |

Anhang

Tabelle 8 p-Werte für die Versuchsreihe "Einfluss einmaliger Bestrahlung unterschiedlicher Dosen und Wellenlänge auf die Aktivierung der THP-1 Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat"

| | 474 nm | 453 nm |
|---|----------|----------|
| | p-Werte | p-Werte |
| Kontrolle mit 5 J/cm ² | 0,49 | 0,01 |
| Kontrolle mit 10 J/cm ² | 7,87E-06 | 1,38E-07 |
| Kontrolle mit 20 J/cm ² | 1,06E-07 | 6,91E-12 |
| Kontrolle mit 40 J/cm ² | 3,77E-08 | 2,16E-13 |
| Kontrolle mit 80 J/cm ² | 2,36E-09 | 4,34E-25 |
| 5 J/cm ² mit 10 J/cm ² | 7,52E-05 | 2,12E-05 |
| 5 J/cm ² mit 20 J/cm ² | 4,16E-07 | 3,37E-12 |
| 5 J/cm ² mit 40 J/cm ² | 6,95E-08 | 2,48E-14 |
| 5 J/cm ² mit 80 J/cm ² | 1,14E-09 | 6,32E-36 |
| 10 J/cm ² mit 20 J/cm ² | 7,14E-02 | 2,30E-06 |
| 10 J/cm ² mit 40 J/cm ² | 1,35E-02 | 6,49E-12 |
| 10 J/cm ² mit 80 J/cm ² | 1,75E-04 | 5,34E-27 |
| 20 J/cm ² mit 40 J/cm ² | 4,47E-01 | 2,57E-06 |
| 20 J/cm ² mit 80 J/cm ² | 2,33E-02 | 1,11E-20 |
| 40 J mit 80 J | 1,23E-01 | 8,39E-11 |

Tabelle 8 – Auflistung der p-Werte für die Versuchsreihe „Einfluss einmaliger Bestrahlung unterschiedlicher Dosen und Wellenlänge auf die Aktivierung der THP-1 Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat“ für die Wellenlänge 474 nm und 453 nm.

Tabelle 9 p-Werte für die Versuchsreihe "Einfluss einmaliger Bestrahlung unterschiedlicher Wellenlänge und Dosis auf aktivierte THP-1 Zellen "

| | 474 nm | 453 nm |
|--|----------|----------|
| | p-Werte | p-Werte |
| Kontrolle mit 5 J/cm ² | 5,11E-03 | 8,57E-09 |
| Kontrolle mit 10 J/cm ² | 1,97E-03 | 3,63E-12 |
| Kontrolle mit 20 J/cm ² | 2,18E-04 | 4,51E-12 |
| Kontrolle mit 40 J/cm ² | 1,54E-05 | 1,06E-11 |
| Kontrolle mit 80 J/cm ² | 4,51E-05 | 2,04E-13 |
| 5 J/cm ² mit 10 J/cm ² | 0,65 | 1,18E-06 |

| | | |
|---|----------|----------|
| 5 J/cm ² mit 20 J/cm ² | 0,13 | 1,34E-11 |
| 5 J/cm ² mit 40 J/cm ² | 0,01 | 1,97E-12 |
| 5 J/cm ² mit 80 J/cm ² | 2,11E-03 | 2,26E-16 |
| 10 J/cm ² mit 20 J/cm ² | 0,27 | 1,75E-07 |
| 10 J/cm ² mit 40 J/cm ² | 0,03 | 7,84E-10 |
| 10 J/cm ² mit 80 J/cm ² | 4,75E-03 | 1,36E-13 |
| 20 J/cm ² mit 40 J/cm ² | 0,29 | 9,12E-07 |
| 20 J/cm ² mit 80 J/cm ² | 0,04 | 4,44E-11 |
| 40 J mit 80 J | 0,17 | 4,41E-03 |

Tabelle 9 - Auflistung der p-Werte für die Versuchsreihe „Einfluss einmaliger Bestrahlung unterschiedlicher Wellenlänge und Dosis auf aktivierte THP-1 Zellen“ für die Wellenlänge 474 nm und 453 nm.

Tabelle 10 p-Werte für die Versuchsreihe "Einfluss dreimaliger Bestrahlung unterschiedlicher Wellenlänge und Dosis auf die Aktivierung von THP-1 Zellen"

| | 474 nm | 453 nm |
|---|----------|----------|
| | p-Werte | p-Werte |
| Kontrolle mit 5 J/cm ² | 8.00E-07 | 0.000104 |
| Kontrolle mit 10 J/cm ² | 1.43E-10 | 4.96E-07 |
| Kontrolle mit 20 J/cm ² | 4.36E-11 | 1.07E-05 |
| Kontrolle mit 40 J/cm ² | 3.03E-06 | 8.79E-11 |
| Kontrolle mit 80 J/cm ² | 7.94E-10 | 3.18E-21 |
| 5 J/cm ² mit 10 J/cm ² | 0.016667 | 0.05923 |
| 5 J/cm ² mit 20 J/cm ² | 6.59E-05 | 0.00231 |
| 5 J/cm ² mit 40 J/cm ² | 0.000123 | 3.30E-10 |
| 5 J/cm ² mit 80 J/cm ² | 7.09E-10 | 3.83E-09 |
| 10 J/cm ² mit 20 J/cm ² | 0.001986 | 0.032032 |
| 10 J/cm ² mit 40 J/cm ² | 0.000625 | 1.33E-09 |
| 10 J/cm ² mit 80 J/cm ² | 1.97E-08 | 2.35E-09 |
| 20 J/cm ² mit 40 J/cm ² | 0.003044 | 0.00136 |
| 20 J/cm ² mit 80 J/cm ² | 7.39E-08 | 0.000192 |
| 40 J mit 80 J | 0.021269 | 0.043232 |

Tabelle 10 - Auflistung der p-Werte für die Versuchsreihe „Einfluss dreimaliger Bestrahlung unterschiedlicher Wellenlänge und Dosis auf die Aktivierung von THP-1 Zellen“ für die Wellenlänge 474 nm und 453 nm.

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Christoph V. Suschek und dem gesamten Laborteam, insbesondere Samira Seghrouchni, Jutta Schneider und Christa Wilkens, die mir auf dem Weg zur Promotion immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Besonderen Dank gilt meinen Eltern, Monika und Dr. Jürgen Pierchalla, die mich mit ihrer unermüdlichen Unterstützung motivieren und mich an meine Ziele bringen.