

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Untersuchungen zur Modulation
ausgewählter, wundheilungsrelevanter
Parameter am humanen Fibroblasten-
und Keratinozyten-Modell
durch LED-*low level light therapy*

Dissertation

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

vorgelegt von

Alexander Tomescu

2020

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

gez.:

Dekan: Prof. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Christoph Suschek

Zweitgutachter: PD Dr. Czaba Mahotka

Widmung

Mein Schaffen und meine Kraft möchte ich im Sinne des Gemeinwohls einsetzen, sowie in Wertschätzung gegenüber jenen, sich mir anvertrauenden Menschen und gegenüber mir selbst das Ethos unseres Berufsstandes nach außen hin vertreten.

Die politischen Zustände bilden Ausgangsbasis unseres ärztlichen Handelns und wir können jene durch unser Schaffen verändern, neu definieren und so unser aller Zukunft gestalten.



Gustave Moreau, Hesiod und die Muse, 1891
bpk Berlin | RMN - Grand Palais | Hervé Lewandowski

Zusammenfassung

Mittlerweile gilt als wissenschaftlich bewiesen, dass *low-level light therapy (LLLT)* verschiedene biologische Effekte vermittelt, welche therapeutisch nutzbar sind. Dazu gehören die verbesserte Wundheilung, sowie die Prävention hypertropher Narbenbildung.

In der wissenschaftlichen Literatur zur *LLLT* wird eine Inkonsistenz und partielle Widersprüchlichkeit der Ergebnisse beobachtet, welche in aktuellen Untersuchungen einer fehlenden Standardisierung hinsichtlich Methodik, angewandter Parameter, sowie deren Feinabstimmung aufeinander und auf das zu behandelnde Gewebe zugerechnet werden. Dies hat dazu geführt, dass die *LLLT* bisher keine breite und regelhafte klinische Anwendung gefunden hat.

Am Zell- und Molekularbiologischen Labor der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie am Universitätsklinikum Düsseldorf konnten bereits proliferationsreduzierende Einflüsse blauen Lichtes (im Wellenlängenbereich von 410 nm bis 453 nm) an primären Fibroblasten aus menschlicher Haut beobachtet werden.

Ziel der Arbeit war es anhand primärer Fibroblasten, sowie Keratinozyten aus menschlicher Haut den eventuell proliferations-, sowie migrationsreduzierenden Einfluss dreier weiterer Farben aus dem Spektrum sichtbaren Lichts, nämlich Grün (524 nm), Gelb (599 nm) und Rot-Orange (632 nm), zu untersuchen. Als Strahlenquellen dienten prototypische schmalbandige LED-Systeme.

Vor oben genanntem Hintergrund wurde zudem eine Optimierung und Standardisierung angewandter Untersuchungsmethodik, sowie Therapieparameter angestrebt.

Dazu wurden Fibroblasten in *multiwell*-Platten ausgesät und ihr Proliferationsverhalten in jeweils fünftägigen Versuchen in Abhängigkeit von applizierter Lichtfarbe und Bestrahlungsdosis (*H*) fluorometrisch (mittels *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay*) untersucht.

Die Untersuchung der keranozytären, wie fibroblastären Migration erfolgte in jeweils vierzigstündigen Versuchen mittels *ibidi® Wound Healing Assay* auf analoge Weise. Zusätzlich zu oben genannten Farben wurde zur Untersuchung der Zellmigration auch blaues Licht (453 nm) angewandt.

Um die Besonderheiten des Alterungsprozesses, mit dem oft erschwerten Heilungsverlauf kutaner Wunden, zu berücksichtigen, wurde die replikative Seneszenz als Alterungsmodell genutzt und Versuche wurden, soweit möglich, auch mit derart *in vitro* gealterten Zellen durchgeführt.

Im Hinblick auf die jeweils fünftägige Untersuchung der zellulären Proliferation anhand primärer Fibroblasten aus menschlicher Haut konnte bei Applikation von grünem, gelbem, sowie rot-orangenem Licht mittels verwendeter LED-Systeme durchschnittlich bereits bei täglicher Anwendung einer geringen Bestrahlungsdosis von etwa 10 J/cm^2 (*low-dose*-Bereich) eine signifikante Reduktion der Zellproliferation um etwa 10 % gegenüber der Kontrolle festgestellt werden.

Dieser Effekt konnte bei Anwendung höherer Bestrahlungsdosen meist gesteigert werden und fiel bei, durch replikative Seneszenz *in vitro*, gealterten Zellen geringer aus.

Im Hinblick auf die jeweils vierzigstündige Untersuchung der zellulären Migration anhand primärer Fibroblasten, sowie Keratinozyten aus menschlicher Haut, waren, abhängig von betrachtetem Zelltyp, Zellalter, sowie applizierter Bestrahlungsdosis, modulierende Effekte durch Anwendung bezeichneter LED-Systeme erkennbar, doch, hinsichtlich der Wirkung, kein einheitlicher Trend herausstellbar.

Insgesamt ist im Zuge vorliegender Arbeit der Beweis gelungen, dass die LED-*low-level light therapy* mit schmalbandigem grünem, gelbem, sowie rot-orangenem Licht, bei Anwendung genannter Parameter, bereits im Niedrigdosis-Bereich die Proliferation primärer Fibroblasten aus der menschlichen Haut reduziert und somit einen neuen Ansatz zur Prävention und *early-stage*-Therapie hypertropher Narben und Keloide darstellen könnte.

Abstract

It is scientifically well proven that low-level light therapy (LLLT) mediates various biological effects, which can be used therapeutically. Among those are an improved wound healing as well as the prevention of hypertrophic scarring.

There are inconsistent and partially even conflicting results reported in literature, which are, in current research, attributed to a lack of standardization regarding methodology, the usage of appropriate parameters and the precise adjustment of those on each other and on the treated tissue as well. Thus LLLT is not used widely and on regular basis in clinical practice up to date.

The Orthopaedic and Trauma Research Group at the Department for Orthopaedics and Trauma Surgery at the University Hospital Düsseldorf has been able to demonstrate that blue light (ranging from 410 nm to 453 nm) reduces the proliferation of human skin fibroblasts.

Purpose of this work has been to identify if light of three additional colours out of the visible spectrum, namely green (524 nm), amber (599 nm) and red-orange (632 nm), might have reductive effects on the proliferation and migration of primary human skin fibroblasts and keratinocytes. Prototypical narrow-band LED-devices were employed as radiation sources.

Against the above mentioned background, it has been aspired to optimise and standardize the methodology and parameters applied in this work.

Fibroblasts were seeded in multiwell plates and the proliferation was examined fluorimetrically in wavelength and dose dependent manner in five-day experiments (using *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay*).

The migration of fibroblasts and keratinocytes was assessed in forty-hour experiments using *ibidi® Wound Healing Assay*. Additionally to the three colours mentioned above, blue light (453 nm) has been used in the analysis of migration.

Cutaneous wound healing is often impaired by old age. Thus replicative senescence has been used as a model for aging and the experiments have additionally been conducted with *in vitro* aged cells, as far as possible.

Regarding the examination of cellular proliferation in the course of five days, using primary fibroblasts from human skin, a significant reduction of about 10 % has been demonstrated by the daily application of 10 J/cm² (low-dose) with all three light colours (green, amber and red-orange).

The effect was gradable by applying higher doses and reduced by application on aged cells.

Regarding the examination of cellular migration in the course of forty hours, using primary fibroblasts and keratinocytes from human skin, modulatory effects of light-application were asserted throughout the usage of all colours, but no consistent trend has been determined.

Overall it has been possible to prove that LED-low-level light therapy, using narrow-band light of green, amber and red-orange colour in the applied parameters, reduces the proliferation of primary fibroblast from human skin already at low dose and thus might be a new approach in the prevention and early-stage-therapy of hypertrophic scars and keloids.

Abkürzungsverzeichnis

CO₂ ▪ Kohlenstoffdioxid

DMEM ▪ *Dulbecco's modified Eagle medium*

DMSO ▪ Dimethylsulfoxid

DPBS ▪ *Dulbecco's balanced salt solution*

EDTA ▪ Ethylendiamintetraacetat

FCS ▪ fetales Kälberserum

Keratinocyte-SFM ▪ *Keratinocyte serum-free medium*

LLLT ▪ *low-level light therapy*

MW ▪ Mittelwert

O₂ ▪ Sauerstoff

PBM ▪ *photobiomodulation*

PBS ▪ phosphate buffered saline

TGF-β ▪ *transforming growth factor β*

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
<i>Abstract</i>	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. Einleitung.....	1
1.1. Haut (<i>Cutis</i>)	1
1.1.1. <i>Epidermis</i>	1
1.1.2. <i>Dermis</i>	2
1.1.3. <i>Subcutis</i>	2
1.2. Hautalterung.....	3
1.2.1. Hautalterung in Zellkultur.....	3
1.3. Kutane Wundheilung.....	5
1.4. <i>Low-level light therapy</i>	7
2. Ziele der Arbeit.....	8
3. Material und Methoden.....	10
3.1. Material	10
3.1.1. Geräte.....	10
3.1.2. Software	11
3.1.3. Lösungen, Substanzen und Verbrauchsmaterialien.....	11
3.1.4. Eigens hergestellte Lösungen.....	12
3.1.5. Biologisches Material	13
3.2. Zellkultur	14
3.2.1. Aufbereitung von Vollhaut zur Keratinozyten- und Fibroblastenisolation	15
3.2.2. Weitergehende Keratinozytenisolation aus Vollhaut	16
3.2.3. Weitergehende Fibroblastenisolation aus Vollhaut.....	17
3.2.4. Keratinozytenisolation aus Spalthaut	17
3.2.5. Routinemethoden zur allgemeinen Handhabung der Zellkultur.....	18
3.2.6. Replikative Seneszenz.....	21
3.3. Proliferationsversuche	22
3.3.1. Versuchsaufbau, Bestrahlungsdosen, sowie Ablauf eines Versuchstages	22
3.3.2. Aussäen einer definierten Zellzahl.....	25
3.3.3. Prinzip und Durchführung des <i>CellTiter-Blue® Cell Viability Assay</i>	27
3.3.4. Mathematische Auswertung der Versuchsergebnisse	29
3.3.5. (Fluoreszenz-)Mikroskopische Aufnahmen bei Versuchsende an Tag 5	35
3.4. Migrationsversuche	37
3.4.1. Versuchsaufbau, Bestrahlungsdosen, sowie Ablauf des Versuches.....	38
3.4.2. Graphische und mathematische Auswertung der Versuchsergebnisse.....	40

3.5.	Statistische Auswertung	46
4.	Ergebnisse.....	47
4.1.	Proliferationsversuche	47
4.1.1.	Applikation von grünem Licht auf juvenile Zellen	48
4.1.2.	Applikation von grünem Licht auf seneszente Zellen	50
4.1.3.	Applikation von gelbem Licht auf juvenile Zellen	52
4.1.4.	Applikation von gelbem Licht auf seneszente Zellen	54
4.1.5.	Applikation von rot-orangenem Licht auf juvenile Zellen.....	56
4.1.6.	Applikation von rot-orangenem Licht auf seneszente Zellen.....	58
4.1.7.	(Fluoreszenz-)Mikroskopische Aufnahmen bei Versuchsende an Tag 5	60
4.2.	Migrationsversuche	63
4.2.1.	Applikation von blauem Licht auf Fibroblasten	64
4.2.2.	Applikation von grünem Licht auf Fibroblasten	66
4.2.3.	Applikation von gelbem Licht auf Fibroblasten	68
4.2.4.	Applikation von rot-orangenem Licht auf Fibroblasten.....	70
4.2.5.	Applikation von grünem Licht auf Keratinozyten	72
4.2.6.	Applikation von gelbem Licht auf Keratinozyten	74
4.2.7.	Applikation von rot-orangenem Licht auf Keratinozyten	76
5.	Diskussion.....	78
5.1.	Forschung an LED-basierten Systemen zur <i>LLLT</i>	78
5.2.	Proliferationsuntersuchung und angewandte Methodik	79
5.3.	Migrationsuntersuchung und angewandte Methodik.....	82
5.4.	Ausblick	85
5.5.	Schlussfolgerungen	86
6.	Literatur- und Quellenverzeichnis	88
7.	Anhang.....	90
7.1.	Detaillierte Formulierung von <i>DMEM</i>	90
7.2.	Detaillierte Formulierung von <i>PBS</i>	91
7.3.	Detaillierte Formulierung von <i>DPBS</i>	92
7.4.	Experimentelle Bestimmung der minimalen Einsaatdichte.....	93
	Danksagung	96

1. Einleitung

Beschrieben wird der Aufbau der menschlichen Haut (*Cutis*) (vgl. 1.1), inkl. ihrer Schichtung (*Epidermis*, *Dermis* und *Subcutis* i.w.S.), der Vorgang der Hautalterung, *in vivo*, wie in Zellkultur (vgl. 1.2), der Vorgang physiologischer Wundheilung (vgl. 1.3), sowie die *low-level light therapy* kontextuiert, inkl. ihres technischen Hintergrundes, des biologischen Wirkmechanismus und der möglichen therapeutischen Nutzbarkeit (vgl. 1.4).

1.1. Haut (*Cutis*)

Die Haut (*Cutis*) ist das größte Organ des menschlichen Körpers und bildet die Grenzfläche zwischen Körperinnerem und der Umgebung. Zusammen mit der darunter liegenden Unterhaut (*Subcutis*), bildet sie das *Integumentum commune*, das in seiner Gesamtheit etwa 15 % des Körpergewichtes ausmacht. Bei einer Person durchschnittlicher anatomischer Konstitution mit einem angenommenen Körpergewicht von 70 kg, hätten *Cutis* und *Subcutis* zusammengenommen ein Gewicht von 13 kg und eine Fläche von etwa 2 m² [1, page 141].

Die *Cutis* besteht aus der Oberhaut (*Epidermis*) und der Lederhaut (*Dermis*). Zur *Cutis* gehören weiterhin die Hautanhangsgebilde, i.E. Haare, Nägel und Drüsen [2, Band 2, Seite 776].

Anhand ihrer Oberflächenstruktur wird zwischen der dickeren Leistenhaut, welche an Hand- und Fußsohlen ein spezifisches Leistenmuster bildet und der dünneren Felderhaut unterschieden, welche den Großteil des Körpers bedeckt und im Gegensatz zur Leistenhaut über Haare verfügt.

1.1.1. *Epidermis*

Die *Epidermis* ist ein mehrschichtig, verhorntes Plattenepithel, welches zu etwa 90 % [2, Band 2, Seite 780] aus Keratinozyten besteht. Weitere Zellen der *Epidermis* sind Melanozyten, Langerhans-Zellen, (Lymphozyten) und Merkel-Zellen [1, page 141] - auf diese soll im Zuge vorliegender Arbeit jedoch kein weiterer Bezug genommen werden.

Die Keratinozyten der *Epidermis* erneuern sich physiologischer Weise im Laufe von 4 Wochen (sog. *turn-over-Zeit*). Dabei bilden sie spezifische Differenzierungsstadien, welche zur typischen Schichtung der *Epidermis* führen. Von basal, nach apikal zur Oberfläche hin werden *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum*, *Stratum lucidum* (nur in Leistenhaut) und *Stratum corneum* unterschieden [3, Seiten 466-7].

Die ersten drei Schichten bestehen aus lebenden, metabolisch aktiven Zellen, *Stratum lucidum* und *Stratum corneum* aus toten Epithelzellen. Ausgangspunkt besagten Differenzierungsprozesses sind Stammzellen in der basalen Epithelschicht, dem *Stratum basale*, Endpunkt ist die Hornschicht, das *Stratum corneum*, das aus mehreren Lagen kern- und organelloser Zellen zusammengesetzt ist und zu etwa 80 % aus dem Intermediärfilament Keratin besteht [1, page 141, 3, Seite 469].

1.1.2. *Dermis*

Die *Dermis* ist der bindegewebige Teil der *Cutis*. Hauptzelltyp der *Dermis* sind Fibroblasten [2, Seite 108]. Diese bilden in der *Dermis*, wie allgemein im Bindegewebe üblich, keinen geschlossenen Gewebeverband, sondern sind durch die extrazelluläre Substanz (auch extrazelluläre Matrix) voneinander getrennt [3, Seite 90]. Die extrazelluläre Matrix wird größtenteils von Fibroblasten selbst synthetisiert und besteht im Einzelnen aus Bindegewebsfasern (Kollagen-, sowie elastische Fasern) und der Grundsubstanz (Glykosaminoglykane, Proteoglykane und Glykoproteine) [2, Seiten 108, 12, 17].

Kollagen ist quantitativ das wichtigste Protein des Körpers, es macht etwa 25 % der Gesamtproteinmasse aus. In der *Dermis* kommen hauptsächlich Kollagen Typ I (80 %) und Kollagen Typ III (20 %) vor [1, page 146, 3, Seite 100].

Es werden zwei Schichten der *Dermis* unterschieden, *Stratum papillare*, sowie *Stratum reticulare*. Das *Stratum papillare* besteht aus lockerem, kollagenem Bindegewebe (überwiegend dünneres Kollagen, Typ III) und umfasst die dermalen Papillen, welche in die *Epidermis* ragen und von den sog. Reteleisten der *Epidermis* umfasst werden. Daraus resultiert eine Verzahnung der beiden *Cutis*-Schichten. Das *Stratum reticulare* besteht aus straffem, geflechtartigem Bindegewebe (überwiegend dickeres Kollagen, Typ I, sowie elastische Fasern). Hauptfunktion dieser Schicht ist die mechanische Festigung der Haut bei gleichzeitig bestehender Dehnbarkeit [2, Band 2, Seite 776, 3, Seite 474].

Die *Dermis* ist im Gegensatz zur *Epidermis* gefäßführend und stellt auch die Ernährung selbiger sicher.

Epidermis und *Dermis* werden von der sog. Basalmembran getrennt. Die Basalmembran ist ein Begriff der Lichtmikroskopie. Sie lässt sich elektronenmikroskopisch weiter in die Basallamina und die *Lamina fibroreticularis* differenzieren. Nahezu alle Komponenten der Basalmembran werden von der *Epidermis* gebildet [1, page 34]. Sie spielt im Rahmen der Wundheilung eine besondere Rolle.

An dieser Stelle sei begrifflich auf Folgendes verwiesen: Der Suffix „-blast“ bezeichnet üblicherweise eine Stammzelle [2, Band 1, Seite 108]. Jedoch bezeichnet der Begriff „Fibroblast“ sowohl in der englisch- [1, page 35], als auch in der deutschsprachigen [3, Seite 92] Literatur besonders (Synthese-) aktive Zellen, wohingegen diese im ruhenden Zustand eher als „Fibrozyten“ bezeichnet werden. In vorliegender Arbeit wird somit, in üblicher Weise, stets der Begriff „Fibroblast“ verwendet.

1.1.3. *Subcutis*

Die *Subcutis* wird in der anatomischen Nomenklatur nicht zur Haut (*Cutis*) im engeren Sinne gezählt, stellt jedoch eine funktionelle Einheit mit dieser dar und soll daher an dieser Stelle Erwähnung finden. Sie besteht hauptsächlich aus Fettgewebe (Adipozyten) und wird durch Bindegewebssepten unterteilt, welche die *Cutis* mit tiefen gelegenen Strukturen, wie Faszien und Periost verbinden [2, Band 2, Seite 776].

1.2. Hautalterung

Etwa ab dem 30. Lebensjahr kommt es in der Haut (*Cutis*) zu Veränderungen in Funktion, Struktur und Aussehen. Diese spiegeln den normalen Alterungsprozess wieder (*intrinsic ageing*) und führen zu epidermaler, wie dermalen Atrophie.

Zwar nimmt die Dicke des verhornten *Stratum corneum* nicht ab, doch die Anzahl der übrigen *Epidermis*-Schichten und somit ihre Gesamtdicke. Weiterhin sinkt die Proliferationsrate der *Epidermis* um bis zu 50 % und es kommt zu einem Verlust der Reteleisten, sodass sich die Adhäsion von *Epidermis* und *Dermis* reduziert.

Aufgrund der abnehmenden Zahl von Fibroblasten und einer Reduktion der Kollagensynthese nimmt die Dicke der *Dermis* und somit ihre mechanische Festigkeit, wie Elastizität ebenso ab [1, page 158].

Neben dem *intrinsic ageing* resultiert aus der Exposition der Haut gegenüber ultraviolettem Licht das sog. *extrinsic ageing* (auch *photoageing*). Ultraviolettes Licht führt in höheren Dosen zu Gewebe- sowie DNA-Schäden in der *Cutis*, induziert die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale und hat kanzerogene Wirkung [1, page 158].

1.2.1. Hautalterung in Zellkultur

Im Jahr 1961 bewiesen Hayflick und Moorhead, dass menschliche Zellen in Kultur nur begrenzt teilungsfähig und nicht unsterblich sind, wie bis dahin angenommen. Dieses Phänomen interpretierten sie als Alterungsprozess (Seneszenz) auf zellulärer Ebene und bezeichneten es als *phase III phenomenon* [4, *passim*]. Seit 1974 wird für die limitierte Replikationsfähigkeit von Zellen primären Ursprungs auch die Bezeichnung *Hayflick limit* verwendet.

An dieser Stelle sei begrifflich darauf verwiesen, dass im ursprünglichen Sinne Zellen nur so lange als Primärkulturzellen bezeichnet wurden, bis diese das erste Mal passagiert wurden. Heutzutage wird eine Zellkultur aus primärem Gewebe - in begrifflicher Abgrenzung zur permanenten Zellkultur aus maligne-transformiertem Gewebe (Zelllinie) - oft unabhängig von Passage-Zahl, als Primärkultur bezeichnet [5, Seite 16].

Der Alterungsprozess gilt, sowohl auf zellulärer Ebene, als auch auf jener des gesamten Organismus, als komplex und kann nicht durch einen einzigen Mechanismus erklärt werden [6, Seiten 70-1]. Dennoch erscheint die Dominanz eines der beteiligten Mechanismen möglich.

In diesem Kontext gilt die Verkürzung der Telomere als essentiell. Telomere stellen die Enden der eukaryotischen Chromosomen dar und werden bei jeder Replikation durch den zugrunde liegenden Mechanismus verkürzt [6, Seiten 69, 72].

In der Gerontologie existiert bisher kein allgemein anerkanntes Maßsystem für biologisches Alter und ebenso ist die Telomerenlänge nicht als Marker für jenes etabliert [6, Seite 73]. Dennoch ist die (der Telomerenverkürzung geschuldete) begrenzte Replikationsfähigkeit von Zellen in Kultur ein häufig verwendetes und etabliertes Modell der humanen Alterung *in vitro* [7, pages 547-8, 8, page 10614].

Früher wurde eine negative Korrelation zwischen der replikativen Lebensdauer von Zellen und dem Spenderalter, angenommen. Diese galt insbesondere für Fibroblasten als gegeben, an welchen diese Beobachtungen ursprünglich erhoben wurden. Neueren Untersuchungen zufolge ist diese Ansicht jedoch nicht mehr haltbar [8, page 10614].

Insgesamt ist die Beziehung zwischen replikativer Seneszenz *in vitro* und dem Alterungsprozess *in vivo* umstritten [6, Seite 70], doch gilt die replikative Seneszenz weiterhin als geeignetes und

aussagekräftiges Alterungsmodell [8, *page* 10619], insbesondere in Fibroblasten-Kultur. Nicht auszuschließen ist jedoch, dass es diesbezüglich Unterschiede bei verschiedenen Zell-Typen gibt. [6, Seite 70].

1.3. Kutane Wundheilung

Unter einer Verwundung der Haut ist die Verletzung von *Epidermis* und darunter liegender *Dermis* zu verstehen. Physiologisches Endresultat der kutanen Wundheilung ist in der Regel eine Narbe, welche den entstandenen Wunddefekt auffüllt. Dennoch ist Narben- ggb. dem ursprünglichen Gewebe biomechanisch von minderer Qualität, eine Regeneration der Hautanhangsgebilde erfolgt nicht [1, page 158].

In die kutane Wundheilung sind verschiedene Zelltypen, Signalmoleküle, sowie Matrixproteine eingebunden. Allgemein wird zwischen vier, zeitlich ineinander übergehende, Phasen unterschieden: Hämostase, Inflammation, Proliferation und *Remodelling*.

Unter dem Begriff Hämostase werden jene Prozesse zusammengefasst, welche einer Beendigung der Blutung, als Folge der kutanen Verwundung, dienen. Unterschieden wird zwischen primärer Hämostase, welche zur Thrombozytenaggregation führt (Bildung des sog. weißen Thrombus), sowie sekundärer, welche letztlich durch die Einlagerung von Erythrozyten in ein Fibrin-Netzwerk (Gerinnungsfaktor Ia) im stabilen Wundverschluss (dem sog. roten Thrombus) resultiert [9, Seiten 181-4].

Im Zuge der Inflammation werden neutrophile Granulozyten, sowie Makrophagen durch diverse chemotaktische Signale angelockt, aktiviert und wandern so in die zuvor gebildete, provisorische Matrix ein. Sie wenden sich gegen pathogene Erreger, bauen, im Fall der Makrophagen, Gewebetrümmern ab und sezernieren selbst weitere Mediatoren, welche residente Endothelzellen, Fibroblasten, sowie Keratinozyten aktivieren [1, page 158].

In der proliferativen Phase erfolgt die Reepithelialisierung durch Keratinozyten, sowie die Bildung von Granulationsgewebe durch Fibroblasten und Endothelzellen. Dabei bedecken von den Wundrändern einwandernde und proliferierende Keratinozyten die Wundoberfläche und etablieren eine neue Basallamina. Fibroblasten synthetisieren eine neue extrazelluläre Matrix (*neo-matrix*), welche *primär* hauptsächlich aus Grundsubstanz, darunter dem Glycosaminoglykan Hyaluronan (auch Hyaluronsäure) und dem Glykoprotein Fibronectin besteht. Durch diese Matrix können an der Auffüllung des Wunddefekts beteiligten Zellen leicht migrieren. Endothelzellen formen innerhalb des Granulationsgewebes Kapillaren (Angiogenese) [1, pages 158-9, 3, Seiten 98-9].

Noch einige Zeit nach Verschluss des Wunddefekts verändern Fibroblasten die Zusammensetzung der neu entstandenen extrazellulären Matrix. Dies wird als *Remodelling* bezeichnet. Die in der proliferativen Phase synthetisierte *neo-matrix* wird *sekundär* durch Kollagenfasern ersetzt, anfänglich durch den dünneren Kollagen Typ III und schlussendlich durch den dickeren Kollagen Typ I. Zu bemerken ist, dass die neu synthetisierten Kollagen-Fasern in kutanen Narben nur auf irreguläre Weise angeordnet sind, sodass ggb. dem Ursprungsgewebe lediglich eine Stabilität von max. 70 % erreicht wird [1, page 159].

Ein wichtiger Bestandteil des *Remodelling* ist die Wundkontraktion, welche sich in einer Annäherung der Wundränder äußert. Diese wird von Myofibroblasten vermittelt, spezialisierten Fibroblasten-ähnlichen Zellen, die in ihren Eigenschaften glatten Muskelzellen ähneln [10, *passim*]. Bisher bestand die Annahme, dass sich Myofibroblasten in Granulationsgewebe aus Fibroblasten, oder aus gemeinsamen mesenchymalen Vorläuferzellen entwickeln [11, *passim*], doch legen neuere Forschungsergebnisse nahe, dass Perizyten (engl. *vascular pericyte*) entsprechende Vorläuferzellen darstellen [1, page 35, 12, *passim*]. Perizyten sind kontraktile Zellen, die von einer Basallamina umgeben sind, einen Bestandteil der Kapillarwand darstellen und deren Durchblutung regulieren [3, Seiten 209-10].

Eine allgemein akzeptierte abschließende Anschauung hstl. der myofibroblastären Abstammung besteht jedoch zurzeit noch nicht. Vor dem Hintergrund heterogener Fibroblasten- und Myofibroblasten-Populationen in verschiedenen Geweben, wird angenommen, dass sie unterschiedlicher Abstammung sein können und evtl. die Möglichkeit zur Transdifferenzierung zwischen beiden Zelltypen besteht [11, pages 667, 9].

Im Prozess der Narbenbildung wird dem Zytokin *transforming growth factor β* (TGF- β) eine herausragende Bedeutung zugerechnet. Es sind drei Isoformen bekannt: TGF- β 1, - β 2 und - β 3. Bemerkenswerter Weise heilen kutane Hautwunden beim menschlichen Fetus vor dem 3. Trimenon narbenfrei. Aus dem Vergleich narbenlos abgeheilter kutaner Wunden beim menschlichen Fetus mit entsprechenden im erwachsenen Organismus, welche Narben gebildet hatten, wurde deutlich, dass TGF- β 1 und - β 2 in narbenlos abgeheilten fetalen Wunden nicht vorkommen. Aus diesem Grund wird angenommen, dass TGF- β 3 mit narbenloser kutaner Wundheilung assoziiert ist. TGF- β 3 wird von Fibroblasten, sowie Keratinozyten gebildet, wohingegen TGF- β 1 und - β 2 von Thrombozyten, sowie Monozyten und Makrophagen gebildet werden. Insgesamt scheint somit die Entwicklung einer Inflammation im Bereich der Hautwunde mit konsekutiver Ausschüttung von TGF- β 1 und - β 2 durch Entzündungszellen maßgeblich zur Narbenbildung beizutragen. Im fetalen Organismus ist die durch TGF- β 3 vermittelte kutane Wundheilung dagegen durch eine geringere Rekrutierung von Entzündungszellen, schnellere Reepithelialisierung, reduzierte Angiogenese, sowie einer Anordnung der neu synthetisierten Kollagenfasern in ursprünglicher, regulärer Weise gekennzeichnet [1, pages 159-60].

1.4. *Low-level light therapy*

Low-level light therapy (LLLT) oder *Photobiomodulation (PBM)* bezeichnet die Applikation von Licht im sichtbaren und unmittelbar daran angrenzenden Spektralbereich auf Gewebe in therapeutischer Absicht. Meist wird dabei Licht im roten bis infraroten Wellenlängenbereich zwischen 600 nm und 1100 nm genutzt [13, page 2, 14, pages 602-3, 15, page 2162], doch wird in der aktuellen Forschung zunehmend auch von Effekten im blauen, grünen und gelben Spektralbereich berichtet [16, *passim*, 17, pages 619-20].

Die ersten Untersuchungen dazu wurden 1967 von Mester durchgeführt. Ursprünglich wurden als Lichtquellen Laser genutzt, sodass die damalige Bezeichnung *low-level laser therapy* lautete [13, pages 1-2]. Im Laufe der Zeit stellte sich jedoch heraus, dass durch Nutzung von LEDs in der *LLLT* gleiche Effekte erzielt werden konnten und ihre Anwendung ökonomisch, wie praktisch sinnvoller war [13, pages 2, 15, pages 2163, 5]. LEDs (*light-emitting diodes*) bestehen aus einem Halbleiterbauelement und produzieren bei Durchfluss elektrischen Stroms schmalbandiges Licht definierter Wellenlänge, abhängig vom jeweils verwendeten Material [16, page 36].

Mittlerweile gilt als wissenschaftlich bewiesen, dass *LLLT* verschiedene biologische Effekte vermittelt, welche therapeutisch nutzbar sind. Dazu gehören Schmerzreduktion, Inflamationsreduktion, Verbesserung der Wundheilung, sowie Prävention hypertropher Narbenbildung [18, page 209]. Speziell zu beiden letzteren sollen die Anregung von epithelialer, sowie fibroblastärer Proliferation und Motilität, von Neoangiogenese, der Granulationsgewebsbildung und Kollagensynthese, sowie die Stimulation der Wundkontraktion beitragen [17, page 616, 19, page 130].

Der Mechanismus, welcher der Wirkung der *LLLT* zugrunde liegt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt, doch gelten diesbezüglich zwei Hypothesen als die wahrscheinlichsten. Zum einen wird angenommen, dass einfallende Photonen (auch Lichtquanten) Stickstoffmonoxid aus den Metallkomplexen (zwei Kupferzentren und zwei Hämgruppen) [20, Seiten 172-3, 739] der Cytochrom-c-Oxidase - Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette - freisetzen und dadurch der Elektronentransport, das mitochondriale Membranpotential und letztlich die Adenosintriphosphat-Produktion erhöht werden. Die zweite Hypothese geht von Licht-sensitiven Ionenkanälen aus, welche bei Aktivierung zu einem Calcium-Einstrom in die Zelle führen. Im Folgenden genannter Mechanismen kommt es zur Aktivierung verschiedener Signalwege und so zur Expression von Genen, welche mit der Proteinsynthese, Zellproliferation, Zellmigration und der Inflamationsreduktion assoziiert sind [13, pages 1-2, 4].

In der wissenschaftlichen Literatur zur biologischen Wirkung und evtl. therapeutischen Nutzbarkeit der *LLLT* wird eine Inkonsistenz und partielle Widersprüchlichkeit der Ergebnisse beobachtet. Diese werden in aktuellen Untersuchungen fehlender Standardisierung hinsichtlich Methodik, angewandter Parameter, sowie deren Feinabstimmung aufeinander und auf das zu behandelnde Gewebe zugerechnet [13, pages 3, 21, 17, pages 616-7, 9, 18, page 214, 19, page 129, 21, pages 117, 22]. Dies hat dazu geführt, dass die *LLLT* bisher keine breite und regelhafte klinische Anwendung gefunden hat.

Daher strebt die Forschung zum Gebiet der *LLLT* zunehmend die optimale Adjustierung der Parameter verwendeten Lichts zu therapeutischen Zwecken an. Im Einzelnen sind dies Wellenlänge, Bestrahlungsdosis, Bestrahlungsstärke, Emissionsart (kontinuierlich oder gepulst) und Anwendungsdauer [14, pages 604, 6, 22, page 358].

Begrifflich sei an dieser Stelle auch auf die englischen Bezeichnungen für die Bestrahlungsdosis (*H*) und die Bestrahlungsstärke (*E*) verwiesen, die in der entsprechenden Literatur häufig synonym verwendet werden. Für die Bestrahlungsstärke (*H*) sind dies *radiant exposure*, *dose*, *energy density* oder *fluence*, für die Bestrahlungsstärke (*E*) *irradiance*, *power density* oder *intensity*.

2. Ziele der Arbeit

Am Zell- und Molekularbiologischen Labor der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie am Universitätsklinikum Düsseldorf konnten bereits proliferationsreduzierende Einflüsse blauen Lichts an primären humanen Fibroblasten beobachtet werden [23, *passim*].

Ultraviolettstrahlung ist bekanntermaßen mit verschiedenen schädlichen Effekten auf die humane Haut assoziiert, welche vom sog. *extrinsic ageing* (auch *photoageing*) bis hin zu kanzerogenen Wirkungen reichen (vgl. 1.2).

Im Gegensatz dazu konnten Opländer *et. al.* zeigen, dass schmalbandiges blaues Licht (Wellenlängenbereich von 410 nm bis 453 nm) die Proliferation humaner dermaler Fibroblasten abhängig von Bestrahlungsdosis (*H*) und genauer Wellenlänge reduziert, wobei, im Kontrast zur Ultraviolettstrahlung (Wellenlänge etwa < 380 nm), toxische Effekte vermieden werden können. Die Autoren schlossen, dass blaues Licht im Bereich höherer Wellenlänge somit einen neuen Ansatz zur Prävention und *early-stage*-Therapie hypertropher Narben und Keloide darstellen könnte und verwies dezidiert auf die Relevanz der diesbezüglich exakt verwendeten Wellenlänge [23, *passim*].

Keratinocyten (*Epidermis*) und Fibroblasten (*Dermis*) stellen, wie oben beschrieben (vgl. 1.1), die beiden Hauptzelltypen der menschlichen Haut dar. In der proliferativen Phase der Wundheilung erfolgt die Reepithelialisierung durch Keratinocyten, Fibroblasten sind maßgeblich an der Bildung des Granulationsgewebes beteiligt und synthetisieren die neue extrazelluläre Matrix (vgl. 1.3).

Ziel der Arbeit sollte es sein anhand von Untersuchungen an diesen beiden Zelltypen den eventuell proliferations-, sowie migrationshemmenden Einfluss dreier weiterer Farben aus dem Spektrum sichtbaren Lichts, nämlich Grün (524 nm), Gelb (599 nm) und Rot-Orange (632 nm), zu untersuchen.

Dazu wurden Fibroblasten und Keratinocyten aus, dem Zell- und Molekularbiologischen Labor der Orthopädie und Unfallchirurgie am Universitätsklinikum Düsseldorf, vorliegenden Hautpräparaten nach ihrer jeweiligen Entnahme isoliert und bis zur ausreichenden Vermehrung in Zellkultur kultiviert.

Nach experimenteller Bestimmung der idealen Aussäzellzahl wurden Fibroblasten in *multiwell*-Platten ausgesät und ihr Proliferationsverhalten in jeweils fünftägigen Versuchen in Abhängigkeit von applizierter Lichtfarbe und Bestrahlungsdosis (*H*) fluorometrisch (mittels *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay*) untersucht.

Die Zellmigration wurde in jeweils vierzigstündigen Versuchen mittels *ibidi® Wound Healing Assay* untersucht. Dazu wurde, ebenfalls experimentell, primär die ideale Aussäzellzahl bestimmt und im Anschluss die Migration von Fibroblasten, wie auch von Keratinocyten in Abhängigkeit von der applizierten Farbe und Bestrahlungsdosis untersucht. Bei der Untersuchung der Zellmigration wurde zu oben genannten Farben zusätzlich auch blaues Licht (453 nm) in die Versuche miteinbezogen.

Als Strahlenquellen dienten prototypische schmalbandige LED-Systeme.

Im Zuge einer steigenden Lebenserwartung, sowie verkomplizierter Heilungsverläufe kutaner Wunden durch konsekutive internistische, wie dermatologische Erkrankungen, scheinen experimentelle Studien besonders relevant, welche die Besonderheiten des Alterungsprozesses berücksichtigen. Um zu untersuchen, ob besagter Einfluss von Licht sichtbarer Wellenlänge auf die Proliferation und Migration von Zellen im Zuge der humanen Wundheilung zudem auch in Abhängigkeit vom Patientenalter variiert, wurde die replikative Seneszenz als Alterungsmodell genutzt (vgl. 1.2.1) und Versuche, soweit möglich, auch mit seneszenten Zellen durchgeführt.

Um statistisch relevante Schlüsse zu ermöglichen wurde eine Fallzahl von jeweils acht untersucht.

ZIELE DER ARBEIT

Vor dem Hintergrund genannter inkonsistenter und teils widersprüchlicher Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der *LLLT*, welche aus fehlender Standardisierung hinsichtlich Methodik, angewandter Parameter, sowie deren Feinabstimmung aufeinander und auf das zu behandelnde Gewebe resultieren (vgl. 1.4), wurde in vorliegender Arbeit eine möglichst optimale Adjustierung besagter Parameter im Hinblick auf eine mögliche therapeutische Nutzbarkeit angestrebt.

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, sowie um das Fundament für die weitere effiziente und standardisierte Forschung auf diesem Gebiet zu legen, wurde ebenso ein besonderer Augenmerk auf die Methodik gelegt. Angewandte Labormethoden sollten, falls bestehend, individuell angepasst und verbessert, falls neu zu entwickeln, standardisiert werden.

3. Material und Methoden

Dargestellt werden das im Zuge vorliegender Arbeit verwendete Material (vgl. 3.1), die Vorgehensweise im Hinblick auf Zellkultur (vgl. 3.2) und auf die durchgeführten Proliferations- (vgl. 3.3) und Migrationsversuche (vgl. 3.4), sowie abschließend die angewandten statistischen Methoden (vgl. 3.5).

3.1. Material

Im Folgenden werden Geräte (vgl. 3.1.1), Software (vgl. 3.1.2), Lösungen, Substanzen und Verbrauchsmaterialien (vgl. 3.1.3), eigens hergestellte Lösungen (vgl. 3.1.4), sowie das biologische Material (vgl. 3.1.5) angegeben, welche im Zuge vorliegender Arbeit genutzt wurden.

3.1.1. Geräte

Tabelle 1 stellt eine Übersicht der im Zuge vorliegender Arbeit genutzten Geräte dar. Die Gerätebezeichnung ist links, der Hersteller rechts angegeben.

Tabelle 1: Übersicht der genutzten Geräte (Bezeichnung links, Hersteller rechts)

Absaugsystem ▪ <i>Mini-Membran-Vakuumpumpen</i> <i>LABOPORT® N 86 KT.18</i>	KNF Neuberger GmbH
Analysenwaage ▪ <i>ABJ 220-4NM</i>	KERN & Sohn GmbH
Autoklav ▪ <i>System-DX-90</i>	Systemc GmbH
Brutschrank ohne CO₂-Begasung ▪ <i>Heraeus B 6060</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
Brutschränke mit CO₂-Begasung ▪ <i>Heracell™ 150</i> ▪ <i>Heracell™ 150i</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
Eppendorf-Multipette® plus	Eppendorf AG
Fluorometer ▪ <i>Wallac 1420 Victor 3</i>	PerkinElmer, Inc.
Flüssigstickstoff-Tank ▪ <i>Locator™ 4 Plus</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
Gefrierschränke ▪ <i>FROSTER-LABO-330</i> ▪ <i>GS 801</i> ▪ <i>HERAfreeze™ HFU2585 Basic</i> ▪ <i>HT 5786</i>	▪ Liebherr-International Deutschland GmbH ▪ Philipp Kirsch GmbH ▪ Thermo Fisher Scientific Inc. ▪ Andreas Hettich GmbH & Co.KG
Kolbenhubpipetten ▪ <i>Eppendorf Research® 100 µl, 200 µl, 1 000 µl</i>	Eppendorf AG
Kühlcontainer ▪ <i>Nalgene® Mr. Frosty®</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
Kühlschrank ▪ <i>KUw 1740</i>	Liebherr-International Deutschland GmbH
Mikroskope ▪ <i>Axiovert 40 C</i> ▪ <i>Axio Vert.A1</i> ▪ <i>Axiovert 200</i>	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Mikroskopkamera ▪ <i>AxioCam MRc Rev. 3 FireWire</i>	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Pipetierhilfe ▪ <i>accu-jet® pro</i>	BRAND GMBH + CO KG
Schüttelwasserbad ▪ <i>WB 20</i>	P-D Industriegesellschaft mbH
Sterilbänke ▪ <i>EuroFlow Type EF/A5</i> ▪ <i>Herasafe™ KS 18</i>	▪ Thermo Fisher Scientific Inc. ▪ Azbil Telstar, S.L.
Strahlenquellen (LED-Systeme)	Philips Electronics Nederland B.V.

Taumelrollenmischer ▪ <i>RM 10</i>	Ingenieurbüro CAT M. Zipperer GmbH
Vortexmischer ▪ <i>Reax top</i>	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Wasserbad ▪ <i>Aqualine AL 12</i>	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG
Zählkammer ▪ <i>Neubauer - improved</i>	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG
Zentrifuge ▪ <i>Heraeus™ Megafuge™ 16R</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.

3.1.2. Software

Tabelle 2 stellt eine Übersicht der im Zuge vorliegender Arbeit genutzten Software dar. Die Softwarebezeichnung ist links, der Hersteller rechts angegeben.

Tabelle 2: Übersicht der genutzten Software (Bezeichnung links, Hersteller rechts)

<i>AxioVision V 4.9.1.0</i>	Carl Zeiss Microscopy GmbH
<i>EndNote X8.2</i>	Clarivate Analytics LLC
<i>Fiji</i>	<i>currently maintained by:</i> Curtis Rueden, Laboratory for Optical and Computational Instrumentation (LOCI) at the University of Wisconsin-Madison
<i>Microsoft® Office Excel® 2007</i>	Microsoft Corporation
<i>Wallac 1420 Software 3.00 revision 5</i>	PerkinElmer, Inc.

3.1.3. Lösungen, Substanzen und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3 stellt eine Übersicht der im Zuge vorliegender Arbeit genutzten Lösungen, Substanzen und Verbrauchsmaterialien dar. Die Produktbezeichnung ist links, der Hersteller rechts angegeben.

Tabelle 3: Übersicht der genutzten Lösungen, Substanzen und Verbrauchsmaterialien (Bezeichnung links, Hersteller rechts)

<i>Bovine Serum Albumine</i> ▪ <i>Albumin Fraktion V</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG
<i>Calcium chloride dihydrate</i>	Sigma-Aldrich Corporation
<i>Cell Scraper, 28 cm long, sterile</i>	Greiner Bio-One GmbH
<i>Cellstar® Cell Culture Dish with vents, 145 x 20 mm, sterile</i>	Greiner Bio-One GmbH
<i>Cellstar® Cell Culture Flask</i> ▪ <i>250 ml, 75 cm², Red Filter Screw Cap, sterile</i> ▪ <i>650 ml, 175 cm², Red Filter Screw Cap, sterile</i>	Greiner Bio-One GmbH
<i>Cellstar® Cellculture Microplate, 96 Well, sterile, F-bottom, with lid</i>	Greiner Bio-One GmbH
<i>Cellstar® Cellculture Multiwell Plate, 24 Well, sterile with lid</i>	Greiner Bio-One GmbH
<i>Cellstar® Tube</i> ▪ <i>15 ml, 17 x 120 mm, Conical Bottom, sterile</i> ▪ <i>50 ml, 30 x 115 mm, Conical Bottom, sterile</i>	Greiner Bio-One GmbH
<i>CellTiter-Blue® Cell Viability Assay</i> ▪ <i>CellTiter-Blue®-Reagent</i>	Promega Corporation
<i>Collagenase, Type CLS</i>	Biochrom GmbH
<i>Combitips advanced®, 10ml Volumenbereich</i>	Eppendorf AG
<i>Corning Falcon™ Cell Strainer, 40 µm, sterile</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>Corning® Costar® Shorty Stripette® serological pipettes, individually paper/plastic wrapped</i> ▪ <i>capacity 5 ml</i> ▪ <i>capacity 10 ml</i> ▪ <i>capacity 25 ml</i>	Sigma-Aldrich Corporation
<i>Culture-Inserts 2 Well</i>	ibidi GmbH
<i>D-(+)-Glucose</i>	Sigma-Aldrich Corporation
<i>Defined Trypsin Inhibitor</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.

Desinfektionsmittel ▪ <i>TechniSolv® Ethanol 70 %</i>	VWR International GmbH
<i>Dispase®, Typ II</i>	Roche Diagnostics GmbH
<i>DMEM (vgl. 7.1)</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>DMSO ≥99.5% (GC)</i>	Sigma-Aldrich Corporation
<i>DPBS (vgl. 7.3)</i>	PAN-Biotech GmbH
<i>EASYstrainer™ Cellstrainer for 50 ml Tubes, 100 µm, sterile</i>	Greiner Bio-One GmbH
<i>Einfrierampullen ▪ Cryo.s™, 2 ml</i>	Greiner Bio-One GmbH
<i>Einmalskalpelle ▪ Disposable Scalpel No. 21</i>	FEATHER® Safety Razor Co. Ltd
<i>FCS ▪ Sera Plus, Special processed FBS</i>	PAN-Biotech GmbH
<i>Glaspasteurpipetten ▪ Pasteur Pipettes Soda-lime glass</i>	Brand GmbH & Co. KG
<i>HEPES</i>	Sigma-Aldrich Corporation
<i>HEPES Buffer Solution 1M</i>	PAN-Biotech GmbH
<i>Hoechst 33342</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>Injekt® 10 ml, Luer-Ansatz</i>	B. Braun Melsungen AG
<i>Kaliumchlorid</i>	Carl Roth GmbH
<i>Keratinocyte-SFM Medium (Kit) with L-glutamine, EGF, and BPE</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>MICROTOUCH® NITRA-TEX™ Nitrile, powder-free examination gloves</i>	Ansell Ltd.
<i>Natriumchlorid</i>	VWR International GmbH
<i>PBS (vgl. 7.2)</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>Penicillin-Streptomycin ▪10 000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin</i>	PAN-Biotech GmbH
<i>Pipette Tip</i> ▪ <i>200 µl Bevelled</i> ▪ <i>1000 µl Graduated</i>	Starlab International GmbH
<i>Propidium iodide ≥ 94.0% (HPLC)</i>	Sigma-Aldrich Corporation
<i>Raucodrape® Abdecktuch, 2-lagig</i>	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG
<i>Trypan Blue solution (0,4 %)</i>	Sigma-Aldrich Corporation
<i>Trypsin Neutralizer Solution</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>Trypsin-EDTA 10X</i>	Biowest SAS

3.1.4. Eigens hergestellte Lösungen

Tabelle 4 stellt eine Übersicht der im Zuge vorliegender Arbeit genutzten, eigens hergestellten Lösungen dar, inklusive der jeweiligen Zusammensetzung.

Tabelle 4: Übersicht der genutzten, eigens hergestellten Lösungen

<i>CellTiter-Blue®-Lösung</i> ▪ <i>5 % CellTiter-Blue®-Reagent</i> ▪ <i>95 % DMEM (5 % FCS, 1 % Penicillin-Streptomycin)</i>
<i>Dispase-Typ-II-Lösung (10 ml)</i> ▪ <i>0,01 g Dispase®, Typ II</i> ▪ <i>0,5 ml HEPES-Buffer Solution</i> ▪ <i>9,5 ml PBS</i>
<i>Einfriermedium</i> ▪ <i>10 % DMSO</i> ▪ <i>90 % FCS</i>
<i>Kollagenase-Puffer (1 l)</i> ▪ <i>0,147 g Calcium chloride dihydrate</i> ▪ <i>0,901 g D-(+)-Glucose</i> ▪ <i>3,728 g Kaliumchlorid</i> ▪ <i>7,013 g Natriumchlorid</i> ▪ <i>23,83 g HEPES</i>

Kollagenase-Typ-I-Lösung (50 ml) <ul style="list-style-type: none"> ▪ 0,1 g <i>Collagenase, Type CLS</i> ▪ 0,75 g <i>Albumin Fraktion V</i> ▪ 50 ml Kollagenase-Puffer
Trypsin-EDTA-Lösung <ul style="list-style-type: none"> ▪ 1 ml <i>Trypsin-EDTA 10X</i> ▪ 9 ml <i>PBS</i>

3.1.5. Biologisches Material

Die Zellisolation erfolgte aus Hautpräparaten (vgl. 3.2.1), welche bei Operationen gewonnen wurden. Zuvor fand die Patienteninformation und jeweilige Zustimmung zur Sammlung und Verwendung der individuellen Biomaterialien zu Forschungszwecken statt.

Von der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vergebene Studiennummer: 3634.

Die Patienten-Datensätze wurden anonymisiert, sodass zu keinem Zeitpunkt ein Rückschluss auf den Ursprung der Hautpräparate und anschließend isolierter Primärkulturzellen möglich war bzw. ist.

Soweit bekannt, wurden Alter und Geschlecht des jeweiligen Patienten, welchem Hautpräparate entnommen wurden, miterfasst.

In den Experimentalverfahren vorliegender Arbeit wurden Keratinozyten von 8 Patienten und Fibroblasten von ebenfalls 8 Patienten verwendet. Dies impliziert jedoch nicht, dass von einem Patienten stets beide Zelltypen verwendet wurden. Dies trifft nicht in jedem Fall zu.

Das Durchschnittsalter (Mittelwert) lag bei 37 Jahren, der Median bei 35 Jahren. In 62 % war das Gewebe weiblicher Abstammung, in 31 % männlicher Abstammung. In 8 % war das zugrunde liegende Geschlecht unbekannt.

3.2. Zellkultur

Die Arbeit an der Zellkultur, welche mit der Zellisolation aus Hautpräparaten begann und über Zucht, Kryokonservierung und die spezifischen Aussä- und Experimentalverfahren reichte, wurde stets unter aseptischen Bedingungen in Sterilbänken durchgeführt.

Verwendete Instrumente zur Gewebepreparation waren stets einzeln abgepackt, vor Benutzung im Autoklav sterilisiert und wurden bei Gebrauch innerhalb der sterilen Werkbank aus ihrer Verpackung entnommen.

Zellkulturgefäße, wie auch alle sterilen Gebrauchsmaterialien wurden nach Desinfektion ihrer äußeren Verpackung in die Werkbank eingeführt und der Inhalt dort zum Gebrauch entnommen.

Stets wurde auf ein vollständiges Verdunsten der Desinfektionsmittel, sowie auf Abzug der entsprechenden Aerosole geachtet, um eine Schädigung der Zellkultur zu vermeiden.

Sterilbänke, sowie Brutschränke wurden täglich auf sichtbare Verschmutzungen hin untersucht, sowie regelmäßig und nach Bedarf gereinigt.

Allgemein wurden Desinfektionsmittel auf Alkoholbasis (70%iges Ethanol) verwendet.

Soweit nicht anders angegeben, wurde als Zellkulturmedium für Fibroblasten *Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)* mit 4,5 g/L D-Glucose, 580 mg/L L-Glutamin, 3,7 g/L Natrium-Hydrogencarbonat¹ und 15 mg/L vom pH-Indikator Phenolrot verwendet. Die detaillierte Formulierung des Mediums ist dem Anhang (vgl. 7.1) zu entnehmen (Herstellerangaben). Stets wies das verwendete Medium, durch entsprechende Zugabe, eine Konzentration der Antibiotika Penicillin und Streptomycin von 1 % auf, um eine bakterielle Kontamination sowohl durch grampositive als auch durch gramnegative Bakterien zu verhindern. Ebenso enthielt dieses, durch entsprechende Zugabe, standardmäßig eine 10%ige Konzentration an fetalem Kälberserum (*FCS*) für die Zellkultivierung, bzw. eine 5%ige *FCS*-Konzentration während der einzelnen Versuche. Die Supplementierung mit *FCS* erfolgte, da das Medium an sich keine Proteine, Lipide oder Wachstumsfaktoren enthielt.

In der Arzneimittelherstellung aus Zellkulturen werden allgemein serumfreie Zellkulturmedien verwendet. Um jedoch eine ökonomischere Praktikabilität zu gewährleisten und die Zellkultur mit allen benötigten Zusätzen zu versorgen, wird in der Forschung als Medien-Zusatz fetales Kälberserum verwendet. Dieses wird nach der Schlachtung aus dem Blut von Rinderfeten zwischen dem 3. und 7. Trächtigkeitsmonat gewonnen und sterilfiltriert. Zusätzlich wurde das *FCS* für die vorliegende Arbeit hitzeinaktiviert, um alle thermolabilen Komponenten des Serums auf eine ungefähr gleich niedrige Konzentration zu bringen und somit zu standardisieren.

Als Zellkulturmedium für Keratinozyten wurde stets *Keratinocyte Serum-Free Medium (Keratinocyte-SFM)* verwendet, welches ebenfalls L-Glutamin, 1,16 g/L Natrium-Hydrogencarbonat, etwa 3,22 g/L N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (HEPES)² und den pH-Indikator Phenolrot enthielt. 2,5 µg an rekombinantem humanem Epidermalem Wachstumsfaktor 1-53 (EGF 1-53) und 25 mg Rinderhypophysenextrakt (*BPE*) waren als Supplemente separat verpackt und wurden dem *Keratinocyte-SFM* vor Benutzung zugegeben. Wiederum wurde mit einer 1%igen Antibiotikakonzentration an Penicillin und Streptomycin gearbeitet. Die detaillierte Formulierung des Mediums ist von Seiten des Herstellers nicht publik.

¹ Natrium-Hydrogencarbonat ist ein häufig eingesetzter Puffer zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes in Zellkulturmedien bei einer CO₂-Atmosphäre von 4 % bis 10 %.

² HEPES ist ein organisches, chemisches Puffermittel, das häufig in Zellkulturmedien eingesetzt wird. Für seine Wirkung benötigt HEPES kein CO₂.

Alle obigen Zugaben erfolgten nach Anbruch der Zellkulturmedien. Aliquote an Penicillin-Streptomycin-Lösung und *FCS* wurden gebrauchsfertig in gefrorenem Zustand (bei -20 °C) gelagert und nur zur unmittelbaren Verwendung aufgetaut. Gleiches galt für beschriebene Supplemente. Die Zellkulturmedien wurden vor, wie nach Anbruch gekühlt (bei etwa 7 °C) gelagert. Vor Applikation der Zellkulturmedien auf die Zellen wurde benötigte Quantität stets auf 37 °C im Wasserbad vorgewärmt.

Soweit nicht anders angegeben, wurde zur Gewebepräparation, zur Herstellung verwendeter Lösungen, sowie bei den Routinemethoden zur allgemeinen Handhabung der Zellkultur (vgl. 3.2.5) phosphatgepufferte Salzlösung (*PBS*) ohne Calcium und Magnesium und mit einem pH-Wert von 7,2 verwendet. *PBS* wird ohne CO₂-Begasung verwendet. Die detaillierte Formulierung ist dem Anhang (vgl. 7.2) zu entnehmen (Herstellerangaben).

In den spezifischen Experimentalverfahren, insofern nicht anders angegeben, wurde *Dulbecco's Balanced Salt Solution (DPBS) mit Calcium* (133 mg/L CaCl₂ x 2 H₂O) und Magnesium (100 mg/L MgCl₂ x 6 H₂O), sowie einem pH-Wert von 7, als gepufferte Salzlösung verwendet. Die detaillierte Formulierung ist dem Anhang (vgl. 7.3) zu entnehmen (Herstellerangaben).

Als Brutschrank diente stets ein üblicher CO₂-Inkubator mit innenliegendem, beheiztem Wasserreservoir. Die Temperatur wurde auf 37 °C und der CO₂-Luftgehalt auf 5 % festgelegt³. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug etwa 95 %.

Zum Verschieben von Flüssigkeiten dienten übliche Pipetten aus Kunststoff, Pipetierhilfen und Kolbenhubpipetten, sowie Zentrifugenröhrchen (15 ml- bzw. 50 ml-Kapazität), zum Absaugen von Flüssigkeiten übliche Absaugpumpen und Glas-Pasteurpipetten.

3.2.1. Aufbereitung von Vollhaut zur Keratinozyten- und Fibroblastenisolation

Die Zellisolation erfolgte aus Hautpräparaten. Zuvor erfolgte Patienteninformation und Zustimmung (vgl. 3.1.5).

Nach Gewebeentnahme erfolgte eine Überführung in sterile Gefäße, die zum Feuchtigkeitserhalt mit physiologischer Kochsalzlösung oder dem Zellkulturmedium *DMEM* gefüllt waren. In gekühltem Zustand wurden die Gewebepräparate am gleichen Tag zur Zellisolation in die Laborräumlichkeiten gebracht.

Vor Einführen der Transportgefäße in die sterile Werkbank wurden diese von außen desinfiziert, innerhalb selbiger geöffnet und das Transportmedium abgesaugt. Das vorhandene Gewebe wurde, je nach Präparatgröße entweder in Petrischalen, oder auf einem, in der Sterilbank ausgebreiteten, sterilen Operationsabdecktuch, mittels Einmalskalpellen auf Arbeitsgröße (etwa 0,5 cm Kantenlänge) geschnitten. Zusammenhängende Epidermis und Dermis wurden von Subcutis befreit und je nach Bedarf mehrmals mit *PBS* gewaschen, um auch kleinere *Subcutis*-Anteile und Blut zu lösen.

50 ml-Zentrifugenröhrchen wurden mit den so präparierten *Epidermis-Dermis*-Gewebestücken bis zu einem Volumen von etwa 30 ml befüllt (dazu Nutzung steriler Pinzetten) und jeweils etwa 10 ml frische und zuvor sterilfiltrierte Dispase-Typ-II-Lösung hinzugegeben.

Dispase-Typ-II ist eine neutrale Protease, welche für die Verwendung zu Forschungszwecken aus dem gram-positiven Bakterium *Bacillus polymyxa* (auch *Paenibacillus polymyxa*) gewonnen wird. Es hydrolysiert die N-terminalen Peptidbindungen nicht-polarer Aminosäurerückstände, welche häufig in

³ Der Anteil von Kohlenstoffdioxid (CO₂) an der Luft der Erdatmosphäre beträgt etwa 0,04 %, der Anteil von Stickstoff (N₂) etwa 78 % und der Anteil von Sauerstoff (O₂) etwa 20 %.

Fibronectin und Kollagen-Typ-IV vorkommen. Aufgrund dieser milden proteolytischen Wirkung im Bezug auf die extrazelluläre Matrix, wird es zur Gewebe- und Zelldissoziation bei Zellisolierung eingesetzt. Die Integrität der Zellmembran bleibt dabei erhalten.

Über Nacht erfolgte eine Inkubation bei 4 °C auf einem Taumelrollmischer.

Am Folgetag wurden die entsprechenden Zentrifugenröhrchen für etwa 45 Minuten im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert. Der Inhalt der Zentrifugenröhrchen wurde im Anschluss in Petrischalen ausgegossen und die Reaktion mit etwa 10 ml bis 20 ml eisgekühltem *PBS* abgestoppt. Mittels steriler Pinzetten, sowie unter eventueller Zuhilfenahme von Einmalskalpellen, erfolgte nun die Trennung von *Epidermis* und *Dermis*. Entsprechende Hautanteile wurden jeweils in separaten Petrischalen gesammelt. Eine Vorfüllung dieser mit *PBS* verhinderte die Gewebeaustrocknung.

Epidermis und *Dermis* wurden im Folgenden zur entsprechenden Zellisolation unterschiedlich behandelt. Um der größeren Empfindlichkeit der epidermalen Zellen gerecht zu werden, wurden stets diese zuerst weiterverarbeitet.

3.2.2. Weitergehende Keratinozytenisolation aus Vollhaut

Die *Epidermis*-Gewebestücke wurden in 50 ml-Zentrifugenröhrchen gefüllt und mit einer Lösung bestehend aus Trypsin-Ethylendiamintetraacetat und *PBS* im Verhältnis 3 zu 1 überschichtet.

Die Konzentration der als Arbeitslösung verwendeten Trypsin-Ethylendiamintetraacetat betrug bei der gesamten vorliegenden Arbeit stets 0,05 %⁴. Laut Herstellerangaben gab es keine Potenzabweichungen verschiedener Produktionsserien, sprich die enzymatische Aktivität war stets gleich.

Trypsin ist eine Protease mit ausgeprägter Substratspezifität. Es spaltet nur Lysin- und Arginin-modifizierte Cysteinbindungen, sodass bestimmte, den Zellverband aufrechterhaltende, Proteine abgebaut werden. Ethylendiamintetraacetat (EDTA) komplexiert zweiwertige Kationen, wie Calcium (Ca^{2+}), die ebenfalls der Membranprotein-Stabilisierung dienen. Durch die Anwendung einer Trypsin-EDTA-Lösung wird somit eine Auflösung (des Zellrasens) adhärenter Zellen erreicht, sodass diese passagiert oder anderweitig verwendet werden können. Um eine (zu starke) Zellschädigung durch Proteolyse zu vermeiden, muss angewandte Trypsin-EDTA-Lösung nach festgestelltem, zweckmäßigem Effekt zügig inaktiviert werden. Aufgrund des Gehalts an Proteinen und weiteren Proteaseinhibitoren kann dazu *FCS*, *FCS*-haltiges Kulturmedium, oder ebenfalls spezieller Trypsin-Inhibitor bzw. -Neutralisator⁵ (dieser in einem Verhältnis von 1 zu 1) verwendet werden. Trypsin-Inhibitor bzw. -Neutralisator findet insbesondere bei Keratinozyten-Kulturen Verwendung.

Nach 10-minütiger Inkubation im Schüttelwasserbad, kurzer Durchmischung mittels Vortexmischer und Abstoppen der Reaktion mittels einiger Milliliter *FCS*, oder Trypsin-Inhibitor bzw. -Neutralisator, wurde ein neues Zentrifugenröhrchen vorbereitet, an dessen Öffnung ein steriles Zellsieb (Porenweite zwischen 40 µm und 100 µm) befestigt war. Mittels Pinzette wurden *Epidermis*-Gewebestücke in das Zellsieb gelegt und mittels Kolben einer sterilen Spritze passender Größe zerrieben. Größere Gewebereste wurden mittels Pinzette entfernt und der Filter mit *PBS* durchgespült. Dieser Prozess wurde bis zur Verarbeitung aller *Epidermis*-Gewebestücke durchgeführt. Es erfolgte ein Zentrifugieren des Zentrifugenröhrchens bei 300 g für 10 Minuten.

⁴ Laut Herstellerangaben betrug die Konzentration der 10-fach konzentrierten Stammlösung 0,5%, woraus sich bei Verdünnung mit 9 Teilen *PBS* eine Konzentration von 0,05 % in der Arbeitslösung ergab.

⁵ Trypsin-Inhibitor-Lösung enthält gereinigten Sojabohnen-Trypsininhibitor und ist frei von Stoffen tierischen Ursprungs, Trypsin-Neutralisator-Lösung ist *FCS*-haltig.

Zur Umrechnung zwischen g -Kraft, die als *Relativen Zentrifugalbeschleunigung (RZB)* angegeben wird und der Einheit rpm (Umdrehungen pro Minute) gilt allgemein folgende Formel, wobei r den Rotorradius in Zentimeter angibt: $RZB = 1,118 * 10^{-5} * r * (rpm)^2$

Im Anschluss wurde der Überstand vorsichtig bis zum Zellpellet abgesaugt, dieses in Keratinozyten-Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellsuspension auf ein Zellkulturgefäß überführt. Da Keratinozyten unter Zellkulturbedingungen ein ausreichendes Maß an Zell-Zell-Kontakten benötigen, war die Größe des Kulturgefäßes auf die Größe des Zellpellets anzupassen.

Der erste Wechsel des Kulturmediums erfolgte erst nach 4 bis 5 Tagen, da sich erst dann erfahrungsgemäß eine ausreichende Adhärenz der Zellen ausgebildet hatte. In dieser Zeit war eine Bewegung der jeweiligen Zellkulturgefäße streng zu vermeiden.

3.2.3. Weitergehende Fibroblastenisolation aus Vollhaut

Analog zur weitergehenden Keratinozytenisolation aus Vollhaut (vgl. 3.2.2) wurden die *Dermis*-Gewebestücke in 50 ml-Zentrifugenröhrchen gefüllt. Es erfolgte ein 5-minütiges Zentrifugieren bei 1500 rpm mit anschließendem Absaugen des flüssigen Überstandes. Im Anschluss wurden die Gewebestücke mit zuvor sterilfiltrierter Kollagenase-Typ-I-Lösung überschichtet und für etwa 60 Minuten im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert.

Kollagenase ist eine Protease, welche die Peptidbindungen zwischen Prolin und anderen Aminosäuren spaltet. In der Forschung wird es zum selektiven Abbau der extrazellulären Matrix genutzt und aus dem gram-positiven Bakterium *Clostridium histolyticum* gewonnen. Das für vorliegende Arbeit genutzte Produkt Kollagenase-Typ-I ist ein Enzymgemisch aus Kollagenase und der Protease Clostripain, welche ebenfalls aus *Clostridium histolyticum* gewonnen wird und C-terminal an Arginin hydrolysiert.

In gleicher Weise zur Keratinozytenisolation erfolgte dann ein Zerreiben der *Dermis*-Gewebestücke mittels Spritzen-Kolben durch ein Zellsieb und ein erneutes 5-minütiges Zentrifugieren der so entstandenen Gewebe-Zell-Suspension bei 1500 rpm. Der Überstand wurde wiederum abgesaugt, das Zellpellet in entsprechendem Fibroblasten-Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellsuspension auf Kulturgefäße aufgeteilt.

3.2.4. Keratinozytenisolation aus Spalthaut

Insofern zur Zellisolation keine Vollhaut-, sondern nur Spalthaut-Gewebepräparate⁶ vorlagen, erfolgte diese vollständig an einem Tag ohne Notwendigkeit zur vorangegangenen Aufbereitung mittels Applikation von Dispase-Typ-II-Lösung über Nacht.

Analog zur weitergehenden Keratinozytenisolation aus Vollhaut (vgl. 3.2.2) erfolgte 10-minütige Applikation und Inkubation einer Lösung bestehend aus Trypsin-EDTA und *PBS* im Verhältnis 3 zu 1 im Schüttelwasserbad, Abstoppen der Reaktion, sowie Zerreiben der *Epidermis*-Gewebestücke mittels Spritzen-Kolben durch Zellsieb in gleicher Weise. Nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 300 g wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in entsprechendem Zellkulturmedium resuspendiert

⁶ Als Spalthaut werden Hauttransplantate bestehend aus *Epidermis* und oberster *Dermis*-Schicht mit einer Dicke von 0,3 mm bis 0,8 mm bezeichnet. Diese werden operativ mittels Dermatom flächig abgetragen und werden medizinisch zum Verschluss großer Hautdefekte eingesetzt. Im Gegensatz dazu bestehen Vollhauttransplantate aus *Epidermis* und gesamter *Dermis*. Diese kommen operativ an kosmetisch besonders relevanten Stellen zur Defektdeckung zum Einsatz.

und die Zellsuspension auf Kulturgefäße aufgeteilt. Wiederum war bei der Kulturgefäßwahl auf ausreichende Zell-Zell-Kontakte zu achten. Ein erster Kulturmediumswechsel erfolgte nach 4 bis 5 Tagen, bei strenger, zwischenzeitlicher Bewegungsvermeidung.

3.2.5. Routinemethoden zur allgemeinen Handhabung der Zellkultur

Zellen in Kultur benötigen regelmäßige Wechsel des Mediums, zum einen, da Bestandteile des Mediums sowie Zusätze im Laufe der Zeit metabolisiert werden und auch zerfallen, zum anderen, da es zur Anhäufung von Stoffwechselprodukten kommt. Das Intervall der Mediumerneuerung richtet sich dabei vor allem nach Stoffwechselaktivität und Wachstumsgeschwindigkeit.

Bei vorliegender Arbeit wurde in der Zellkultur ein Wechsel des Mediums etwa alle 3 bis 4 Tage durchgeführt. Im Falle von sehr langsam wachsenden Zellen, wie es teils bei Keratinozyten der Fall war, wurde nur die Hälfte des Mediums gewechselt, um von den Zellen selbstständig sezernierte Wachstumsfaktoren im ausreichenden Maße im Kulturgefäß zu belassen und die Stoffwechselsituation der Zellen nicht allzu abrupten Schwankungen auszusetzen.

Da die durchgeführten Versuche in stoffwechselphysiologischem Kontext standen, wurde stets am Tag vor Versuchsbeginn ein Mediumwechsel der entsprechenden Zellen durchgeführt, um die stete Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Bei den Zellen, welche experimentelle Verwendung fanden, wurde auf eine gleiche Wachstumsgeschwindigkeit geachtet. Diese wurde allgemein mittels üblichem, inversen Durchlichtmikroskop (mit Phasenkontrasteinrichtung) beurteilt.

Bezeichnetes Mikroskop wurde stets auch zur routinemäßigen, täglichen Kontrolle des Zellkulturzustands, inklusive Kontaminationsausschlusses (Vergrößerung⁷ zwischen 50-fach und 200-fach) genutzt.

Kurz vor Erreichen der Konfluenz⁸ im jeweiligen Kulturgefäß, wurden durch Passagieren Subkulturen in anderen Kulturgefäßen angelegt, um durch nachfolgende Vermehrung weitere Zellen für experimentelle Zwecke zu erhalten und auch um eine dichteabhängige Wachstumsinhibition, die auch als Kontaktinhibition bezeichnet wird, zu verhindern.

Zum Lösen der adhären Zellen aus den jeweiligen Kulturgefäßen wurde das Kulturmedium dekantiert, der Zellrasen vorsichtig mit *PBS* abgespült und wie bereits beschrieben (vgl. 3.2.2) Trypsin-EDTA-Lösung angewandt.

Trypsin-EDTA-Lösung wurde als gebrauchsfertiges Aliquot in gefrorenem Zustand (bei -20 °C) gelagert, zur unmittelbaren Verwendung aufgetaut und auf 37 °C im Wasserbad vorgewärmt. Das Einfrieren der gebrauchsfertigen Lösungen erfolgte, um stets mit der gleichen, reproduzierbaren enzymatischen Aktivität zu arbeiten. Durch das Einfrieren wurden nämlich evtl. vorhandene thermolabile Komponente stets im gleichen Maß reduziert, sowie eine Auswirkung evtl. längerer Lagerungszeiten der Trypsin-EDTA-Lösung auf die enzymatische Aktivität ausgeschlossen. Zu beachten war, dass sich dadurch die Einwirkzeit von etwa 2 Minuten (ohne vorheriges Einfrieren der gebrauchsfertigen Aliquote) auf etwa 7 Minuten (nach vorherigem Einfrieren der gebrauchsfertigen Aliquote) im CO₂-Inkubator verlängerte.

⁷ Die Vergrößerung eines Mikroskops ist das Produkt aus der Vergrößerung des Objektivs und jener des Okulars.

⁸ Von Konfluenz wird gesprochen, sobald die gesamte Kulturgefäßoberfläche mit Zellen bedeckt ist.

Nach gesagter 7-minütiger Inkubation erfolgte die mikroskopische Kontrolle des AblöSENS der Zellen vom Kulturgefäßboden (*detachment*). Assistierend wurden noch haftende Zellen durch leichtes Schlagen gegen das Kulturgefäß abgeklopft (*shake-off*-Verfahren) oder sanft mit dem Zellschaber abgelöst. Zu beachten ist jedoch, dass mechanische Dissoziation prinzipiell eher ungeeignet ist, da eine relativ starke Zellschädigung durch die mechanischen Einflüsse erfolgt.

Um eine unerwünschte Selektion von nur schlecht-haftenden Zellen einer Kultur zu vermeiden, muss allgemein ebenso auf vollständigen Ablauf des sog. Trypsinierungsprozess geachtet werden.

Im Anschluss erfolgte zügig die Inaktivierung der Trypsin-EDTA-Lösung mittels *FCS*-haltigem Kulturmedium, oder Trypsin-Inhibitor bzw. -Neutralisator. Auch das Einbringen der Inaktivierungslösung ließ sich, unter Ausnutzung des Pipetierhilfen-Strahls, mechanisch ablösend ausnutzen.

Die in Suspension gebrachten Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 bis 7 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Zuvor wurde, bei entsprechender Absicht zur Zellzahlbestimmung, ein 50 µl-Aliquot der Zellsuspension mittels Kolbenhubpipette entnommen, in einer 96-well-zählenden Mikrotiterplatte mit 50 µl Trypanblau (im Verhältnis 1 zu 1) gemischt und in eine Zählkammer (auch Hämocytometer genannt) eingeführt. Verwendet wurde bei vorliegender Arbeit die *Neubauer improved*.

Da nur perforierte Zellen, nicht jedoch lebende, den Farbstoff Trypanblau⁹ aufnehmen, gelang bei der Zellzählung durch entsprechende Verwendung, deren Ausschluss. Verwendet wurde eine 0,4%ige Trypanblau-Lösung.

Zur Bestimmung der Zellzahl pro ml wurden 4 Großquadrate gezählt und der Durchschnitt gebildet. Da ein Großquadrat über ein Volumen von 0,1 µl verfügt (die gesamte Zählkammer entsprechend über 0,9 µl), ergab sich (unter Berücksichtigung des obigen Verdünnungsfaktors 2 durch die Zugabe von Trypanblau) zur Berechnung folgende Formel:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{4} * 2 * 10^4$$

Im Anschluss an das Zentrifugieren wurde der Überstand bis zum Zellpellet abgesaugt und dieses entweder für die Aufteilung auf weitere Kulturgefäße zur Zucht oder für die spezifischen Aussäverfahren in Kulturmedium resuspendiert. Alternativ erfolgte ein Resuspendieren in speziellem Einfriermedium und in der Folge ein Einfrieren der entsprechenden Zellen (Kryokonservierung).

Die andauernde Kultur führt, durch entsprechende Replikation, zu Zellalterung (Seneszenz) (vgl. 1.2.1). Weiterhin treten im Laufe der Zeit phänotypische und genotypische Veränderungen auf, da Zellen bei jeder Passage einem gewissen Selektionsdruck unterliegen. Zudem besteht bei permanenter Nutzung auch das Risiko eines Schadens an der Kultur durch äußere Einflüsse, wie Kontaminationen, oder plötzliche infrastrukturelle Probleme (z.B. Stromausfälle).

Da unterhalb einer Temperatur von -130 °C keine biochemischen Reaktionen mehr stattfinden, bietet die Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C die ideale Möglichkeit zur Langzeitlagerung von Zellen für eine spätere Verwendung.

Als Einfriermedium wurde eine Lösung verwendet, die zu 90 % aus *FCS* und zu 10 % aus dem Frostschutzmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) bestand. Dimethylsulfoxid verhindert während des Einfrierprozesses bis zum Erreichen der kritischen Temperatur von -130 °C die Bildung von Eiskristallen außerhalb, sowie auch innerhalb der Zellen und somit deren Zerstörung.

⁹ Trypanblau gehört zu den Azofarbstoffen. Sein Anion binden an Zellproteine.

Idealerweise werden Zellen möglichst rasch eingefroren, da DMSO (in der verwendeten Konzentration) hoch toxisch ist. Die optimale Einfrierrate liegt für Säugetierzellen bei etwa $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro Minute. In dieser Zeit diffundiert DMSO in die Zellen.

Besagtes Einfriermedium wurde stets zur unmittelbaren Verwendung hergestellt.

Nach oben beschriebenem Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes erfolgte das Resuspendieren des Zellpellets in Einfriermedium. Da stets 1 Millionen (1×10^6) Zellen in 1 ml Einfriermedium kryokonserviert wurden, richtete sich die zum Resuspendieren verwendete Menge an Einfriermedium an die zuvor bestimmte Zellzahl. Die Temperatur des Einfriermediums bei Applikation betrug $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Im Anschluss wurde die Zellsuspension mittels Kolbenhubpipetten in spezielle Einfrierampullen (Kryoröhrchen) umgefüllt. Pro Kryoröhrchen betrug die verwendete Füllmenge 1 ml.

Um obig beschriebene Einfrierrate zu realisieren wurden die Kryoröhrchen dann in spezielle, mit Isopropanol gefüllte, Kühlcontainer eingebracht und diese über Nacht bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Am Folgetag erfolgte die Überführung zur Langzeitlagerung in den Flüssigstickstoff-Tank.

Eine Temperatur oberhalb von $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ musste ausgeschlossen werden, da dann bereits nach 15 Minuten eine Zellschädigung durch Eiskristallbildung erfolgt. 24 Stunden vor beabsichtigter Kryokonservierung fand stets ein Wechsel des Kulturmediums statt.

Aufgrund der beschriebenen DMSO-Toxizität muss ein Auftauen kryokonservierter Zellen ebenfalls möglichst zügig erfolgen. Dazu wurde ein entsprechendes Kryoröhrchen nach Entnahme aus dem Flüssigstickstoff-Tank, sowie nach äußerer Desinfektion innerhalb der Sterilbank in der Hand erwärmt, bis nur noch ein kleiner Rest des Inhalts gefroren war. Im Anschluss wurde mittels Kolbenhubpipette 1 ml vorgewärmtes Zellkulturmedium in das Kryoröhrchen gegeben, der Inhalt darin resuspendiert und in ein mit 10 ml vorgefülltes Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 5-minütigem Zentrifugieren bei 1500 rpm, Absaugen des Überstandes und Resuspendieren des Zellpellets in frischem Kulturmedium, wurde die Zellsuspension schließlich auf ein Zellkulturgefäß übertragen. Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte am nächsten Tag, um eventuelle DMSO-Reste zu entfernen.

Das Material, aus dem die verwendeten Zellkulturgefäße (vgl. Abbildung 1), sowie *multiwell*- und Mikrotiterplatten (vgl. Abbildung 2) bestanden, war der Kunststoff Polystyrol. Es wurden Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm^2 bis 175 cm^2 genutzt. Diese verfügten über einen Schraubverschluss mit kontaminationssicherer Belüftungskappe und integriertem hydrophoben Filter (Porenweite $0,2\text{ }\mu\text{m}$), der einen CO_2 -Austausch ermöglicht.

Um einen optimalen Gasaustausch in der Zellkultur zu gewährleisten, wurde ein Verhältnis von Wachstumsfläche zu appliziertem Zellkulturmedium von 1 zu 6 eingehalten. Bei einer Zellkulturflasche mit 175 cm^2 Wachstumsfläche, wurden somit etwa 30 ml Zellkulturmedium verwendet.



Abbildung 1: Verwendete Zellkulturflaschen
(175 cm^2 Wachstumsfläche)
Legende 1: © Greiner Bio-One GmbH

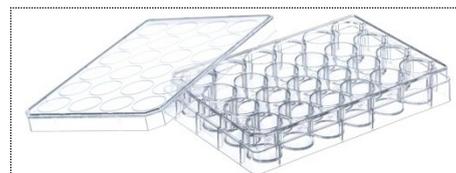


Abbildung 2: Verwendete (24-well-) multiwell-Platten
Legende 2: © Greiner Bio-One GmbH

3.2.6. Replikative Seneszenz

Wie vorangegangen beschrieben (vgl. 1.2.1) gilt die replikative Seneszenz als geeignetes und aussagekräftiges Alterungsmodell. Diese wurde in vorliegender Arbeit durch Vermehrung der verwendeten Zellen primären Ursprungs in Kultur und notwendige stete Passagierung erreicht.

Die Versuche erfolgten vor diesem Hintergrund - soweit nicht anders angegeben - sowohl an Zellen, die in ihrem Zustand *in vitro* jenem, vor Entnahme aus dem Ursprungsorganismus, möglichst gleich kamen - diese Zellen werden im Folgenden als *juvenil* bezeichnet -, als auch an Zellen gleichen Ursprungsorganismus, die jedoch *in vitro* besagtem Seneszenzprozess unterzogen wurden - diese Zellen werden im Folgenden als *seneszent* bezeichnet.

Kurz vor Erreichen der Konfluenz im jeweiligen Kulturgefäß, wurde stets ein Drittel (33 %) der vorhandenen Zellen auf ein neues Kulturgefäß passagiert. Als juvenile Zellen galten Zellen der 4. und 5. Passage, als seneszente Zellen galten jene der 10. Passage.

Durch diese Verfahrensweise sollte eine Effekt-Vergleichbarkeit der identischen Intervention an juvenilen und seneszenten Zellen erzielt werden.

3.3. Proliferationsversuche

In beschriebenen Proliferationsversuchen wurden primäre Fibroblasten aus menschlicher Haut in *multiwell*-Platten ausgesät und die Zellviabilität, sowie das Proliferationsverhalten in jeweils 5-tägigen Versuchen in Abhängigkeit von applizierter Lichtfarbe und Bestrahlungsdosis (*Radiant exposure, H*) fluoreszenz-spektroskopisch (mittels *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay* von *Promega*) untersucht.

Die Versuche wurden sowohl mit juvenilen, als auch mit seneszenten Zellen durchgeführt (vgl. 3.2.6).

Als Strahlenquellen wurden prototypische schmalbandige LED-Systeme (auch *LED-Arrays*¹⁰) von *Philips* verwendet. Genutzt wurde Licht der Farben Grün (Wellenlänge 524 nm), Gelb (Wellenlänge 599 nm) und Rot-Orange (Wellenlänge 632 nm). Während der Versuche erfolgte die Applikation von 5 Bestrahlungsdosen, daher die Bezeichnung der Proliferationsversuche als 5-tägig.

3.3.1. Versuchsaufbau, Bestrahlungsdosen, sowie Ablauf eines Versuchstages

In diesen Versuchen wurden *24-well-multiwell*-Platten (im Folgenden abgekürzt als *24-well*-Platten) genutzt. Dabei besetzten Zellen eines Patienten jeweils 12-*wells* einer Platte (vgl. Abbildung 3), wobei in jedes dieser *wells* stets am Tag (24 h) vor Versuchsbeginn, 20 000 Zellen ausgesät wurden¹¹. Besagte 24 h dienen dem Anwachsen der ausgesäten Zellen. Pro *24-well*-Platte konnten die Zellen zweier Patienten untersucht werden (da 2 x 12-*wells*).

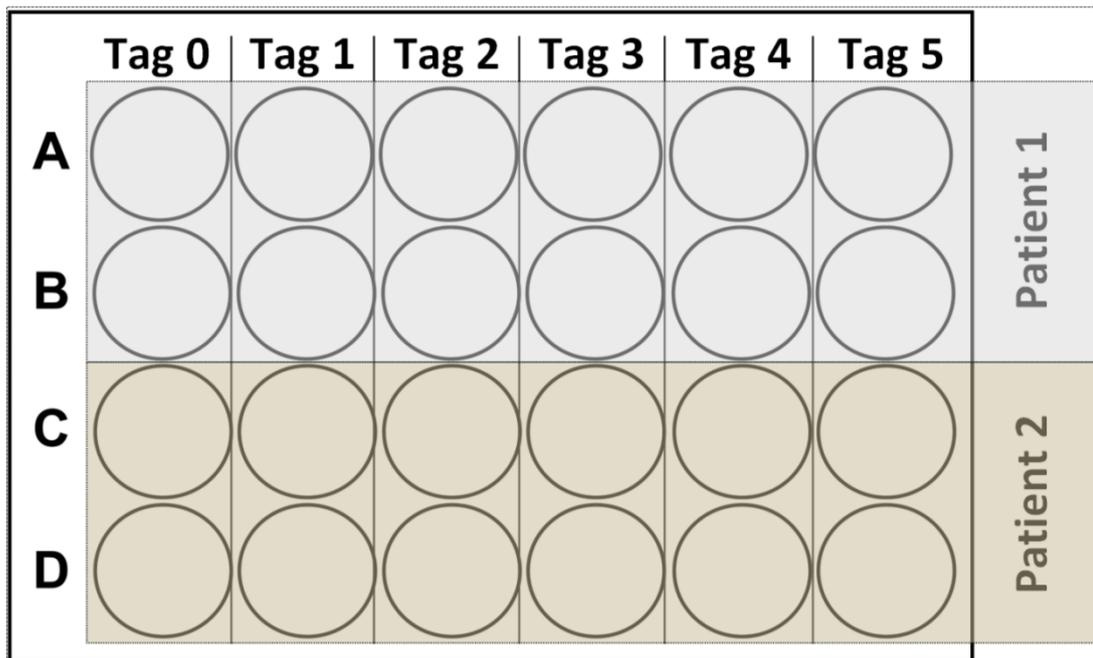


Abbildung 3: Eine im Laufe des 5-tägigen Proliferationsversuches zu bestrahlende 24-well-Platte
 Legende 3: Zellen eines Patienten besetzen 12 *wells*. Pro Strahlenquelle (*LED-Array*) wurden 7 Platten genutzt. Die Zahl 7 ergab sich aus 6 zu untersuchenden Bestrahlungsdosen und einer Kontroll-Platte als Referenz.

Pro untersuchter Strahlenquelle (*LED-Array*) wurden für die Zellen 2er Patienten sieben *24-well*-Platten in dieser Art besetzt (vgl. Abbildung 4). Die Zahl 7 ergab sich aus den 6 zu untersuchenden Bestrahlungsdosen und einer Kontroll-Platte als Referenz.

¹⁰ Ein *LED-Array* ist eine elektronische Schaltung, bei der beliebig viele Leuchtdioden (LEDs) in Zeilen und Spalten angeordnet und miteinander verbunden sind.

¹¹ Folglich enthielt jedes *well* einer *24-well*-Platte zu Versuchsbeginn (Tag 0) 20 000 Zellen. 12 *wells* enthielten die Zellen eines Patienten (Patient 1), 12 *wells* Zellen eines anderen Patienten (Patient 2).

Die Bestrahlungsdosis (*Radiant exposure, H*) wird in J/cm^2 angegeben. Diese wurde variiert und der Effekt der jeweiligen Intervention untersucht.

	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	
A							Patient 1
B							
C							Patient 2
D							

	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	
A							Patient 1
B							
C							Patient 2
D							

	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	
A							Patient 1
B							
C							Patient 2
D							

	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	
A							Patient 1
B							
C							Patient 2
D							

	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	
A							Patient 1
B							
C							Patient 2
D							

Abbildung 4: Sieben 24-well-Platten für eine untersuchte Strahlenquelle und Zellen 2er Patienten

Legende 4: Pro untersuchter Strahlenquelle (LED-Array) wurden für die Zellen 2er Patienten sieben 24-well-Platten in dieser Art besetzt. Die Zahl 7 ergab sich aus den 6 zu untersuchenden Bestrahlungsdosen (H1 bis H6) und einer Kontrollplatte (K) als Referenz. Die Zellen eines Patienten besetzten jeweils 12-wells einer Platte, wobei in jedes dieser wells 24 h vor Versuchsbeginn 20 000 Zellen ausgesät wurden. Folglich enthielten zu Versuchsbeginn an Tag 0 alle wells 20 000 Zellen. Pro 24-well-Platte konnten die Zellen zweier Patienten untersucht werden (da 2 x 12-wells).

Für grünes Licht wurden folgende Bestrahlungsdosen (*H*) untersucht: $10 \text{ J}/\text{cm}^2$, $20 \text{ J}/\text{cm}^2$, $40 \text{ J}/\text{cm}^2$, $80 \text{ J}/\text{cm}^2$, $150 \text{ J}/\text{cm}^2$ und $200 \text{ J}/\text{cm}^2$.

Für gelbes und rot-orangenes Licht wurden folgende Bestrahlungsdosen (*H*) untersucht: $5 \text{ J}/\text{cm}^2$, $10 \text{ J}/\text{cm}^2$, $20 \text{ J}/\text{cm}^2$, $40 \text{ J}/\text{cm}^2$, $80 \text{ J}/\text{cm}^2$ und $100 \text{ J}/\text{cm}^2$.

Die Bestrahlungsstärke (*Irradiance*, E) wird in mW/cm^2 angegeben. Diese war bei jedem verwendeten LED-Array jeweils konstant. Für grünes Licht betrug diese $58 \text{ mW}/\text{cm}^2$ (Herstellerangabe), bei gelbem Licht $36,33 \text{ mW}/\text{cm}^2$ (Herstellerangabe) und bei rot-orangenem Licht $30,36 \text{ mW}/\text{cm}^2$ (Herstellerangabe).

Zur Berechnung der Zeit (T), mit welcher die Zellen, bei feststehender Bestrahlungsstärke (E), bestrahlt werden mussten, um auf die jeweilig zu untersuchende Bestrahlungsdosis (H) zu kommen, wurde folgende Formel angewandt:

$$\frac{T}{\text{s}} = \frac{\frac{H}{\text{J}/\text{cm}^2}}{\frac{E}{\text{mW}/\text{cm}^2}}$$

Die Bestrahlungszeiten, welche sich dadurch ergaben, sind nachfolgenden Tabellen zu entnehmen (vgl. Tabelle 5, Tabelle 6, Tabelle 7).

Tabelle 5: Bestrahlungszeiten für Grün

Bestrahlungsdosis	Bestrahlungszeit
10 J/cm^2	02:52 min
20 J/cm^2	05:45 min
40 J/cm^2	11:30 min
80 J/cm^2	22:59 min
150 J/cm^2	43:06 min
200 J/cm^2	57:28 min

Tabelle 6: Bestrahlungszeiten für Gelb

Bestrahlungsdosis	Bestrahlungszeit
5 J/cm^2	02:18 min
10 J/cm^2	04:35 min
20 J/cm^2	09:11 min
40 J/cm^2	18:21 min
80 J/cm^2	36:42 min
100 J/cm^2	45:53 min

Tabelle 7: Bestrahlungszeiten für Rot-Orange

Bestrahlungsdosis	Bestrahlungszeit
5 J/cm^2	02:45 min
10 J/cm^2	05:29 min
20 J/cm^2	10:59 min
40 J/cm^2	21:57 min
80 J/cm^2	43:55 min
100 J/cm^2	54:54 min

Die Abweichung der verwendeten Bestrahlungsdosen zwischen den unterschiedlichen LED-Arrays (bei gelbem und rot-orangenem Licht gleich, bei grünem Licht abweichend) ergab sich aus der Absicht, die Zellen für max. 60 Minuten in DPBS und bei Raumluft (ohne CO_2 -Begasung) zu halten, in dieser Zeit jedoch eine möglichst hohe max. Bestrahlungsdosis zu erreichen. Die maximale Bestrahlungsdosis (H) ergab sich somit aus den technischen Möglichkeiten des jeweiligen LED-Arrays (die Bestrahlungsstärke (E) bei Grün war mit $58 \text{ mW}/\text{cm}^2$ höher, als jene bei Gelb mit $36,33 \text{ mW}/\text{cm}^2$ und jene bei Rot-Orange mit $30,36 \text{ mW}/\text{cm}^2$).

Der Ablauf eines jeden Versuchstages war stets gleich. Morgendlich erfolgte die Bestimmung von Zellviabilität (mittels *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay*) (vgl. 3.3.3) innerhalb der beiden dafür vorgesehenen wells¹² - erstmals an Tag 0 nach Aussäen (vgl. 3.3.2) und 24-stündigem Anwachsen der Zellen. Danach fand die, im Folgenden beschriebene, Bestrahlung statt. Abschließend wurden die Versuchsplatten bis zum nächsten Morgen im Brutschrank gelagert.

Konkret erfolgte die Bestrahlung in DPBS bei Raumluft (ohne CO_2 -Begasung), die übrige Lagerung unter üblichen Bedingungen im CO_2 -Inkubator und in DMEM. Die Temperatur, welcher die Zellen

¹² Die entsprechenden beiden wells (bei Patient 1 die wells A und B, bei Patient 2 die wells C und D) wurden im Anschluss nicht mehr weiterverwendet, sondern abgesaugt. Dies aus dem Grund, um eine ggf. erfolgende Wertebeflussung durch wiederholte Applikation des *CellTiter-Blue®*-Reagents auf dieselben Zellen auszuschließen (vgl. 3.3.3).

während der Bestrahlung ausgesetzt waren, entsprach jener im CO₂-Inkubator (37 °C). Das Flüssigkeitsvolumen (*DPBS* bzw. *DMEM*) pro *well* betrug stets 500 µl.

Im Gegensatz zum allgemein für die Zellkultivierung verwendeten Kulturmedium, das standardmäßig eine 10%ige Konzentration an *FCS* enthielt, enthielt das, während der Versuche verwendete Nährmedium, lediglich eine 5%ige *FCS*-Konzentration. Dadurch sollte eine zu hohe Wachstumsgeschwindigkeit und das damit zusammenhängende evtl. Erreichen einer Konfluenz (samt folgender Kontaktinhibition) während des Versuches verhindert werden. Dies hätte folglich die Untersuchung von der Zellproliferation in stoffwechselfysiologischem Kontext unmöglich gemacht.

Nach erfolgter Bestrahlung wurden die 24-*well*-Platten jeweils für die respektive zeitliche Differenz der jeweiligen Bestrahlung zur längsten Bestrahlungszeit entsprechenden LED-*Arrays* in *DPBS* in einem Inkubator *ohne* CO₂-Begasung bei 37 °C gelagert. Umgebende Luft entsprach folglich der Raumluft.

Die Kontrolle wurde für die Dauer der längsten Bestrahlungszeit ebenfalls in besagtem Inkubator in *DPBS* gehalten.

Somit waren alle während der Experimente auf die Zellen einwirkenden Faktoren konstant. Lediglich die applizierte Bestrahlungsdosis (*H*) wurde variiert.

3.3.2. Aussäen einer definierten Zellzahl

Um die in einem Kulturgefäß adhären Zellen eines Patienten für ein Experimentalverfahren in *multiwell*-Platten (hier 24-*well*-Platten) auszusäen, wurden diese in üblicher Weise mittels Trypsin-EDTA-Lösung aus dem jeweiligen Kulturgefäß gelöst und die Zellzahl wurde bestimmt (vgl. 3.2.5).

Mit der Absicht über eine ausreichende Zellzahl zu verfügen, wurde dazu stets eine Zellkulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 175 cm² kurz vor Erreichen der Konfluenz genutzt. Konstant wurden dafür 10 ml Trypsin-EDTA-Lösung und im Anschluss zur Inaktivierung 10 ml *DMEM* mit einer 10%igen *FCS*-Konzentration angewandt.

Um parallel Zellen eines Patienten mit allen 3 LED-*Arrays* (Grün, Gelb und Rot-Orange) in den jeweiligen Bestrahlungsdosen zu bestrahlen und entsprechende Effekte zu untersuchen, mussten pro Patient 252 *wells* ausgesät werden¹³.

Als auszusäende Zellzahl, welche nötig war, um die minimale Einsaatdichte zu erreichen und somit ein Anwachsen und Überleben der Zellen zu gewährleisten, wurde bei vorliegendem Versuch experimentell 20 000 (2 x 10⁴) ermittelt. Die detaillierten Ergebnisse sind dem Anhang (vgl. 7.4) zu entnehmen.

Daraus ergab sich pro Patient eine mindestens benötigte Zellzahl von 5 040 000 (5,04 x 10⁶) Zellen¹⁴. Da jedoch allgemein bei jeder Lösung von adhären Zellen aus einem Kulturgefäß und folgender Passagierung aufgrund mechanischer und chemischer Belastung (während der Dissoziation) mit einem gewissen Zellverlust gerechnet werden muss, wurde von 315 auszusäenden *wells* pro Patient ausgegangen¹⁵ und somit die mindestens benötigte Zellzahl auf 6 300 000 (6,3 x 10⁶) festgesetzt¹⁶.

¹³ $12 \frac{\text{wells}}{\text{Platte}} * 7 \frac{\text{Platten}}{\text{Strahlenquelle}} * 3 \text{ Strahlenquelle} = 252 \text{ wells}$

¹⁴ $252 \frac{\text{wells}}{\text{Patient}} * 20\,000 \frac{\text{Zellen}}{\text{well}} = 5\,040\,000 \frac{\text{Zellen}}{\text{Patient}}$

¹⁵ $15 \frac{\text{wells}}{\text{Platte}} * 7 \frac{\text{Platten}}{\text{Strahlenquelle}} * 3 \text{ Strahlenquelle} = 315 \text{ wells}$

Nach obig beschriebenem *detachment* erfolgte Zentrifugieren in üblicher Weise und ein Resuspendieren des Zellpellets in exakt 20 ml *DMEM* (5% *FCS*)¹⁷.

Um zu bestimmen, welches Volumen (x) (in ml) aus dem, die Zellsuspension enthaltende, 50 ml-Zentrifugenröhrchen entnommen werden musste, um auf die auszusäenden 20 000 (2×10^4) Zellen zu kommen, wurde folgende Formel angewandt:

$$x \text{ ml} = \frac{2 \cdot 10^4 \text{ Zellen} \cdot 1 \text{ ml}}{y}$$

Dabei bezeichnet x das zu entnehmende Volumen (Zellsuspension) in ml und y die vorherig bestimmte, vorliegende Zellzahl des Patienten pro ml.

Jedes *well* verwendeter 24-*well*-Platten sollte schlussendlich ein Volumen von 0,5 ml enthalten. Somit hatten alle für einen Patienten verwendeten *wells*¹⁸ in ihrer Gesamtheit ein Füllvolumen von 157,5 ml¹⁹.

Dieses Füllvolumen von 157,5 ml benötigter (noch zu erstellender) Zellsuspension pro Patient setzte sich zusammen aus dem Produkt oben berechneten Volumens x (aus ursprünglicher 20 ml-Zellsuspension) mit dem Faktor 315, sowie der sich zu 157,5 ml ergebenden Differenz, welche mit *DMEM* (5% *FCS*) aufgefüllt wurde.

Diese letztlich derart hergestellte Zellsuspension mit einem Volumen von 157,5 ml enthielt in 0,5 ml exakt die beabsichtigten 20 000 Zellen²⁰. Pro zu füllendem *well* wurden diese 0,5 ml angewandt um so 20 000 Zellen auszusäen.

Um bei der Durchführung langer Pipetierserien - wie sich diese sowohl während des eben beschriebenen Aussäprozesses vor Versuchsbeginn, wie auch bei der Durchführung des *CellTiter-Blue*® *Cell Viability Assay* (vgl. 3.3.3) und der Dispension von *DPBS* und *DMEM* während der Versuchsdurchführung ergaben - konstant ein exaktes Pipetieren zu gewährleisten, wurden stets *Eppendorf-Multipette*® und *-Combitips*®²¹ verwendet.

Nachdem eine 24-*well*-Platte mit beschriebener Zellsuspension befüllt war, erfolgte stets ein waagerechtes Verschieben selbiger auf der Arbeitsfläche der Sterilbank, ruckartig in die 4 senkrecht zueinander stehenden Richtungen. Dadurch wurde eine flächenbezogen gleichmäßige Aussat in allen *wells* erreicht.

$$16 \quad 315 \frac{\text{wells}}{\text{Patient}} * 20\,000 \frac{\text{Zellen}}{\text{well}} = 6\,300\,000 \frac{\text{Zellen}}{\text{Patient}}$$

¹⁷ Es war äußerst wichtig das Zellpellet in exakt 20 ml Nährmedium zu resuspendieren, da ansonsten die vorherig bestimmte Zellzahl pro ml nicht mehr stimmig gewesen wäre (vgl. 3.2.5).

¹⁸ Pro Patient waren dies, wie oben dargestellt, bei paralleler Untersuchung aller 3 Strahlenquellen, 315 *wells*.

$$19 \quad 315 \frac{\text{wells}}{\text{Patient}} * 0,5 \frac{\text{ml}}{\text{well}} = 157,5 \frac{\text{ml}}{\text{Patient}}$$

²⁰ Letztlich auf bezeichnete Weise 157,5 ml-fassende Zellsuspension wurde durch Aufteilung der ursprünglichen, 20 ml-fassenden, Zellsuspension auf drei 50 ml-Zentrifugenröhrchen und entsprechende Substitution der Differenz mit *DMEM* (5% *FCS*) erreicht.

²¹ Genutzt wurden *Eppendorf-Combitips*® mit einem Volumen von 10 ml.

3.3.3. Prinzip und Durchführung des *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay*

Zur Bestimmung der *Zellvitalität*, welche den Anteil lebender Zellen an einer Zellpopulation bezeichnet, sind allgemein verschiedene Messprinzipien anwendbar. Dazu gehört die Untersuchung der zellulären Stoffwechselaktivität (*Zellviabilität*).

Das *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay*, als eingesetzte Methode, analysiert die enzymatische Aktivität metabolisch-aktiver Zellen.

Das *CellTiter-Blue®*-Reagent enthält den Redoxindikator Resazurin, einen dunkelblauen Farbstoff mit geringer intrinsischer Fluoreszenz²². Dieser wird von lebenden Zellen aufgenommen, dort (u.a. mitochondrial) zum rosafarbenen, stark fluoreszierenden Resorufin reduziert und anschließend wieder in das umgebende Kulturmedium abgegeben, sodass die Fluoreszenz gemessen werden kann (vgl. Abbildung 5).

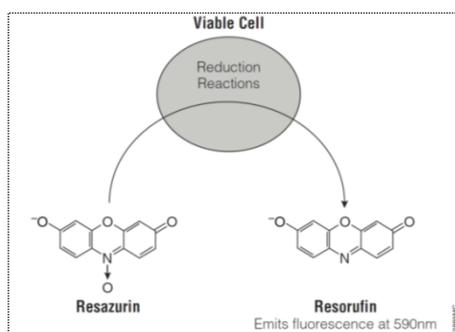


Abbildung 5: Reduktion von Resazurin zu Resorufin durch lebende, metabolisch aktive Zellen
 Legende 5: Mit freundlicher Genehmigung der *Promega Corp./Courtesy of Promega Corp.*

Die Fluoreszenz-Messung ist Gegenstand der Fluoreszenz-Spektroskopie²³, gerätetechnisch wird dazu ein Fluorometer genutzt. Verwendet wurde eine Anregungswellenlänge (Exzitation, λ_{ex}) von 540 nm, detektiert wurde bei der Emissionswellenlänge (Emission, λ_{em}) von 590 nm²⁴.

Da die Reduktion von Resazurin zu Resorufin proportional zur Anzahl lebender Zellen ist, ist es so bei mehrtägiger Bestimmung möglich, auf die *Zellproliferation* zu schließen.

Zwar ist das *CellTiter-Blue®*-Reagent nicht toxisch, doch wird in der Literatur bei mehrtägiger Anwendung auf dieselben Zellen von einer abnehmenden zellulären Reduktionsfähigkeit berichtet. Daher wurde bei vorliegender Arbeit davon abgesehen, stets bei *denselben Zellen* Viabilität und so, im Laufe der 5-tägigen Proliferationsversuche, auch Proliferation zu analysieren. Stattdessen wurde das *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay* jeden Tag in 2 neuen, vorher noch nicht dafür verwendeten, *wells* durchgeführt, welche *Zellen desselben Patienten* enthielten. In diesem Sinne wurden 24-*well*-Platten genutzt (vgl. 3.3.1).

²² Als Fluoreszenz wird die kurzzeitige Lichtemission nach vorheriger Absorption eines Lichtquants bezeichnet. Wenn fluoreszierende Stoffe mit Licht bestimmter Wellenlängen angeregt werden (Exzitation), strahlen sie Licht anderer, längerer Wellenlängen ab (Emission). Dies wird als *stokes-shift* bezeichnet.

²³ Die *Photometrie* bezeichnet verschiedene Messverfahren im Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichtes. Eine Messung der Extinktion über verschiedene Wellenlängen wird als *Spektroskopie* bezeichnet. Die *Fluoreszenz-Spektroskopie* ist ein Spektroskopie-Verfahren. Dabei wird die Fluoreszenz mit bestimmter Emissionswellenlänge (λ_{em}) senkrecht zur Richtung der Anregungsstrahlung (λ_{ex}) gemessen, um diese nicht mitzuerfassen.

²⁴ Sowohl Exzitation als auch Emission erfolgten somit in dem vom Hersteller angegebenen Bereich (Exzitation bei 530 nm bis 570 nm, Emission bei 580 nm bis 620 nm).

Dadurch, dass die entsprechend bestimmten beiden *wells* (bei Patient 1 die *wells* A und B, bei Patient 2 die *wells* C und D), wie eben beschrieben, im Anschluss nicht mehr weiterverwendet sondern abgesaugt und folglich nicht mehr verwendet wurden, wurde die Anzahl der zu bearbeitenden *wells* im Laufe der Versuchstage stetig geringer.

Aliquote des *CellTiter-Blue*[®]-Reagents wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen lichtgeschützt in gefrorenem Zustand (bei -20 °C) gelagert und nur zur unmittelbaren Verwendung aufgetaut.

Zur Bestimmung der Zellviabilität mittels des *CellTiter-Blue*[®] *Cell Viability Assay* waren pro LED-Array (2 Patienten auf sieben 24-*well*-Platten für 6 Bestrahlungsdosen und Kontrolle) jeweils täglich 28 *wells* zu untersuchen²⁵ (vgl. Abbildung 3, bei Patient 1 die *wells* A und B, bei Patient 2 die *wells* C und D).

Dazu wurde eine Lösung (im Folgenden als *CellTiter-Blue*[®]-Lösung bezeichnet) hergestellt, die zu 5 % aus dem *CellTiter-Blue*[®] Reagent und zu 95 % aus *DMEM* (5% *FCS*) bestand. Um mögliche Pipetierfehler zu minimieren, wurde dabei von einer zu untersuchenden Zahl von 42 *wells* ausgegangen²⁶. Pro LED-Array war somit insgesamt eine Lösung von 21 ml Quantität herzustellen²⁷. Diese wurde im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Nach vorangegangener mikroskopischer Kontrolle aller 24-*well*-Platten wurden die 7 Platten, welche zur Untersuchung eines LED-Arrays verwendet wurden, in die Sterilbank eingeführt, dort bei jeder Platte zügig die 4 zu untersuchenden *wells* abgesaugt und mittels *Eppendorf-Multipette*[®] und *-Combitips*[®] (vgl. 3.3.2) mit 500 µl zuvor hergestellter *CellTiter-Blue*[®]-Lösung befüllt. Alle am jeweiligen Tag nicht zu bestimmenden *wells* wurden mit Nährmedium belassen. Im Anschluss erfolgte eine exakt 60-minütige Inkubation im Brutschrank.

Dieses Prozedere wurde nach Abschluss und jeweils 5- bis 10-minütigem zeitlichen Abstand in gleicher Weise mit den Platten der anderen LED-Arrays durchgeführt.

Nach erfolgter 60-minütiger Inkubation wurden die entsprechenden 7 Platten aus dem Brutschrank entnommen und mittels 100 µl-Kolbenhubpipette jeweils 100 µl der *CellTiter-Blue*[®]-Lösung aus den entsprechenden *wells* entnommen und nach einem festgelegten Schema in ein *well* einer 96-*well*-Mikrotiterplatte zur anschließenden fluoreszenz-spektroskopischen Bestimmung überführt (vgl. Abbildung 6).

Dabei war beim Pipetieren strikt auf Luftblasen-Freiheit zu achten, um eine Verfälschung der Messwerte zu verhindern. Ebenso wurde stets bei der Bearbeitung der 24-*well*-Platten auf die gleiche zeitliche Reihenfolge bezüglich Befüllung mit 500 µl *CellTiter-Blue*[®]-Lösung und anschließender Entnahme von 100 µl nach Inkubation geachtet, um die exakte Inkubationszeit zu gewährleisten.

Der verbliebene Rest, der nicht auf die zu bestimmenden *wells* angewandten *CellTiter-Blue*[®]-Lösung (ursprünglich 21 ml hergestellt), wurde im 50 ml-Zentrifugenröhrchen ebenfalls 60 Minuten im Brutschrank inkubiert und anschließend entnommene 100 µl fluoreszenz-spektroskopisch bestimmt. Diese Leermessung (*blank*) diente der Messung der Hintergrundfluoreszenz, welche in der Auswertung vom gemessenen Datensatz subtrahiert wurde. Somit errechnete sich als Ergebnis die Fluoreszenz des jeweils von den Zellen umgesetzten Resorufin.

²⁵ $4 \frac{\text{zu bestimmende wells}}{\text{Platte}} * 7 \frac{\text{Platten}}{\text{Strahlenquelle}} = 28 \frac{\text{wells}}{\text{Strahlenquelle}}$

²⁶ $6 \frac{\text{zu bestimmende wells}}{\text{Platte}} * 7 \frac{\text{Platten}}{\text{Strahlenquelle}} = 42 \frac{\text{wells}}{\text{Strahlenquelle}}$

²⁷ $42 \frac{\text{wells}}{\text{Strahlenquelle}} * 0,5 \frac{\text{ml}}{\text{well}} = 21 \frac{\text{ml}}{\text{Strahlenquelle}}$

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	5 J/cm ² , P1	10 J/cm ² , P1	20 J/cm ² , P1	40 J/cm ² , P1	80 J/cm ² , P1	100 J/cm ² , P1	Kontrolle, P1						Patient 1 & 2, gelbes Licht
B	5 J/cm ² , P1	10 J/cm ² , P1	20 J/cm ² , P1	40 J/cm ² , P1	80 J/cm ² , P1	100 J/cm ² , P1	Kontrolle, P1						
C	5 J/cm ² , P2	10 J/cm ² , P2	20 J/cm ² , P2	40 J/cm ² , P2	80 J/cm ² , P2	100 J/cm ² , P2	Kontrolle, P2	blank					
D	5 J/cm ² , P2	10 J/cm ² , P2	20 J/cm ² , P2	40 J/cm ² , P2	80 J/cm ² , P2	100 J/cm ² , P2	Kontrolle, P2	blank					
E	5 J/cm ² , P1	10 J/cm ² , P1	20 J/cm ² , P1	40 J/cm ² , P1	80 J/cm ² , P1	100 J/cm ² , P1	Kontrolle, P1						Patient 1 & 2, rot-orangenes Licht
F	5 J/cm ² , P1	10 J/cm ² , P1	20 J/cm ² , P1	40 J/cm ² , P1	80 J/cm ² , P1	100 J/cm ² , P1	Kontrolle, P1						
G	5 J/cm ² , P2	10 J/cm ² , P2	20 J/cm ² , P2	40 J/cm ² , P2	80 J/cm ² , P2	100 J/cm ² , P2	Kontrolle, P2	blank					
H	5 J/cm ² , P2	10 J/cm ² , P2	20 J/cm ² , P2	40 J/cm ² , P2	80 J/cm ² , P2	100 J/cm ² , P2	Kontrolle, P2	blank					
A	10 J/cm ² , P1	20 J/cm ² , P1	40 J/cm ² , P1	80 J/cm ² , P1	150 J/cm ² , P1	200 J/cm ² , P1	Kontrolle, P1						Patient 1 & 2, grünes Licht
B	10 J/cm ² , P1	20 J/cm ² , P1	40 J/cm ² , P1	80 J/cm ² , P1	150 J/cm ² , P1	200 J/cm ² , P1	Kontrolle, P1						
C	10 J/cm ² , P2	20 J/cm ² , P2	40 J/cm ² , P2	80 J/cm ² , P2	150 J/cm ² , P2	200 J/cm ² , P2	Kontrolle, P2	blank					
D	10 J/cm ² , P2	20 J/cm ² , P2	40 J/cm ² , P2	80 J/cm ² , P2	150 J/cm ² , P2	200 J/cm ² , P2	Kontrolle, P2	blank					
E													
F													
G													
H													

Abbildung 6: Pipetierschema zur täglichen Bestimmung der Zellviabilität mittels CellTiter-Blue® Cell Viability Assay in 96-well-Mikrotiterplatten

Legende 6: Nach 60-minütiger Inkubation der am jeweiligen Tag zu untersuchenden wells (vgl. Abbildung 4, bei Patient 1 die wells A und B, bei Patient 2 die wells C und D) mit der CellTiter-Blue®-Lösung, wurden mittels Kolbenhubpipette jeweils 100 µl aus den entsprechenden wells entnommen und nach vorliegendem Schema in eine well einer 96-well-Mikrotiterplatte zur fluoreszenz-spektroskopischen Bestimmung übertragen.

3.3.4. Mathematische Auswertung der Versuchsergebnisse

Wie zuvor beschrieben (vgl. 3.3.1) fand an jedem Versuchstag morgendlich die Bestimmung der Zellviabilität mittels CellTiter-Blue® Cell Viability Assay statt (vgl. 3.3.3) - erstmals an Tag 0 (nach Aussäen und 24-stündigem Anwachsen der Zellen) vor der ersten Bestrahlung.

Für jeden Patienten ergaben sich dabei täglich Rohdaten (angegeben in *arbitrary units*) für die 6 zu untersuchenden Bestrahlungsdosen $H1$ bis $H6$ und die Kontrollplatte (K) als Referenz (vgl. Abbildung 7).

Um möglichst genau Resultate zu gewährleisten, wurde stets eine Doppelbestimmung durchgeführt (vgl. Abbildung 3, Patient 1 besetzte die *wells* A und B, Patient 2 die *wells* C und D) und für die weitere Berechnung der Mittelwert genutzt.

Applikation von gelbem Licht auf juvenile Zellen von Patient 5									
1. ORIGINALDATEN									
1.372.420	1.297.749	1.287.399	1.312.023	1.312.308	1.307.275				
1.328.519	1.294.168	1.255.487	1.303.237	1.266.438	1.284.563				
5 J/cm ²	10 J/cm ²	20 J/cm ²	40 J/cm ²	80 J/cm ²	100 J/cm ²				
								Kontrolle	blank
								1.270.545	577.460
								1.242.988	567.300

Abbildung 7: Täglich entstehende Rohdaten bei der Bestimmung der Zellviabilität ($n = 1$)

Legende 7: Bei der morgendlichen Bestimmung der Zellviabilität mittels *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay* an jedem Versuchstag ergaben sich Rohdaten (angegeben in *arbitrary units*). Von links nach rechts finden sich die Werte zu jeweiliger Bestrahlungsdosis (H), zur Kontrollplatte, sowie zur Leermessung (*blank*). Hier sind beispielhaft die Rohdaten der Untersuchung juveniler Zellen von Patient 5 bei Anwendung von gelbem Licht dargestellt.

Die Leermessung (*blank*) diente der Messung der Hintergrundfluoreszenz. Diese wurde in der Auswertung vom bezeichneten Mittelwert subtrahiert, sodass sich als Ergebnis die Fluoreszenz des jeweils von den Zellen umgesetzten Resorufin ergab (vgl. Abbildung 8).

Applikation von gelbem Licht auf juvenile Zellen von Patient 5									
3. MITTELWERTE MINUS BLANK									
778.090	723.579	699.063	735.250	716.993	723.539				
								684.387	

Abbildung 8: Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz ($n = 1$)

Legende 8: Nachdem aus den 2, sich pro Bestrahlungsdosis ergebenden Werten (Rohdaten) (vgl. Abbildung 7), der Mittelwert gebildet wurde, wurde der Mittelwert der Leermessungen (*blank*) subtrahiert, welcher die Hintergrundfluoreszenz angibt. Von links nach rechts finden sich die somit bereinigten Werte zu jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) und zur Kontrollplatte (Angaben in *arbitrary units*). Hier sind beispielhaft die Werte juveniler Zellen von Patient 5 bei Anwendung von gelbem Licht dargestellt.

In dieser Form wurde die *Viabilität* der untersuchten Zellen (in Abhängigkeit von applizierter Lichtfarbe und Bestrahlungsdosis) an allen Versuchstagen bestimmt.

Durch diese mehrtägige Bestimmung der *Zellviabilität* (vgl. Tabelle 8), wurde bei jedem Patienten auf die *Zellproliferation* im zeitlichen Verlauf geschlossen, die sich graphisch am anschaulichsten in Form eines Liniendiagramms darstellen ließ (vgl. Abbildung 9).

Tabelle 8: Zusammenstellung der jeweils an den 5 Versuchstagen, in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H), gemessenen Zellviabilität (Angaben in *arbitrary units*) ($n = 1$) (beispielhaft: Applikation von gelbem Licht auf juvenile Zellen von Patient 5)

Applikation von gelbem Licht auf juvenile Zellen von Patient 5						
B. Dosis (H)	0. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
5 J/cm ²	778.090	1.208.212	2.061.556	2.880.555	3.701.229	3.727.122
10 J/cm ²	723.579	1.049.065	1.859.348	2.837.839	3.405.270	3.174.077
20 J/cm ²	699.063	978.540	1.747.148	2.817.650	3.364.633	3.239.933
40 J/cm ²	735.250	1.022.956	1.765.470	2.656.249	3.073.441	3.201.579
80 J/cm ²	716.993	1.016.400	1.691.605	2.532.581	3.202.325	3.201.448
100 J/cm ²	723.539	904.032	1.824.696	2.842.459	3.356.990	3.238.786
Kontrolle	684.387	1.013.487	2.067.053	3.107.793	3.719.025	3.781.190

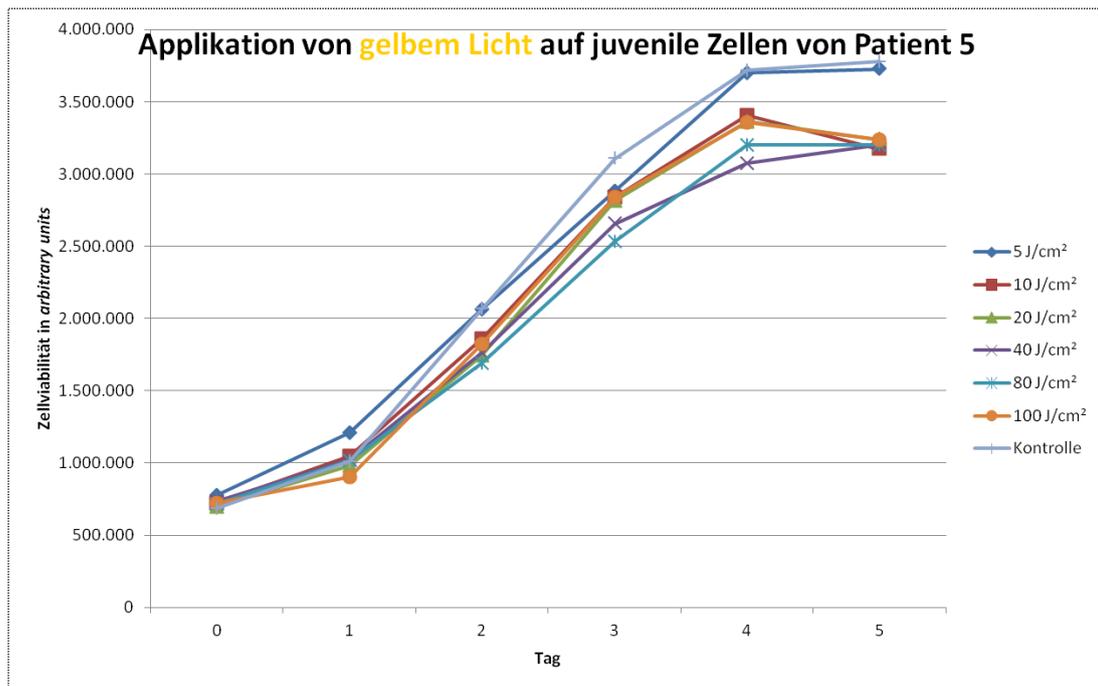


Abbildung 9: Zellproliferation bei jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 1$)

Legende 9: Durch besagte mehrtägige Bestimmung der Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*), wurde bei jedem Patienten auf die Zellproliferation in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf geschlossen. Diese war graphisch am anschaulichsten in Form jeweils eines Liniendiagramms darstellbar. Hier sind beispielhaft die Werte juveniler Zellen von Patient 5 bei Applikation von gelbem Licht dargestellt.

Nachdem, wie eben dargestellt, bei allen Patienten der zeitliche Verlauf der Zellproliferation in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis bekannt war, sollten schlussendlich die Ergebnisse aller Patienten, hinsichtlich applizierter Lichtfarbe (Grün, Gelb, Rot-Orange) und Zellalter (juvenil, seneszent), zusammengefasst werden, sodass die durchschnittliche Auswirkungen der jeweilig applizierten Bestrahlungsdosis (H) ersichtlich würde.

Dazu erfolgte in einem ersten Schritt Bestrahlungsdosis-bezogen aus den jeweiligen Ergebnissen der einzelnen Patienten (vgl. Tabelle 9 und Abbildung 10) die Berechnung von Mittelwert (MW), sowie Standardabweichung (bei $n = 8$) (vgl. Abbildung 11). Im Folgenden dazu beispielhaft die Darstellung der Ergebnisse für die Bestrahlungsdosis (H) 5 J/cm^2 bei Applikation von gelbem Licht auf juvenile Zellen.

Tabelle 9: Zusammenstellung der jeweils an den 5 Versuchstagen individuell gemessenen Zellviabilität bei angegebener Bestrahlungsdosis (H) (Angaben in *arbitrary units*), mit Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung ($n = 8$) (beispielhaft: Applikation von gelbem Licht auf juvenile Zellen mit einer Bestrahlungsdosis von 5 J/m^2)

Applikation von gelbem Licht auf juvenile Zellen							
mit einer Bestrahlungsdosis von 5 J/cm^2							
Patient	0. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	
1	758.357	682.638	993.667	1.395.710	1.672.435	2.334.191	
2	676.005	841.132	1.195.371	1.757.631	1.633.630	2.234.628	
3	736.923	858.255	1.054.807	1.572.673	1.510.111	2.412.483	
4	745.372	1.000.599	1.331.277	2.253.683	2.021.640	3.049.260	
5	778.090	1.208.212	2.061.556	2.880.555	3.701.229	3.727.122	
6	650.654	713.549	1.089.813	1.338.519	1.714.822	2.631.120	
7	608.806	791.903	897.568	1.292.328	1.902.300	1.771.202	
8	662.300	810.947	956.131	1.439.465	1.333.208	1.868.117	
MW	702.063	863.404	1.197.524	1.741.321	1.936.172	2.503.515	
Standardabweichung	56.613	158.601	351.109	520.034	696.335	597.976	
(Standardabw./MW)*100	8,06	18,37	29,32	29,86	35,96	23,89	

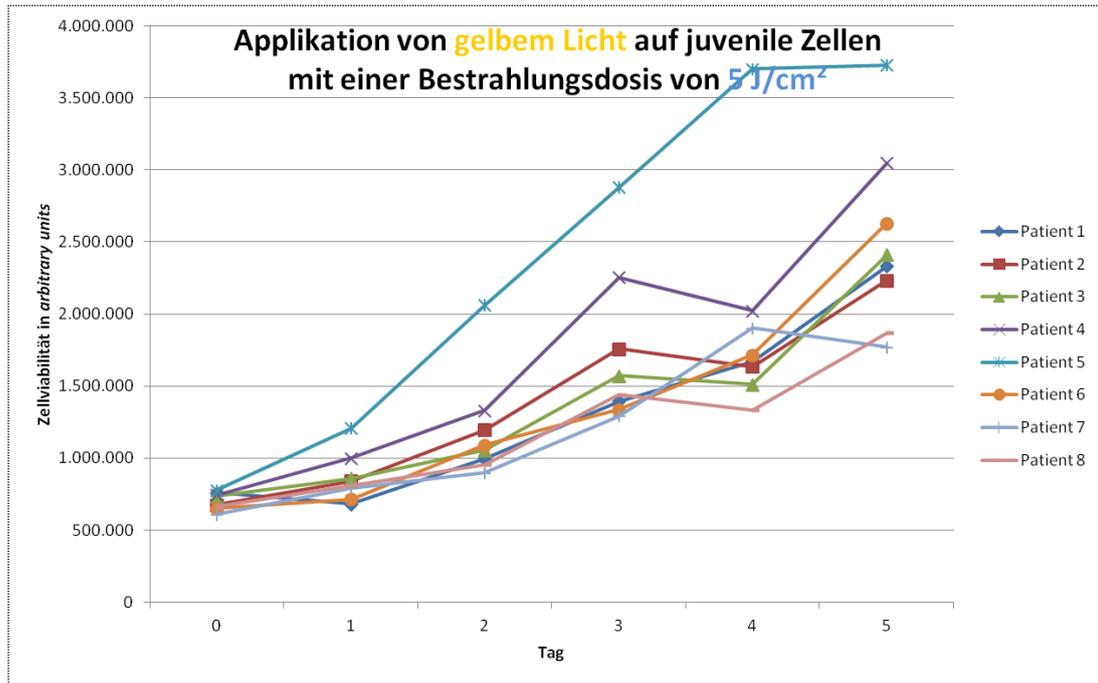


Abbildung 10: Individuelle Zellproliferation bei angegebener Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 10: Durch besagte mehrtägige Bestimmung der Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*), wurde für jeden Patienten auf die Zellproliferation im zeitlichen Verlauf geschlossen. Diese war graphisch am anschaulichsten in Form eines Liniendiagramms darstellbar. Hier sind beispielhaft die Ergebnisse der Applikation von gelbem Licht auf juvenile Zellen mit einer Bestrahlungsdosis (H) von 5 J/cm^2 dargestellt.

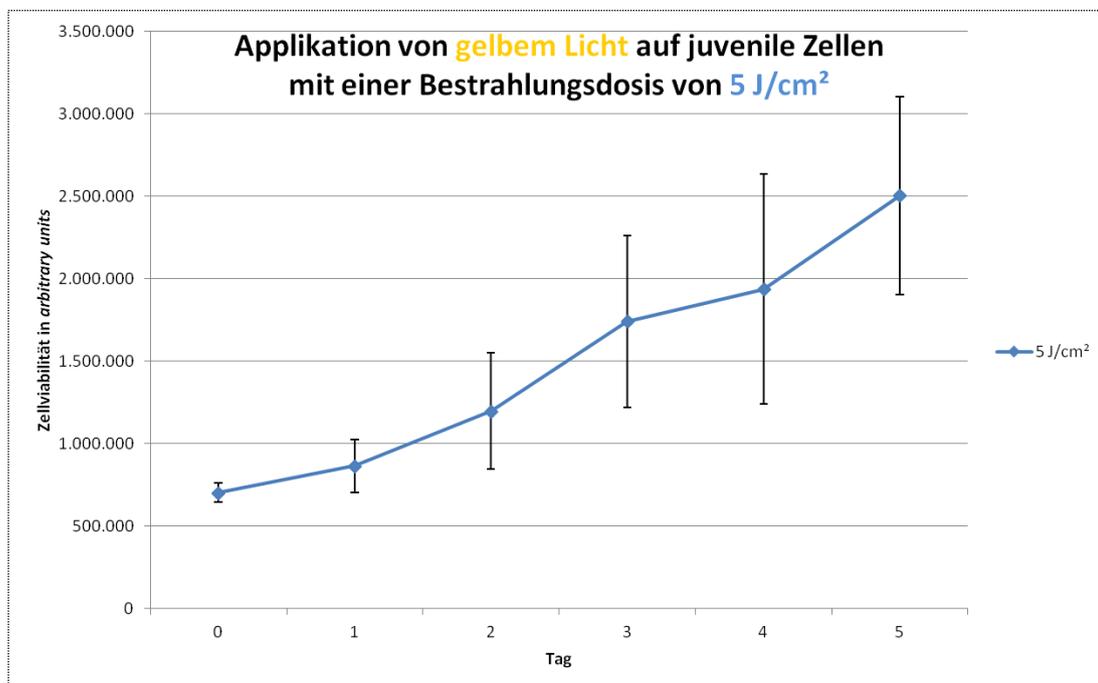


Abbildung 11: Durchschnittliche Zellproliferation bei angegebener Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 11: Durch besagte mehrtägige Bestimmung der Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*), wurde auf die Zellproliferation in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf geschlossen. Diese war graphisch am anschaulichsten in Form eines Liniendiagramms darstellbar. Angezeigt ist die entsprechende Standardabweichung. Hier ist beispielhaft das Ergebnis der Applikation von gelbem Licht auf juvenile Zellen mit einer Bestrahlungsdosis (H) von 5 J/cm^2 dargestellt.

Im Anschluss erfolgte die Zusammenstellung der jeweils an den 5 Versuchstagen, in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich gemessenen Zellviabilität (vgl. Tabelle 10), sowie die graphische Darstellung der Zellproliferation als Liniendiagramm (vgl. Abbildung 12).

Schlussendlich wurden so die Ergebnisse hinsichtlich applizierter Lichtfarbe (Grün, Gelb, Rot-Orange) und Zellalter (juvenil, seneszent) zusammengefasst, sodass die Auswirkung der jeweils applizierten Bestrahlungsdosis (H) ersichtlich wurde.

Tabelle 10: Zusammenstellung der jeweils an den 5 Versuchstagen, in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich gemessenen Zellviabilität (Angaben in *arbitrary units*) ($n = 8$) (beispielhaft: Applikation von gelbem Licht auf juvenile Zellen)

Applikation von gelbem Licht auf juvenile Zellen						
B.Dosis (H)	0. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
5 J/cm ²	702.063	863.404	1.197.524	1.741.321	1.936.172	2.503.515
10 J/cm ²	671.889	847.943	1.204.303	1.704.308	1.914.673	2.329.846
20 J/cm ²	664.088	835.826	1.164.519	1.659.337	1.880.686	2.328.616
40 J/cm ²	674.842	835.105	1.154.636	1.665.390	1.794.244	2.371.696
80 J/cm ²	667.973	823.162	1.130.550	1.630.584	1.785.181	2.246.872
100 J/cm ²	656.002	788.677	1.151.856	1.707.777	1.918.667	2.287.182
Kontrolle	675.348	876.476	1.304.439	1.962.163	2.240.205	2.662.901

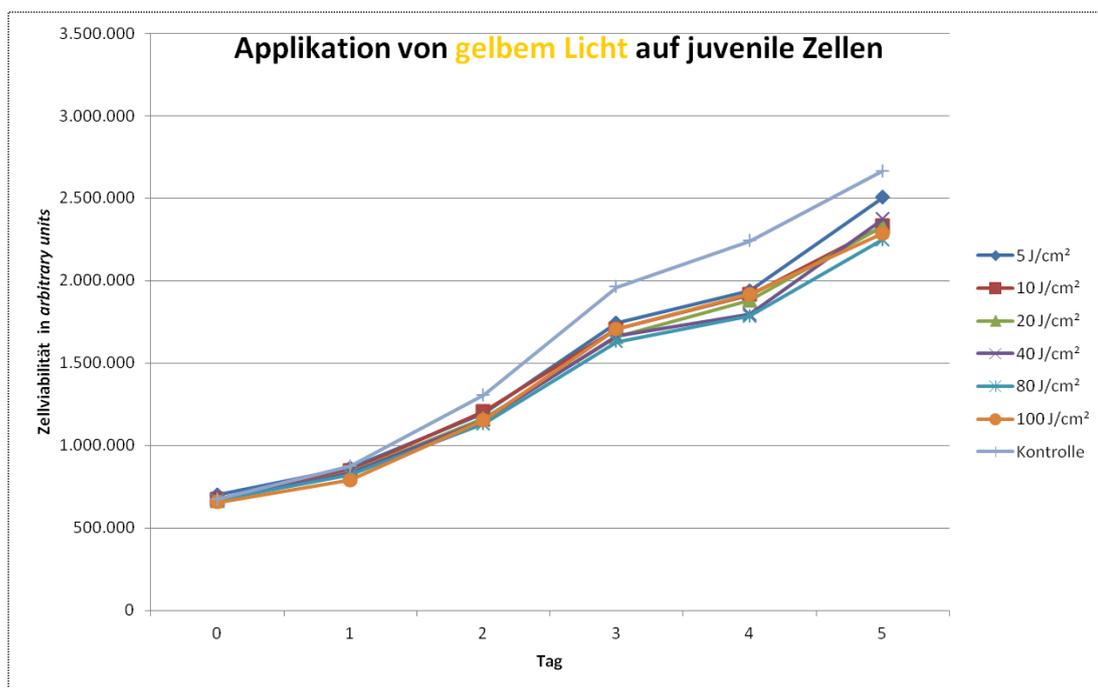


Abbildung 12: Durchschnittliche Zellproliferation bei jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)
 Legende 12: Durch besagte mehrtägige Bestimmung der Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*), wurde auf die Zellproliferation in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf geschlossen. Diese war graphisch am anschaulichsten in Form eines Liniendiagramms darstellbar. Hier sind beispielhaft die Ergebnisse der Applikation von gelbem Licht auf juvenile Zellen dargestellt.

Um die entsprechende Standardabweichung darstellen zu können, erfolgte ebenso die graphische Veranschaulichung als Säulendiagramm (vgl. Abbildung 13).

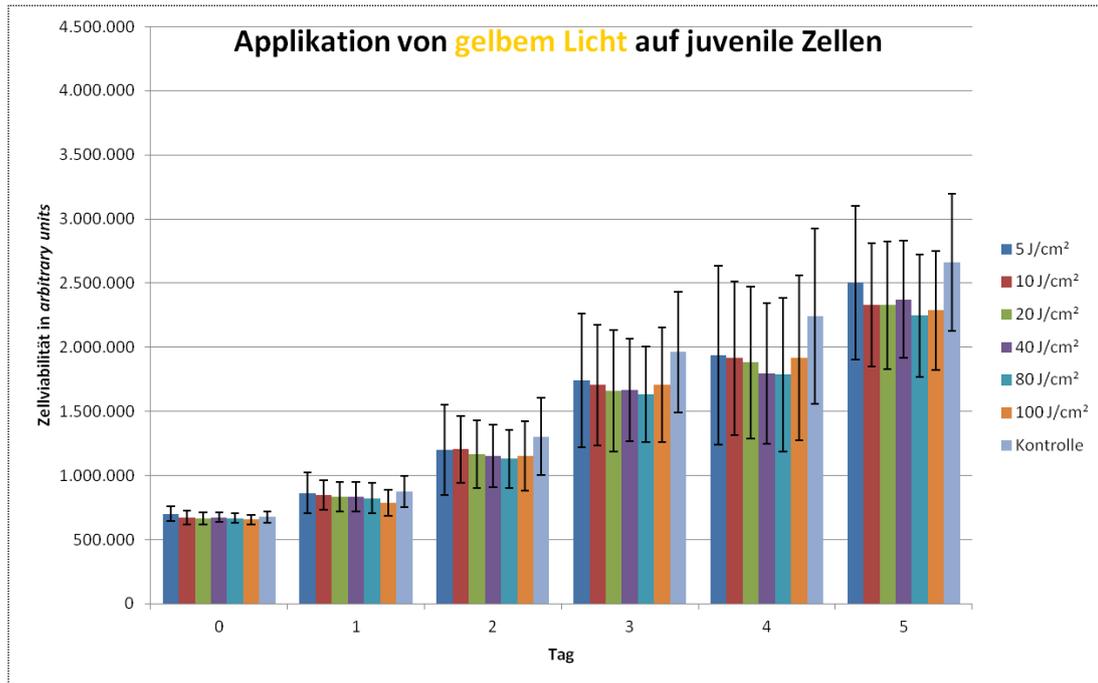


Abbildung 13: Durchschnittliche Zellproliferation bei jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)
 Legende 13: Durch besagte mehrtägige Bestimmung der Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*), wurde auf die Zellproliferation in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf geschlossen. Die graphische Veranschaulichung als Säulendiagramm erfolgte, um die entsprechende Standardabweichung anzeigen zu können. Hier sind beispielhaft die Ergebnisse der Applikation von gelbem Licht auf juvenile Zellen dargestellt.

Abschließend erfolgte die Berechnung (vgl. Tabelle 11) und graphische Darstellung (vgl. Abbildung 14) der durchschnittlichen prozentualen Minderung der Zellproliferation gegenüber Kontrolle nach 5 Bestrahlungstagen in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H). Dem voran gingen die Berechnungen zur Prüfung der Signifikanz. Im Folgenden dazu beispielhaft die Darstellung der Ergebnisse bei Applikation von gelbem Licht auf juvenile Zellen.

Tabelle 11: Durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation gegenüber Kontrolle nach 5 Bestrahlungstagen mit Angabe entsprechender Standardabweichung in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$) (beispielhaft: Applikation von gelbem Licht auf juvenile Zellen)

Prozentuale Minderung der Zellproliferation durch Bestrahlung ggb. Kontrolle zu Versuchsende nach 5 Bestrahlungstagen (jeweilige Standardabw. rechts)	
6,36	7,86
12,29	8,16
12,53	7,48
10,67	6,12
15,60	6,09
14,10	3,52
0,00	0,00

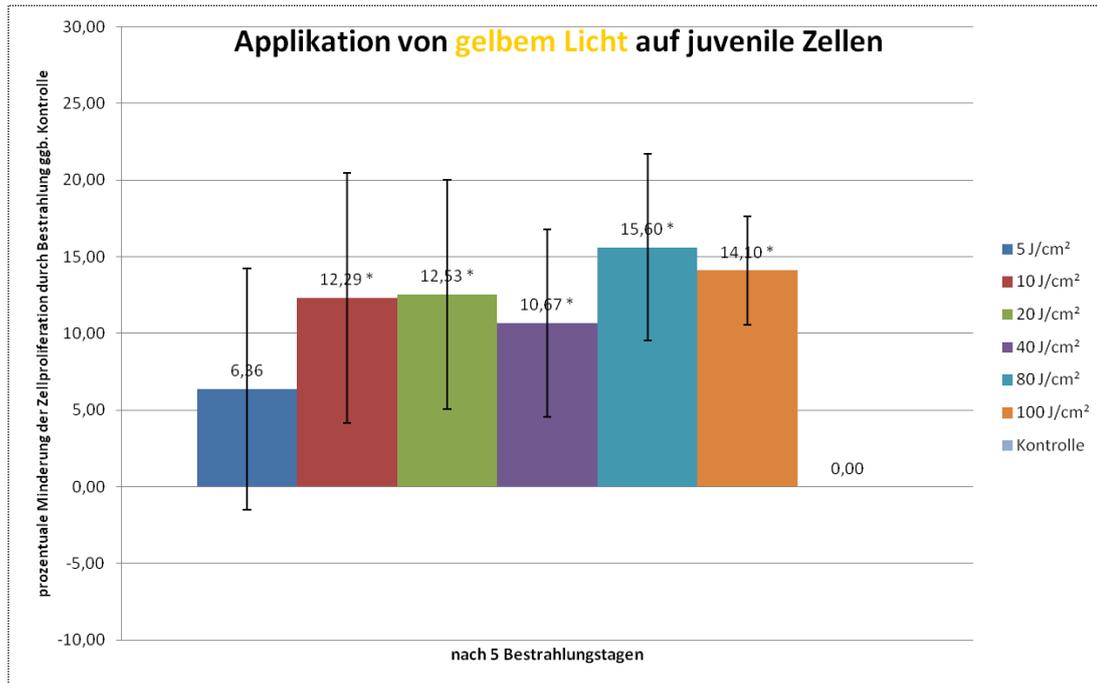


Abbildung 14: Durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation gegenüber Kontrolle nach 5 Bestrahlungstagen bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 14: Dargestellt ist die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation ggb. Kontrolle nach 5 Bestrahlungstagen bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) mit entsprechender Standardabweichung. Hier sind beispielhaft die Ergebnisse der Applikation von gelbem Licht auf juvenile Zellen dargestellt.

Hinsichtlich statistischer Auswertung und der angewandten Methoden sei auf das entsprechende Kapitel (vgl. 3.5) verwiesen.

3.3.5. (Fluoreszenz-)Mikroskopische Aufnahmen bei Versuchsende an Tag 5

Wie bereits obig erläutert (vgl. 3.3.3) bezeichnet Fluoreszenz die kurzzeitige Licht-Emission eines Stoffes nach vorangegangener Exzitation. Der *stokes-shift* bezeichnet dabei die Wellenlängenverschiebung von der Exzitations- (λ_{ex}) zur größeren Emmissionswellenlänge (λ_{em}).

Hoechst 33342 ist ein Nukleinsäurefarbstoff, welcher zelldurchlässig ist und daher häufig zur Diskriminierung lebender Zellen genutzt wird. Insbesondere werden jene Abschnitte der Doppelstrang-DNA gebunden, welche reich an Adenin-Thymin-Basenpaaren sind. Die Exzitationswellenlänge (λ_{ex}) beträgt 346 nm, die Emmissionswellenlänge (λ_{em}) 460 nm.

Propidiumiodid ist ebenfalls ein Nukleinsäurefarbstoff. Die Exzitationswellenlänge (λ_{ex}) beträgt 535 nm, die Emmissionswellenlänge (λ_{em}) 617 nm. Da Propidiumiodid nicht die intakte Membran lebender Zellen durchdringt, werden nur tote Zellen angefärbt.

Durch die kombinierte Nutzung von *Hoechst 33342* und Propidiumiodid wurde bei vorliegender Arbeit eine fluoreszenzmikroskopische Unterscheidung lebender und toter Zellen möglich.

Durch entsprechende Aufnahmen zu Versuchsabschluss an Tag 5 wurde der Einfluss jeweils applizierter Lichtfarbe und Bestrahlungsdosis (H) auf die Zellproliferation zusätzlich zur fluoreszenzspektroskopischen quantitativen Bestimmung bildlich visualisiert.

Ebenfalls erfolgten Aufnahmen im Hellfeld.

MATERIAL UND METHODEN, Proliferationsversuche

Bei entsprechend zu analysierende *wells* wurde nach der letzten Bestimmung der Zellviabilität an Tag 5 die zuvor angewandte *CellTiter-Blue*®-Lösung abgesaugt, die Zellen mehrmals mit *PBS* gewaschen und im Anschluss 500 µl einer *PBS*-Lösung appliziert, welche eine Endkonzentration von 5 µg/ml *Hoechst 33342* und eine Endkonzentration von 50 µg/ml *Propidiumiodid* enthielt (Herstellerangaben).

Nach 10-minütiger Inkubation im Brutschrank (die Lichtempfindlichkeit der Farbstoffe war zu beachten) erfolgten die fluoreszenzmikroskopischen-, sowie die Hellfeld-Aufnahmen.

3.4. Migrationsversuche

Während der proliferativen Phase der Wundheilung (vgl. 1.3) spielt die Migration von Zellen eine besondere Rolle. Diese manifestiert sich *in vivo* in der Reepithelisation durch Keratinozyten, sowie der Granulation zur Auffüllung des Wunddefektes u.a. durch Einwanderung, Aktivierung und Proliferation von Fibroblasten.

Eine Untersuchung der Migration humaner Fibroblasten und Keratinozyten in Abhängigkeit von applizierter Lichtfarbe und Bestrahlungsdosis *in vitro* erschien daher von Interesse.

Als Strahlenquellen wurden, wie beim vorangegangenen Experimentalverfahren (vgl. 3.3), prototypische schmalbandige LED-Arrays von Philips verwendet. Genutzt wurde abermals Licht der Farben Grün (Wellenlänge 524 nm), Gelb (Wellenlänge 599 nm) und Rot-Orange (Wellenlänge 632 nm). Zudem wurde bei Untersuchung der Fibroblasten zusätzlich auch Licht der Farbe Blau (Wellenlänge 453 nm) verwendet.

In diesen Versuchen wurden *Culture-Inserts* der Firma *ibidi* genutzt (vgl. Abbildung 15). Dabei handelt es sich um 9 mm x 9 mm große, rechteckige Einsätze aus biokompatiblen Material mit einer Höhe von 5 mm. Durch einen 500 µm breiten, ebenfalls 5 mm hohen Steg, werden innerhalb eines Einsatzes 2 Kammern mit einer jeweiligen Wachstumsfläche von 0,22 cm² voneinander getrennt (Herstellerangaben).

Die Oberfläche besagter Einsätze ist auf einer Seite haftend, sodass diese in *multiwell*-Platten eingebracht werden konnten und dort adhärent verblieben.

Durch Einbringen einer Zellsuspension definierter Konzentration in die beiden Kammern, kam es entsprechend nur auf Fläche besagter Kammern zu einem Anwachsen der Zellen. Nach Entfernung des Einsatzes mittels steriler Pinzette, verblieben im entsprechenden *well* 2 einander gegenüberliegende Flächen konfluenter Zellen (jeweils 0,22 cm² groß und 500 µm voneinander entfernt) (vgl. Abbildung 16).

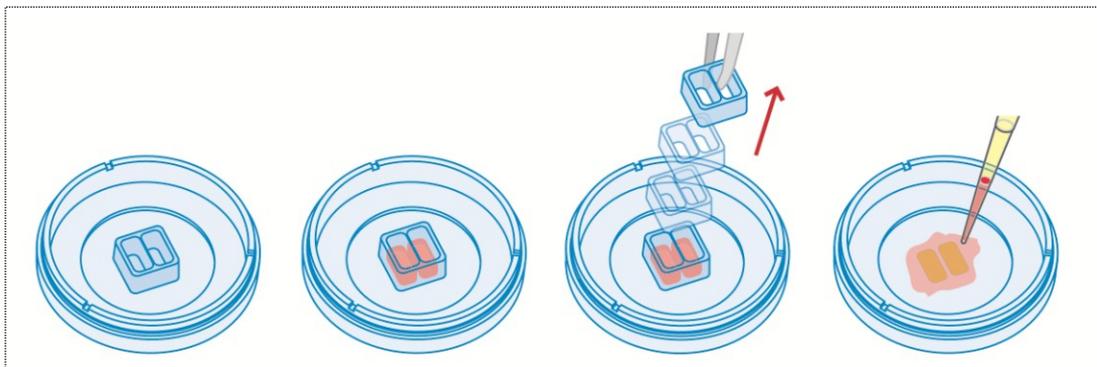


Abbildung 15: Arbeitsablauf bei der Verwendung der *ibidi Culture-Inserts*

Legende 15: Nach Einbringen der *Culture-Inserts* in entsprechende *multiwell*-Platten, erfolgte Applikation zu verwendender Zellsuspension in die Kammern. Nach 24-stündigem Anwachsen der Zellen, wurden die Einsätze entfernt und letztlich das jeweilige Nährmedium appliziert. Mit freundlicher Genehmigung der *ibidi GmbH*.

Es erfolgte jeweils die Applikation einer einzigen Bestrahlungsdosis.

Durch wiederholte mikroskopische Aufnahmen zu definierten Zeitpunkten konnte im Folgenden der Einfluss des Lichts applizierter Wellenlänge und Bestrahlungsdosis (*H*) auf die Zellmigration quantifiziert werden, welcher in der Entwicklung der Zell-bedeckten Fläche im Laufe der Zeit ersichtlich wurde.

Dargestelltes Verfahren wird in der englischsprachigen Fachliteratur auch als *Scratch-Assay* bezeichnet.

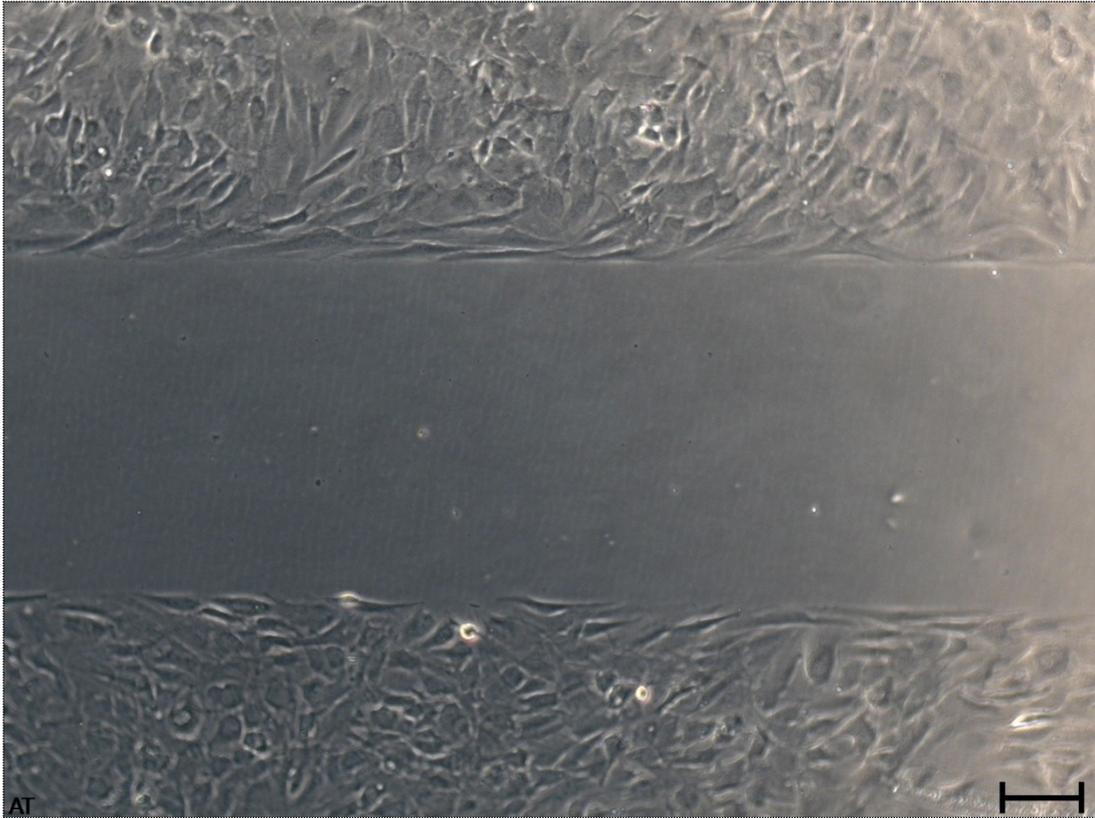


Abbildung 16: Wunderzeugung *in vitro* durch Entfernung der *Culture-Inserts* nach 24-stündigem Anwachsen
 Legende 16: Nach Entfernung des Einsatzes mittels steriler Pinzette, verblieben in *well 2* einander gegenüberliegende Flächen konfluenter Zellen im Abstand von 500 μm . Dies stellte den Versuchsbeginn ($t = 0$ h) dar. *Scale bar* = 100 μm . Beispielhaft ist eine Aufnahme von Fibroblasten dargestellt.

3.4.1. Versuchsaufbau, Bestrahlungsdosen, sowie Ablauf des Versuches

Um vom Versuchsaufbau her möglichst nah am vorangegangenen Experimentalverfahren zu bleiben (vgl. 3.3.1), wurden in diesem Versuch ebenfalls 24-*well*-Platten genutzt. Durch genutzte Methodik sollte nämlich - bei Konstanterhaltung der übrigen experimentellen Faktoren - eine weitere Phase des Wundheilungsprozesses hinsichtlich einer eventuellen Abhängigkeit von Licht applizierter Wellenlänge und Bestrahlungsdosis analysiert werden.

Pro 24-*well*-Platte wurden in 8 *wells* *Culture-Inserts* eingebracht. Dabei besetzten Zellen eines Patienten jeweils 2 Einsätze (Doppelbestimmung). Somit konnten pro 24-*well*-Platte die Zellen vierer Patienten untersucht werden. 16 *wells* blieben unverwendet.

Für blaues Licht wurde die Bestrahlungsdosis (H) 5 J/cm^2 untersucht. Für grünes Licht wurden die Bestrahlungsdosen (H) 10 J/cm^2 , 80 J/cm^2 , und 200 J/cm^2 untersucht. Für gelbes, sowie rot-oranges Licht wurden die Bestrahlungsdosen (H) 5 J/cm^2 , 40 J/cm^2 und 100 J/cm^2 untersucht.

Die Bestrahlungszeiten (T) für Grün, Gelb und Rot-Orange entsprachen den oben angegebenen (vgl. Tabelle 5, Tabelle 6, Tabelle 7). Die Bestrahlungszeit für Blau ergab sich aus der Bestrahlungsstärke (E) von 18,96 mW/cm^2 (Herstellerangabe) und ist der folgenden Tabelle zu entnehmen (vgl. Tabelle 12).

Tabelle 12: Bestrahlungszeit für Blau

Bestrahlungsdosis	Bestrahlungszeit
5 J/cm^2	02:18 min

Pro untersuchter Strahlenquelle wurden für Grün, Gelb, sowie Rot-Orange somit für 4 Patienten vier 24-*well*-Platten in dieser Art besetzt. Die Zahl 4 ergab sich aus den 3 zu untersuchenden Bestrahlungsdosen und einer Kontroll-Platte als Referenz. Für Blau wurden entsprechend zwei 24-*well*-Platten besetzt.

Bei den Fibroblasten betrug die, pro Kammer eines verwendeten Einsatzes, ausgesäte Zellzahl - wie bei den zuvor dargestellten Proliferationsversuchen - 20 000 (begründend war die obig genannte Konstanterhaltung experimenteller Faktoren). Bei den Keratinozyten stellte sich diese Aussäzellzahl in Vorversuchen als zu gering heraus, sodass pro Kammer 30 000 Zellen ausgesät wurden.

Das Aussäen erfolgte analog oben beschriebener Vorgehensweise (vgl. 3.3.2). Pro Kammer betrug das Volumen applizierter Zellsuspension 70 μ l.

Die Entfernung der *Culture-Inserts* erfolgte jeweils nach 24-stündigem Anwachsen und stellte die Wunderzeugung *in vitro* dar (Versuchsbeginn).

Nach Entfernung der Einsätze aus den *wells*, wurden diese zügig mit *PBS* gewaschen, um evtl. nicht-adhärenente Zellen zu entfernen und es erfolgten die ersten mikroskopischen Aufnahmen ($t = 0$ h) nach Applikation des jeweiligen Nährmediums.

Im Anschluss wurde die einzige Bestrahlungsdosis appliziert.

Die Bestrahlung erfolgte in *DPBS* bei umgebender Raumluft (*ohne* CO₂-Begasung). Die übrige Lagerung erfolgte unter üblichen Bedingungen im CO₂-Inkubator und im jeweiligen Nährmedium (*DMEM* für Fibroblasten, *Keratinocyte-SFM* für Keratinozyten). Das Flüssigkeitsvolumen (*DPBS* bzw. Nährmedium) pro *well* betrug stets 500 μ l.

Die Temperatur, welcher die Zellen während der Bestrahlung ausgesetzt waren, entsprach jener im CO₂-Inkubator (37 °C).

Dem vorangegangenen Experimentalverfahren analog, wurden die 24-*well*-Platten nach erfolgter Bestrahlung für die jeweilige zeitliche Differenz der angewandten zur längsten Bestrahlungszeit entsprechender Lampe in *DPBS* in einem Inkubator *ohne* CO₂-Begasung bei 37 °C gelagert. Umgebende Luft entsprach folglich der Raumluft. Die Kontrolle wurde für die Dauer der längsten Bestrahlungszeit ebenfalls in besagtem Inkubator in *DPBS* gehalten.

Somit waren alle, während der Experimente auf die Zellen einwirkenden, Faktoren konstant. Lediglich die applizierte Bestrahlungsdosis (*H*) wurde variiert.

Während der jeweils 40-stündigen Versuche erfolgten mikroskopische Aufnahmen jeweils zu Versuchsbeginn unmittelbar nach Entfernung der Einsätze ($t = 0$ h), sowie nach 16 h, 20 h, 24 h und 40 h. Vorversuche hatten innerhalb der ersten 16 h nach Wund-Erzeugung *in vitro* kaum Zellmigration gezeigt, nach 40 h einen Anteil der Zell-bedeckten Fläche von 100 Prozent.

Zur Aufnahme mikroskopischer Bilder erfolgte zwangsläufig Herausnahme der *well*-Platten aus dem Brutschrank, umgebende Luft entsprach folglich während der Aufnahmen der Raumluft. Dahingehend wurde auch davon abgesehen, die Zellen von mehr als vier Patienten pro *well*-Platte zu untersuchen (s.o.), da so die CO₂-Begasung zu lange hätte ausgesetzt werden müssen.

Da die *Culture-Inserts* wiederverwendbar waren, erfolgte nach Verwendung stets Entfernung eventuelle noch vorhandener Zellreste und Desinfektion mittels 70%igem Ethanol, sowie Lagerung bis zum nächsten Gebrauch in eben diesem. Vor unmittelbarer Verwendung wurden die Einsätze erneut mehrere Minuten in 70%igem Ethanol gelagert und 2 Mal mit *PBS* gewaschen. Die Lufttrocknung bis zur Evaporation letzter Flüssigkeitsreste (innerhalb der Sterilbank) stellte anschließend die ausreichende Haftung der Einsätze am *well*-Boden sicher.

Auf Seite der Fibroblasten wurden die Versuche mit seneszenten Zellen, auf Seite der Keratinozyten mit juvenilen Zellen durchgeführt (vgl. 3.4.1 und 5.3).

3.4.2. Graphische und mathematische Auswertung der Versuchsergebnisse

Wie eben beschrieben (vgl. 3.4.1) erfolgten zu 5 definierten Zeitpunkten mikroskopische Aufnahmen (bei $t = 0$ h, $t = 16$ h, $t = 20$ h, $t = 24$ h und $t = 40$ h). Tabelle 13 stellt beispielhaft den Verlauf bei unbestrahlten Kontroll-Zellen dar. Links sind Fibroblasten, rechts Keratinozyten dargestellt.

Beispielhaft ist dazu im Folgenden (vgl. Abbildung 17) vergrößert die Aufnahme der Keratinozyten von $t = 24$ h dargestellt (entnommen aus Tabelle 13).

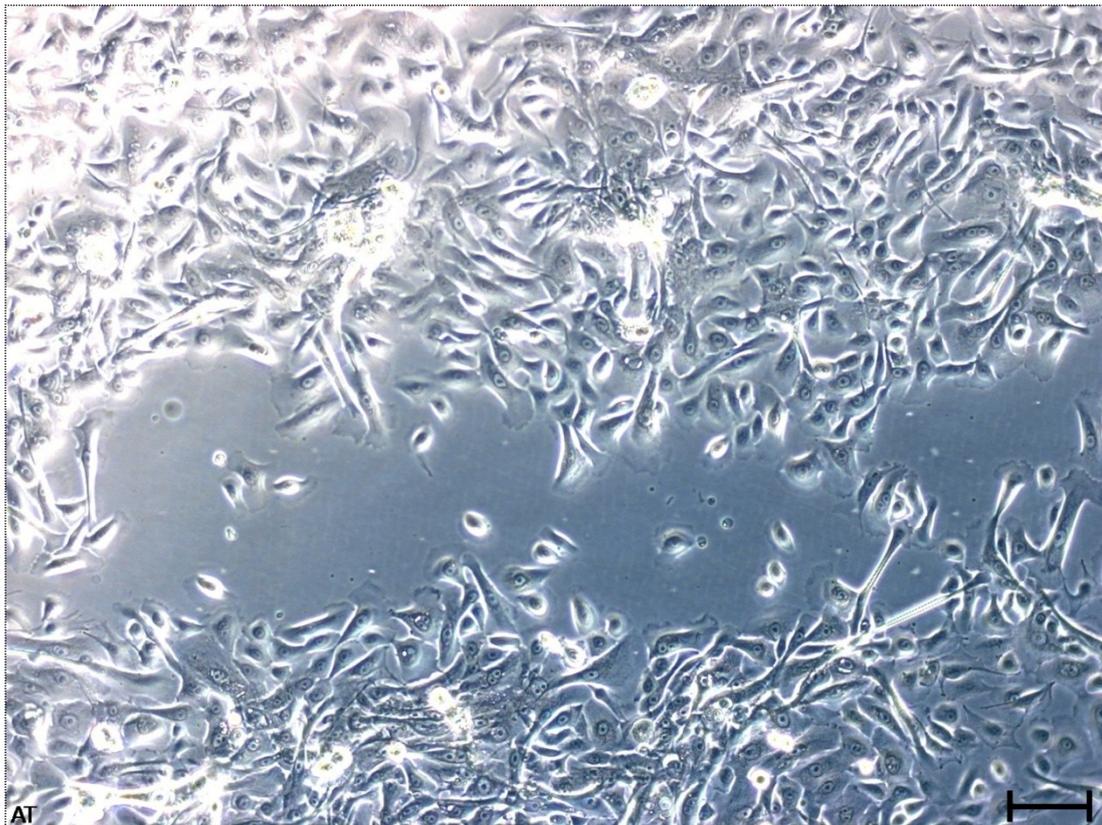
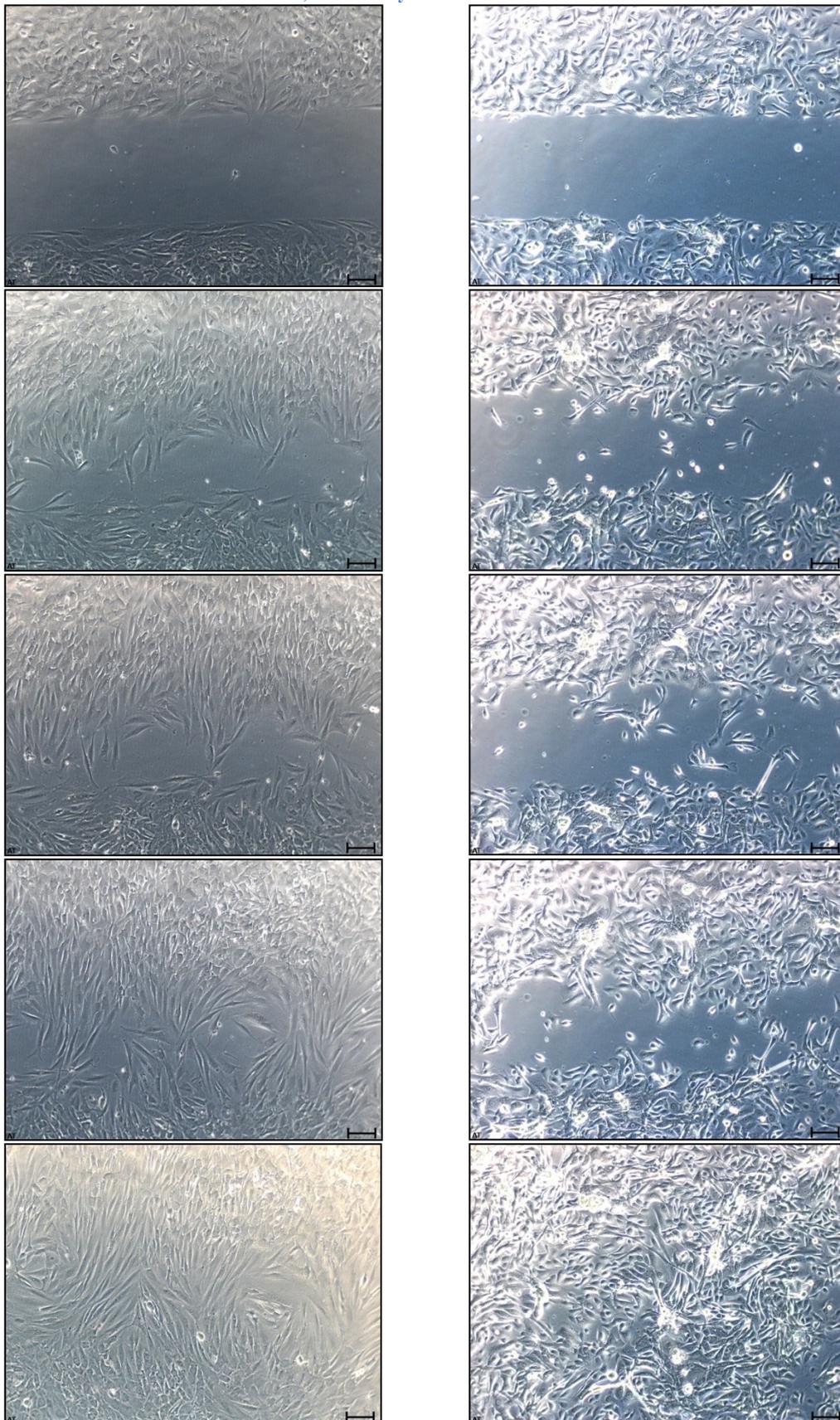


Abbildung 17: Graphische Auswertung mikroskopischer Aufnahmen zu den Migrationsversuchen

Legende 17: Mittels der Software *Fiji* erfolgte die graphische Auswertung aller mikroskopischen Aufnahmen zu den Migrationsversuchen. Die zellfreie Fläche wurde dabei manuell bestimmt. *Scale bar* = 100 μ m. Beispielhaft ist hier die Aufnahme unbestrahlter Kontroll-Zellen (Keratinozyten) aus Tabelle 13 bei $t = 24$ h dargestellt.

Tabelle 13: Wiederholte mikroskopische Aufnahmen zu den Zeitpunkten $t=0$ h (unmittelbar nach Erzeugung des Wunddefekts *in vitro*), $t=16$ h, $t=20$ h, $t=24$ h und $t=40$ h im Rahmen der Migrationsversuche ($n=1$). Scale bar = 100 μm . Beispielhafte Darstellung des Verlaufes bei unbestrahlten Kontroll-Zellen: Fibroblasten links, Keratinozyten rechts.



Die graphische Auswertung der Aufnahmen (insgesamt 1 120 an der Zahl) erfolgt mit der Software *Fiji* [24, *passim*]. Dabei wurde in einem ersten Schritt bei allen Aufnahmen *manuell* die zellfreie Fläche bestimmt (angegeben in *arbitrary units*) (vgl. Tabelle 14). Im Folgenden dazu beispielhaft die Darstellung der Ergebnisse unbestrahlter Keratinozyten-Kontroll-Zellen.

Tabelle 14: Zusammenstellung der, anhand individueller mikroskopischer Aufnahmen ermittelten, zellfreien Flächen zu den jeweiligen Aufnahmezeitpunkten (Angaben in *arbitrary units*), sowie der durch Zellmigration anteilmäßig zugewachsenen Fläche (Angaben in Prozent) bei angegebener Bestrahlungsdosis (*H*) mit Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung ($n = 8$) (beispielhaft: Kontroll-Zellen zur Applikation von grünem Licht auf Keratinozyten)

Applikation von grünem Licht auf Keratinozyten										
Kontroll-Zellen										
Patient	Zell-freie Fläche in <i>arbitrary units</i>					prozentualer Anteil der durch Zellmigration zugewachsenen Fläche				
	$t = 0$ h	$t = 16$ h	$t = 20$ h	$t = 24$ h	$t = 40$ h	$t = 0$ h	$t = 16$ h	$t = 20$ h	$t = 24$ h	$t = 40$ h
1	595.083	492.630	407.861	275.797	30.133	0,00	17,22	31,46	53,65	94,94
2	766.170	681.763	629.300	504.710	11.681	0,00	11,02	17,86	34,13	98,48
3	587.638	501.364	410.718	285.073	37.702	0,00	14,68	30,11	51,49	93,58
4	653.792	543.939	518.021	461.025	93.552	0,00	16,80	20,77	29,48	85,69
5	690.235	547.107	505.793	457.997	47.896	0,00	20,74	26,72	33,65	93,06
6	695.386	577.778	557.270	516.458	44.104	0,00	16,91	19,86	25,73	93,66
7	719.600	440.914	389.917	243.758	4.532	0,00	38,73	45,81	66,13	99,37
8	685.237	568.219	469.017	370.474	6.360	0,00	17,08	31,55	45,93	99,07
				MW		0,00	19,15	28,02	42,52	94,73
				Standardabweichung		0,00	7,83	8,44	13,11	4,20
				(Standardabw./MW)*100		0,00	40,90	30,11	30,82	4,44

Durch Verrechnung mit dem jeweiligen Ausgangswert zu $t = 0$ h ergab sich der Anteil, der durch Zellmigration zugewachsenen Fläche (angegeben in Prozent) (vgl. Tabelle 14 und Abbildung 18). Final ließen sich dazu Bestrahlungsdosis-bezogen Mittelwert und Standardabweichung berechnen (vgl. Tabelle 14 und Abbildung 19).

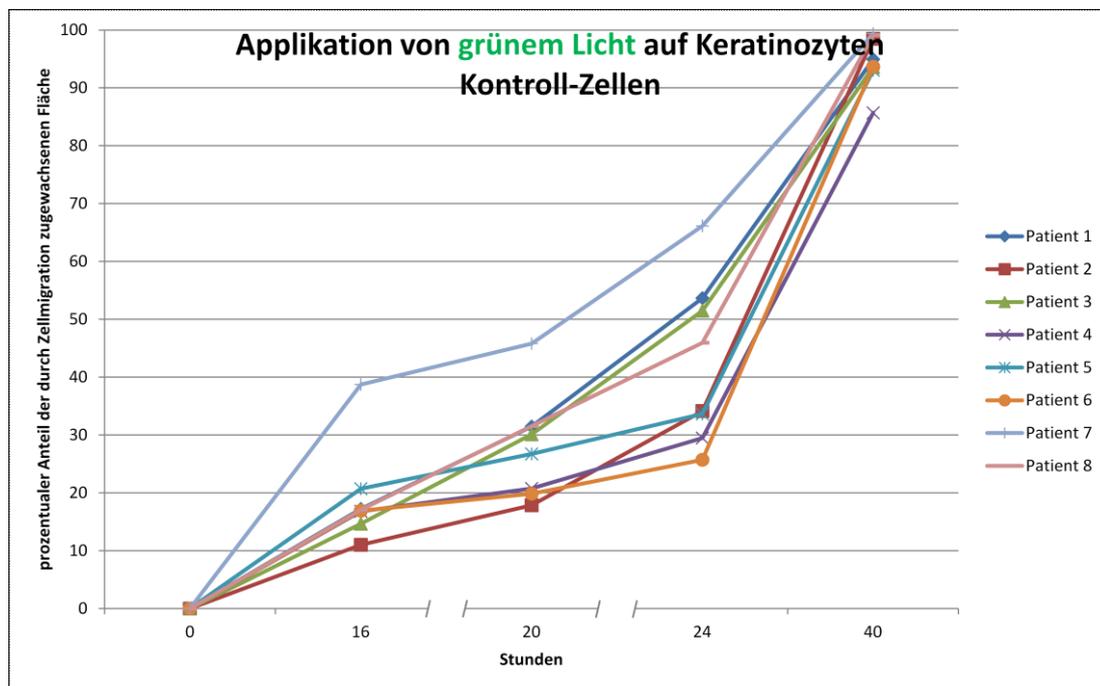


Abbildung 18: Bei angegebener Bestrahlungsdosis (*H*) individuell durch Zellmigration zugewachsene Fläche ($n = 8$)

Legende 18: Aus den graphisch quantifizierten zellfreien Flächen zu den jeweiligen Aufnahmezeitpunkten, resultierte rechnerisch für jeden Patienten der Anteil der durch Zellmigration zugewachsenen Fläche im zeitlichen Verlauf (angegeben in Prozent). Dies war graphisch am anschaulichsten in Form eines Liniendiagramms darstellbar. Hier ist beispielhaft der Verlauf bei unbestrahlten Kontroll-Zellen zur Applikation von grünem Licht auf Keratinozyten dargestellt.

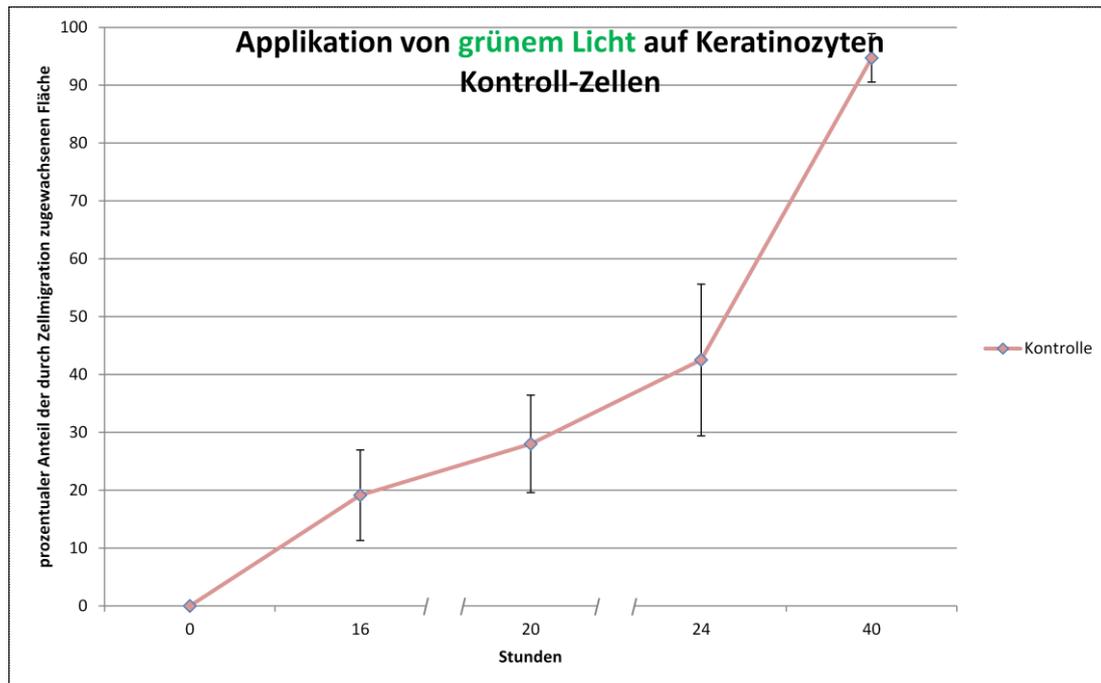


Abbildung 19: Bei angegebener Bestrahlungsdosis (H) durchschnittlich durch Zellmigration zugewachsene Fläche ($n = 8$)

Legende 19: Aus den graphisch quantifizierten zellfreien Flächen zu den jeweiligen Aufnahme-Zeitpunkten, resultierte rechnerisch der Anteil der durch Zellmigration zugewachsenen Fläche im zeitlichen Verlauf (angegeben in Prozent). Dies war graphisch am anschaulichsten in Form eines Liniendiagramms darstellbar. Angezeigt ist die entsprechende Standardabweichung. Hier ist beispielhaft der Verlauf bei unbestrahlten Kontroll-Zellen zur Applikation von grünem Licht auf Keratinozyten dargestellt.

Im zweiten Schritt wurden, für das entsprechend angewandte LED-System, die errechneten Durchschnittswerte jeweiliger Bestrahlungsdosen zusammengefasst (vgl. Tabelle 15). Im Folgenden dazu beispielhaft die Darstellung der Ergebnisse bei Applikation von grünem Licht auf Keratinozyten.

Tabelle 15: Zusammenstellung der zu den einzelnen Aufnahmezeitpunkten, in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich durch Zellmigration zugewachsenen Fläche (angegeben in Prozent) ($n = 8$) (beispielhaft: Applikation von grünem Licht auf Keratinozyten)

Applikation von grünem Licht auf Keratinozyten					
B.Dosis (H)	0 h	16 h	20 h	24 h	40 h
10 J/cm ²	0	21	30	48	95
80 J/cm ²	0	12	19	32	86
200 J/cm ²	0	9	16	24	76
Kontrolle	0	19	28	43	95

Die Ergebnisse ließen sich graphisch zum einen als Liniendiagramm (vgl. Abbildung 20), zum anderen als Säulendiagramm (vgl. Abbildung 21), zwecks Abbildung der jeweiligen Standardabweichung, darstellen.

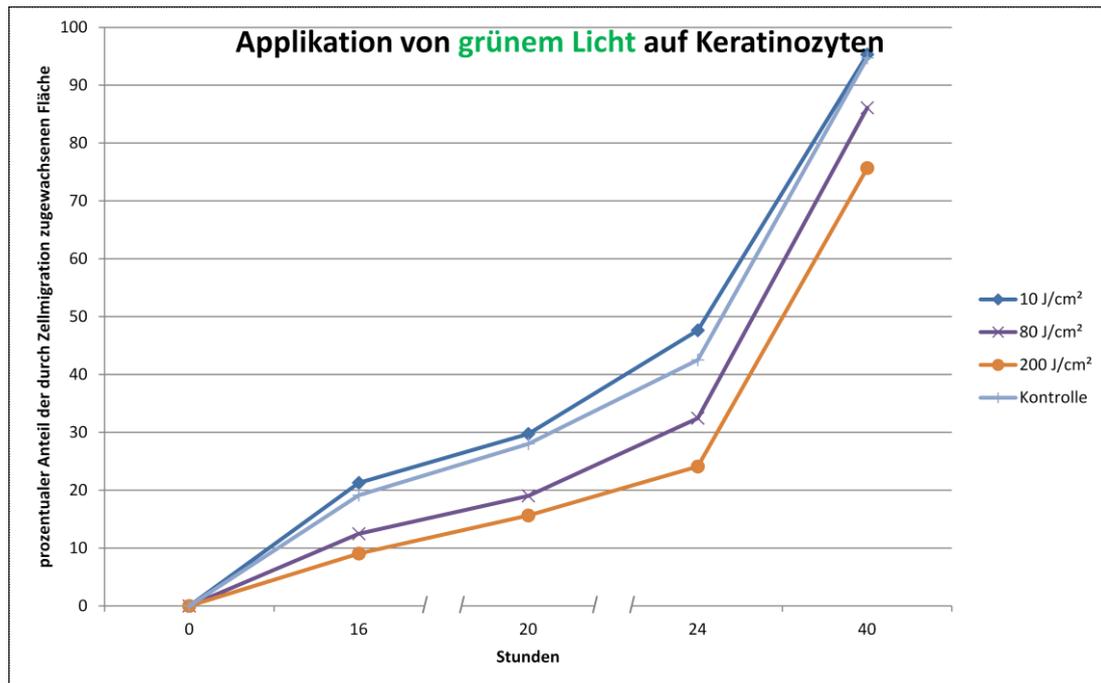


Abbildung 20: Durchschnittlich durch Zellmigration zugewachsene Fläche in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 20: Aus den graphisch quantifizierten zellfreien Flächen zu den jeweiligen Aufnahmezeitpunkten, resultierte rechnerisch der Anteil der durch Zellmigration zugewachsenen Fläche in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf (angegeben in Prozent). Dies war graphisch am anschaulichsten in Form eines Liniendiagramms darstellbar. Hier sind beispielhaft die Ergebnisse der Applikation von grünem Licht auf Keratinozyten dargestellt.

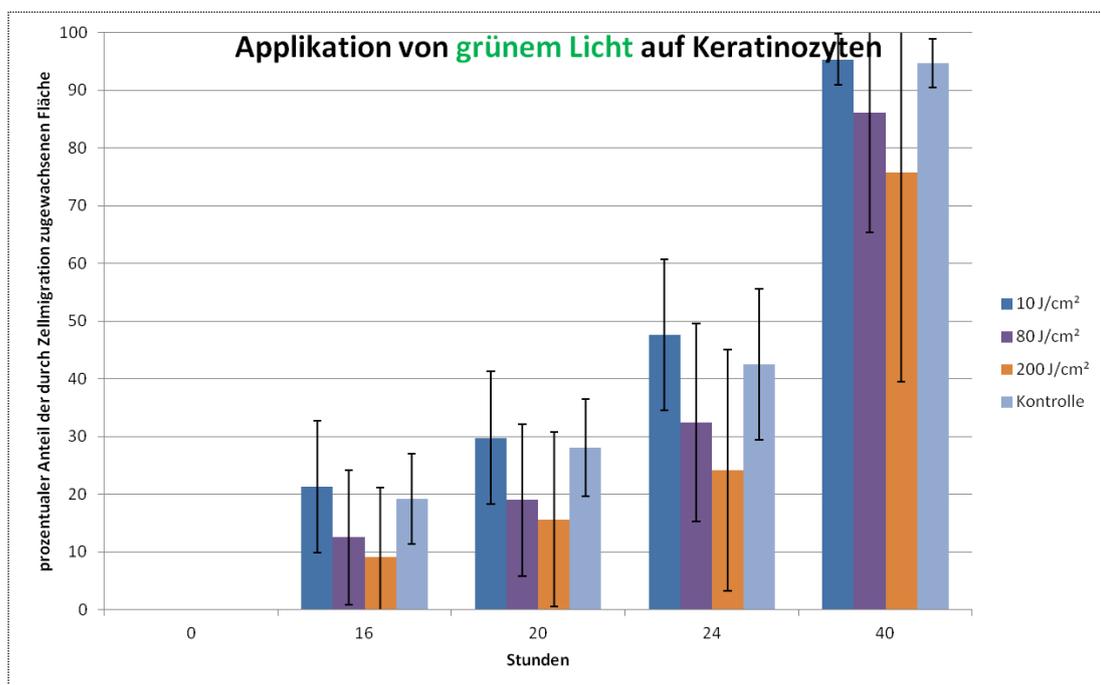


Abbildung 21: Durchschnittlich durch Zellmigration zugewachsene Fläche in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 21: Aus den graphisch quantifizierten zellfreien Flächen zu den jeweiligen Aufnahmezeitpunkten, resultierte rechnerisch der Anteil der durch Zellmigration zugewachsenen Fläche in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf (angegeben in Prozent). Die graphische Veranschaulichung als Säulendiagramm erfolgte, um die entsprechende Standardabweichung anzeigen zu können. Hier sind beispielhaft die Ergebnisse der Applikation von grünem Licht auf Keratinozyten dargestellt.

Abschließend erfolgte die Berechnung (vgl. Tabelle 16) und graphische Darstellung der durchschnittlichen prozentualen Minderung der Zellmigration gegenüber Kontrolle zu Versuchsende nach 40 Stunden in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) (vgl. Abbildung 22). Dem voran gingen die Berechnungen zur Prüfung der Signifikanz.

Anzumerken ist, dass eine final angegebene negative prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung ggb. der Kontrolle nach 40 h - welche sich bei einer *Steigerung* der Migration durch Bestrahlung ergab - nicht gleichzeitig das Verhältnis der Bestrahlungsdosis-bezogenen Mittelwert abbildet. Diese ergab sich aus den angewandten mathematischen Verfahren, welche zur Berechnung nicht besagte Mittelwerte, sondern stets die primär erhobenen Daten der jeweiligen Patienten ins Verhältnis setzte. Die mathematische Korrektheit ist gegeben. Gültig sind die final angegebenen Werte.

Im Folgenden dazu beispielhaft wiederum die Darstellung der Ergebnisse bei Applikation von grünem Licht auf Keratinozyten.

Tabelle 16: Durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration gegenüber Kontrolle zu Versuchsende nach 40 Stunden mit Angabe entsprechender Standardabweichung in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$) (beispielhaft: Applikation von grünem Licht auf Keratinozyten)

Prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung ggb. Kontrolle zu Versuchsende nach 40 h (jeweilige Standardabweichung rechts)	
-0,70	4,00
9,01	22,33
19,68	38,68
0,00	0,00

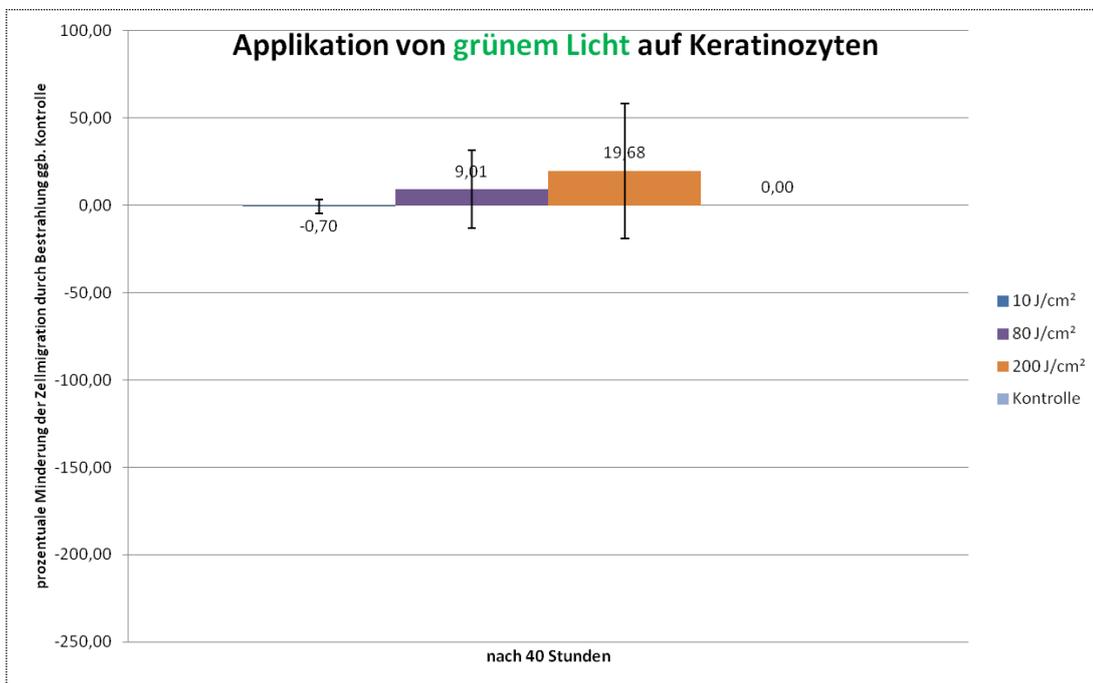


Abbildung 22: Durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration gegenüber Kontrolle zu Versuchsende nach 40 Stunden bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 22: Dargestellt ist die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration ggb. Kontrolle nach 40 Stunden bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) mit entsprechender Standardabweichung. Hier sind beispielhaft die Ergebnisse der Applikation von grünem Licht auf Keratinozyten dargestellt.

Hinsichtlich statistischer Auswertung und der angewandten Methoden sei auf das entsprechende Kapitel (vgl. 3.5) verwiesen.

3.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse vorliegender Arbeit erfolgte mit freundlicher Beratung, Unterstützung, sowie abschließender Prüfung durch den Zentralbereich Bioinformatik und Biostatistik (CBiBs) des Mathematischen Instituts der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Angewandt wurden das arithmetische Mittel, zur Mittelwert-Bestimmung, die Berechnung der Standardabweichung als Maß für die Streuung, sowie der gepaarte Student-*t*-Test zur Überprüfung der Signifikanz. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

Die graphische Darstellung erfolgte anhand von Linien- und Säulendiagrammen (*Microsoft® Office Excel® 2007*).

Statistische Signifikanz wurde, soweit nicht anders angegeben, mit einem Asteriskus (Sternchen, *) dargestellt.

4. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Proliferationsversuche, sowie der Migrationsversuche dargestellt. Diese sind nach Farbe des applizierten Lichts, sowie nach Alter der untersuchten Zellen (juvenil oder seneszent) getrennt.

Es gilt immer $n = 8$.

Als Strahlenquellen wurden bei beiden Versuchen prototypische schmalbandige LED-Arrays von Philips verwendet. Genutzt wurde bei beiden Versuchen Licht der Farben Grün (Wellenlänge 524 nm), Gelb (Wellenlänge 599 nm) und Rot-Orange (Wellenlänge 632 nm). Bei den Migrationsversuchen wurde zusätzlich noch Licht der Farbe Blau (Wellenlänge 453 nm) genutzt.

Die Bestrahlungsstärke (E) betrug bei Blau 18,96 mW/cm², bei Grün 58 mW/cm², bei Gelb 36,33 mW/cm² und bei Rot-Orange 30,36 mW/cm².

4.1. Proliferationsversuche

In den vorliegenden 5-tägigen Versuchen (vgl. 3.3) wurden humanen Fibroblasten mit Licht definierter Wellenlänge bestrahlt und der Einfluss jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) auf die Zellproliferation fluoreszenz-spektroskopisch (mittels *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay*) untersucht (vgl. 4.1.3 bis 4.1.2).

Untersucht wurden für Grün die Bestrahlungsdosen (H) 10 J/cm², 20 J/cm², 40 J/cm², 80 J/cm², 150 J/cm² und 200 J/cm². Für Gelb und Rot-Orange wurden die Bestrahlungsdosen (H) 5 J/cm², 10 J/cm², 20 J/cm², 40 J/cm², 80 J/cm² und 100 J/cm² untersucht.

Die Versuche wurden sowohl mit juvenilen, als auch mit seneszenten Zellen durchgeführt.

Während der jeweils 5-tägigen Versuche erfolgte die Applikation von 5 Bestrahlungsdosen.

Durch die kombinierte Nutzung der Fluoreszenzfarbstoffe *Hoechst 33342* und *Propidiumiodid* wurde bei vorliegender Arbeit eine fluoreszenzmikroskopische Unterscheidung lebender und toter Zellen möglich (vgl. 3.3.5).

Entsprechende Aufnahmen zu Versuchsabschluss (vgl. 4.1.7) an Tag 5 visualisierten den Einfluss applizierter Lichtfarbe und Bestrahlungsdosis (H) auf die Zellvitalität zusätzlich zur vorangegangenen fluoreszenz-spektroskopischen, quantitativen Bestimmung der zellulären Proliferation.

Zudem erfolgten Aufnahmen im Hellfeld.

4.1.1. Applikation von grünem Licht auf juvenile Zellen

Tabelle 17 zeigt zum einen die Zusammenstellung der jeweils an den 5 Versuchstagen, in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich gemessenen Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*) und gibt zum anderen die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation durch Bestrahlung gegenüber der Kontrolle zu Versuchsende nach 5 Bestrahlungstagen mit entsprechender Standardabweichung an.

Abbildung 23 stellt anschaulich die aus Tabelle 17 resultierende Zellproliferation im zeitlichen Verlauf als Liniendiagramm dar. Zwecks Darstellung der Standardabweichung an den einzelnen Tagen, veranschaulicht Abbildung 24 die Zellproliferation im zeitlichen Verlauf als Säulendiagramm.

Abbildung 25 stellt die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation gegenüber Kontrolle nach 5 Bestrahlungstagen bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis graphisch als Säulendiagramm dar.

Tabelle 17: Zusammenstellung der jeweils an den 5 Versuchstagen, in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich gemessenen Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*), sowie durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation durch Bestrahlung ggb. der Kontrolle zu Versuchsende nach 5 Bestrahlungstagen mit Angabe entsprechender Standardabweichung ($n = 8$)

Applikation von grünem Licht auf juvenile Zellen							Prozentuale Minderung der Zellproliferation durch Bestrahlung ggb. Kontrolle zu Versuchsende nach 5 Bestrahlungstagen (jeweilige Standardabw. rechts)	
B.Dosis (H)	0. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag		
10 J/cm ²	693.177	903.278	1.305.107	1.683.734	1.938.201	2.165.635	14,73	7,34
20 J/cm ²	660.673	856.151	1.330.643	1.712.140	1.911.280	2.184.012	13,15	6,30
40 J/cm ²	659.691	855.281	1.262.873	1.643.665	1.823.225	2.174.850	14,53	6,27
80 J/cm ²	640.354	816.017	1.225.309	1.611.275	1.733.812	2.073.161	18,47	5,28
150 J/cm ²	633.511	839.882	1.213.722	1.598.438	1.750.227	2.045.629	19,43	4,79
200 J/cm ²	661.593	875.441	1.227.460	1.610.418	1.857.194	2.189.499	13,44	11,39
Kontrolle	702.703	931.814	1.376.873	1.863.201	2.189.827	2.534.644	0,00	0,00

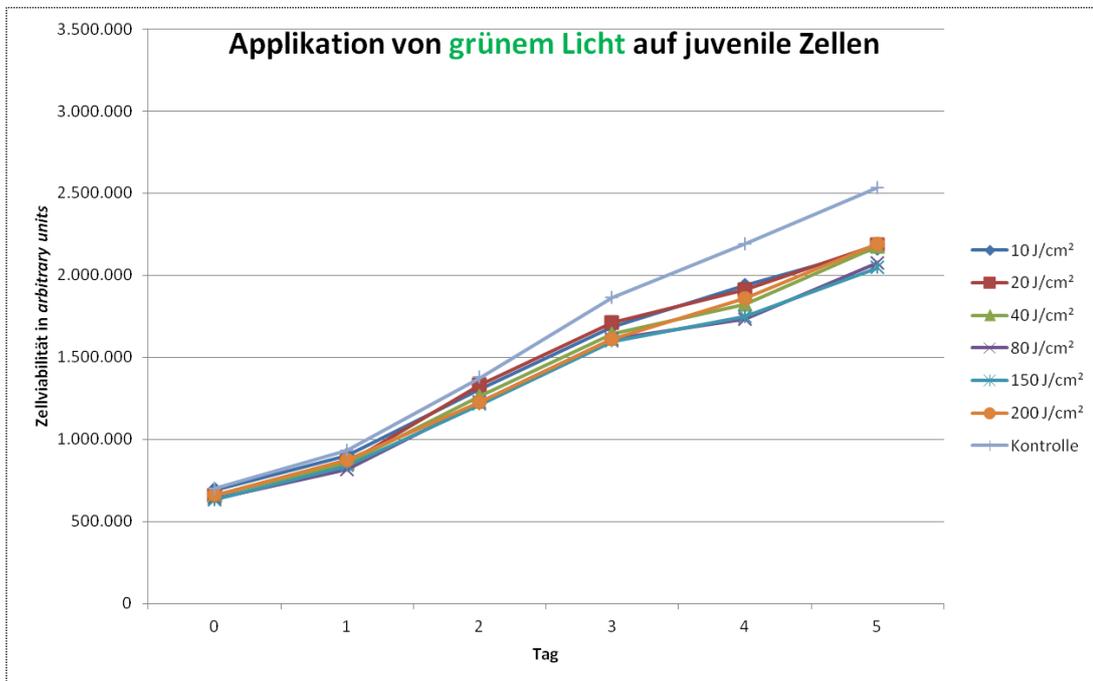


Abbildung 23: Durchschnittliche Zellproliferation bei jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 23: Durch besagte mehrtägige Bestimmung der Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*), wurde auf die Zellproliferation in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf geschlossen.

Ab Tag 3 wurde eine zunehmende Minderung der Zellviabilität durch Bestrahlung ggb. unbestrahlter Kontrolle ersichtlich.

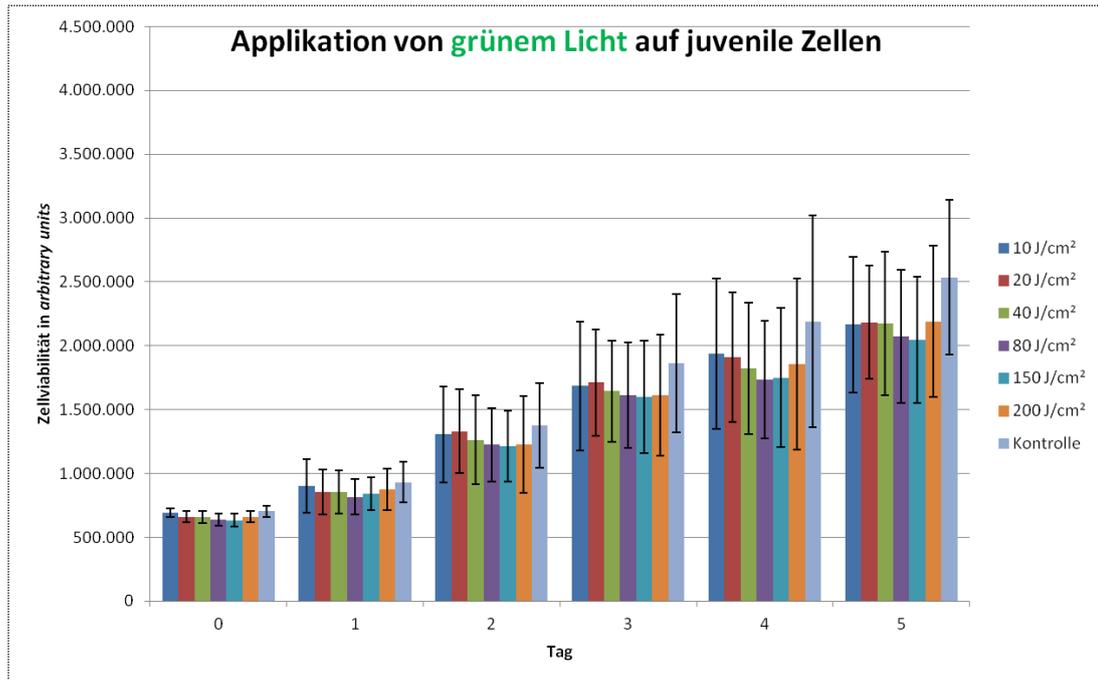


Abbildung 24: Durchschnittliche Zellproliferation bei jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)
 Legende 24: Dargestellt ist die Zellproliferation in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf. Die graphische Veranschaulichung als Säulendiagramm erfolgte, um die entsprechende Standardabweichung anzeigen zu können.

Nach 5 Bestrahlungstagen betrug die prozentuale Minderung der Zellproliferation durch Bestrahlung ggb. der Kontrolle bei der minimalen Bestrahlungsdosis von 10 J/cm^2 durchschnittlich $14,73 \%$ (*). Bei einer Bestrahlungsdosis von 20 J/cm^2 fiel dieser Effekt mit einem Wert von $13,15 \%$ (*) geringer aus. Steigern ließ er sich bis auf $19,43 \%$ (*) (150 J/cm^2).

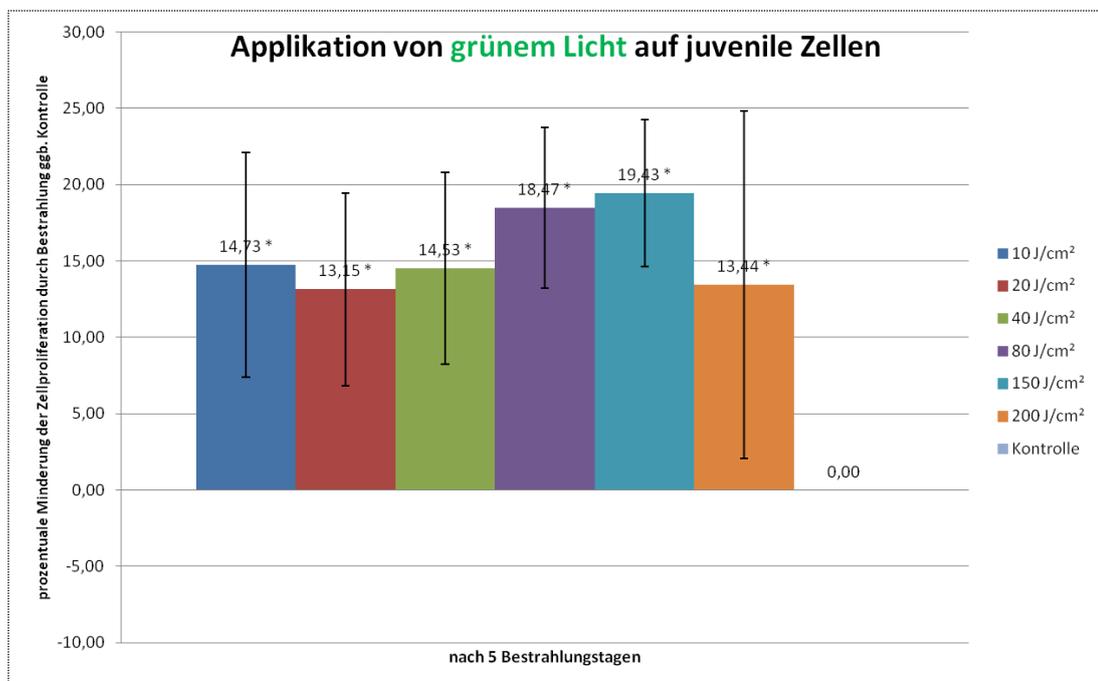


Abbildung 25: Durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation gegenüber Kontrolle nach 5 Bestrahlungstagen bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)
 Legende 25: Dargestellt ist die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation ggb. Kontrolle nach 5 Bestrahlungstagen bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) mit entsprechender Standardabweichung.

4.1.2. Applikation von grünem Licht auf seneszente Zellen

Tabelle 18 zeigt zum einen die Zusammenstellung der jeweils an den 5 Versuchstagen, in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich gemessenen Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*) und gibt zum anderen die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation durch Bestrahlung gegenüber der Kontrolle zu Versuchsende nach 5 Bestrahlungstagen mit entsprechender Standardabweichung an.

Abbildung 26 stellt anschaulich die aus Tabelle 18 resultierende Zellproliferation im zeitlichen Verlauf als Liniendiagramm dar. Zwecks Darstellung der Standardabweichung an den einzelnen Tagen, veranschaulicht Abbildung 27 die Zellproliferation im zeitlichen Verlauf als Säulendiagramm.

Abbildung 28 stellt die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation gegenüber Kontrolle nach 5 Bestrahlungstagen bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis graphisch als Säulendiagramm dar.

Tabelle 18: Zusammenstellung der jeweils an den 5 Versuchstagen, in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich gemessenen Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*), sowie durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation durch Bestrahlung ggb. der Kontrolle zu Versuchsende nach 5 Bestrahlungstagen mit Angabe entsprechender Standardabweichung ($n = 8$)

Applikation von grünem Licht auf seneszente Zellen							Prozentuale Minderung der Zellproliferation durch Bestrahlung ggb. Kontrolle zu Versuchsende nach 5 Bestrahlungstagen (jeweilige Standardabw. rechts)	
B.Dosis (H)	0. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag		
10 J/cm ²	679.118	1.051.783	1.543.431	2.105.139	2.614.343	3.109.747	-2,43	3,94
20 J/cm ²	650.840	1.013.467	1.469.345	1.952.092	2.474.948	3.004.954	1,23	3,46
40 J/cm ²	634.278	969.772	1.402.108	1.944.046	2.372.812	2.776.066	9,54	2,92
80 J/cm ²	619.004	932.152	1.355.103	1.846.150	2.204.487	2.643.526	13,73	4,78
150 J/cm ²	625.167	951.378	1.300.224	1.744.944	2.194.780	2.523.884	17,58	4,57
200 J/cm ²	633.358	921.478	1.272.286	1.746.905	2.176.886	2.533.887	17,64	4,34
Kontrolle	658.426	1.058.496	1.537.130	2.123.023	2.553.426	3.050.845	0,00	0,00

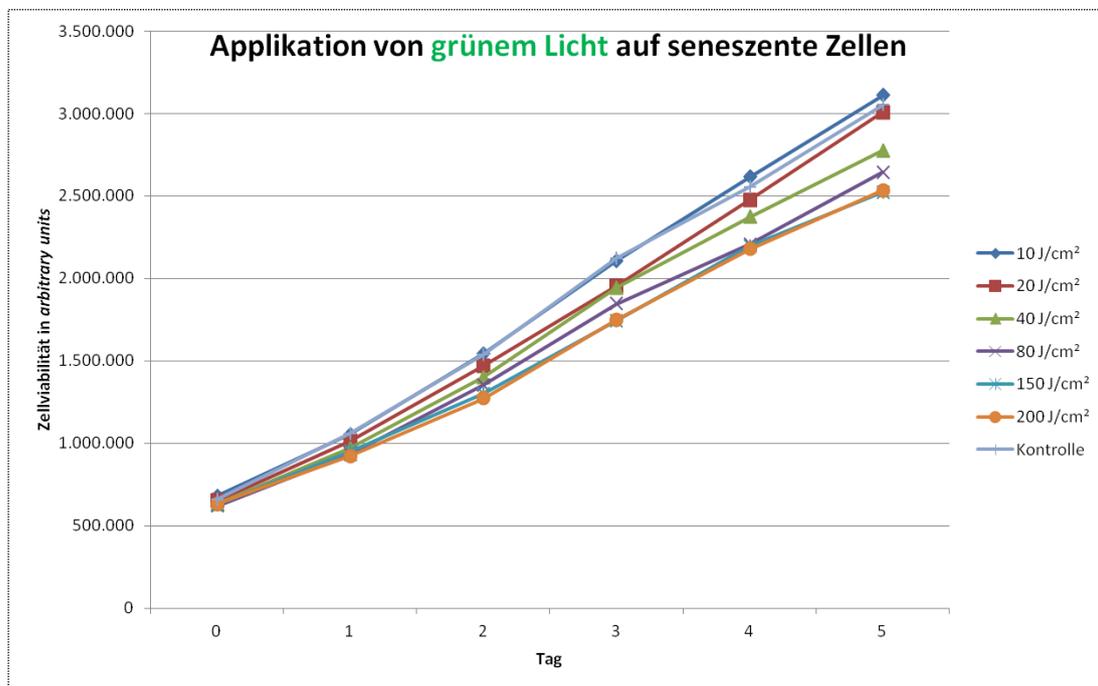


Abbildung 26: Durchschnittliche Zellproliferation bei jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 26: Durch besagte mehrtägige Bestimmung der Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*), wurde auf die Zellproliferation in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf geschlossen.

Ab Tag 4 wurde eine zunehmende Minderung der Zellviabilität durch Bestrahlung ggb. unbestrahlter Kontrolle ab einer Bestrahlungsdosis von 20 J/cm² ersichtlich. Nach 5 Bestrahlungstagen betrug die

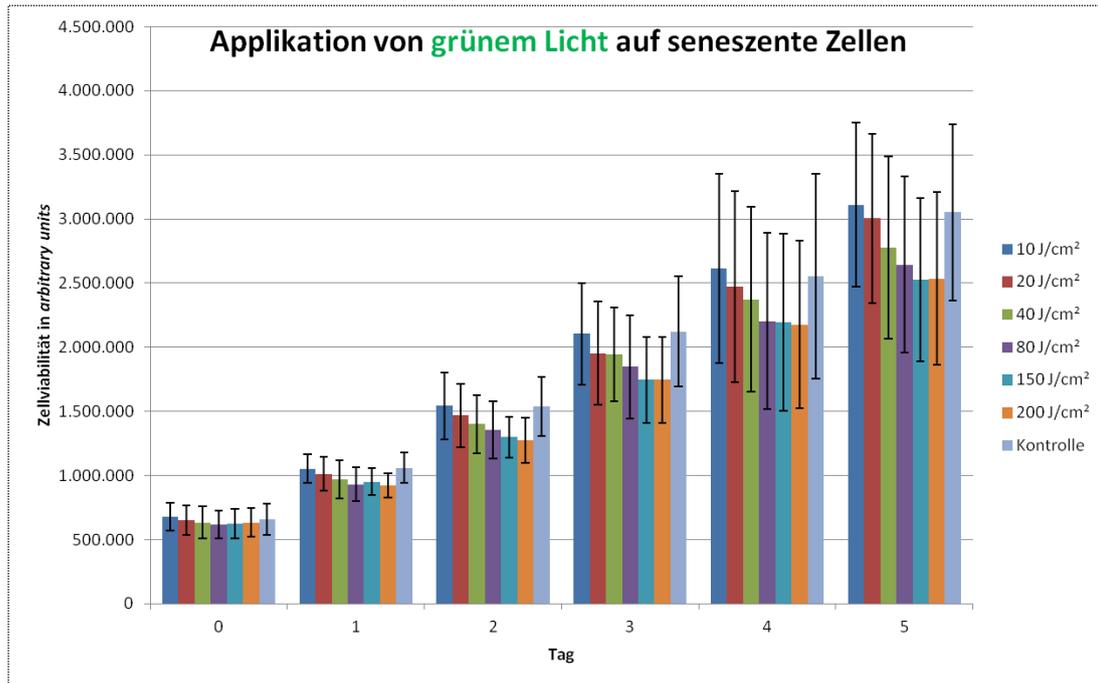


Abbildung 27: Durchschnittliche Zellproliferation bei jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)
 Legende 27: Dargestellt ist die Zellproliferation in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf. Die graphische Veranschaulichung als Säulendiagramm erfolgte, um die entsprechende Standardabweichung anzeigen zu können.

prozentuale Minderung der Zellproliferation durch Bestrahlung ggb. der Kontrolle bei einer Bestrahlungsdosis von 20 J/cm² durchschnittlich 1,23 % bei 40 J/cm² 9,54 % (*). Dieser Effekt ließ sich bis auf 17,64 % (*) (200 J/cm²) steigern. Bei der minimalen Bestrahlungsdosis von 10 J/cm² war eine leichte Steigerung der Zellproliferation durch Bestrahlung ggb. der Kontrolle festzustellen (um 2,43 %).

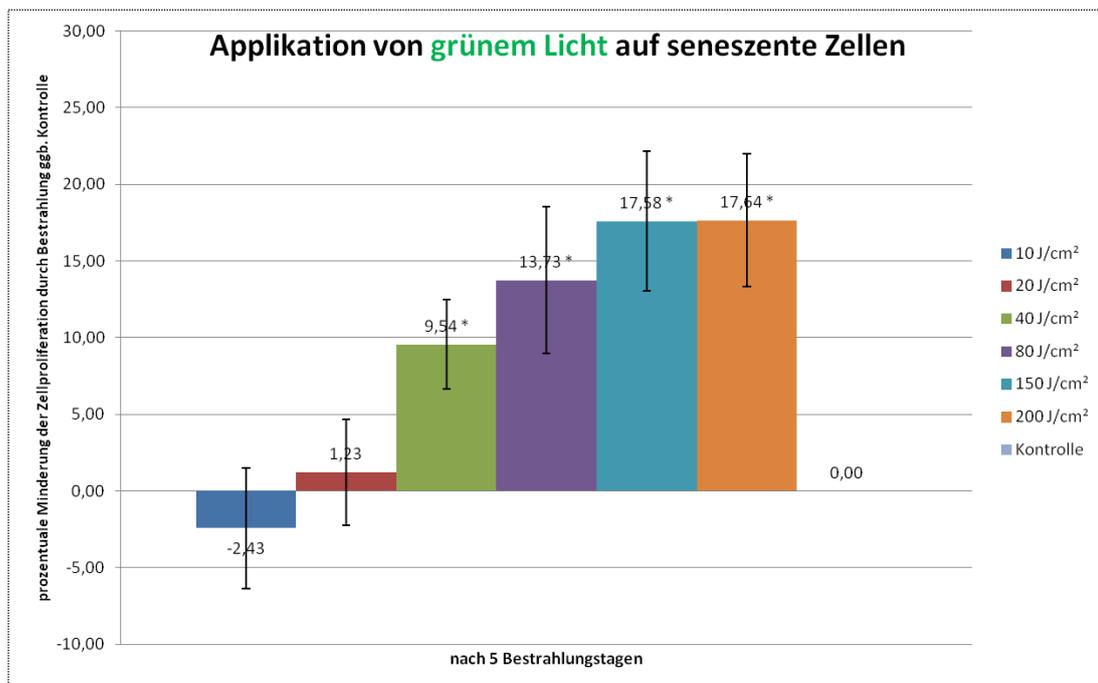


Abbildung 28: Durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation gegenüber Kontrolle nach 5 Bestrahlungstagen bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)
 Legende 28: Dargestellt ist die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation ggb. Kontrolle nach 5 Bestrahlungstagen bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) mit entsprechender Standardabweichung.

4.1.3. Applikation von gelbem Licht auf juvenile Zellen

Tabelle 19 zeigt zum einen die Zusammenstellung der jeweils an den 5 Versuchstagen, in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich gemessenen Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*) und gibt zum anderen die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation durch Bestrahlung gegenüber der Kontrolle zu Versuchsende nach 5 Bestrahlungstagen mit entsprechender Standardabweichung an.

Abbildung 29 stellt anschaulich die aus Tabelle 19 resultierende Zellproliferation im zeitlichen Verlauf als Liniendiagramm dar. Zwecks Darstellung der Standardabweichung an den einzelnen Tagen, veranschaulicht Abbildung 30 die Zellproliferation im zeitlichen Verlauf als Säulendiagramm.

Abbildung 31 stellt die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation gegenüber Kontrolle nach 5 Bestrahlungstagen bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis graphisch als Säulendiagramm dar.

Tabelle 19: Zusammenstellung der jeweils an den 5 Versuchstagen, in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich gemessenen Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*), sowie durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation durch Bestrahlung ggb. der Kontrolle zu Versuchsende nach 5 Bestrahlungstagen mit Angabe entsprechender Standardabweichung ($n = 8$)

Applikation von gelbem Licht auf juvenile Zellen							Prozentuale Minderung der Zellproliferation durch Bestrahlung ggb. Kontrolle zu Versuchsende nach 5 Bestrahlungstagen (jeweilige Standardabw. rechts)	
B.Dosis (H)	0. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag		
5 J/cm ²	702.063	863.404	1.197.524	1.741.321	1.936.172	2.503.515	6,36	7,86
10 J/cm ²	671.889	847.943	1.204.303	1.704.308	1.914.673	2.329.846	12,29	8,16
20 J/cm ²	664.088	835.826	1.164.519	1.659.337	1.880.686	2.328.616	12,53	7,48
40 J/cm ²	674.842	835.105	1.154.636	1.665.390	1.794.244	2.371.696	10,67	6,12
80 J/cm ²	667.973	823.162	1.130.550	1.630.584	1.785.181	2.246.872	15,60	6,09
100 J/cm ²	656.002	788.677	1.151.856	1.707.777	1.918.667	2.287.182	14,10	3,52
Kontrolle	675.348	876.476	1.304.439	1.962.163	2.240.205	2.662.901	0,00	0,00

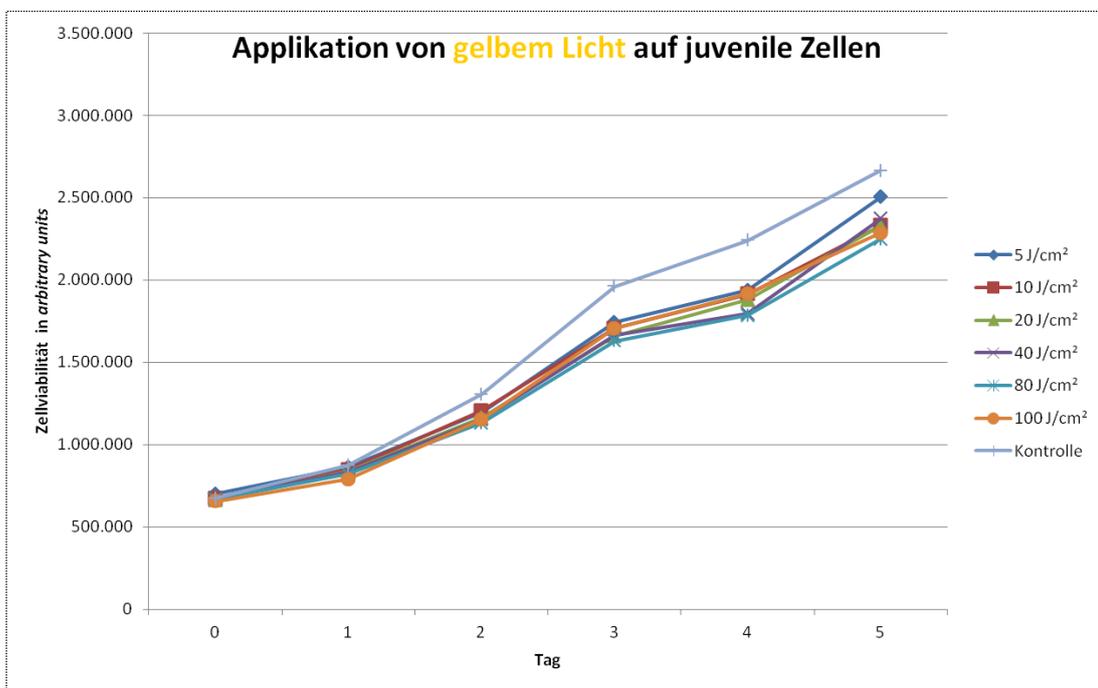


Abbildung 29: Durchschnittliche Zellproliferation bei jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)
 Legende 29: Durch besagte mehrtägige Bestimmung der Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*), wurde auf die Zellproliferation in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf geschlossen.

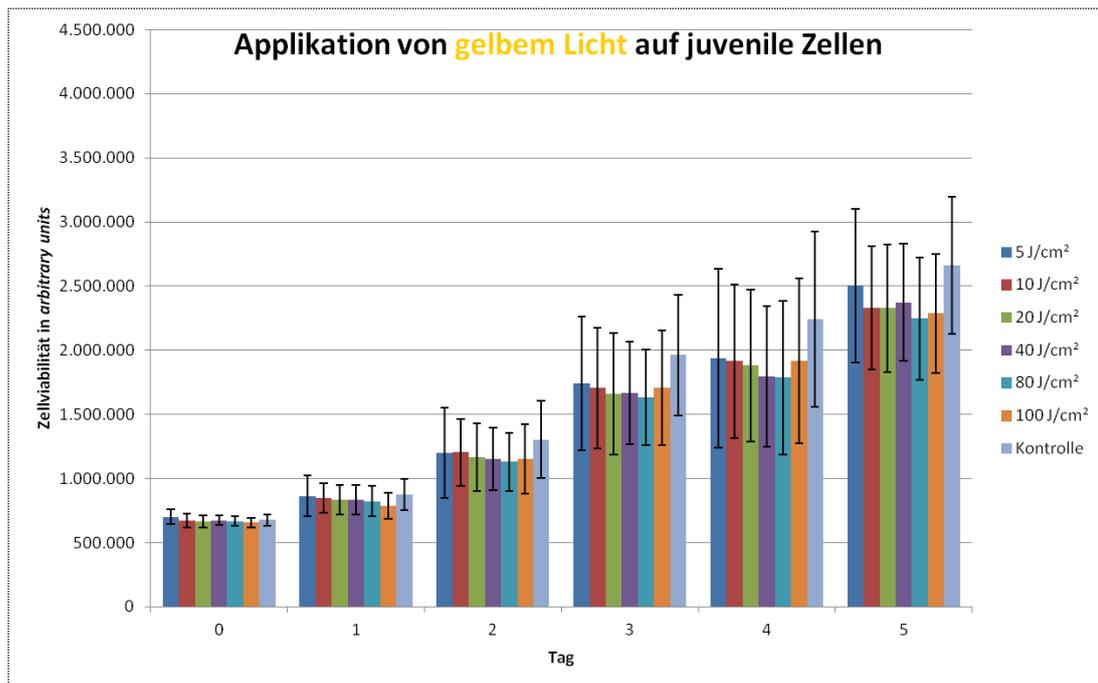


Abbildung 30: Durchschnittliche Zellproliferation bei jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)
 Legende 30: Dargestellt ist die Zellproliferation in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf. Die graphische Veranschaulichung als Säulendiagramm erfolgte, um die entsprechende Standardabweichung anzeigen zu können.

Ab Tag 2 wurde eine zunehmende Minderung der Zellviabilität durch Bestrahlung ggb. unbestrahlter Kontrolle ersichtlich. Nach 5 Bestrahlungstagen betrug die prozentuale Minderung der Zellproliferation durch Bestrahlung ggb. der Kontrolle bei der minimalen Bestrahlungsdosis von 5 J/cm² durchschnittlich 6,36 %, bei 10 J/cm² 12,29 % (*). Dieser Effekt ließ sich bis auf 15,6 % (*) (80 J/cm²) steigern.

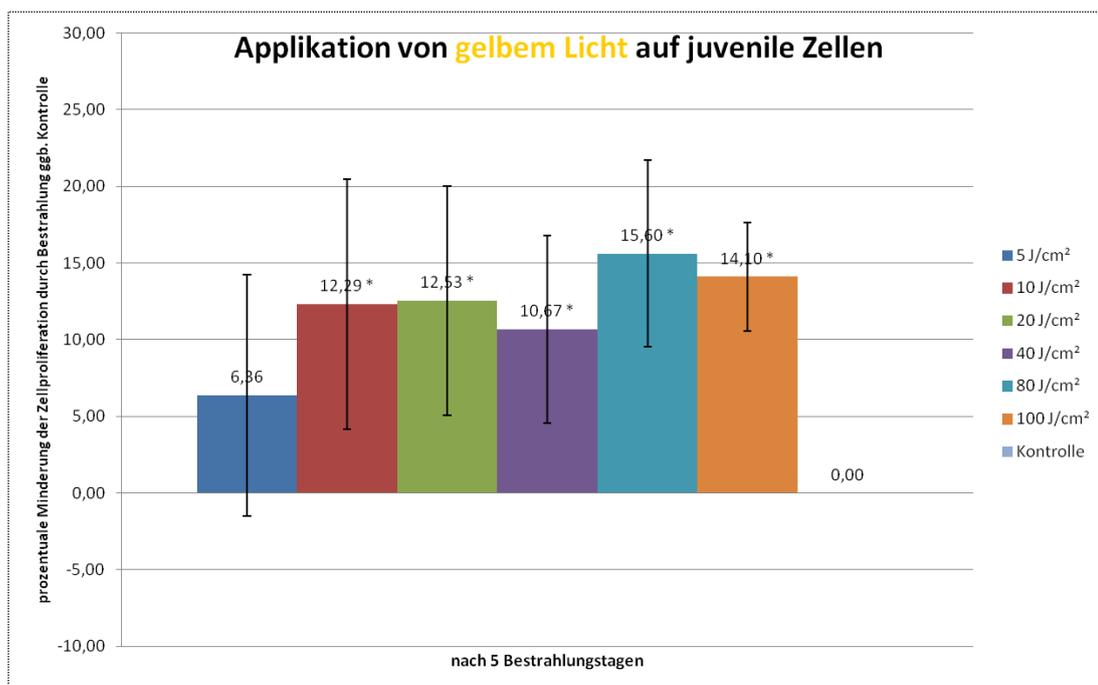


Abbildung 31: Durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation gegenüber Kontrolle nach 5 Bestrahlungstagen bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)
 Legende 31: Dargestellt ist die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation ggb. Kontrolle nach 5 Bestrahlungstagen bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) mit entsprechender Standardabweichung.

4.1.4. Applikation von gelbem Licht auf senescente Zellen

Tabelle 20 zeigt zum einen die Zusammenstellung der jeweils an den 5 Versuchstagen, in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich gemessenen Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*) und gibt zum anderen die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation durch Bestrahlung gegenüber der Kontrolle zu Versuchsende nach 5 Bestrahlungstagen mit entsprechender Standardabweichung an.

Abbildung 32 stellt anschaulich die aus Tabelle 20 resultierende Zellproliferation im zeitlichen Verlauf als Liniendiagramm dar. Zwecks Darstellung der Standardabweichung an den einzelnen Tagen, veranschaulicht Abbildung 33 die Zellproliferation im zeitlichen Verlauf als Säulendiagramm.

Abbildung 34 stellt die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation gegenüber Kontrolle nach 5 Bestrahlungstagen bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis graphisch als Säulendiagramm dar.

Tabelle 20: Zusammenstellung der jeweils an den 5 Versuchstagen, in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich gemessenen Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*), sowie durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation durch Bestrahlung ggb. der Kontrolle zu Versuchsende nach 5 Bestrahlungstagen mit Angabe entsprechender Standardabweichung ($n = 8$)

Applikation von gelbem Licht auf senescente Zellen						Prozentuale Minderung der Zellproliferation durch Bestrahlung ggb. Kontrolle zu Versuchsende nach 5 Bestrahlungstagen (jeweilige Standardabw. rechts)		
B.Dosis (H)	0. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag		
5 J/cm ²	709.742	1.027.096	1.445.185	2.238.206	2.532.330	3.014.679		3,87
10 J/cm ²	650.212	1.004.909	1.367.527	2.076.986	2.417.415	2.849.877		3,99
20 J/cm ²	633.466	982.536	1.356.733	2.036.460	2.330.228	2.771.321		12,26
40 J/cm ²	639.659	978.160	1.317.417	1.968.547	2.334.790	2.745.033		12,71
80 J/cm ²	623.111	913.503	1.309.878	1.949.536	2.268.094	2.797.499		10,99
100 J/cm ²	620.101	863.241	1.214.645	1.941.372	2.262.452	2.799.272		11,11
Kontrolle	656.500	1.081.198	1.451.188	2.284.718	2.615.131	3.139.320		0,00

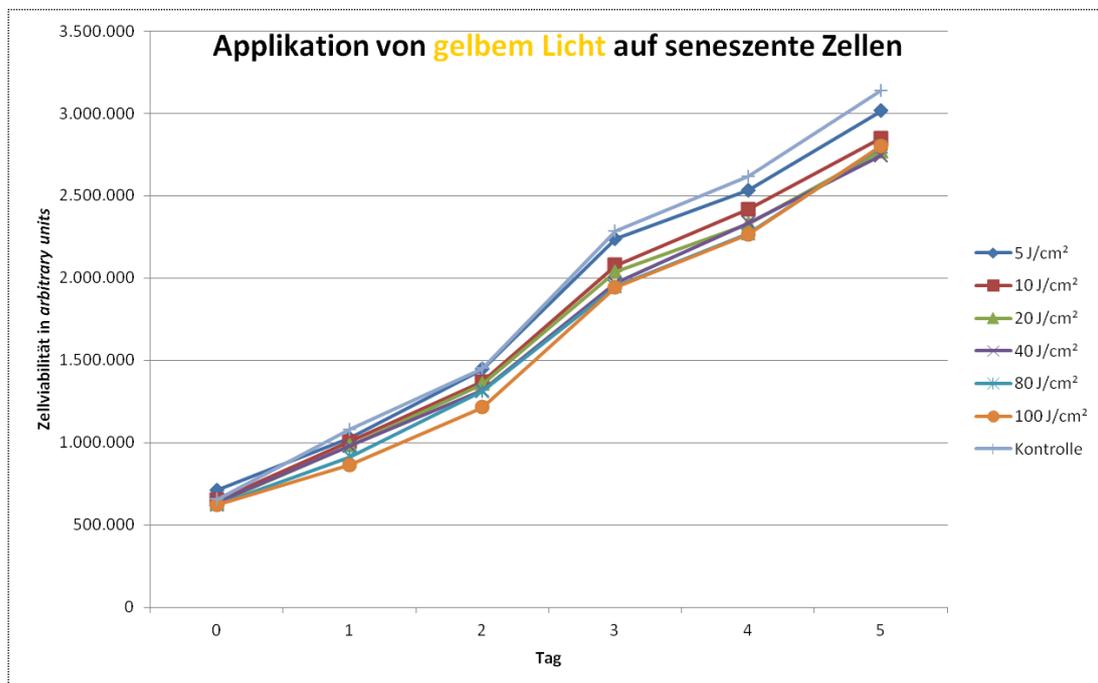


Abbildung 32: Durchschnittliche Zellproliferation bei jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 32: Durch besagte mehrtägige Bestimmung der Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*), wurde auf die Zellproliferation in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf geschlossen.

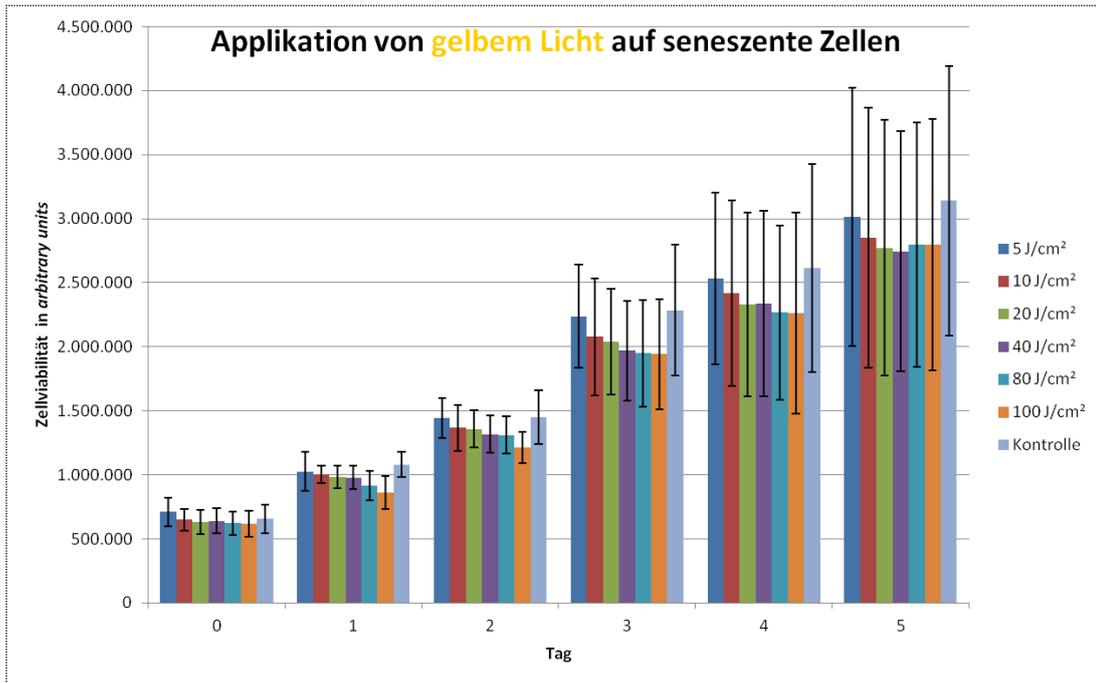


Abbildung 33: Durchschnittliche Zellproliferation bei jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)
 Legende 33: Dargestellt ist die Zellproliferation in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf. Die graphische Veranschaulichung als Säulendiagramm erfolgte, um die entsprechende Standardabweichung anzeigen zu können.

Ab Tag 3 wurde eine zunehmende Minderung der Zellviabilität durch Bestrahlung ggb. unbestrahlter Kontrolle ersichtlich. Nach 5 Bestrahlungstagen betrug die prozentuale Minderung der Zellproliferation durch Bestrahlung ggb. der Kontrolle bei der minimalen Bestrahlungsdosis von 5 J/cm² durchschnittlich 3,87 % (*), bei 10 J/cm² 9,69 % (*). Dieser Effekt ließ sich bis auf 12,71 % (*) (40 J/cm²) steigern.

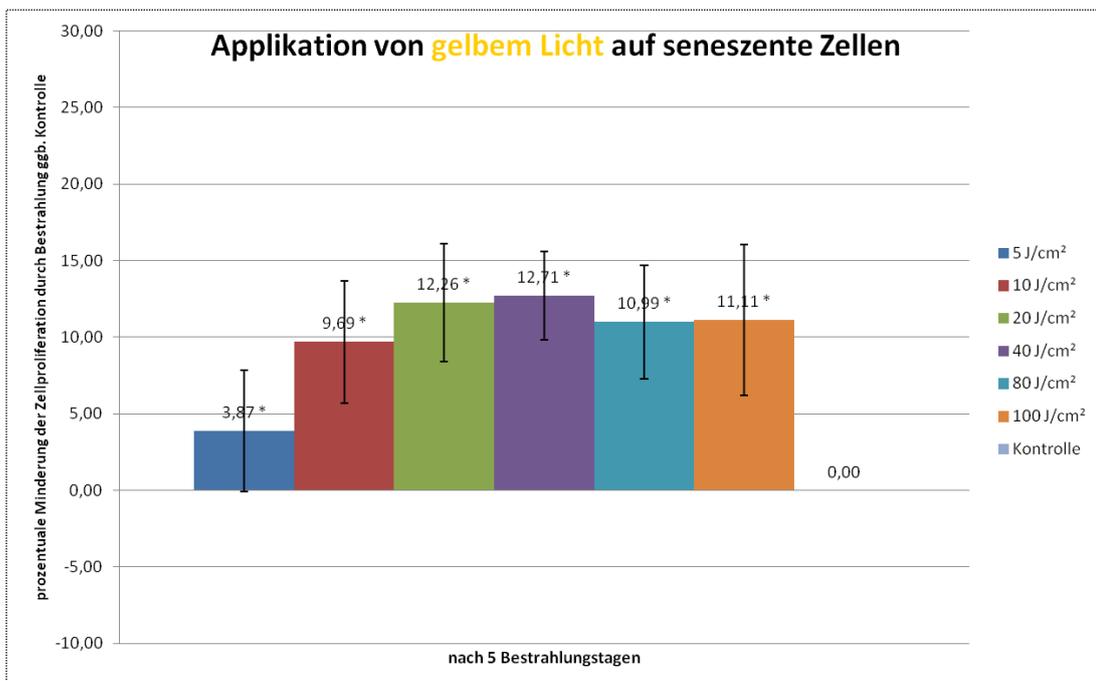


Abbildung 34: Durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation gegenüber Kontrolle nach 5 Bestrahlungstagen bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)
 Legende 34: Dargestellt ist die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation ggb. Kontrolle nach 5 Bestrahlungstagen bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) mit entsprechender Standardabweichung.

4.1.5. Applikation von rot-orangenem Licht auf juvenile Zellen

Tabelle 21 zeigt zum einen die Zusammenstellung der jeweils an den 5 Versuchstagen, in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich gemessenen Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*) und gibt zum anderen die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation durch Bestrahlung gegenüber der Kontrolle zu Versuchsende nach 5 Bestrahlungstagen mit entsprechender Standardabweichung an.

Abbildung 35 stellt anschaulich die aus Tabelle 21 resultierende Zellproliferation im zeitlichen Verlauf als Liniendiagramm dar. Zwecks Darstellung der Standardabweichung an den einzelnen Tagen, veranschaulicht Abbildung 36 die Zellproliferation im zeitlichen Verlauf als Säulendiagramm.

Abbildung 37 stellt die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation gegenüber Kontrolle nach 5 Bestrahlungstagen bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis graphisch als Säulendiagramm dar.

Tabelle 21: Zusammenstellung der jeweils an den 5 Versuchstagen, in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich gemessenen Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*), sowie durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation durch Bestrahlung ggb. der Kontrolle zu Versuchsende nach 5 Bestrahlungstagen mit Angabe entsprechender Standardabweichung ($n = 8$)

Applikation von rot-orangenem Licht auf juvenile Zellen							Prozentuale Minderung der Zellproliferation durch Bestrahlung ggb. Kontrolle zu Versuchsende nach 5 Bestrahlungstagen (jeweilige Standardabw. rechts)	
B.Dosis (H)	0. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag		
5 J/cm ²	686.293	874.438	1.253.693	1.650.908	1.848.870	2.236.343	7,63	6,83
10 J/cm ²	639.840	846.576	1.144.177	1.522.730	1.728.172	2.090.155	13,08	7,30
20 J/cm ²	626.713	797.700	1.157.672	1.602.742	1.722.368	2.102.020	11,53	6,89
40 J/cm ²	634.464	807.340	1.175.672	1.565.229	1.604.983	2.112.789	11,34	6,29
80 J/cm ²	626.458	790.218	1.171.746	1.571.043	1.649.577	2.088.150	11,43	7,00
100 J/cm ²	630.572	805.671	1.153.649	1.540.147	1.720.751	2.205.855	7,20	6,10
Kontrolle	695.442	864.147	1.241.538	1.775.939	2.076.139	2.401.269	0,00	0,00

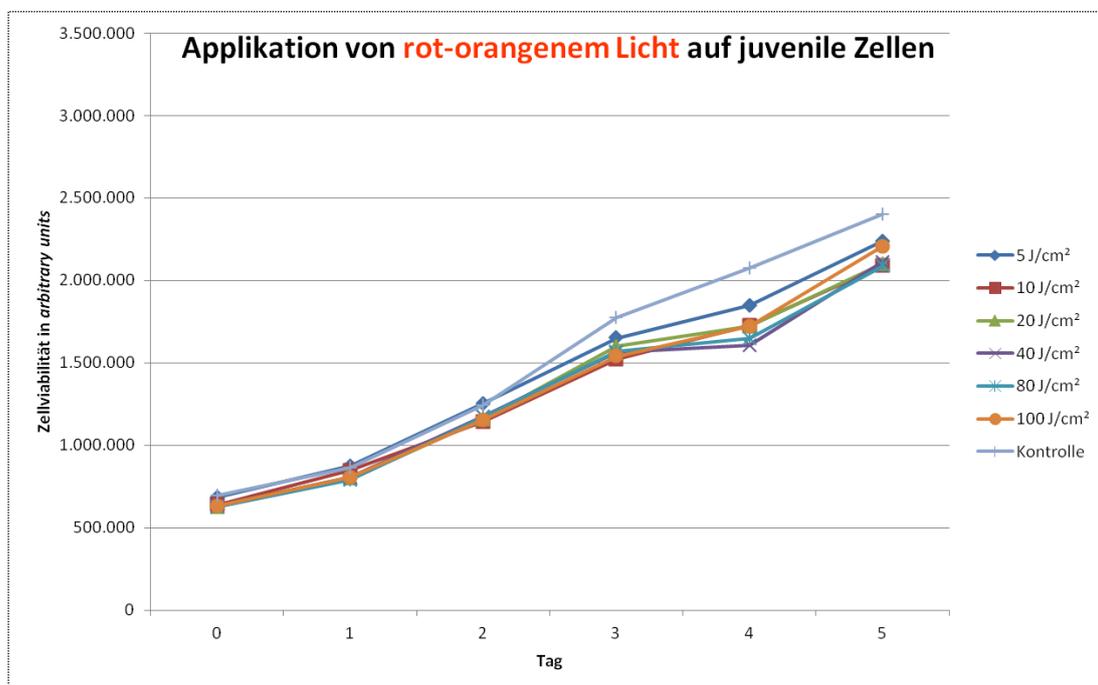


Abbildung 35: Durchschnittliche Zellproliferation bei jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 35: Durch besagte mehrtägige Bestimmung der Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*), wurde auf die Zellproliferation in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf geschlossen.

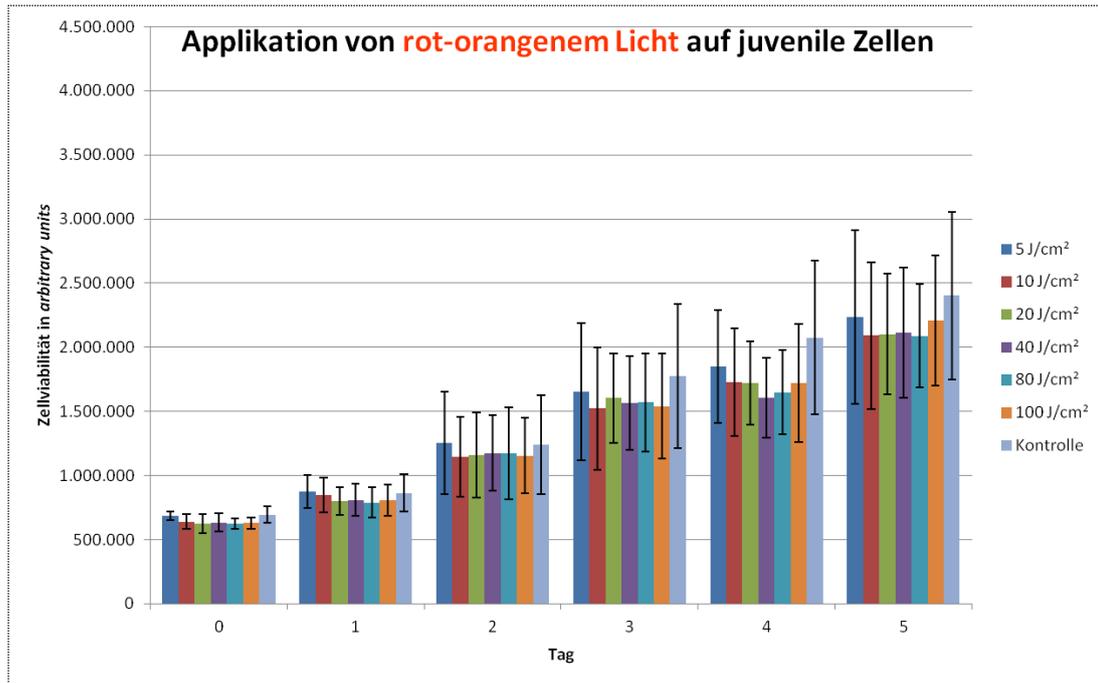


Abbildung 36: Durchschnittliche Zellproliferation bei jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)
 Legende 36: Dargestellt ist die Zellproliferation in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf. Die graphische Veranschaulichung als Säulendiagramm erfolgte, um die entsprechende Standardabweichung anzeigen zu können.

Ab Tag 3 wurde eine zunehmende Minderung der Zellviabilität durch Bestrahlung ggb. unbestrahlter Kontrolle ersichtlich. Nach 5 Bestrahlungstagen betrug die prozentuale Minderung der Zellproliferation durch Bestrahlung ggb. der Kontrolle bei der minimalen Bestrahlungsdosis von 5 J/cm^2 durchschnittlich $7,63 \%$ (*) und bei 10 J/cm^2 $13,08 \%$ (*), welche somit auch den größten erzielten Effekt darstellte.

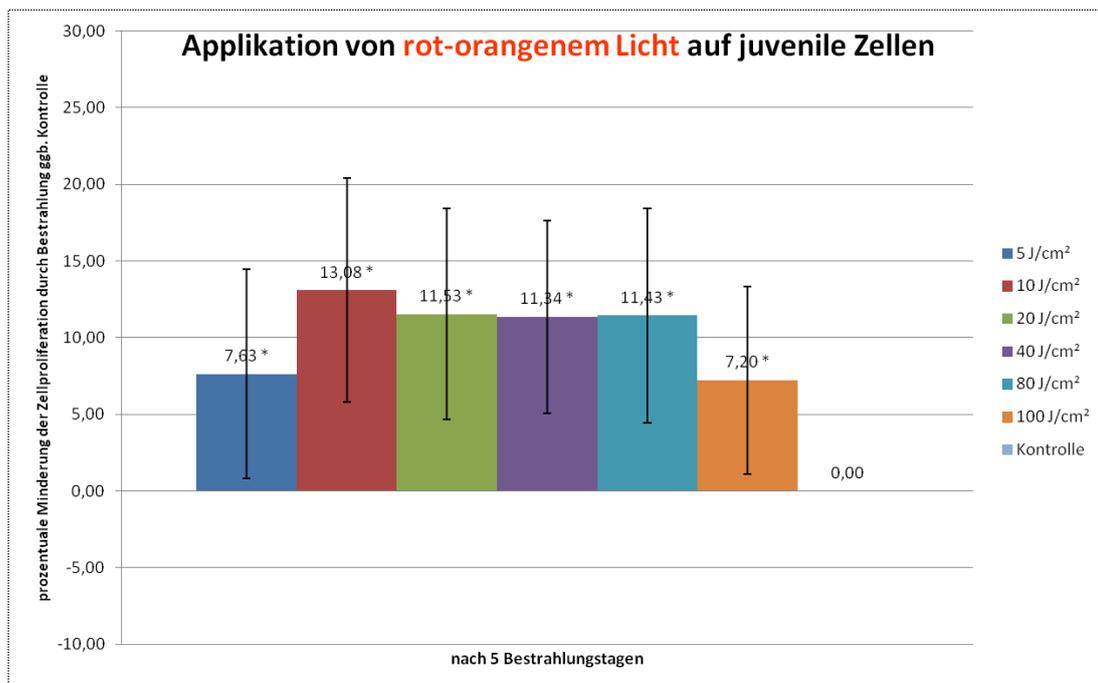


Abbildung 37: Durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation gegenüber Kontrolle nach 5 Bestrahlungstagen bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)
 Legende 37: Dargestellt ist die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation ggb. Kontrolle nach 5 Bestrahlungstagen bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) mit entsprechender Standardabweichung.

4.1.6. Applikation von rot-orangenem Licht auf seneszente Zellen

Tabelle 22 zeigt zum einen die Zusammenstellung der jeweils an den 5 Versuchstagen, in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich gemessenen Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*) und gibt zum anderen die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation durch Bestrahlung gegenüber der Kontrolle zu Versuchsende nach 5 Bestrahlungstagen mit entsprechender Standardabweichung an.

Abbildung 38 stellt anschaulich die aus Tabelle 22 resultierende Zellproliferation im zeitlichen Verlauf als Liniendiagramm dar. Zwecks Darstellung der Standardabweichung an den einzelnen Tagen, veranschaulicht Abbildung 39 die Zellproliferation im zeitlichen Verlauf als Säulendiagramm.

Abbildung 40 stellt die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation gegenüber Kontrolle nach 5 Bestrahlungstagen bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis graphisch als Säulendiagramm dar.

Tabelle 22: Zusammenstellung der jeweils an den 5 Versuchstagen, in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich gemessenen Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*), sowie durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation durch Bestrahlung ggb. der Kontrolle zu Versuchsende nach 5 Bestrahlungstagen mit Angabe entsprechender Standardabweichung ($n = 8$)

Applikation von rot-orangenem Licht auf seneszente Zellen							Prozentuale Minderung der Zellproliferation durch Bestrahlung ggb. Kontrolle zu Versuchsende nach 5 Bestrahlungstagen (jeweilige Standardabw. rechts)	
B.Dosis (H)	0. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag		
5 J/cm ²	684.076	1.034.638	1.424.301	2.145.687	2.498.890	2.805.406	-0,21	5,88
10 J/cm ²	647.269	976.057	1.381.346	1.962.355	2.326.298	2.660.786	5,14	4,92
20 J/cm ²	627.237	944.541	1.325.070	1.943.901	2.302.708	2.588.229	7,02	4,88
40 J/cm ²	618.313	968.132	1.327.240	1.880.784	2.210.755	2.584.191	7,10	4,02
80 J/cm ²	617.804	941.345	1.312.037	1.873.648	2.140.169	2.506.525	10,28	3,04
100 J/cm ²	620.378	932.383	1.291.488	1.867.266	2.228.065	2.597.331	6,64	1,81
Kontrolle	643.774	1.009.294	1.416.278	2.164.646	2.492.961	2.794.323	0,00	0,00

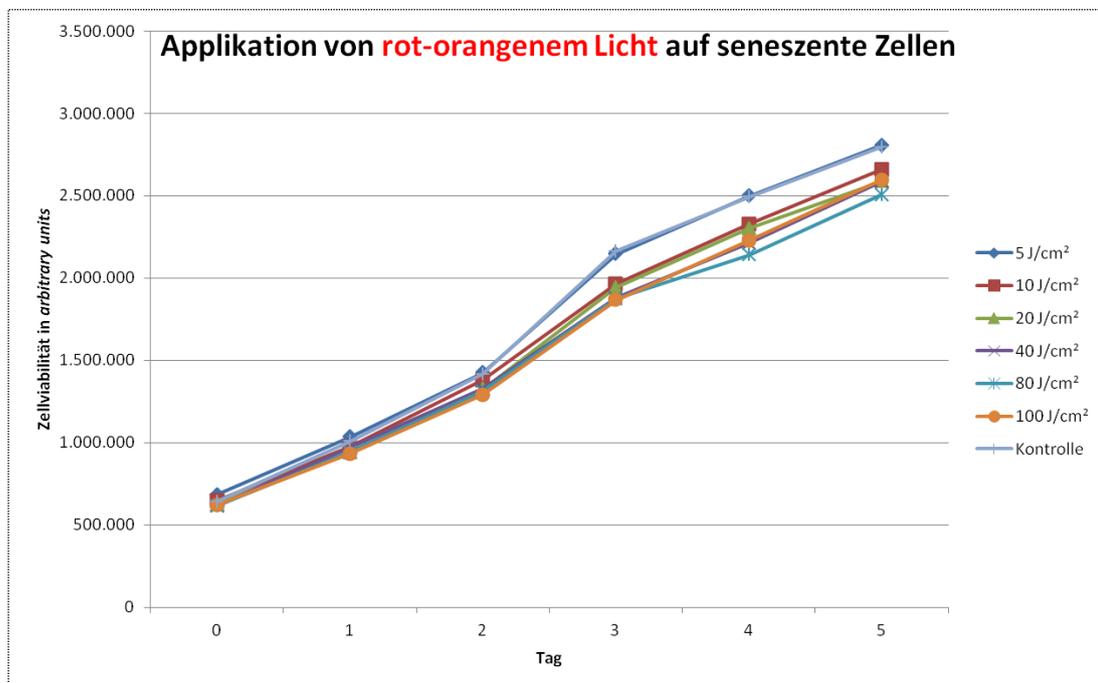


Abbildung 38: Durchschnittliche Zellproliferation bei jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 38: Durch besagte mehrtägige Bestimmung der Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*), wurde auf die Zellproliferation in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf geschlossen.

Ab Tag 3 wurde eine zunehmende Minderung der Zellviabilität durch Bestrahlung (ab einer Bestrahlungsdosis von 10 J/cm²) ggb. unbestrahlter Kontrolle ersichtlich. Nach 5 Bestrahlungstagen betrug die prozentuale Minderung der Zellproliferation durch Bestrahlung ggb. der Kontrolle bei

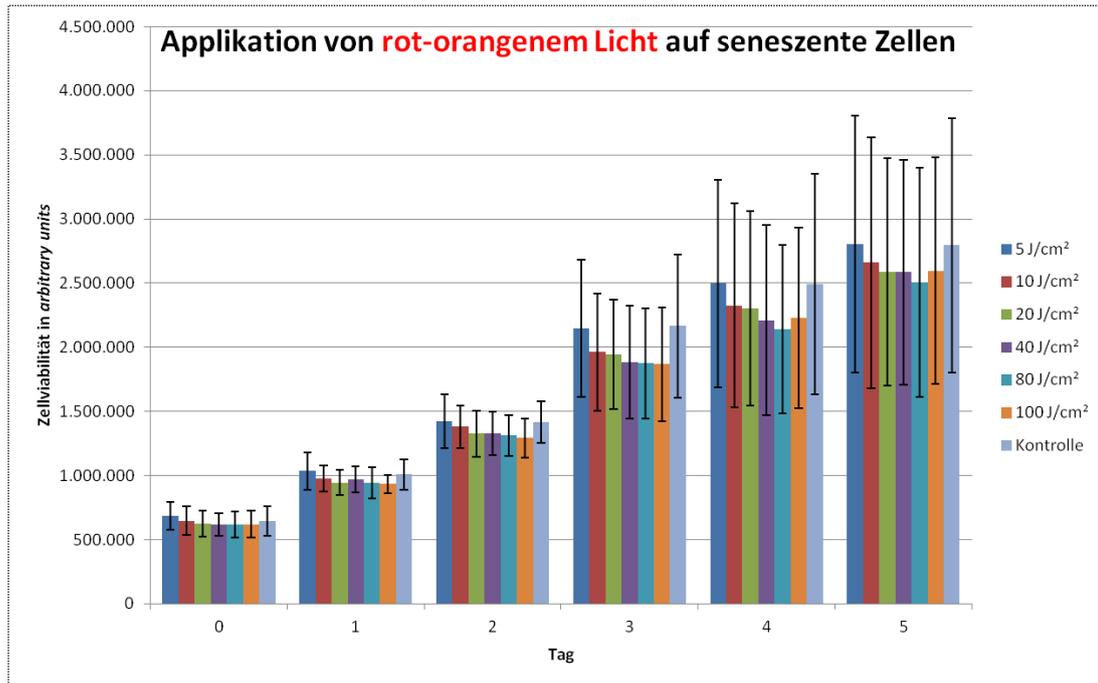


Abbildung 39: Durchschnittliche Zellproliferation bei jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)
 Legende 39: Dargestellt ist die Zellproliferation in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf. Die graphische Veranschaulichung als Säulendiagramm erfolgte, um die entsprechende Standardabweichung anzeigen zu können.

einer Bestrahlungsdosis von 10 J/cm^2 durchschnittlich $5,14 \%$ (*) und bei 20 J/cm^2 $7,02 \%$ (*). Dieser Effekt ließ sich bis auf $10,28 \%$ (*) (80 J/cm^2) steigern. Bei der minimalen Bestrahlungsdosis von 5 J/cm^2 war eine leichte Steigerung der Zellproliferation durch Bestrahlung ggb. der Kontrolle festzustellen (um $0,21 \%$).

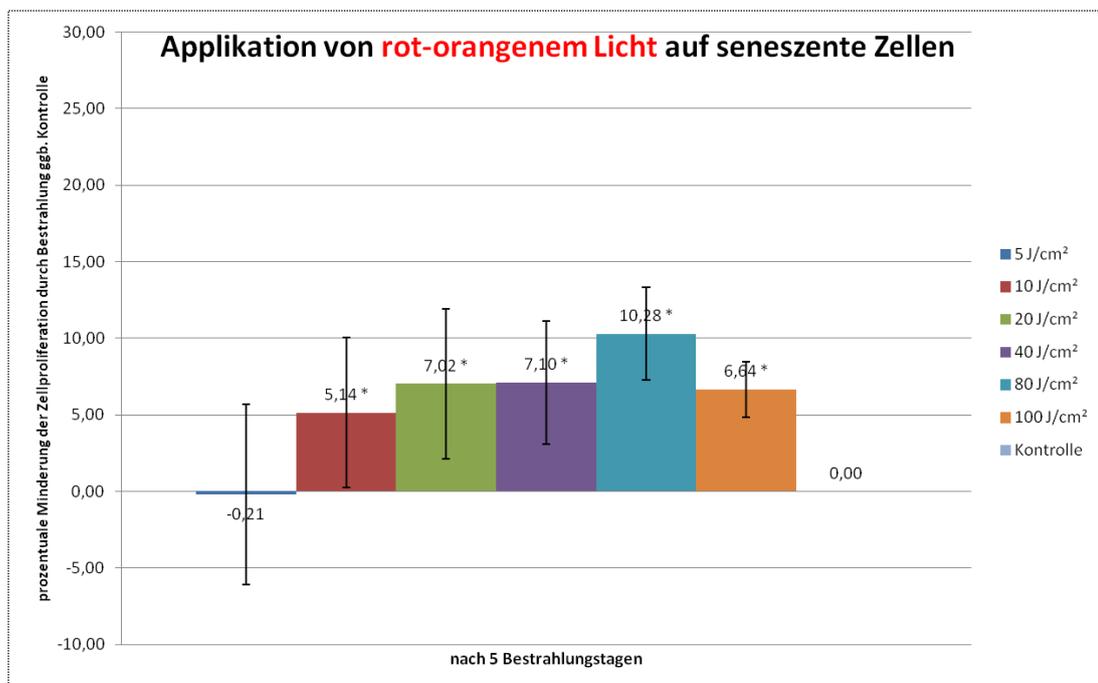


Abbildung 40: Durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation gegenüber Kontrolle nach 5 Bestrahlungstagen bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)
 Legende 40: Dargestellt ist die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellproliferation ggb. Kontrolle nach 5 Bestrahlungstagen bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) mit entsprechender Standardabweichung.

4.1.7. (Fluoreszenz-)Mikroskopische Aufnahmen bei Versuchsende an Tag 5

Im Folgenden sind exemplarische Hellfeld- sowie fluoreszenzmikroskopische-Aufnahmen nach 5-tägiger Applikation von jeweils minimaler und maximaler Bestrahlungsdosis (H) der jeweiligen Lichtfarben Grün (10 J/cm^2 , 200 J/cm^2), Gelb (5 J/cm^2 , 100 J/cm^2) und Rot-Orange (5 J/cm^2 , 100 J/cm^2) inklusive der entsprechenden Kontrollen dargestellt.

Der Maßstabsbalken entspricht $100 \mu\text{m}$.

Bei vergleichender Betrachtung der Hellfeld-, sowie auch der fluoreszenzmikroskopische-Aufnahmen, bei Darstellung von *Hoechst 33342* (blau) und *Propidiumiodid* (rot), erschienen weder bei Applikation von grünem (vgl. Abbildung 41), noch von gelbem (vgl. Abbildung 42), oder rot-orangenem (vgl. Abbildung 43) Licht optische Unterschiede gegenüber der jeweiligen Kontrolle, die den angewandten Bestrahlungsdosen entsprechen würden.

Im Hellfeld stellten sich die Zellen hinsichtlich ihres morphologischen Erscheinungsbildes als gesund und vital heraus, ohne dass äußerliche Unterschiede zu ihrem Zustand vor Versuchsdurchführung ersichtlich gewesen wären.

Nur vereinzelt waren tote Zellen sichtbar (rot angefärbt), was ebenfalls darauf schließen ließ, dass applizierte Bestrahlungen nicht toxisch waren. Die vereinzelt toten Zellen waren am ehesten dem beginnenden Erreichen einer Konfluenz mit entsprechend beginnender Kontaktinhibition zuzurechnen.

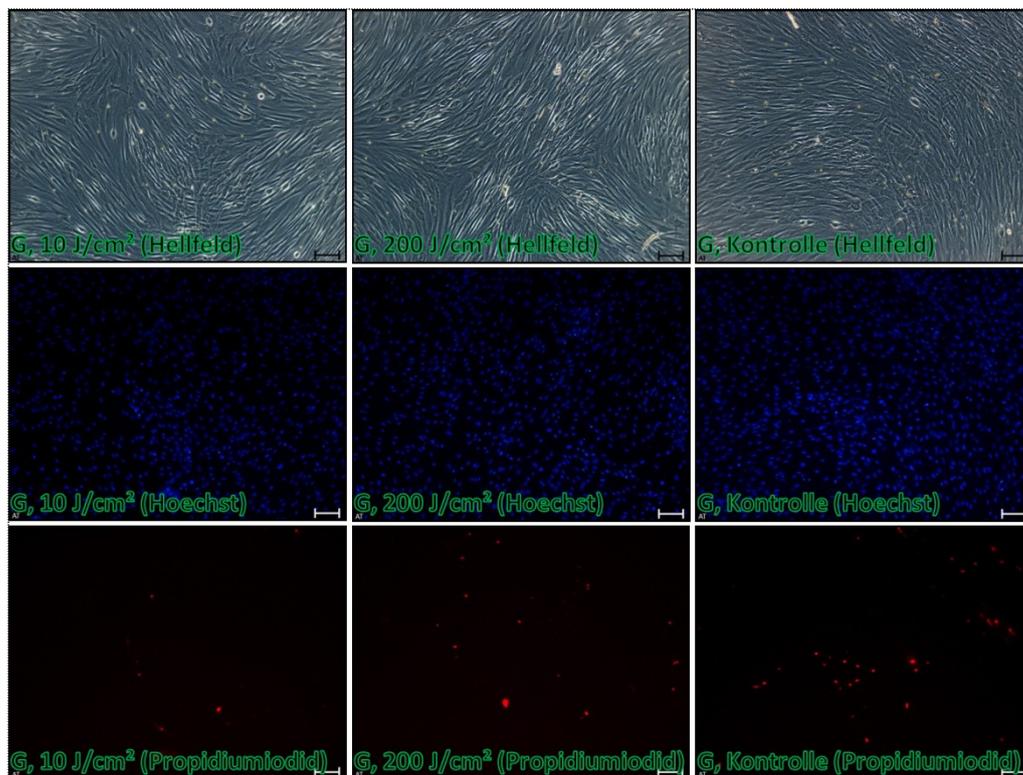


Abbildung 41: Exemplarische Hellfeld- sowie fluoreszenzmikroskopische-Aufnahmen nach 5-tägiger Applikation von minimaler und maximaler Bestrahlungsdosis bei grünem Licht (*scale bar* = $100 \mu\text{m}$)
 Legende 41: Der Nukleinsäure-Farbstoff *Hoechst 33342* ist zelldurchlässig und diskriminiert daher lebende Zellen (blau). Der Nukleinsäure-Farbstoff *Propidiumiodid* durchdringt intakte Zellmembranen nicht und färbt daher nur tote Zellen an (rot). Die entsprechende Kontrolle ist rechts abgebildet.

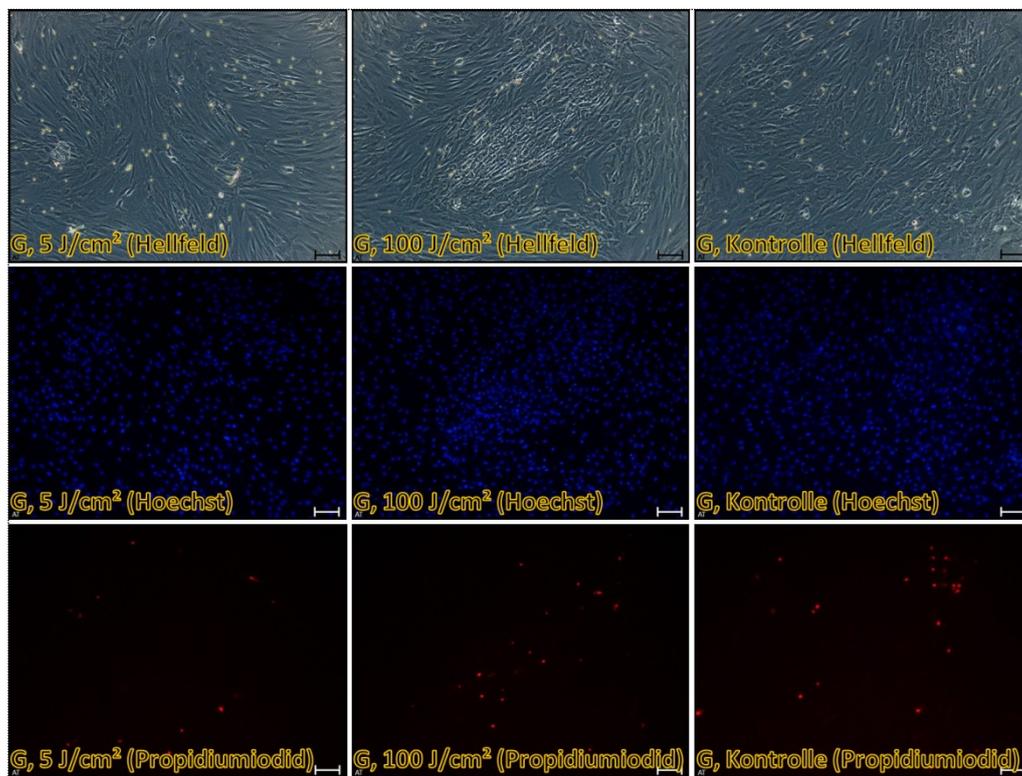


Abbildung 42: Exemplarische Hellfeld- sowie fluoreszenzmikroskopische-Aufnahmen nach 5-tägiger Applikation von minimaler und maximaler Bestrahlungsdosis bei gelbem Licht (*scale bar* = 100 μm)
 Legende 42: Der Nukleinsäure-Farbstoff *Hoechst 33342* ist zelldurchlässig und diskriminiert daher lebende Zellen (blau). Der Nukleinsäure-Farbstoff *Propidiumiodid* durchdringt intakte Zellmembranen nicht und färbt daher nur tote Zellen an (rot). Die entsprechende Kontrolle ist rechts abgebildet.

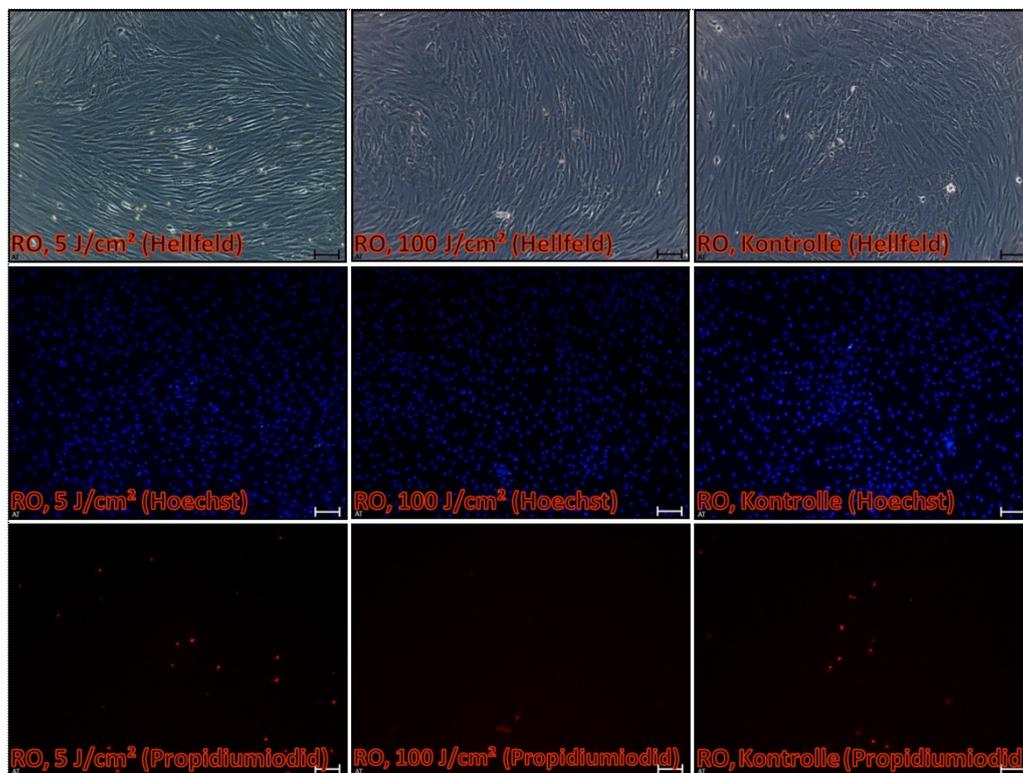


Abbildung 43: Exemplarische Hellfeld- sowie fluoreszenzmikroskopische-Aufnahmen nach 5-tägiger Applikation von minimaler und maximaler Bestrahlungsdosis bei rot-orangenem Licht (scale bar = 100 μm)
 Legende 43: Der Nukleinsäure-Farbstoff *Hoechst 33342* ist zelldurchlässig und diskriminiert daher lebende Zellen (blau). Der Nukleinsäure-Farbstoff *Propidiumiodid* durchdringt intakte Zellmembranen nicht und färbt daher nur tote Zellen an (rot). Die entsprechende Kontrolle ist rechts abgebildet.

4.2. Migrationsversuche

In den vorliegenden 40-stündigen Versuchen wurden humane Fibroblasten, wie auch Keratinozyten mit Licht definierter Wellenlänge bestrahlt und der Einfluss jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) auf das Migrationsverhalten durch wiederholte mikroskopische Aufnahmen und anschließende graphische Auswertung quantifiziert.

Untersucht wurde für Blau die Bestrahlungsdosis (H) 5 J/cm^2 (Anwendung ausschließlich auf Fibroblasten). Für Grün wurden die Bestrahlungsdosen (H) 10 J/cm^2 , 80 J/cm^2 , und 200 J/cm^2 untersucht. Für Gelb und Rot-Orange wurden die Bestrahlungsdosen (H) 5 J/cm^2 , 40 J/cm^2 und 100 J/cm^2 untersucht.

Auf Seite der Fibroblasten wurden die Versuche mit seneszenten Zellen, auf Seite der Keratinozyten mit juvenilen Zellen durchgeführt (vgl. 3.4.1).

Während der jeweils 40-stündigen Versuche erfolgte die Applikation einer einzigen Bestrahlungsdosis direkt nach jeweiliger Entfernung des Einsatzes (Erzeugung des Wunddefekts).

Mikroskopische Aufnahmen erfolgten zu den Zeitpunkten $t = 0 \text{ h}$ (unmittelbar nach Erzeugung des Wunddefekts), $t = 16 \text{ h}$, $t = 20 \text{ h}$, $t = 24 \text{ h}$ und $t = 40 \text{ h}$.

4.2.1. Applikation von blauem Licht auf Fibroblasten

Tabelle 23 zeigt zum einen die Zusammenstellung der durch Zellmigration jeweils in 40 Stunden, in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich zugewachsenen Fläche (angegeben in Prozent) und gibt zum anderen die prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung gegenüber der Kontrolle zu Versuchsende nach 40 Stunden (mit Standardabweichung) an.

Abbildung 44 stellt anschaulich die aus Tabelle 23 resultierende Zellmigration im zeitlichen Verlauf als Liniendiagramm dar. Zwecks Darstellung der Standardabweichung zu den einzelnen Zeitpunkten, veranschaulicht Abbildung 45 die Zellmigration im zeitlichen Verlauf als Säulendiagramm.

Abbildung 46 stellt die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration durch Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) ggb. Kontrolle nach 40 Stunden graphisch als Säulendiagramm dar.

Tabelle 23: Zusammenstellung der zu den einzelnen Aufnahmezeitpunkten, in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich durch Zellmigration zugewachsenen Fläche (angegeben in Prozent), sowie durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung ggb. Kontrolle zu Versuchsende nach 40 Stunden (mit Standardabweichung) ($n = 8$)

Applikation von blauem Licht auf Fibroblasten						Prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung ggb. Kontrolle zu Versuchsende nach 40 h (jeweilige Standardabweichung rechts)	
B.Dosis (H)	0 h	16 h	20 h	24 h	40 h		
5 J/cm ²	0	34	41	55	88	2,42	11,80
Kontrolle	0	43	53	68	91	0,00	0,00

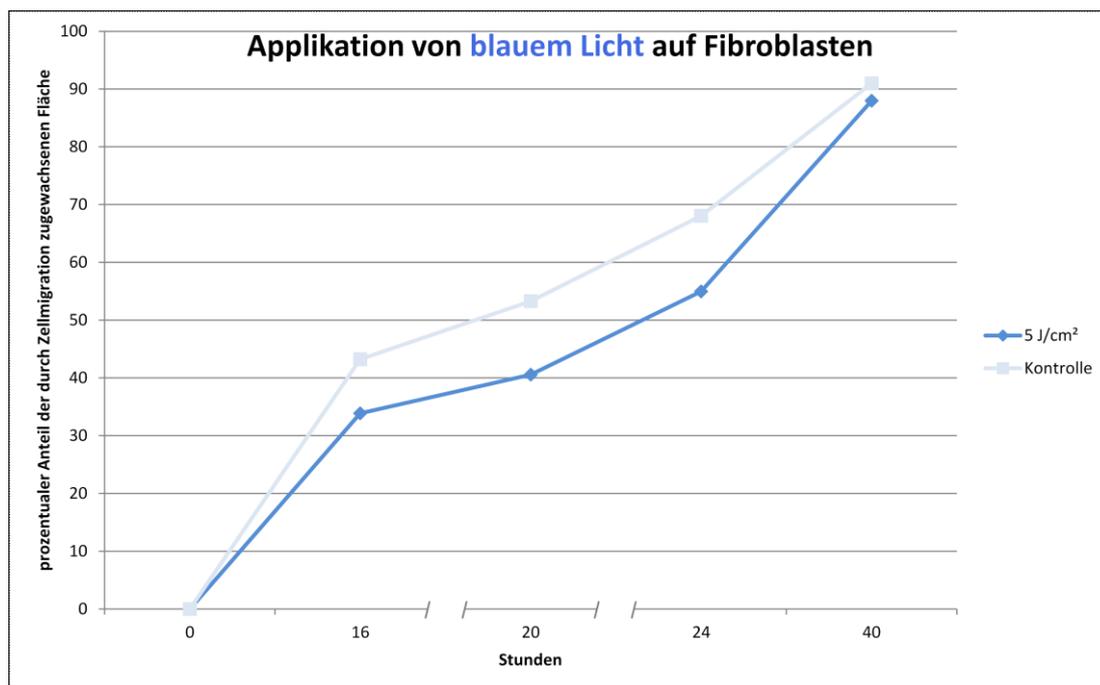


Abbildung 44: Durchschnittlich durch Zellmigration zugewachsene Fläche in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 44: Aus den graphisch quantifizierten zellfreien Flächen zu den jeweiligen Aufnahmezeitpunkten, resultierte rechnerisch der Anteil der durch Zellmigration zugewachsenen Fläche in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf (angegeben in Prozent).

Bereits nach 16 Stunden wurde eine Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung ggb. unbestrahlter Kontrolle ersichtlich.

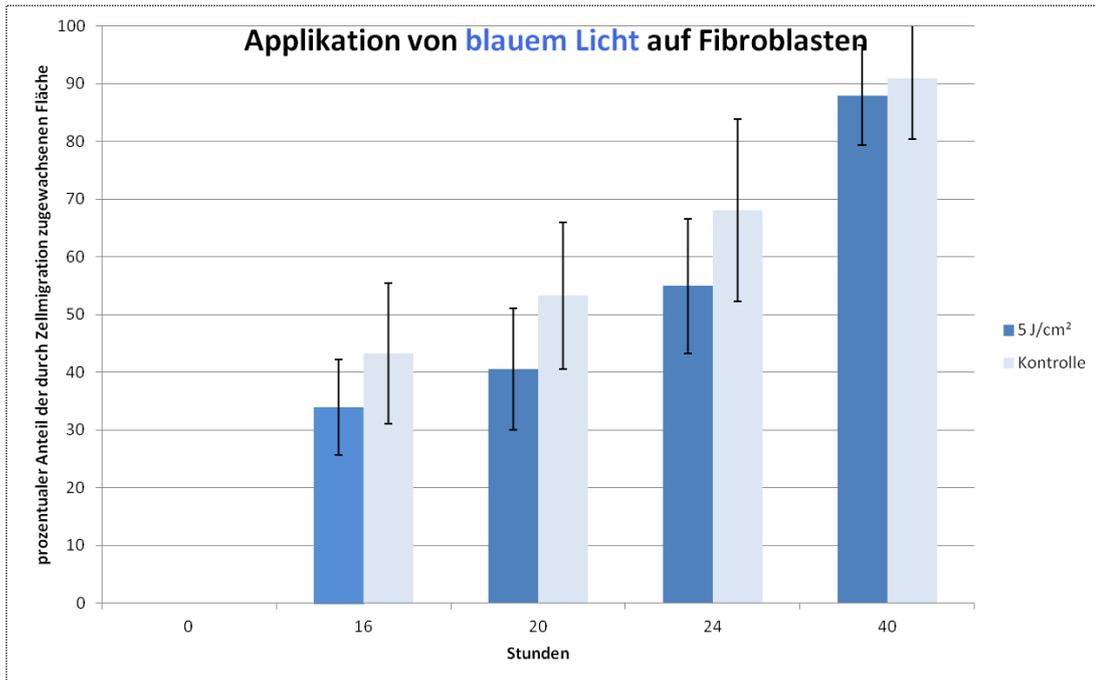


Abbildung 45: Durchschnittlich durch Zellmigration zugewachsene Fläche in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 45: Aus den graphisch quantifizierten zellfreien Flächen zu den jeweiligen Aufnahmezeitpunkten, resultierte rechnerisch der Anteil der durch Zellmigration zugewachsenen Fläche in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf (angegeben in Prozent). Die graphische Veranschaulichung als Säulendiagramm erfolgte, um die entsprechende Standardabweichung anzeigen zu können.

Obwohl sich nach 20 Stunden, sowie nach 24 Stunden eine Steigerung besagten Effekts zeigte, betrug die prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung ggb. der Kontrolle bei einer Bestrahlungsdosis von 5 J/cm^2 zum vorher definierten Endpunkt des Versuches nach 40 Stunden final lediglich 2,42 %. Der Effekt war statistisch nicht signifikant.

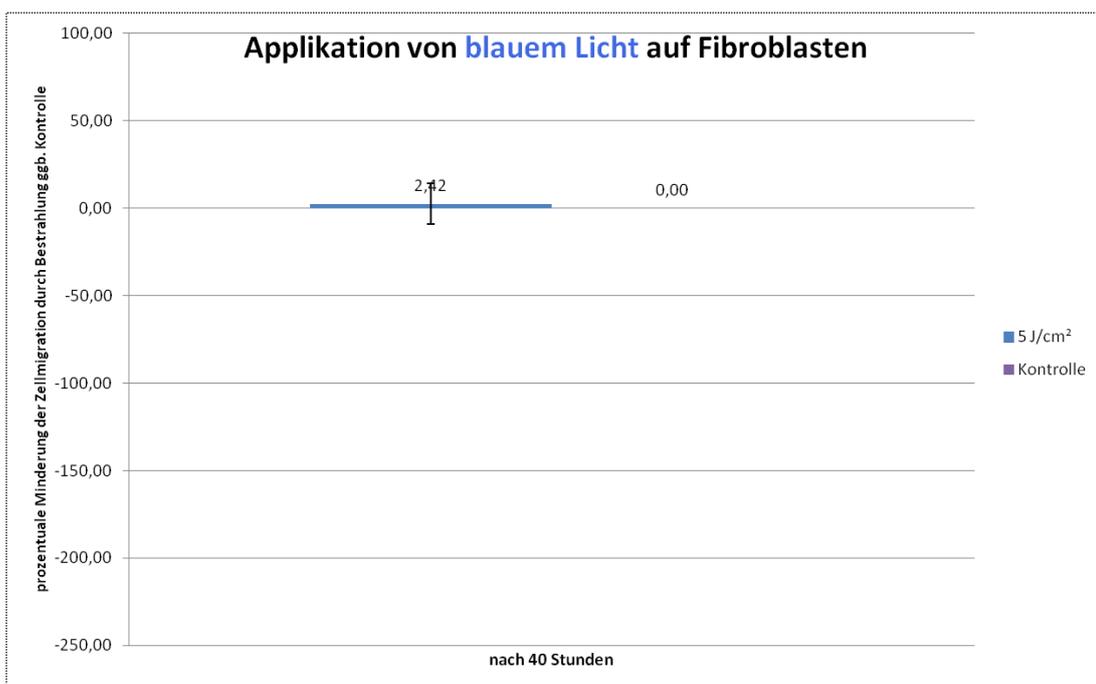


Abbildung 46: Durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration gegenüber Kontrolle zu Versuchsende nach 40 Stunden bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 46: Dargestellt ist die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration ggb. Kontrolle nach 40 Stunden bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) mit entsprechender Standardabweichung.

4.2.2. Applikation von grünem Licht auf Fibroblasten

Tabelle 24 zeigt zum einen die Zusammenstellung der durch Zellmigration jeweils in 40 Stunden, in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich zugewachsenen Fläche (angegeben in Prozent) und gibt zum anderen die prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung gegenüber der Kontrolle zu Versuchsende nach 40 Stunden (mit Standardabweichung) an.

Abbildung 47 stellt anschaulich die aus Tabelle 24 resultierende Zellmigration im zeitlichen Verlauf als Liniendiagramm dar. Zwecks Darstellung der Standardabweichung zu den einzelnen Zeitpunkten, veranschaulicht Abbildung 48 die Zellmigration im zeitlichen Verlauf als Säulendiagramm.

Abbildung 49 stellt die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration durch Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) ggb. Kontrolle nach 40 Stunden graphisch als Säulendiagramm dar.

Tabelle 24: Zusammenstellung der zu den einzelnen Aufnahmezeitpunkten, in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich durch Zellmigration zugewachsenen Fläche (angegeben in Prozent), sowie durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung ggb. Kontrolle zu Versuchsende nach 40 Stunden (mit Standardabweichung) ($n = 8$)

Applikation von grünem Licht auf Fibroblasten						Prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung ggb. Kontrolle zu Versuchsende nach 40 h (jeweilige Standardabweichung rechts)	
B.Dosis (H)	0 h	16 h	20 h	24 h	40 h		
10 J/cm ²	0	38	49	59	83	-50,59	97,35
80 J/cm ²	0	32	42	54	83	-78,85	126,32
200 J/cm ²	0	27	38	51	79	-70,51	121,56
Kontrolle	0	10	21	28	66	0,00	0,00

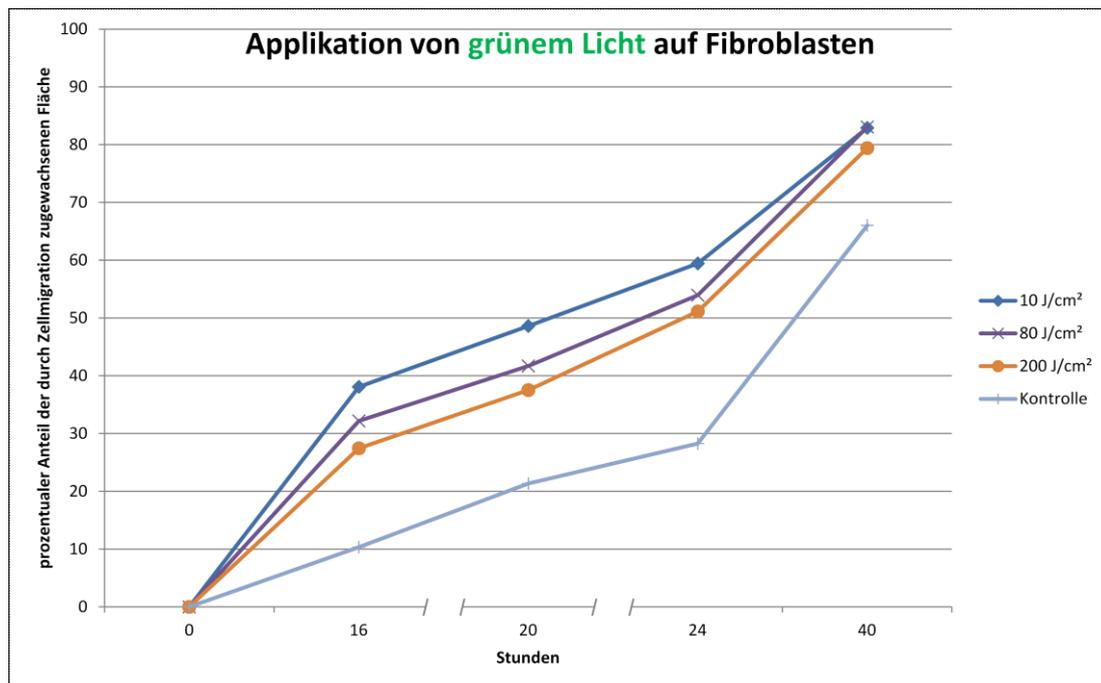


Abbildung 47: Durchschnittlich durch Zellmigration zugewachsene Fläche in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 47: Aus den graphisch quantifizierten zellfreien Flächen zu den jeweiligen Aufnahmezeitpunkten, resultierte rechnerisch der Anteil der durch Zellmigration zugewachsenen Fläche in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf (angegeben in Prozent).

Bereits nach 16 Stunden wurde eine Steigerung der Zellmigration durch Bestrahlung ggb. unbestrahlter Kontrolle ersichtlich. Dieser Effekt blieb bis zum vorher definierten Endpunkt des Versuches nach 40 Stunden erhalten, obgleich er vergleichsweise geringer ausfiel als nach 20 Stunden bzw. 24 Stunden. Die hier beobachtete prozentuale Steigerung der Zellmigration durch

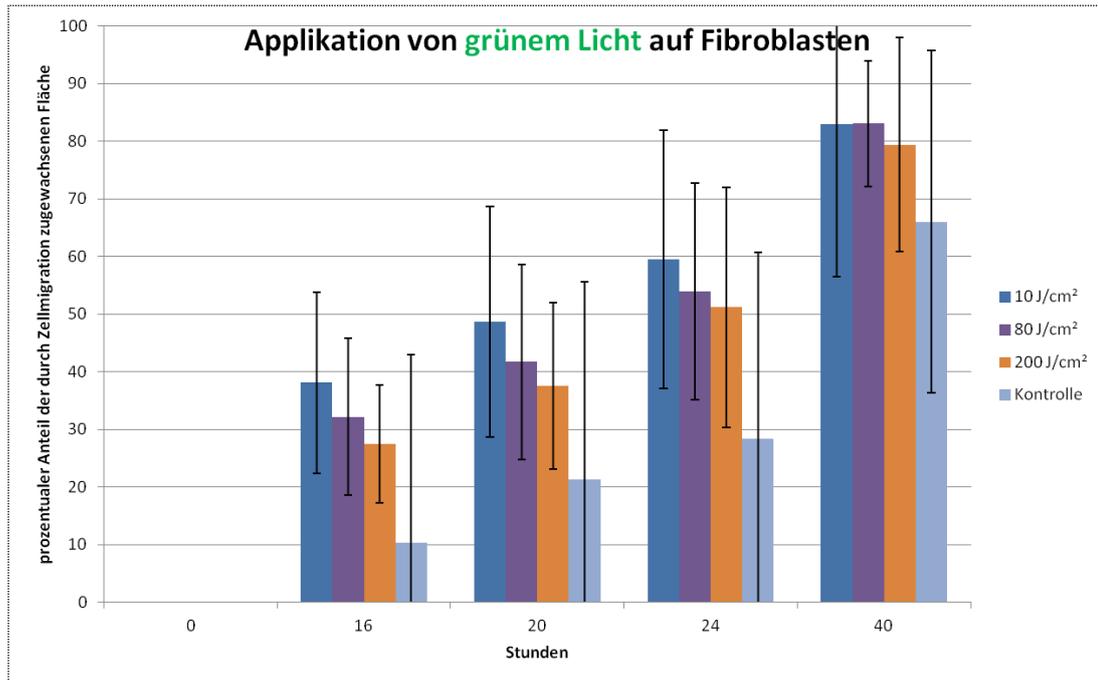


Abbildung 48: Durchschnittlich durch Zellmigration zugewachsene Fläche in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 48: Aus den graphisch quantifizierten zellfreien Flächen zu den jeweiligen Aufnahmezeitpunkten, resultierte rechnerisch der Anteil der durch Zellmigration zugewachsenen Fläche in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf (angegeben in Prozent). Die graphische Veranschaulichung als Säulendiagramm erfolgte, um die entsprechende Standardabweichung anzeigen zu können.

Bestrahlung ggb. der Kontrolle betrug bei einer Bestrahlungsdosis von 10 J/cm^2 nach 40 Stunden $50,59 \%$, bei 80 J/cm^2 $78,85 \%$ und bei 200 J/cm^2 $70,51 \%$. Die Effekte waren statistisch jedoch nicht signifikant. Bzgl. der genauen prozentualen Werte sei auf die angewandten mathematischen Verfahren zur Berechnung hingewiesen (vgl. 3.4.2).

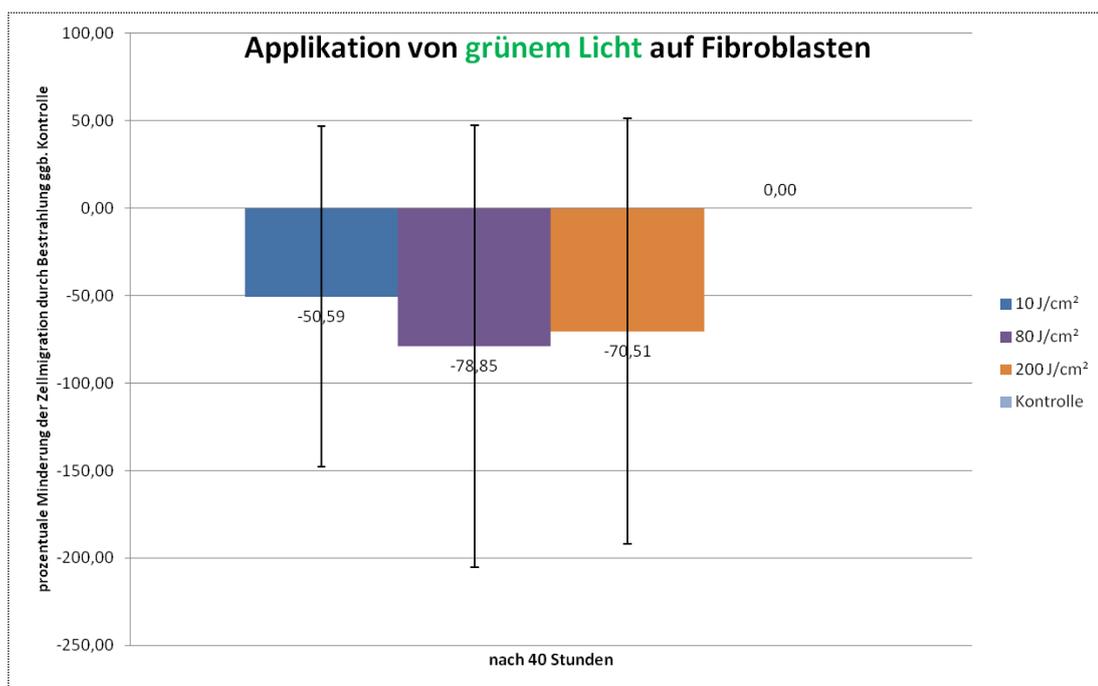


Abbildung 49: Durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration gegenüber Kontrolle zu Versuchsende nach 40 Stunden bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 49: Dargestellt ist die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration ggb. Kontrolle nach 40 Stunden bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) mit entsprechender Standardabweichung.

4.2.3. Applikation von gelbem Licht auf Fibroblasten

Tabelle 25 zeigt zum einen die Zusammenstellung der durch Zellmigration jeweils in 40 Stunden, in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich zugewachsenen Fläche (angegeben in Prozent) und gibt zum anderen die prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung gegenüber der Kontrolle zu Versuchsende nach 40 Stunden (mit Standardabweichung) an.

Abbildung 50 stellt anschaulich die aus Tabelle 25 resultierende Zellmigration im zeitlichen Verlauf als Liniendiagramm dar. Zwecks Darstellung der Standardabweichung zu den einzelnen Zeitpunkten, veranschaulicht Abbildung 51 die Zell-Migration im zeitlichen Verlauf als Säulendiagramm.

Abbildung 52 stellt die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration durch Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) ggb. Kontrolle nach 40 Stunden graphisch als Säulendiagramm dar.

Tabelle 25: Zusammenstellung der zu den einzelnen Aufnahmezeitpunkten, in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich durch Zellmigration zugewachsenen Fläche (angegeben in Prozent), sowie durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung ggb. Kontrolle zu Versuchsende nach 40 Stunden (mit Standardabweichung) ($n = 8$)

Applikation von gelbem Licht auf Fibroblasten						Prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung ggb. Kontrolle zu Versuchsende nach 40 h (jeweilige Standardabweichung rechts)	
B.Dosis (H)	0 h	16 h	20 h	24 h	40 h		
5 J/cm ²	0	40	52	64	91	-0,62	7,94
40 J/cm ²	0	37	49	61	85	6,82	11,62
100 J/cm ²	0	37	50	62	90	0,44	3,02
Kontrolle	0	39	50	62	91	0,00	0,00

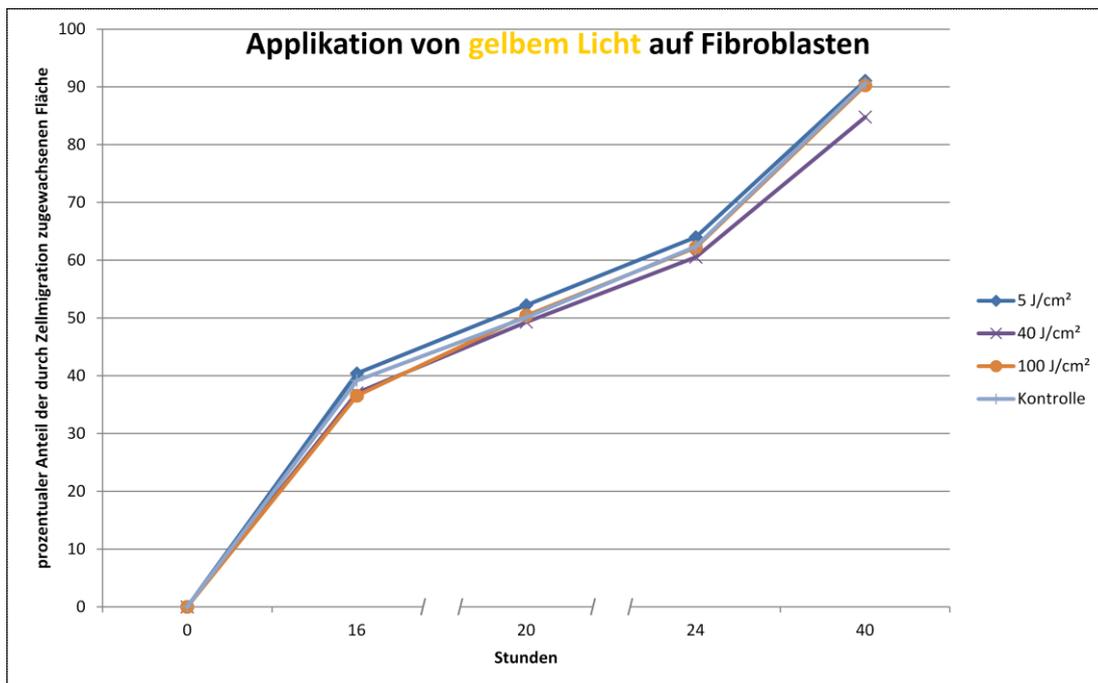


Abbildung 50: Durchschnittlich durch Zellmigration zugewachsene Fläche in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 50: Aus den graphisch quantifizierten zellfreien Flächen zu den jeweiligen Aufnahmezeitpunkten, resultierte rechnerisch der Anteil der durch Zellmigration zugewachsenen Fläche in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf (angegeben in Prozent).

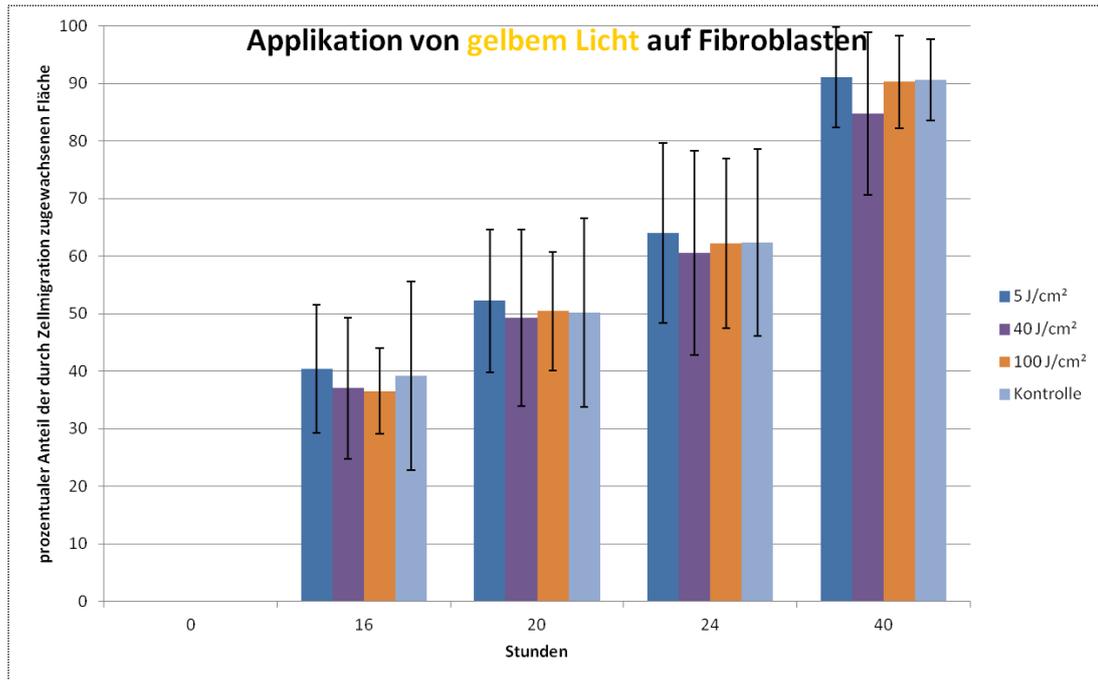


Abbildung 51: Durchschnittlich durch Zellmigration zugewachsene Fläche in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 51: Aus den graphisch quantifizierten zellfreien Flächen zu den jeweiligen Aufnahmezeitpunkten, resultierte rechnerisch der Anteil der durch Zellmigration zugewachsenen Fläche in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf (angegeben in Prozent). Die graphische Veranschaulichung als Säulendiagramm erfolgte, um die entsprechende Standardabweichung anzeigen zu können.

Im Verlauf des Versuches wurde gegenüber der Kontrolle kein deutlicher Effekt einer Bestrahlung auf die Zellmigration deutlich. Lediglich zu Versuchsabschluss nach 40 Stunden wurde bei einer Bestrahlungsdosis von 40 J/cm² eine Reduktion der Zellmigration durch Bestrahlung ggb. der Kontrolle beobachtet. Diese betrug 6,82 %. Der Effekt war jedoch statistisch nicht signifikant.

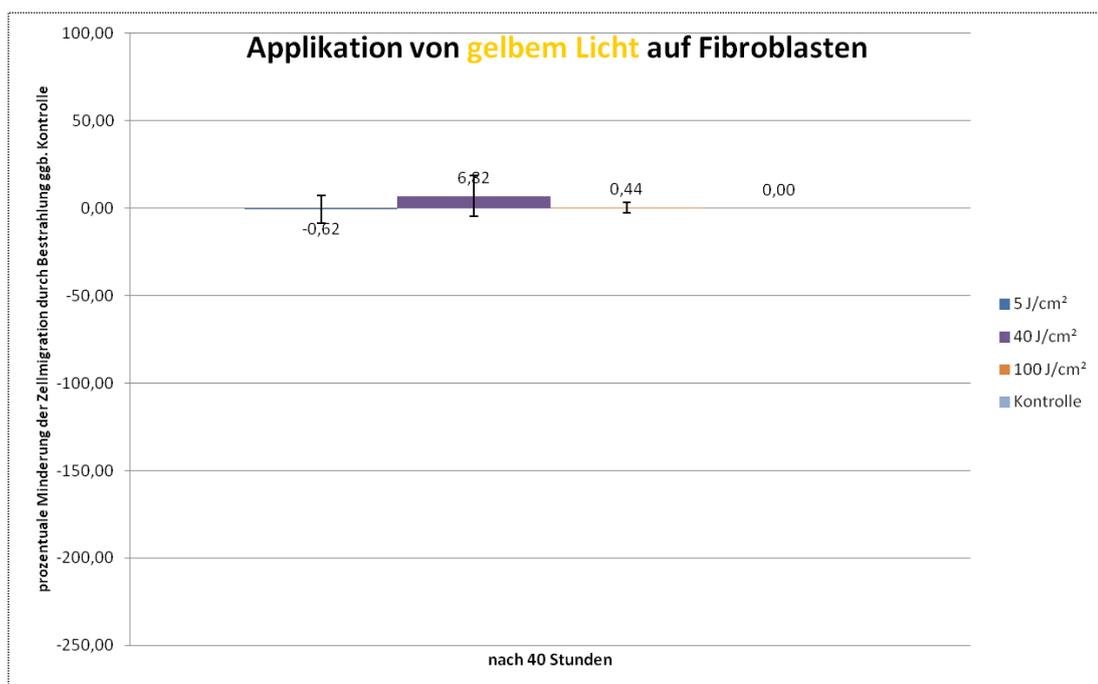


Abbildung 52: Durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration gegenüber Kontrolle zu Versuchsende nach 40 Stunden bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 52: Dargestellt ist die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration ggb. Kontrolle nach 40 Stunden bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) mit entsprechender Standardabweichung.

4.2.4. Applikation von rot-orangenem Licht auf Fibroblasten

Tabelle 26 zeigt zum einen die Zusammenstellung der durch Zellmigration jeweils in 40 Stunden, in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich zugewachsenen Fläche (angegeben in Prozent) und gibt zum anderen die prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung gegenüber der Kontrolle zu Versuchsende nach 40 Stunden (mit Standardabweichung) an.

Abbildung 53 stellt anschaulich die aus Tabelle 26 resultierende Zellmigration im zeitlichen Verlauf als Liniendiagramm dar. Zwecks Darstellung der Standardabweichung zu den einzelnen Zeitpunkten, veranschaulicht Abbildung 54 die Zell-Migration im zeitlichen Verlauf als Säulendiagramm.

Abbildung 55 stellt die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration durch Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) ggb. Kontrolle nach 40 Stunden graphisch als Säulendiagramm dar.

Tabelle 26: Zusammenstellung der zu den einzelnen Aufnahmezeitpunkten, in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich durch Zellmigration zugewachsenen Fläche (angegeben in Prozent), sowie durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung ggb. Kontrolle zu Versuchsende nach 40 Stunden (mit Standardabweichung) ($n = 8$)

Applikation von rot-orangenem Licht auf Fibroblasten						Prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung ggb. Kontrolle zu Versuchsende nach 40 h (jeweilige Standardabweichung rechts)	
B.Dosis (H)	0 h	16 h	20 h	24 h	40 h		
5 J/cm ²	0	38	49	60	83	26,83	85,31
40 J/cm ²	0	28	38	45	85	33,57	104,65
100 J/cm ²	0	33	43	55	83	41,95	110,86
Kontrolle	0	14	21	34	71	0,00	0,00

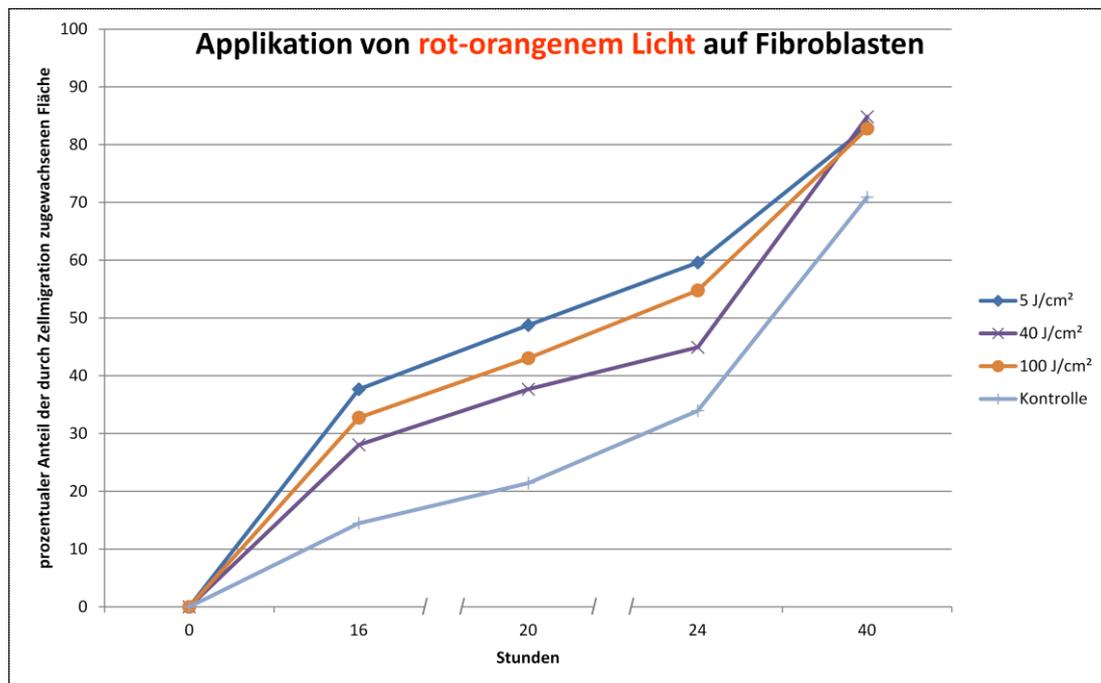


Abbildung 53: Durchschnittlich durch Zellmigration zugewachsene Fläche in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 53: Aus den graphisch quantifizierten zellfreien Flächen zu den jeweiligen Aufnahmezeitpunkten, resultierte rechnerisch der Anteil der durch Zellmigration zugewachsenen Fläche in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf (angegeben in Prozent).

Bereits nach 16 Stunden wurde eine Steigerung der Zellmigration durch Bestrahlung ersichtlich. Dieser Effekt blieb bis zum vorher definierten Endpunkt des Versuches nach 40 Stunden erhalten, obgleich er vergleichsweise geringer ausfiel als nach 20 Stunden bzw. 24 Stunden. Die Reduktion der zellulären Migration (s.u.) war in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis steigerbar und betrug 26,83 % für 5 J/cm² und 33,57 % bzw. 41,95 % für 40 J/cm² respektive 100 J/cm².

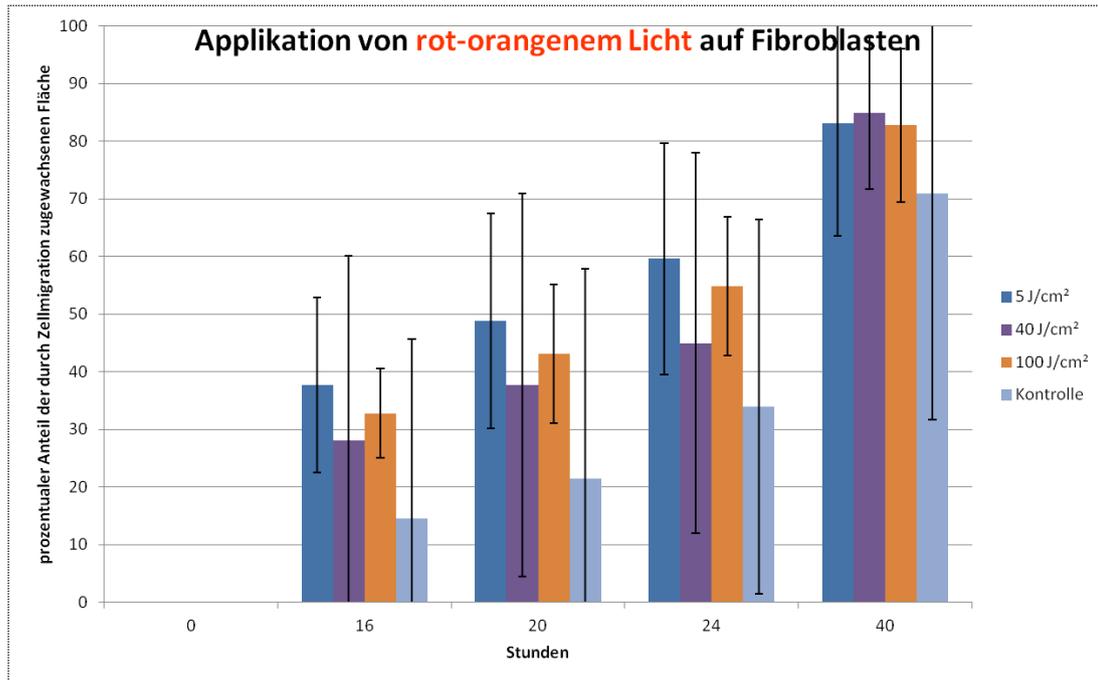


Abbildung 54: Durchschnittlich durch Zellmigration zugewachsene Fläche in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 54: Aus den graphisch quantifizierten zellfreien Flächen zu den jeweiligen Aufnahmezeitpunkten, resultierte rechnerisch der Anteil der durch Zellmigration zugewachsenen Fläche in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf (angegeben in Prozent). Die graphische Veranschaulichung als Säulendiagramm erfolgte, um die entsprechende Standardabweichung anzeigen zu können.

Zwar erscheint bei Betrachten der errechneten Mittelwerte in Abbildung 53 und Abbildung 54 eine Migrationssteigerung durch Bestrahlung gegeben, doch stellt sich bei Betrachtung der primären Datensätze nach 40 h finale eine Minderung der Migration durch Bestrahlung heraus - diese hat Gültigkeit. Hingewiesen sei auf die angewandten mathematischen Verfahren (vgl. 3.4.2).

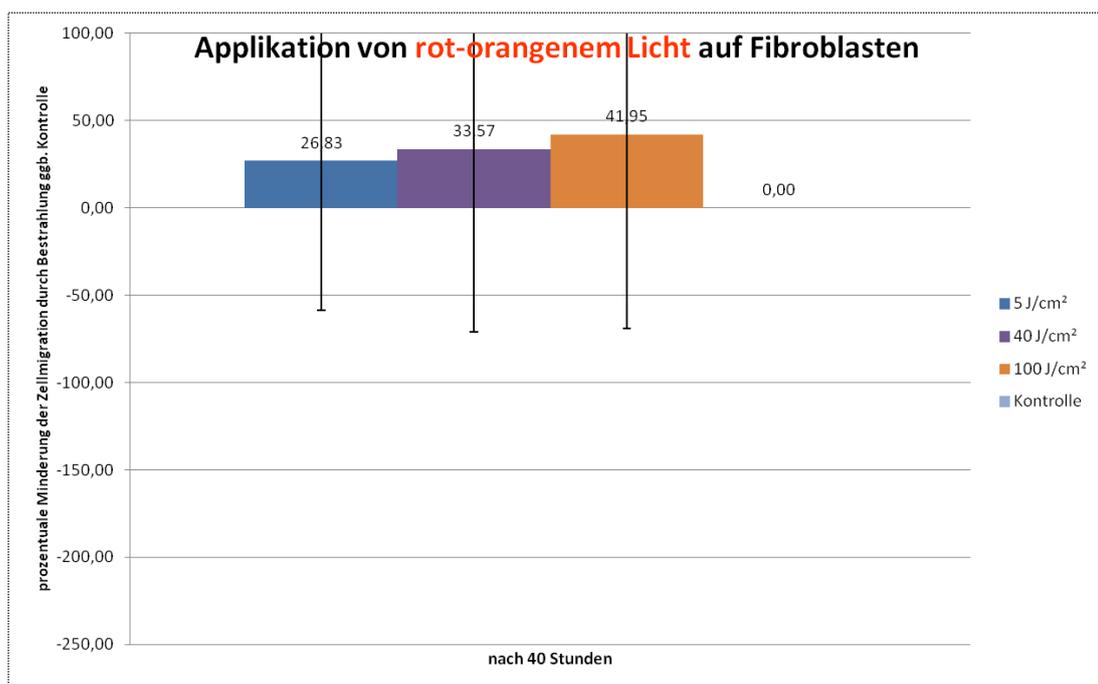


Abbildung 55: Durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration gegenüber Kontrolle zu Versuchsende nach 40 Stunden bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 55: Dargestellt ist die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration ggb. Kontrolle nach 40 Stunden bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) mit entsprechender Standardabweichung.

4.2.5. Applikation von grünem Licht auf Keratinozyten

Tabelle 27 zeigt zum einen die Zusammenstellung der durch Zellmigration jeweils in 40 Stunden, in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich zugewachsenen Fläche (angegeben in Prozent) und gibt zum anderen die prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung gegenüber der Kontrolle zu Versuchsende nach 40 Stunden (mit Standardabweichung) an.

Abbildung 56 stellt anschaulich die aus Tabelle 27 resultierende Zellmigration im zeitlichen Verlauf als Liniendiagramm dar. Zwecks Darstellung der Standardabweichung zu den einzelnen Zeitpunkten, veranschaulicht Abbildung 57 die Zellmigration im zeitlichen Verlauf als Säulendiagramm.

Abbildung 58 stellt die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration durch Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) ggb. Kontrolle nach 40 Stunden graphisch als Säulendiagramm dar.

Tabelle 27: Zusammenstellung der zu den einzelnen Aufnahmezeitpunkten, in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich durch Zellmigration zugewachsenen Fläche (angegeben in Prozent), sowie durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung ggb. Kontrolle zu Versuchsende nach 40 Stunden (mit Standardabweichung) ($n = 8$)

Applikation von grünem Licht auf Keratinozyten						Prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung ggb. Kontrolle zu Versuchsende nach 40 h (jeweilige Standardabweichung rechts)	
B.Dosis (H)	0 h	16 h	20 h	24 h	40 h		
10 J/cm ²	0	21	30	48	95	-0,70	4,00
80 J/cm ²	0	12	19	32	86	9,01	22,33
200 J/cm ²	0	9	16	24	76	19,68	38,68
Kontrolle	0	19	28	43	95	0,00	0,00

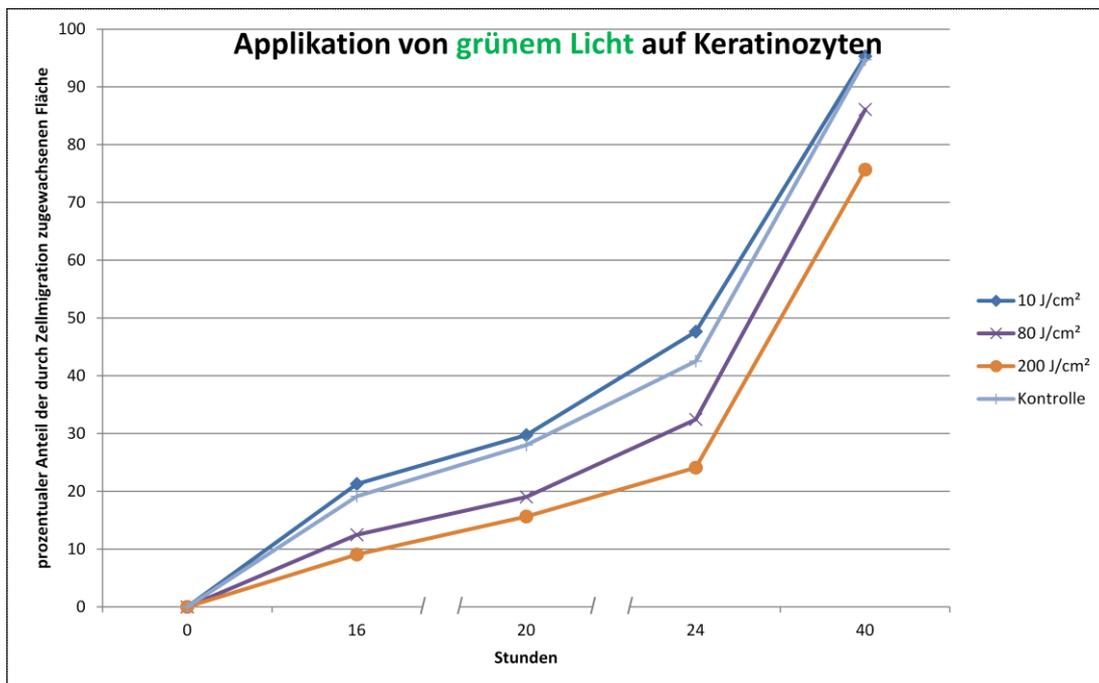


Abbildung 56: Durchschnittlich durch Zellmigration zugewachsene Fläche in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 56: Aus den graphisch quantifizierten zellfreien Flächen zu den jeweiligen Aufnahmezeitpunkten, resultierte rechnerisch der Anteil der durch Zellmigration zugewachsenen Fläche in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf (angegeben in Prozent).

Bereits nach 16 Stunden wurde bei den Bestrahlungsdosen 80 J/cm² und 200 J/cm² eine Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung ggb. unbestrahlter Kontrolle ersichtlich. Bei einer Bestrahlungsdosis von 10 J/cm² wurde im Verlauf kein deutlicher Effekt erkenntlich.

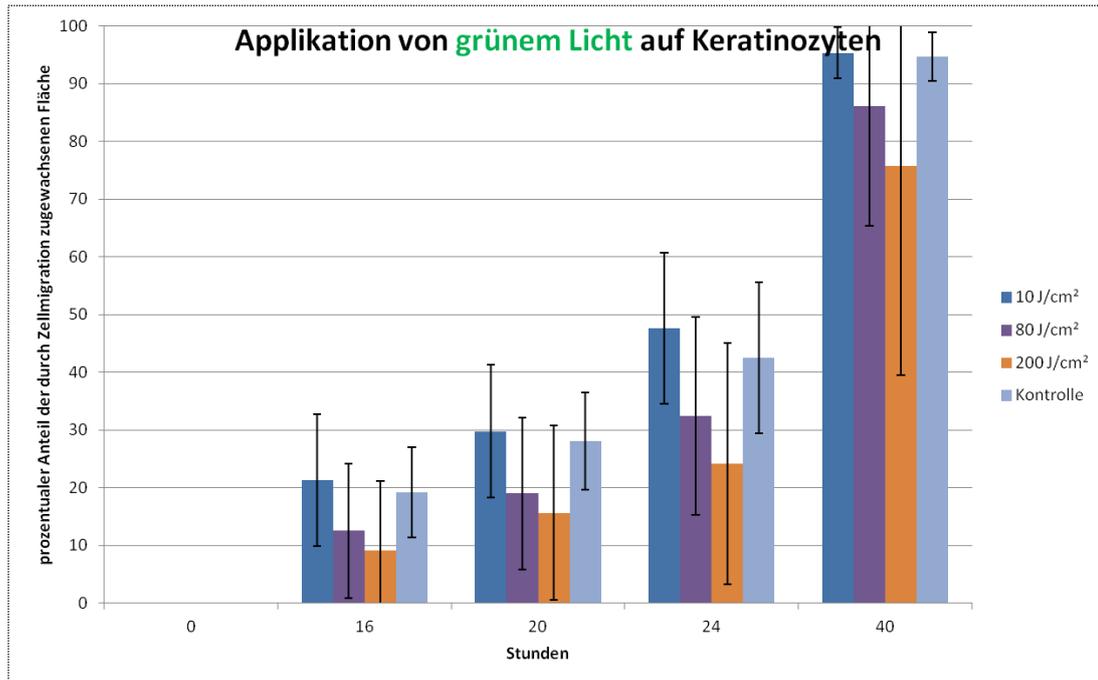


Abbildung 57: Durchschnittlich durch Zellmigration zugewachsene Fläche in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 57 Aus den graphisch quantifizierten zellfreien Flächen zu den jeweiligen Aufnahmezeitpunkten, resultierte rechnerisch der Anteil der durch Zellmigration zugewachsenen Fläche in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf (angegeben in Prozent). Die graphische Veranschaulichung als Säulendiagramm erfolgte, um die entsprechende Standardabweichung anzeigen zu können.

Die prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung ggb. der Kontrolle betrug bei einer Bestrahlungsdosis von 80 J/cm^2 zum vorher definierten Endpunkt des Versuches nach 40 Stunden $9,01 \%$, bei einer Bestrahlungsdosis von 200 J/cm^2 $19,68 \%$. Diese Effekte waren statistisch jedoch nicht signifikant.

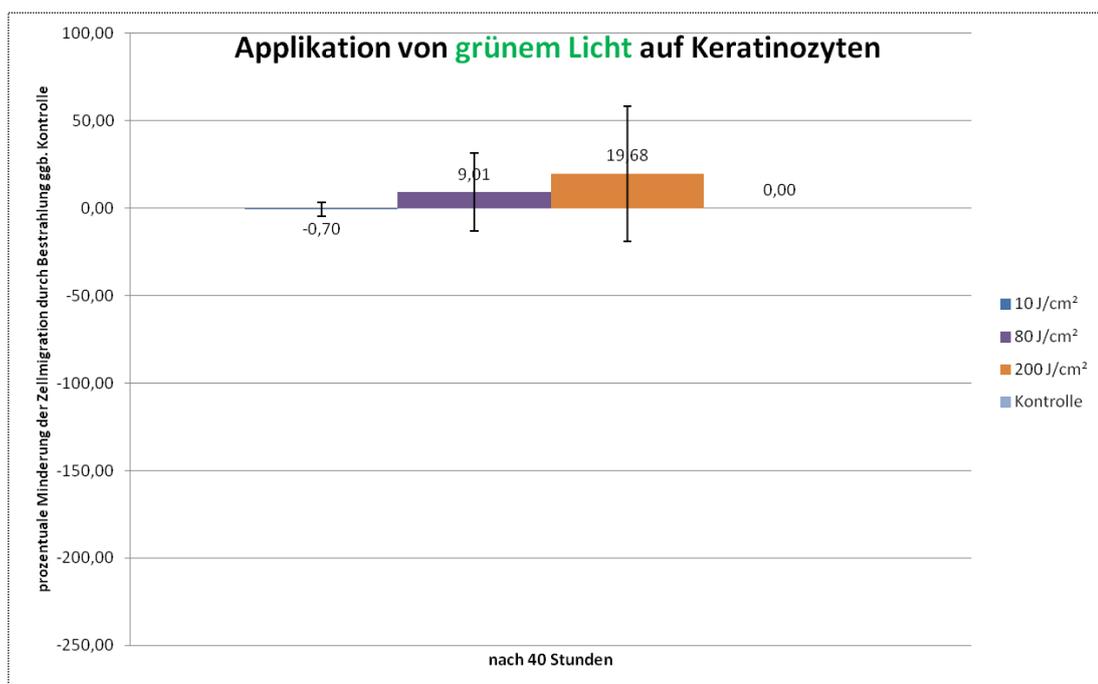


Abbildung 58: Durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration gegenüber Kontrolle zu Versuchsende nach 40 Stunden bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 58: Dargestellt ist die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration ggb. Kontrolle nach 40 Stunden bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) mit entsprechender Standardabweichung.

4.2.6. Applikation von gelbem Licht auf Keratinozyten

Tabelle 28 zeigt zum einen die Zusammenstellung der durch Zellmigration jeweils in 40 Stunden, in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich zugewachsenen Fläche (angegeben in Prozent) und gibt zum anderen die prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung gegenüber der Kontrolle zu Versuchsende nach 40 Stunden (mit Standardabweichung) an.

Abbildung 59 stellt anschaulich die aus Tabelle 28 resultierende Zellmigration im zeitlichen Verlauf als Liniendiagramm dar. Zwecks Darstellung der Standardabweichung zu den einzelnen Zeitpunkten, veranschaulicht Abbildung 60 die Zellmigration im zeitlichen Verlauf als Säulendiagramm.

Abbildung 61 stellt die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration durch Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) ggb. Kontrolle nach 40 Stunden graphisch als Säulendiagramm dar.

Tabelle 28: Zusammenstellung der zu den einzelnen Aufnahmezeitpunkten, in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich durch Zellmigration zugewachsenen Fläche (angegeben in Prozent), sowie durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung ggb. Kontrolle zu Versuchsende nach 40 Stunden (mit Standardabweichung) ($n = 8$)

Applikation von gelbem Licht auf Keratinozyten						Prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung ggb. Kontrolle zu Versuchsende nach 40 h (jeweilige Standardabweichung rechts)	
B.Dosis (H)	0 h	16 h	20 h	24 h	40 h		
5 J/cm ²	0	10	19	30	84	14,32	36,88
40 J/cm ²	0	9	17	23	66	32,10	41,58
100 J/cm ²	0	14	18	25	76	22,31	37,41
Kontrolle	0	20	28	35	97	0,00	0,00

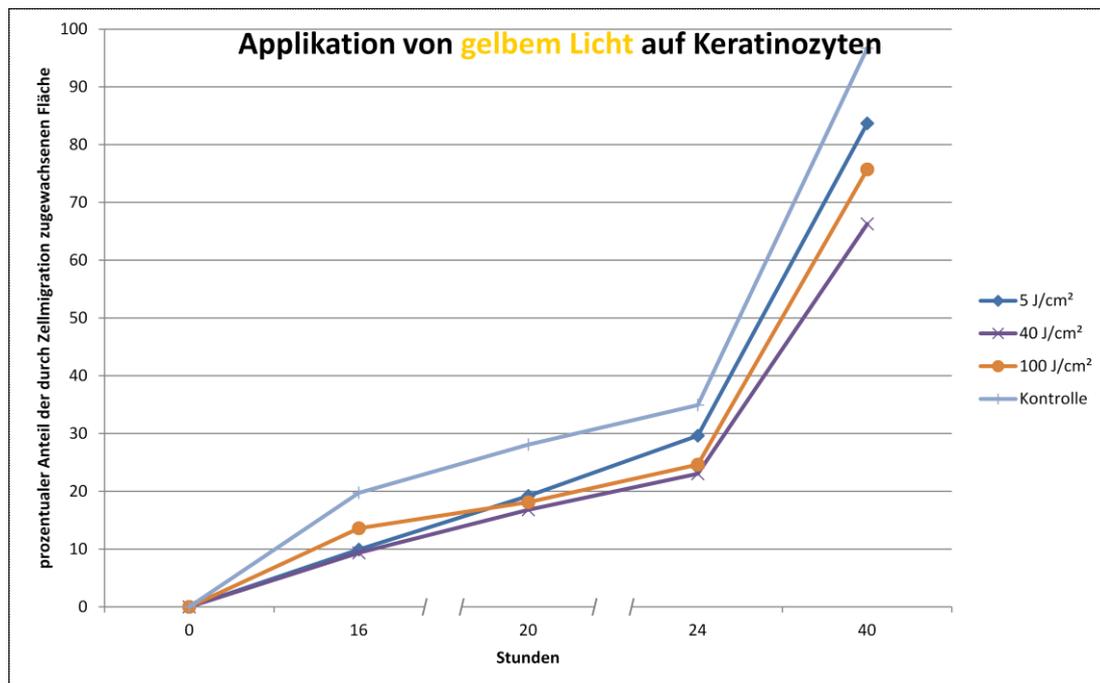


Abbildung 59: Durchschnittlich durch Zellmigration zugewachsene Fläche in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 59: Durch Aus den graphisch quantifizierten zellfreien Flächen zu den jeweiligen Aufnahmezeitpunkten, resultierte rechnerisch der Anteil der durch Zellmigration zugewachsenen Fläche in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf (angegeben in Prozent).

Bereits nach 16 Stunden wurde eine Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung ggb. unbestrahlter Kontrolle ersichtlich.

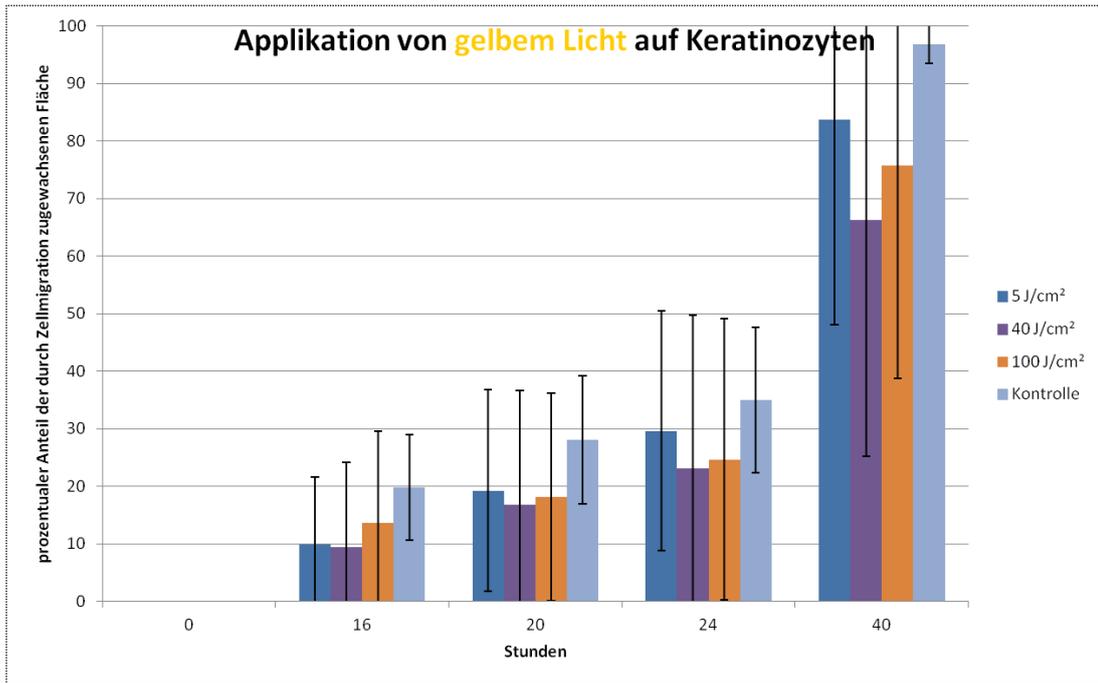


Abbildung 60: Durchschnittlich durch Zellmigration zugewachsene Fläche in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 60: Aus den graphisch quantifizierten zellfreien Flächen zu den jeweiligen Aufnahmezeitpunkten, resultierte rechnerisch der Anteil der durch Zellmigration zugewachsenen Fläche in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf (angegeben in Prozent). Die graphische Veranschaulichung als Säulendiagramm erfolgte, um die entsprechende Standardabweichung anzeigen zu können.

Die beobachtete prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung ggb. der Kontrolle betrug bei einer Bestrahlungsdosis von 5 J/cm^2 nach 40 Stunden 14,32 %, bei 40 J/cm^2 32,1 % und bei 100 J/cm^2 22,31 %. Die Effekte waren statistisch jedoch nicht signifikant.

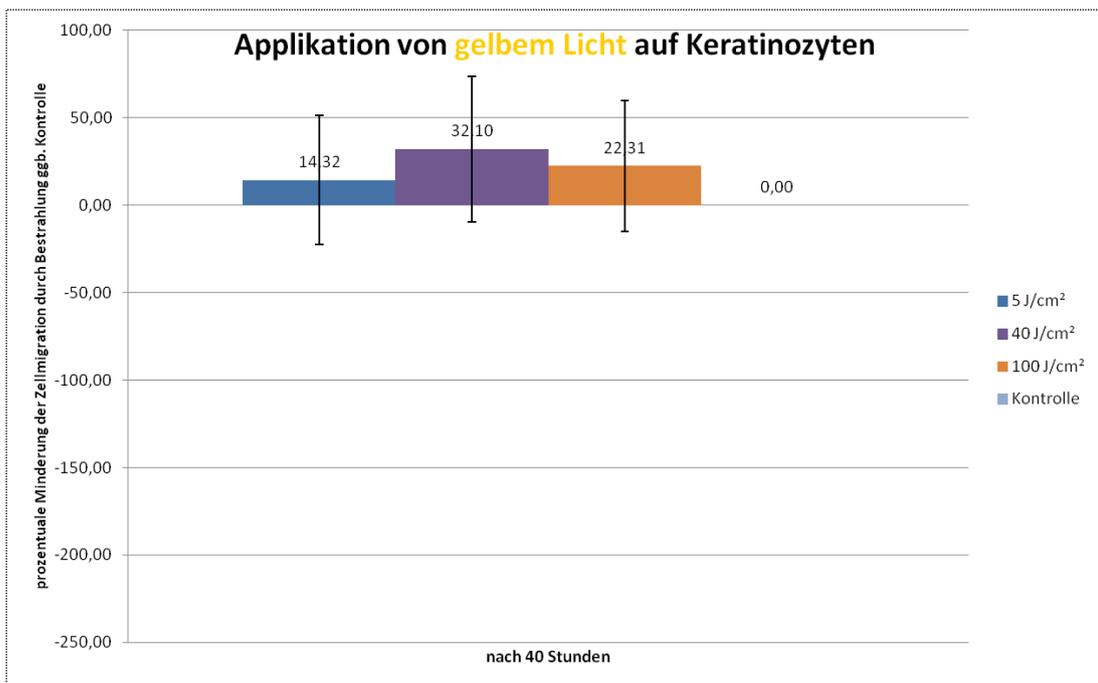


Abbildung 61: Durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration gegenüber Kontrolle zu Versuchsende nach 40 Stunden bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 61: Dargestellt ist die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration ggb. Kontrolle nach 40 Stunden bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) mit entsprechender Standardabweichung.

4.2.7. Applikation von rot-orangenem Licht auf Keratinozyten

Tabelle 29 zeigt zum einen die Zusammenstellung der durch Zellmigration jeweils in 40 Stunden, in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich zugewachsenen Fläche (angegeben in Prozent) und gibt zum anderen die prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung gegenüber der Kontrolle zu Versuchsende nach 40 Stunden (mit Standardabweichung) an.

Abbildung 62 stellt anschaulich die aus Tabelle 29 resultierende Zellmigration im zeitlichen Verlauf als Liniendiagramm dar. Zwecks Darstellung der Standardabweichung zu den einzelnen Zeitpunkten, veranschaulicht Abbildung 63 die Zellmigration im zeitlichen Verlauf als Säulendiagramm.

Abbildung 64 stellt die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration durch Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) ggb. Kontrolle nach 40 Stunden graphisch als Säulendiagramm dar.

Tabelle 29: Zusammenstellung der zu den einzelnen Aufnahmezeitpunkten, in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H), durchschnittlich durch Zellmigration zugewachsenen Fläche (angegeben in Prozent), sowie durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung ggb. Kontrolle zu Versuchsende nach 40 Stunden (mit Standardabweichung) ($n = 8$)

Applikation von rot-orangenem Licht auf Keratinozyten						Prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung ggb. Kontrolle zu Versuchsende nach 40 h (jeweilige Standardabweichung rechts)	
B.Dosis (H)	0 h	16 h	20 h	24 h	40 h		
5 J/cm ²	0	14	19	33	86	-23,07	63,38
40 J/cm ²	0	15	19	30	86	-34,59	112,19
100 J/cm ²	0	12	17	25	77	3,66	19,28
Kontrolle	0	9	13	23	80	0,00	0,00

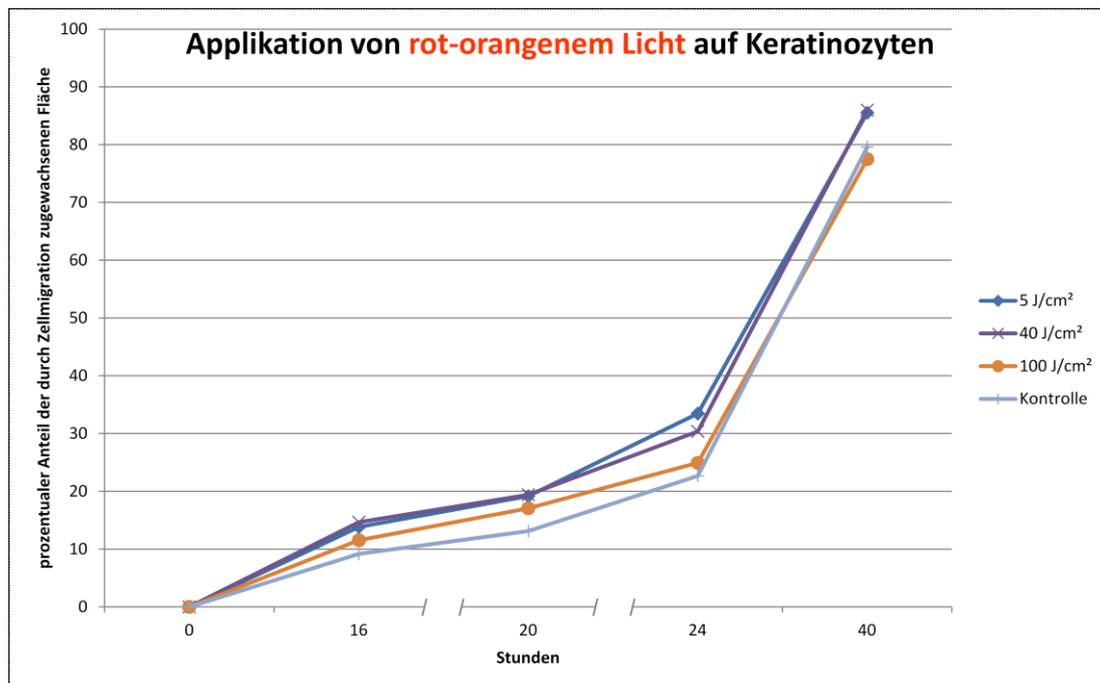


Abbildung 62: Durchschnittlich durch Zellmigration zugewachsene Fläche in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 62 Aus den graphisch quantifizierten zellfreien Flächen zu den jeweiligen Aufnahmezeitpunkten, resultierte rechnerisch der Anteil der durch Zellmigration zugewachsenen Fläche in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf (angegeben in Prozent).

Bereits nach 16 Stunden wurde eine Steigerung der Zellmigration durch Bestrahlung ggb. unbestrahlter Kontrolle ersichtlich. Dieser Effekt blieb 24 Stunden lang bei allen 3 untersuchten Bestrahlungsdosen erhalten. Nach 40 Stunden wurde eine prozentuale Steigerung der Zellmigration nur noch bei den Bestrahlungsdosen 5 J/cm² und 40 J/cm² deutlich. Diese betrug 23,07 % bzw. 34,59 %. Bei einer Bestrahlungsdosis von 100 J/cm² verkehrte sich der anfänglich beobachtete Effekt

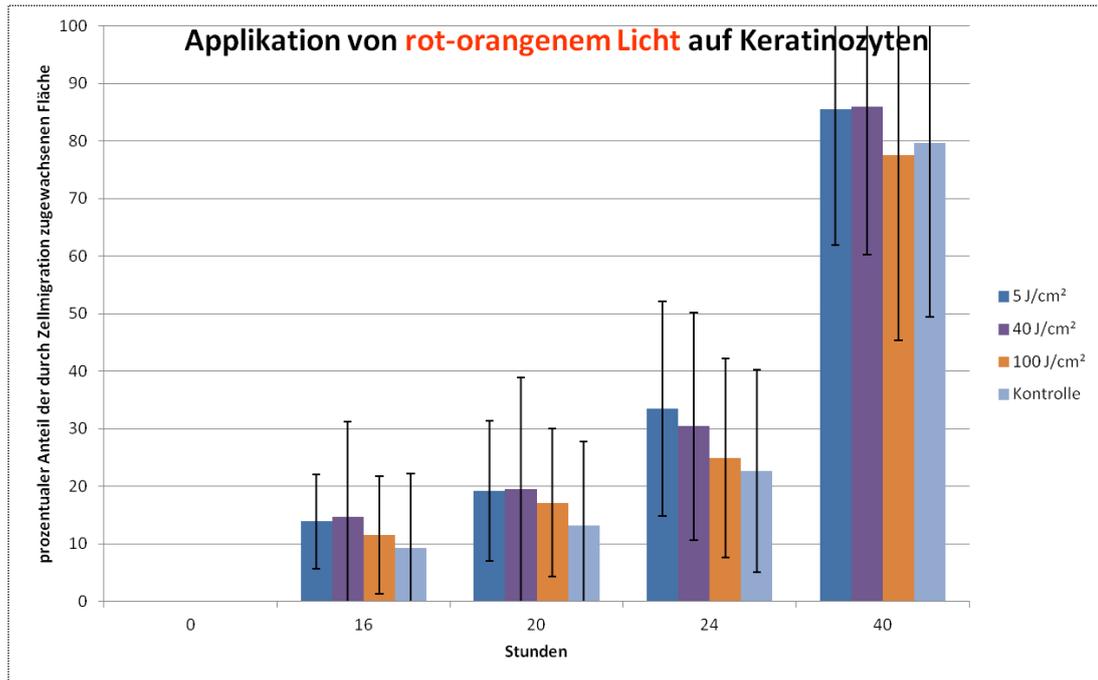


Abbildung 63: Durchschnittlich durch Zellmigration zugewachsene Fläche in Abhängigkeit von jeweils applizierter Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 63: Aus den graphisch quantifizierten zellfreien Flächen zu den jeweiligen Aufnahmezeitpunkten, resultierte rechnerisch der Anteil der durch Zellmigration zugewachsenen Fläche in Abhängigkeit von applizierter Bestrahlungsdosis (H) im zeitlichen Verlauf (angegeben in Prozent). Die graphische Veranschaulichung als Säulendiagramm erfolgte, um die entsprechende Standardabweichung anzeigen zu können.

ins Gegenteil, sodass, zum vorher definierten Endpunkt des Versuches nach 40 Stunden, eine prozentuale Minderung der Zellmigration durch Bestrahlung ggb. der Kontrolle um 3,66 % ersichtlich wurde. Besagte Effekte waren statistisch jedoch nicht signifikant. Bzgl. der genauen prozentualen Werte sei auf die angewandten mathematischen Verfahren zur Berechnung hingewiesen (vgl. 3.4.2).

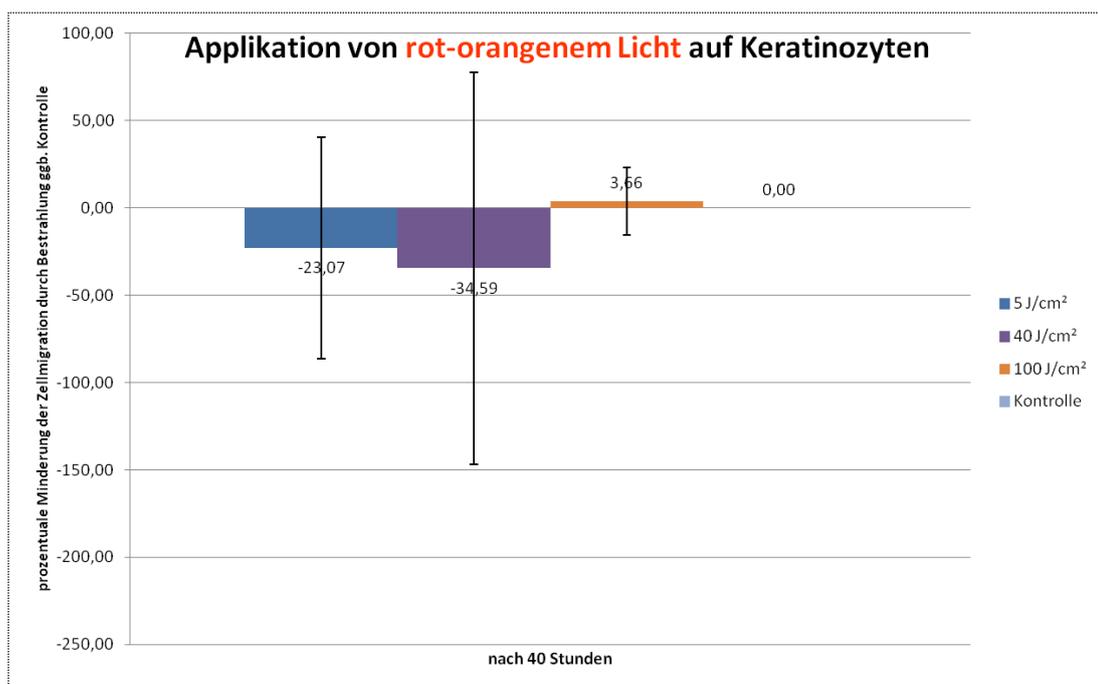


Abbildung 64: Durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration gegenüber Kontrolle zu Versuchsende nach 40 Stunden bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) ($n = 8$)

Legende 64: Dargestellt ist die durchschnittliche prozentuale Minderung der Zellmigration ggb. Kontrolle nach 40 Stunden bei Applikation jeweiliger Bestrahlungsdosis (H) mit entsprechender Standardabweichung.

5. Diskussion

Diskutiert werden die Anreize zur Forschung an LED-basierten Systemen zur *LLLT* (vgl. 5.1), sowie die dargestellten Proliferations-, sowie Migrationsuntersuchungen, inklusive der jeweiligen Methodik (vgl. 5.2 und 5.3). Vor dem Hintergrund gemachter Forschungsergebnisse erfolgt ein Ausblick auf mögliche zukünftige Untersuchungen zur Anwendung der *LLLT* im Kontext der kutanen Wundheilung (vgl. 5.4), sowie abschließend die Darstellung der Schlussfolgerungen vorliegender Arbeit (vgl. 5.5).

5.1. Forschung an LED-basierten Systemen zur *LLLT*

Mittlerweile gilt als wissenschaftlich bewiesen, dass die *Low-level light therapy (LLLT)* oder auch *Photobiomodulation (PBM)* verschiedene biologische Effekte vermittelt, welche therapeutisch nutzbar sind - darunter Schmerzreduktion, Inflammationsreduktion, eine Verbesserung der Wundheilung - und zur Prävention und *early-stage*-Therapie hypertropher Narbenbildung nach vorangegangener kutaner Verwundung genutzt werden kann (vgl. 1.4).

Dennoch hat sie bisher keine breite und regelhafte klinische Anwendung gefunden, da in der wissenschaftlichen Literatur eine Inkonsistenz und partielle Widersprüchlichkeit der Forschungsergebnisse beobachtet wird, welche in aktuellen Untersuchungen fehlender Standardisierung hinsichtlich Methodik, angewandter Parameter, sowie deren Feinabstimmung aufeinander und auf das zu behandelnde Gewebe zugerechnet werden.

In den Ursprüngen der *LLLT* wurden Laser als Lichtquellen genutzt, doch stellte sich im Laufe der Zeit heraus, dass durch Nutzung von LEDs in der *LLLT* gleiche Effekte erzielt werden konnten und für LEDs eine Reihe von Vorteilen besteht: LEDs sind mittlerweile im Vergleich zum Laser (1) für das gesamte Wellenlängenspektrum (inkl. UV- und Infrarot-Bereich) verfügbar, (2) in ihrer Anwendung ökonomischer und langlebiger, (3) sicherer, da für ihren Betrieb keine Hochspannung benötigt wird, (4) praktischer in der Anwendung durch das geringere Gewicht, (5) durch die modulare Bauweise an die Größe der zu behandelnden Fläche anpassbar, (6) produzieren geringere Hitze, reduzieren daher Hyperthermie-induzierte Effekte und können zudem näher an das Gewebe gebracht werden, sodass die Applikation höherer Bestrahlungsdosen möglich ist bzw. der Energieverbrauch reduziert werden kann und können (7) schmalbandiges Licht emittieren und so nicht-funktionelle Spektralanteile eliminieren [15, pages 2163, 5, 25, page 59]. Aus diesen Gründen werden in der *LLLT* Laser-basierte Systeme zunehmend durch LEDs verdrängt, sodass die Forschung an LED-basierten Systemen vielversprechend erscheint.

Am Zell- und Molekularbiologischen Labor der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie am Universitätsklinikum Düsseldorf konnten Opländer *et. al.* anhand prototypischer LED-Arrays zeigen, dass schmalbandiges blaues Licht (Wellenlängenbereich von 410 nm bis 453 nm) die Proliferation von primären Fibroblasten aus menschlicher Haut abhängig von Bestrahlungsdosis (*H*) und genauer Wellenlänge reduziert, wobei, im Kontrast zur Ultraviolettstrahlung (Wellenlänge etwa < 380 nm), toxische Effekte vermieden werden können. Deziidiert verwiesen die Autoren auf die Relevanz der diesbezüglich exakt verwendeten Wellenlänge [23, *passim*].

In vorliegender Arbeit wurden anhand prototypischer LED-Systeme die evtl. proliferations-, sowie migrationshemmenden Einflüsse dreier weiterer Farben aus dem Spektrum sichtbaren Lichts untersucht, nämlich grün (Wellenlänge 524 nm), gelb (Wellenlänge 599 nm) und rot-orange (Wellenlänge 632 nm).

Eine detaillierte Bezugnahme auf und ein dezidierter Vergleich mit anderen Studien zu diesem Thema erschienen im Zuge der vorliegenden Arbeit aus mehreren Gründen nicht in großem Umfang sinnvoll. Zum einen wurden, wie zuvor beschrieben (vgl. 1.4) stets unterschiedlich eingestellte Lichtquellen mit jeweils abweichenden Geräteparametern genutzt, zum anderen unterschiedene sich (1) die Ursprünge der verwendeten Gewebe (tierisch/menschlich, sowie embryonal/reif), (2) die Kulturbedingungen, (3) die jeweilige Versuchsdauer, sowie (4) die angewandten Mess- und Auswertmethoden. Alle genannten Faktoren beeinflussen allgemein die erzielten Studienergebnisse und erschweren so, auf genannte Weise, die Vergleichbarkeit.

In der kritischen Auseinandersetzung mit den angewandten Methoden und erzielten Ergebnisse vorliegender Arbeit wurden dennoch ausgewählte Arbeiten gegenübergestellt und vor dem Hintergrund einer evtl. zukünftigen therapeutischen Nutzbarkeit verglichen.

5.2. Proliferationsuntersuchung und angewandte Methodik

Das Proliferationsverhalten wurde in jeweils fünftägigen Versuchen anhand primärer Fibroblasten aus menschlicher Haut untersucht. Um ebenso eine Abhängigkeit der Ergebnisse vom Gewebeatler zu untersuchen, wurden die replikative Seneszenz als Alterungsmodell genutzt und die Versuche auch mit derart gealterten Zellen durchgeführt.

Etwa ab Tag 3 konnte farbübergreifend eine zunehmende Minderung der Zellviabilität durch Bestrahlung gegenüber unbestrahlter Kontrolle festgestellt werden. Innerhalb von 5 Tagen war durchschnittlich bereits ab einer Bestrahlungsdosis von etwa 10 J/cm^2 eine Reduktion der Zellproliferation um etwa 10 % möglich.

Bei seneszenten Zellen war dieser Effekt leichtgradig geringer ausgeprägt, als bei juvenilen Zellen.

Bei juvenilen Zellen war die Zellproliferation nach 5 Tagen bei einer Vergleichsbestrahlungsdosis von 10 J/cm^2 bei Applikation von grünem Licht um 14,73 % (*) reduziert, bei gelbem um 12,29 % (*) und bei rot-orangenem um 13,08 % (*). Genannte Effekte waren signifikant (*).

Bei der Applikation von grünem Licht auf seneszente Zellen wurde bei genannter Vergleichsbestrahlungsdosis von 10 J/cm^2 interessanter Weise keine Reduktion der Proliferation beobachtet, sondern eine Steigerung dieser um 2,43 %. Bei der nächsthöheren Bestrahlungsdosis von 20 J/cm^2 stellte sich wiederum eine Proliferationsreduktion um 1,23 % ein, welche jedoch somit deutlich geringer ausfiel, als jene bei juvenilen Zellen.

Bei Applikation von gelbem Licht auf seneszente Zellen kam die Reduktion der Proliferation um 9,69 % (*) etwa jener bei juvenilen Zellen gleich. Bei rot-orangenem Licht fiel die Proliferationsreduktion mit 5,14 % (*) etwa halb so stark aus, wie bei juvenilen Zellen. Genannte Effekte waren für gelbes und rot-orangenes Licht signifikant (*).

Sowohl bei juvenilen, als auch bei seneszenten Zellen konnte die Zellproliferation meist durch die Anwendung höherer Dosen weiter reduziert werden - somit war der beobachtete Effekt größtenteils steigerbar. Bei seneszenten Zellen jedoch fiel der durch eine höhere Bestrahlungsdosis maximal erzielbare Effekt wiederum geringer aus. Zudem war meist auch die dazu benötigte Bestrahlungsdosis höher.

Bei grünem Licht ließ sich die Proliferationsreduktion bis auf 19,43 % (*) für juvenile Zellen und 17,64 % (*) für seneszente Zellen steigern, bei einer Bestrahlungsdosis von 150 J/cm^2 , respektive 200 J/cm^2 . Genannte Effekte waren signifikant (*).

Bei gelbem Licht war die Proliferationsreduktion auf 15,6 % (*) für juvenile Zellen und 12,71 % (*) für seneszente Zellen steigerbar. Benötigte Bestrahlungsdosen hierfür waren 80 J/cm², bzw. 40 J/cm². Genannte Effekte waren signifikant (*).

Bei rot-orangenem Licht war die Proliferation bei juvenilen Zellen nicht über genannte 13,08 % (*) hinaus reduzierbar, bei seneszenten Zellen jedoch bis auf 10,28 % (*) bei einer Bestrahlungsdosis von 80 J/cm². Genannte Effekte waren signifikant (*).

Die Tatsache, dass die Zellproliferation bei seneszenten Zellen durch LED-Anwendung nur in geringerem Maße reduzierbar war, als bei juvenilen Zellen - seneszente Zellen somit eine, wie auch immer geartete, reduzierte Empfindlichkeit ausgebildet hatten - und es bei der Anwendung von grünem Licht auf seneszente Zellen bei der niedrigsten untersuchten Bestrahlungsdosis sogar zu einer Steigerung der zellulären Proliferation kam, lässt vermuten, dass durch Applikation von Licht in noch niedrigeren Bestrahlungsdosen, als jenen, im Zuge vorliegender Arbeit, untersuchten, möglicherweise regelhaft eine Steigerung der zellulären Proliferation erreicht werden könnte. Dieser Vermutung ist im Rahmen zukünftiger Arbeiten nachzugehen.

Im Bezug auf die Glukosekonzentration verwendeten Zellkulturmediums erscheint der Vergleich zur Arbeit von Vinck *et al.* sinnvoll. Diese untersuchte den Einfluss von grünem Licht (570 nm) auf die Proliferation von Fibroblasten gewonnen aus Hühnerembryonen in hyperglykämischem Medium (30 g/l) und stellten nach einer dreitägigen Applikation von jeweils 0,1 J/cm² eine leichtgradig erhöhte Proliferation bestrahlter Zellen ggb. der Kontrolle fest [26, *passim*]. Die hohe Glukosekonzentration wurde mit der Simulation diabetischer Blutzuckerspiegel gerechtfertigt. Diese ist um etwa den Faktor 6,7 höher als bei vorliegender Arbeit, in deren Zuge Standard-Zellkulturmedium (4,5 g/l Glukose) genutzt wurde.

Im Vergleich zur Arbeit von Vinck *et al.* scheinen die in dieser Arbeit gewählten Parameter - vor dem Hintergrund einer beabsichtigten Übertragbarkeit der *in vitro* erzielten Ergebnisse auf die Situation *in vivo* - aus zwei Gründen sinnvoller: Zum einen beeinträchtigt ein diabetisch erhöhter Glukosespiegel im Gefäßsystem nicht direkt die kutanen Zellen, sondern führt primär zu einer Schädigung der versorgenden Gefäße. Ein diabetisch erhöhter Glukosespiegel im Zellkulturmedium ist daher, auch bei Absicht eine diabetische Situation zu simulieren, nicht sinnvoll. Zum anderen ist die Untersuchung reifer kutaner Fibroblasten humanen Ursprungs jener embryonaler tierischen Ursprungs in genanntem Sinne überlegen.

In Übersichtsarbeiten sind jene Geräteparameter herausgestellt, welche bisher am häufigsten zur LLLT mit dem Ziel der Wundheilungsmodulation eingesetzt wurden. Wie bereits dargestellt wurde meist Licht im roten bis infraroten Wellenlängenbereich zwischen 600 nm und 1 100 nm genutzt und Bestrahlungsdosen von unter 20 J/cm² bei einer Bestrahlungsstärke von unter 50 mW/cm² appliziert [13, page 2, 14, pages 602-3, 15, page 2162].

Opländer *et al.* berichteten in obig genannter Arbeit von einer Wellenlängen-, sowie *Bestrahlungsdosis*-abhängigen Proliferationsreduktion primärer Fibroblasten aus menschlicher Haut durch Applikation blauen Lichts. Untersucht wurden die Wellenlängen 410 nm, 420 nm, 453 nm und 480 nm, die angewandte Bestrahlungsstärke betrug 50 mW/cm². Analysiert wurde dabei die tägliche Anwendung von Bestrahlungsdosen von bis zu 30 J/cm² über 4 Tage. Für 410 nm und 420 nm wurde eine signifikante Proliferationsreduktion ggb. Kontrolle bereits bei einer Bestrahlungsdosis von 10 J/cm² festgestellt. Bei 453 nm ergab sich signifikante Proliferationsreduktion bei Anwendung einer Bestrahlungsdosis von 30 J/cm². Für 480 nm war kein Effekt festzustellen [23, *passim*].

Um zu untersuchen, ob sich evtl. proliferationsreduzierende Effekte durch Erhöhung der Bestrahlungsdosis über einen Bereich niedriger Bestrahlungsdosis (sog. *low-dose*) hinaus weiter steigern lassen, wurden in vorliegender Arbeit Bestrahlungsdosen von bis zu 200 J/cm² (bei grünem

Licht) bzw. 100 J/cm^2 (bei gelbem und rot-orangenem Licht) angewandt. Die angewandten Bestrahlungsstärken ergaben sich aus den technischen Möglichkeiten genutzter LED-Systeme und betragen zwischen $30,36 \text{ mW/cm}^2$ und 58 mW/cm^2 .

Wie in den entsprechenden Kapitel dargestellt, waren - bis auf die applizierten Bestrahlungsdosen - sowohl bei den Proliferations- (vgl. 3.3.1), als auch bei den Migrationsversuchen (vgl. 3.4.1), alle experimentellen Bedingungen gleich, welchen bestrahlte Interventions- und nicht-bestrahlte Kontrollzellen ausgesetzt waren. In diesem Kontext sei gesondert auf zwei Faktoren hingewiesen: die Zusammensetzung der umgebenden Luft, sowie die Umgebungstemperatur. Beim Vergleich mit anderen Arbeiten fiel auf, dass zur Konstanterhaltung speziell dieser beiden Faktoren oftmals keine genauen Aussagen gemacht wurden.

Im Zuge von Vorversuchen (Daten sind nicht abgebildet) wurde deutlich, dass relevante Ergebnisabweichungen resultierten, wenn beispielsweise die Kontrollzellen während der Bestrahlungszeit der Interventionszellen (leider war methodisch keine Bestrahlung bei CO_2 -Begasung möglich) unter CO_2 -Begasung gelagert (stärkere Proliferation), oder nicht bei 37°C gelagert wurden (niedrigere Proliferation). Aus diesem Grund wurde entschieden Interventions-, wie Kontrollzellen während der Versuche bei Raumluft und konstanter Temperatur von 37°C zu lagern.

Taflinski *et al.* untersuchten in ihrer Arbeit den Einfluss von blauem Licht (420 nm) auf die Proliferation primärer Fibroblasten aus menschlicher Haut *in vitro* und stellten bei wiederholter Applikation nicht-toxischer Bestrahlungsdosen (15 J/cm^2 bzw. 30 J/cm^2) über 4 Tage eine signifikante Reduktion dieser durch Bestrahlung fest [27, *passim*].

Die Untersuchung erfolgte, wie in vorliegender Arbeit, ebenso fluoreszenz-spektroskopisch, jedoch mittels einer alternativen Assays. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurde nicht das *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega)*, sondern das *AlamarBlue® Assay (Thermo Fisher Scientific)* verwendet. Beide Assays verwenden jedoch den Redoxindikator Resazurin.

Die Autoren stellten in Abhängigkeit von der Konzentration an *FCS* im verwendeten Zellkulturmedium (5 % bzw. 10 %) ein unterschiedliches Verhältnis von gemessener Fluoreszenz und manuell bestimmter Zellzahl fest, wobei jenes bei einer verwendeten *FCS*-Konzentration von 5 % um etwa ein Drittel erhöht war. Die Autoren schlossen, dass derart erzielte Messwerte möglicherweise eher die Zellaktivität und den Metabolismus widerspiegeln könnten, als die genaue Zellzahl [27, *pages* 243, 5].

Bei vorliegender Arbeit wurde in Vorversuchen (Daten sind nicht abgebildet) die Wichtigkeit der *exakt* 60-minütigen Inkubation mit der verwendeten *CTB*-Lösung (vgl. 3.3.3) und die anschließend *sofortige* fluoreszenz-spektroskopische Bestimmung deutlich, um deutliche Ergebnisabweichungen zu vermeiden (schon bei unter 5-minütiger Messverzögerung resultierten anderweitig teils Werteabweichungen von etwa 10 %).

Vor diesem Hintergrund ist die gemachte Beobachtung von Taflinski *et al.* sicherlich kritisch zu betrachten, da sie teils auch durch beschriebene Messverzögerungen mitbedingt sein könnte - hierzu wird von den Autoren keine Aussage gemacht. Dennoch könnte man im Rahmen zukünftiger Versuche die Anregung von Taflinski *et al.* aufgreifen und neben der fluorometrischen Untersuchung zusätzlich eine maschinelle Zählung der genauen Zellzahl durchführen.

Die Ergebnisse vorliegender Arbeit - im Gegensatz zum allgemein für die Zellkultivierung verwendeten Kulturmedium, das standardmäßig eine 10%ige Konzentration an *FCS* enthält, enthält das, während der Versuche verwendete Nährmedium, aus oben genannten Gründen, lediglich eine 5%ige *FCS*-Konzentration (vgl. 3.3.1) - scheinen jedoch nicht durch genannte Hypothese von Taflinski *et al.* beeinflusst, da die in den Ergebnissen dargestellte prozentuale Minderung der

Zellproliferation durch Bestrahlung ggb. der Kontrolle ein *Verhältnis* darstellt und keinen absoluten Wert.

Es ist bekannt, dass während der Kultivierung *in vitro* von Passage zu Passage weniger eine Adaptation der gesamten Zellpopulation, als eine Selektion bestimmter Zellen nach unbekanntem Kriterien erfolgt [28, Seiten 95, 141] und dass so jene Subpopulation, welche die höchste Proliferationsrate besitzt, alle anderen Zellen aus der Kultur verdrängen kann [28, Seite 154].

Um eine derartige Selektion proliferationsstärkster Zellen zu vermeiden, wurden die Experimente bei vorliegender Arbeit im Gegensatz zu Vergleichsarbeiten, wie der von Taflinski *et al.* [27, *passim*], oder der von Opländer *et al.* [23, *passim*], nicht mit gepoolten Zellen durchgeführt, sondern die Zellen eines Patienten stets individuell untersucht. Ebenfalls in gleichem Sinne wurde auf eine zwischenzeitliche Kryokonservierung der, aus dem Ursprungsorganismus entnommenen, Zellen vor Versuchsdurchführung verzichtet.

Im Rahmen von Vorversuchen erfolgte, wie im entsprechenden Kapitel dargestellt (vgl. 3.3.2), die experimentelle Bestimmung und Validierung der minimalen Einsaatdichte, welche nötig war, um ein Anwachsen und Überleben der Zellen während durchgeführter Experimente zu gewährleisten. Diese betrug 20 000 (2×10^4) Zellen. Die detaillierten Ergebnisse sind dem Anhang (vgl. 7.4) zu entnehmen.

Allgemein findet in Zellkultur, auch bei Fehlen schädigender Reize, ein ständiger Auf- und Abbau von Zellen und somit eine basale Rate von Apoptose statt [28, Seite 157]. Um zu Versuchsabschluss an Tag 5 eine Diskrimination lebender und toter Zellen zu erreichen und somit eine Toxizität applizierter Bestrahlungsdosen auf untersuchte Zellen durch die evtl. Feststellung einer überhöhten Apoptoserate festzustellen, erfolgt deren fluoreszenzmikroskopische Untersuchung durch Anwendung der beiden Nukleinsäure-Farbstoffe *Hoechst 33342* und Propidiumiodid (vgl. 3.3.5).

In der kritischen Auseinandersetzung damit ist zu äußern, dass die beabsichtigte Darstellung evtl. vorhandener toter Zellen mittels Propidiumiodid-Färbung in dieser Form problematisch erscheint, da diese (bei Vorhandensein) nach Apoptose und möglicher konsekutiver Loslösung aus dem Zellrasen durch die vielen versuchsbedingten Flüssigkeitswechsel in den *wells* evtl. nicht zur Darstellung gekommen wären. Der Toxizitätsausschluss applizierter Bestrahlungsdosen erfolgte somit eher durch die Darstellung einer hohen Zahl lebender Zellen mittels ebenfalls angewandter *Hoechst 33342*-Färbung.

5.3. Migrationsuntersuchung und angewandte Methodik

Das Migrationsverhalten wurde in jeweils vierzigstündigen Versuchen anhand primärer Fibroblasten, sowie Keratinozyten aus menschlicher Haut untersucht.

Aufseiten der Fibroblasten wurden die Versuche mit seneszenten Zellen durchgeführt, da im Rahmen der kutanen Wundheilung eher eine *herabgesetzte* zelluläre Migration einen pathologischen Zustand darstellt (beispielsweise im Rahmen von peripherer arterieller Verschlusskrankheit oder *Diabetes mellitus*) und diese *in vivo* am ehesten in gealterten Individuen zu finden ist. In diesem Sinne wurde die replikative Seneszenz als Alterungsmodell genutzt.

Da die physiologische *turn-over-Zeit* der *Epidermis in vivo* etwa 4 Wochen beträgt (vgl. 1.1.1) und die individuell-zelluläre Seneszenz somit kaum eine Rolle spielt, erschien ihre modellhafte Abbildung *in vitro* nicht sinnvoll und die Versuche wurden aufseiten der Keratinozyten mit juvenilen Zellen durchgeführt.

Bei der Applikation von blauem Licht auf Fibroblasten konnte bei untersuchter Bestrahlungsdosis von 5 J/cm^2 bereits nach 16 h eine Reduktion der zellulären Migration durch Bestrahlung ggb. unbestrahlter Kontrolle festgestellt werden. Zu Versuchsende nach 40 h war dieser Effekt weiterhin feststellbar. Die Reduktion der Migration durch Bestrahlung betrug 2,42 %.

Bei Applikation von gelbem Licht auf Fibroblasten konnte bei mittlerer Bestrahlungsdosis von 40 J/cm^2 ebenfalls eine Reduktion der zellulären Migration festgestellt werden. Nach 40 h betrug diese 6,82 %. Bei minimal, sowie maximal untersuchter Bestrahlungsdosis (5 J/cm^2 bzw. 100 J/cm^2) wurden jedoch keine Effekte beobachtet.

Bei Applikation von grünem Licht auf Fibroblasten konnte eine Steigerung der Zellmigration nachgewiesen werden, welche schon nach 16 h deutlich wurde. Nach 40 h betrug die Migrationssteigerung bei Anwendung von grünem Licht 50,39 % bei Anwendung der minimalen Bestrahlungsdosis von 10 J/cm^2 und 78,85 % bzw. 70,51 % bei Anwendung von 80 J/cm^2 , respektive 200 J/cm^2 . Beim Übergang von 10 J/cm^2 zu 80 J/cm^2 war besagter Effekt in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis somit steigerbar, jedoch nicht in Anbetracht der höchsten angewandten Bestrahlungsdosis.

Bei Applikation von rot-orangenem Licht auf Fibroblasten konnte nach 40 h eine Reduktion der zellulären Migration festgestellt werden. In Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis war diese steigerbar und betrug 26,83 %, für 5 J/cm^2 und 33,57 % bzw. 41,95 % für 40 J/cm^2 respektive 100 J/cm^2 .

Bei Applikation von grünem, sowie gelbem Licht auf Keratinozyten konnte jeweils eine Reduktion der zellulären Migration nachgewiesen werden, welche in beiderlei Fällen schon nach 16 h deutlich wurde. Im Falle von grünem Licht war der Effekt auch in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis steigerbar: 9,01 % bei 80 J/cm^2 und 19,68 % bei 200 J/cm^2 . Bei gelbem Licht betrug die Migrationsreduktion 14,32 % bei 5 J/cm^2 , 31,1 % bei 40 J/cm^2 und 22,31 % bei 100 J/cm^2 .

Bei Applikation von rot-orangenem Licht auf Keratinozyten wurden für die Bestrahlungsdosen von 5 J/cm^2 und 40 J/cm^2 migrationsreduzierende Effekte von 23,07 %, respektive 34,59 % festgestellt. Bei einer Bestrahlungsdosis von 100 J/cm^2 wurde eine leichte Migrationssteigerung von 3,66 % festgestellt.

Zur Einordnung der Ergebnisse und der angewandten Methodik erschienen der Vergleich mit den Arbeiten von Masson-Meyers *et al.* [29, *passim*], sowie Adamskaya *et al.* [30, *passim*] sinnvoll.

Masson-Meyers *et al.* [29, *passim*] untersuchten in ihrer Arbeit den Einfluss von blauem Licht (470 nm) auf die kutane Wundheilung *in vitro* mittels eines *Scratch-Assays* über 24 h und kamen, bei unten beschriebenen, angewandten Parametern, zu dem Ergebnis, dass blaues Licht niedriger Bestrahlungsdosis (3 J/cm^2 , 5 J/cm^2 , sowie 10 J/cm^2) den Wundverschluss nicht verzögert, wohl aber bei Anwendung einer höheren Bestrahlungsdosis (55 J/cm^2).

Genutzt wurden, wie in vorliegender Arbeit auch, primäre Fibroblasten aus menschlicher Haut ($n = 6$). Die Einsaatdichte kam mit 30 000 Fibroblasten pro *well* der in dieser Arbeit genutzten (20 000 pro *well*) beinahe gleich. Abweichende Parameter waren (1) die niedrigere Konzentration an *FCS* im Zellkulturmedium während der Versuche (2,5 %), (2) die Art der Wunderzeugung (manuell-mechanisch mittels Pipetten-Spitze), (3) eine höhere Bestrahlungsstärke (30 mW/cm^2), sowie (4) die deutlich abweichende Art der graphischen Ergebnisauswertung und (5) die festgesetzte experimentelle Dauer (24 h) mit Durchführung einer einzigen Aufnahme. Die beiden letzteren sind in der Gegenüberstellung hervorzuheben.

Die graphische Flächenbestimmung erfolgte bei Masson-Meyers *et al.* deutlich ungenauer als in vorliegender Arbeit. Die angegebene zellfreie Fläche in den jeweiligen Aufnahmen dort entspricht

stets einem annähernden Durchschnittswert, welcher in etwa die Fläche zwischen den sich gegenüberliegenden vordersten Zellreihen abbildet. Bei dieser Art der Flächenbestimmung wird angenommen, dass die Zellen gegenüberliegender Flächen gemeinsam als geschlossene Einheit an einer konstanten Migrationsbewegung Richtung Wundverschluss teilnehmen.

Diese Annahme stellt sich vor dem Hintergrund der Aufnahmen zur vorliegenden Arbeit jedoch als falsch heraus, da erkennbar wird, dass sich *innerhalb* der aufeinander zuwachsenden Flächen, während des Migrationsprozesses, zellfreie Flächen ergeben. Diese werden bei der Flächenbestimmung durch Masson-Meyers *et al.* nicht miterfasst.

Zudem stellt sich im Zuge der Aufnahmen zu vorliegender Arbeit heraus, dass beobachtete Zellen in den Migrationsuntersuchungen nicht stets nur eine Vorwärtsbewegung beschritten, sondern sich teils auch nach einem gewissen Voranrücken wieder zurückzogen, und entsprechende Fläche in einer späteren Aufnahme wieder frei erschienen. Aus diesem Grund erscheint die Vorgehensweise zur graphischen Auswertung, welche bei vorliegender Arbeit angewandt wurde, *in vitro* die genauere. Ob beschriebenes zelluläres Migrationsverhalten *in vivo* ebenso auftritt, ist unklar.

Die experimentelle Dauer der Migrationsuntersuchungen wurde bei vorliegender Arbeit einheitlich auf 40 h festgesetzt, da eine vollständige Reepithelisierung unbehandelter Zellen zuvor in Vorversuchen in diesem Zeitraum beobachtet wurde. Demgegenüber ist an der Festsetzung einer kürzeren experimentellen Dauer (24 h) vorteilhaft, dass es derart in keiner Modellwunde bereits vor Ablauf der Versuchszeit zum Zusammenwachsen der gegenüberliegenden Wundränder kommt und so der Endzustand (Wundverschluss) in keinem Fall überschritten wird. Es ist nicht auszuschließen, dass dies während der 40-stündigen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit (*zwischen* den Aufnahmen zu $t = 24$ h und $t = 40$ h) teilweise eingetreten ist und so die Versuchsergebnisse entsprechend beeinflusst wurden. Nachteilhaft an der Durchführung einer einzigen Aufnahme ist jedoch, dass derart obig dargestellte Migrationsdynamik nicht miterfasst wird, welche scheinbar auch Rückwärtsbewegungen beinhaltet.

Insgesamt ist festzuhalten, dass bei vorliegender Arbeit die deutlich genauere Art der graphischen Aufnahmen-Auswertung vorteilhaft ist, bei der Arbeit von Masson-Meyers *et al.* jedoch die kürzere experimentelle Dauer, welche in keinem Fall des Zeitpunkt des Wundverschlusses verpasst.

Hinsichtlich der experimentellen Dauer ist abschließend festzuhalten, dass dargestellte Untersuchungen zur zellulären Migration sicherlich, durch ihre relative Kürze im Vergleich zu obig dargestellten Proliferationsuntersuchungen (vierzigstündig ggb. fünftägig), störanfälliger waren als diese.

Eine qualitative Verbesserung dieses Modells zur Migrationsuntersuchung ergäbe sich durch die Verwendung eines Systems, welches automatisierte kontinuierliche Aufnahmen ermöglicht, doch ist fraglich, ob dem resultierenden technischen Aufwand ein gleichwertiger Erkenntnisgewinn gegenüberstehen würde.

Adamskaya *et al.* [30, *passim*] untersuchten in einem Tiermodell (Ratte) den Einfluss von blauem (470 nm), sowie rotem (630 nm) Licht auf den Wundverschluss nach chirurgischer Exzision (von *Cutis* und *Subcutis* bis Erreichen der Muskulatur) über 7 Tage ($n = 6$). Die Bestrahlung erfolgte an 5 aufeinander folgenden Tagen für jeweils 10 Minuten bei Anwendung einer Bestrahlungsstärke von 50 mW/cm^2 . Zu derart applizierter Bestrahlungsdosis wurde vonseiten der Autoren keine Angabe gemacht. Die Auswertung erfolgte anhand der graphischen Auswertung photographischer Aufnahmen, genauere Angaben zum methodischen Vorgehen fehlen jedoch.

Adamskaya *et al.* stellten zu Versuchsende bei Anwendung von blauem Licht eine um 50 % geringere Wundfläche ggb. der Kontrolle, bei Anwendung von rotem Licht, eine ggb. der Kontrolle größere Wundfläche (nicht quantifiziert) fest.

Hinsichtlich der Frage einer möglichen Übertragbarkeit der tierexperimentellen Studienergebnisse auf die Situation am Menschen stellten die Autoren heraus, dass sich die Gewichtung an kutaner Wundheilung beteiligter Mechanismen (vgl. 1.3) in Mensch und Tier unterscheiden (Vorrangigkeit von Wundkontraktion bzw. Proliferation). Dieser Sachverhalt wurde auch von *Whinfield et al.* akzentuiert [21, page 122].

Vor diesem Hintergrund erscheinen experimentelle Untersuchungen zu LED-basierten Systemen zur *LLLT* an menschlichem Gewebe langfristig geeigneter, als tierexperimentelle.

Hinsichtlich genutzter Geräteparameter (Bestrahlungsdosen, Bestrahlungsstärke) sei auf obige Diskussion verwiesen (vgl. 5.2). Die angewandten Bestrahlungsstärken genutzter LED-Systeme betragen zwischen 18,96 mW/cm² und 58 mW/cm².

5.4. Ausblick

Vor dem Hintergrund genannter inkonsistenter und teils widersprüchlicher Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der *LLLT*, welche aus fehlender Standardisierung hinsichtlich Methodik, angewandter Parameter, sowie deren Feinabstimmung aufeinander und auf das zu behandelnde Gewebe resultierten (vgl. 1.4), bemängeln Übersichtsarbeiten in der wissenschaftlichen Literatur suboptimale Studiendesigns [21, page 122]. Im Zuge der Untersuchungen zu vorliegender Arbeit wurde daher eine Anpassung, Verbesserung und Standardisierung der Untersuchungsmethodik, sowie eine optimale Adjustierung relevanter Parameter angestrebt.

Dennoch bilden Untersuchungen *in vitro* naturgemäß die Situation *in vivo* niemals vollständig ab und stellen stets nur Arbeitsmodelle dar.

Im Rahmen vorliegender Arbeit wurde mit zweidimensionalen Zellkulturen (sog. *Monolayer*-Kulturen) gearbeitet [5, Seite 239]. Vor allem von der jeweiligen Wellenlänge abhängig, variiert jedoch die Gewebepenetrationstiefe von Licht. Licht im Wellenlängenbereich von unter 600 nm wird nämlich in großem Maße von (Gewebe-)Chromophoren absorbiert, sodass beispielsweise blaues Licht nur eine maximale Gewebepenetrationstiefe von etwa 1 mm erreicht, infrarotes Licht hingegen eine von bis zu etwa 1 cm [16, pages 36, 8, 40, 17, pages 619-20].

Durch den Einsatz von dreidimensionalen Zellkulturen könnten demgegenüber im Rahmen zukünftiger Arbeiten die physiologischen und pathophysiologischen Gegebenheiten der menschlichen Haut besser abgebildet und so eine bessere Übertragbarkeit der *in vitro*-Ergebnisse auf die Situation *in vivo* erreicht werden [5, Seiten 6, 239].

Weiterhin bleibt zukünftig zu klären, ob gleiche Effekte bei auch bei gepulster Emissionsart erzielbar sind und derart signifikante Energieersparnis möglich ist, sowie, ob durch kombinierte Applikation von Licht mehrerer spezifischer Wellenlängen, eine Optimierung der (therapeutischen) Wirksamkeit gelingt - beiderlei ist bereits erfolgreich im Bereich der Pflanzenzucht umgesetzt worden [25, page 57].

Speziell auch im Bereich der kutanen Wundheilung gibt es Hinweise darauf, dass die Anwendung von *LLLT* neben der direkten lokalen Wirkung auf das bestrahlte Areal, auch eine Wirkung auf unbestrahlte Areale, somit systemische Effekte, vermitteln kann [18, page 211].

Lee *et al.* untersuchten diesbezüglich im Tiermodell (Maus und Ratte), ob dorsale Verbrennungsverletzungen bei abdominalen Anwendung einer 830 nm LED-*LLLT* schneller heilten und stellten über den Untersuchungszeitraum von 7 Tagen eine beschleunigte Wundheilung durch LED-*LLLT* fest. Dies werteten die Autoren als Indikator für systemische Effekte der *LLLT* [18, page 211, 31, *passim*].

Im Zuge zukünftiger Untersuchungen bleibt somit zu klären, inwieweit genannte systemische Effekte auch beim Menschen beobachtbar und diese evtl. zur Modulation der kutanen Wundheilung nutzbar sind.

Vor dem Hintergrund der zahlreichen biologischen Effekte, welche durch die wissenschaftliche Forschung zur *LLLT* in den letzten 50 Jahren in *in vitro*-Untersuchungen, sowie im Tiermodell demonstriert wurden, einer steigenden Anzahl von Studien an Patienten, sowie der ermutigenden Ergebnisse vorliegender Arbeit, bilden systematische randomisierte kontrollierte Studien den nächsten und abschließenden Schritt zur Klärung von Wirkung und therapeutischer Nutzbarkeit der *LLLT in vivo* - speziell auch im Bereich der kutanen Wundheilungsmodulation - sodass dann letztlich die Integration in vorhandene therapeutische Regime und ihre derartige Verbesserung gelingt.

5.5. Schlussfolgerungen

Im Hinblick auf die jeweils fünftägige Untersuchung der zellulären Proliferation anhand primärer Fibroblasten aus menschlicher Haut konnte bei Applikation von grünem, gelbem, sowie rot-orangenem Licht mittels verwendeter LED-Systeme durchschnittlich bereits bei täglicher Anwendung einer geringen Bestrahlungsdosis von etwa 10 J/cm^2 (*low-dose*-Bereich) eine signifikante Reduktion der Zellproliferation (um etwa 10 %) festgestellt werden.

Dieser Effekt konnte bei Anwendung höherer Bestrahlungsdosen meist gesteigert werden und fiel bei, durch replikative Seneszenz *in vitro*, gealterten Zellen geringer aus.

Im Hinblick auf die jeweils vierzigstündige Untersuchung der zellulären Migration anhand primärer Fibroblasten, sowie Keratinozyten aus menschlicher Haut, waren, abhängig von betrachtetem Zelltyp, Zellalter, sowie applizierter Bestrahlungsdosis, gewisse Effekte durch Anwendung bezeichneter LED-Systeme erkennbar, doch, hinsichtlich der Wirkung, kein einheitlicher Trend herausstellbar.

Da sich die Reparatur [32, Seite 71] einer kutanen Verwundung, inklusive des *Remodelling*, sowie sich evtl. ereignender pathologischer Prozesse im Sinne einer hypertrophen Narben-, oder Keloidbildung, bekanntermaßen über einen Zeitraum von mehreren Monaten erstrecken kann [33, pages 1256-7], erscheinen jene experimentellen Untersuchungen aussagekräftiger, welche die kutane Wundheilung ebenfalls über einen längeren Zeitraum untersuchen. Zudem sind Fibroblasten Hauptakteure in bezeichneten pathologischen Prozessen, sodass Untersuchungen an diesem Zelltyp prioritär erscheinen.

Aus dargestellten beiden Gründen sind die Ergebnisse der im Zuge vorliegender Arbeit durchgeführten Proliferationsuntersuchungen, vor dem Hintergrund einer beabsichtigten Übertragbarkeit auf die Situation *in vivo*, sicherlich aufschlussreicher, sodass folgende abschließende Betrachtung herauszustellen ist: Im Zuge vorliegender Arbeit ist der Beweis gelungen, dass die *LED-low-level light therapy* mit schmalbandigem grünem, gelbem, sowie rot-orangenem Licht (bei Anwendung genannter Parameter) bereits im Niedrigdosis-Bereich die Proliferation primärer Fibroblasten aus der menschlichen Haut reduziert und somit einen neuen Ansatz zur Prävention und *early-stage*-Therapie hypertropher Narben und Keloide darstellen könnte.

DISKUSSION, Schlussfolgerungen

Dieses Ergebnis steht in übereinstimmendem Kontext mit vorangegangenen Arbeiten zur LED-*LLLT* mit blauem Licht, welche am Zell- und Molekularbiologischen Labor der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie am Universitätsklinikum Düsseldorf durchgeführt wurden.

6. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Standring, S., *Gray's anatomy : the anatomical basis of clinical practice*. 2016.
2. Benninghoff, A., *Anatomie : makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. 17., durchges. Aufl. ed, ed. A. Benninghoff, D. Drenckhahn, and B. Christ. München u.a.: Elsevier, Urban & Fischer.
3. Welsch, U., *Lehrbuch Histologie*. 3. Aufl. ed, ed. U. Welsch and T. Deller. 2010, München: Elsevier, Urban & Fischer.
4. Shay, J.W. and W.E. Wright, *Hayflick, his limit, and cellular ageing*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000. **1**(1): p. 72-6.
5. Schmitz, S., *Der Experimentator: Zellkultur*. 3. Aufl. ed, ed. S. Schmitz. 2011, Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.
6. Saretzki, G. and T. von Zglinicki, *Replikative Seneszenz als Alternsmodell: Die Rolle von oxidativem Streß und Telomerenverkürzung - eine Übersicht*. *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie*, 1999. **32**(2): p. 69-75.
7. Rodier, F. and J. Campisi, *Four faces of cellular senescence*. *J Cell Biol*, 2011. **192**(4): p. 547-56.
8. Cristofalo, V.J., et al., *Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(18): p. 10614-9.
9. Behrends, J.C., *Physiologie [Lehrbuch]*. 2. Auflage ed, ed. J.C. Behrends. 2012, Stuttgart: Thieme.
10. Hinz, B., et al., *Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling*. *Am J Pathol*, 2012. **180**(4): p. 1340-55.
11. McNulty, R.J., *Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007. **39**(4): p. 666-71.
12. Duffield, J.S., *The elusive source of myofibroblasts: problem solved?* *Nat Med*, 2012. **18**(8): p. 1178-80.
13. de Freitas, L.F. and M.R. Hamblin, *Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy*. *IEEE J Sel Top Quantum Electron*, 2016. **22**(3).
14. Huang, Y.Y., et al., *Biphasic dose response in low level light therapy - an update*. *Dose Response*, 2011. **9**(4): p. 602-18.
15. Yeh, N.G., C.-H. Wu, and T.C. Cheng, *Light-emitting diodes—Their potential in biomedical applications*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010. **14**(8): p. 2161-2166.
16. Opel, D.R., et al., *Light-emitting Diodes: A Brief Review and Clinical Experience*. *J Clin Aesthet Dermatol*, 2015. **8**(6): p. 36-44.
17. Chaves, M.E., et al., *Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED*. *Am Bras Dermatol*, 2014. **89**(4): p. 616-23.
18. Kim, W.S. and R.G. Calderhead, *Is light-emitting diode phototherapy (LED-LLLT) really effective?* *Laser Ther*, 2011. **20**(3): p. 205-15.
19. Andrade Fdo, S., R.M. Clark, and M.L. Ferreira, *Effects of low-level laser therapy on wound healing*. *Rev Col Bras Cir*, 2014. **41**(2): p. 129-33.
20. Rassow, J., *Biochemie : 67 Tabellen*. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. ed, ed. J. Rassow. 2012, Stuttgart: Thieme.
21. Whinfield, A.L. and I. Aitkenhead, *The light revival: does phototherapy promote wound healing? A review*. *Foot (Edinb)*, 2009. **19**(2): p. 117-24.
22. Huang, Y.Y., et al., *Biphasic dose response in low level light therapy*. *Dose Response*, 2009. **7**(4): p. 358-83.
23. Oplander, C., et al., *Effects of blue light irradiation on human dermal fibroblasts*. *J Photochem Photobiol B*, 2011. **103**(2): p. 118-25.
24. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. *Nat Methods*, 2012. **9**(7): p. 676-82.
25. Yeh, N., T.J. Ding, and P. Yeh, *Light-emitting diodes' light qualities and their corresponding scientific applications*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2015. **51**: p. 55-61.
26. Vinck, E.M., et al., *Green light emitting diode irradiation enhances fibroblast growth impaired by high glucose level*. *Photomed Laser Surg*, 2005. **23**(2): p. 167-71.
27. Tafilinski, L., et al., *Blue light inhibits transforming growth factor-beta1-induced myofibroblast differentiation of human dermal fibroblasts*. *Exp Dermatol*, 2014. **23**(4): p. 240-6.

28. Gstraunthaler, G., *Zell- und Gewebekultur : allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. 7. Aufl. ed, ed. G. Gstraunthaler and T. Lindl. 2013, Berlin u.a.: Springer.
29. Masson-Meyers, D.S., V.V. Bumah, and C.S. Enwemeka, *Blue light does not impair wound healing in vitro*. *J Photochem Photobiol B*, 2016. **160**: p. 53-60.
30. Adamskaya, N., et al., *Light therapy by blue LED improves wound healing in an excision model in rats*. *Injury*, 2011. **42**(9): p. 917-21.
31. Lee, G.Y. and W.S. Kim, *The systemic effect of 830-nm LED phototherapy on the wound healing of burn injuries: A controlled study in mouse and rat models*. *J Cosmet Laser Ther*, 2012. **14**(2): p. 107-10.
32. Böcker, W., *Pathologie : mit rund 150 Tabellen ; [Plus im Web mediscript]*. 5., vollst. überarb. Aufl. ed, ed. W. Böcker. 2012, München: Elsevier, Urban & Fischer.
33. Arno, A.I., et al., *Up-to-date approach to manage keloids and hypertrophic scars: a useful guide*. *Burns*, 2014. **40**(7): p. 1255-66.

7. Anhang

7.1. Detaillierte Formulierung von *DMEM*

FORMULATION DMEM, high glucose:			
COMPONENTS	Mole. Weight	Conc. (mg/L)	Molarity (mM)
INORGANIC SALTS			
Calcium Chloride (CaCl ₂) (anhyd.)	111	200.00	1.80
Ferric Nitrate (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	404	0.10	0.000248
Potassium Chloride (KCl)	75	400.00	5.30
Magnesium Sulfate (MgSO ₄)	120	97.67	0.813
Sodium Chloride (NaCl)	58	6400.00	110.34
Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	84	3700.00	44.10
Sodium Phosphate (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	138	125.00	0.906
OTHER COMPONENTS			
D-Glucose	180	4500.00	25.00
Phenol red	376.4	15.00	0.0398
AMINO ACIDS			
L-Arginine-HCl	211	84.00	0.398
L-Cystine 2HCl	313	63.00	0.200
L-Glutamine	146	584.00	4.00
Glycine	75	30.00	0.399
L-Histidine HCl·H ₂ O	210	42.00	0.20
L-Isoleucine	131	105.00	0.802
L-Leucine	131	105.00	0.802
L-Lysine-HCl	183	146.00	0.798
L-Methionine	149	30.00	0.201
L-Phenylalanine	165	66.00	0.400
L-Serine	105	42.00	0.400
L-Threonine	119	95.00	0.078
L-Tryptophan	204	16.00	0.078
L-Tyrosine 2Na 2H ₂ O	261	104.00	0.398
L-Valine	117	94.00	0.803
VITAMINS			
D-Ca pantothenate	477	4.00	0.0083
Choline Chloride	140	4.00	0.0285
Folic Acid	441	4.00	0.00906
i-Inositol	180	7.20	0.04
Niacinamide	122	4.00	0.0328
*Pyridoxine HCl	206	4.00	0.0194
Riboflavin	376	0.40	0.00106
Thiamine HCl	337	4.00	0.0118

Abbildung 65: Detaillierte Formulierung von *DMEM* (Herstellerangaben)

Legende 65: Mit freundlicher Genehmigung der *Thermo Fisher Scientific Inc.*

7.2. Detaillierte Formulierung von PBS

FORMULATION PBS, pH 7.2, No Calcium, No Magnesium:

COMPONENTS	Molec. Weight	Conc. (gm/L)	Molarity (mM)
Potassium Phosphate Monobasic (KH ₂ PO ₄)	136	210.0	1.51
Sodium Chloride (NaCl)	58	9000.0	155.00
Sodium Phosphate Dibasic (Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O)	268	726.0	2.70

Abbildung 66: Detaillierte Formulierung von PBS (Herstellerangaben)

Legende 66: Mit freundlicher Genehmigung der *Thermo Fisher Scientific Inc.*

7.3. Detaillierte Formulierung von DPBS



Certificate of Analysis
DPBS
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

Product	Description	Catalogue-No.	Size
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline With Calcium and Magnesium	P04-35500	500 ml

Lot No.: 9110816

Date of production: August 19, 2016

Composition:

Calcium chloride x 2H ₂ O	0.133 g/L
Magnesium chloride x 6 H ₂ O	0.1 g/L
Potassium chloride	0.2 g/L
Potassium dihydrogen phosphate	0.2 g/L
Sodium chloride	8.0 g/L
di-Sodium hydrogen phosphate (anh.)	1.15 g/L

Storage conditions and stability:

Storage: 2°C to RT
Stability: 3 years from date of production

Specification:	Acceptance criteria	Result
pH value	7.0 – 7.1	7.03
Osmolality	270 - 300 mOsm/kg	282 mOsm/kg
Sterility		
Incubation at 32°C	sterile	sterile
Incubation at 20°C	sterile	sterile

Suitability

FOR RESEARCH USE ONLY!

Not approved for human or animal diagnostic or therapeutic procedures. Not for consumption.

Manufactured in Germany

This document was produced electronically and is valid without signature.

Date: Aug/31/2016

PAN Biotech GmbH – Am Gewerbepark 13 – 94501 Aidenbach – GERMANY
www.pan-biotech.com – phone +49-8543-601630 – fax +49-8543-601649

Abbildung 67: Detaillierte Formulierung von DPBS (Herstellerangaben)

Legende 67: Mit freundlicher Genehmigung der PAN-Biotech GmbH

7.4. Experimentelle Bestimmung der minimalen Einsaatdichte

Vor Durchführung der Proliferations-, wie Migrationsversuche musste die jeweils auszusäende Zellzahl bestimmt werden, welche nötig war, um die minimale Einsaatdichte zu erreichen und somit ein Anwachsen und Überleben der Zellen zu gewährleisten. Diese wurde experimentell ermittelt.

Im Folgenden sind die detaillierten Ergebnisse besagter experimenteller Ermittlung dargestellt.

Analog der obigen Beschreibung zum Aussäen einer definierten Zellzahl im entsprechenden Kapitel (vgl. 3.3.2) wurden in jeweils 12- der 24-wells entsprechender *multiwell*-Platten Zellen in folgender Zahl ausgesät: 1 000, 2 000, 3 000, 5 000, 10 000, 20 000, 50 000 (vgl. Tabelle 30). Genutzt wurden dafür exemplarisch die Zellen eines Patienten.

Über 5 Tage erfolgte morgendlich die fluoreszenz-spektroskopische Bestimmung der Zellviabilität (mittels *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay*) und die - hinsichtlich der beabsichtigten Experimente - versuchskonforme Lagerung aller verbliebenen *wells* in *DBPS* in einem Inkubator ohne CO₂-Begasung bei 37 °C für die längste beabsichtigte Bestrahlungszeit (57:28 Minuten entsprechend der Applikation einer Bestrahlungsdosis von 200 J/cm² mittels grünem Licht).

Die übrige Lagerung erfolgte unter üblichen Bedingungen im CO₂-Inkubator und in *DMEM*.

Aufgrund vorangegangener Erfahrungen wurde vermutet, dass letztlich eine der höheren Zellzahlen zu nutzen sein würde. Daher wurden die Zellzahlen 20 000 und 50 000 zusätzlich auch mittels der Zellen eines zweiten Patienten untersucht (vgl. Tabelle 31).

Tabelle 30 (Patient 1) und Tabelle 31 (Patient 2) zeigen somit die Zusammenstellung der jeweils an den 5 Versuchstagen, in Abhängigkeit von ursprünglich ausgesäter Zellzahl, gemessenen Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*) ($n = 1$).

Tabelle 30: Zusammenstellung der jeweils an den 5 Versuchstagen, in Abhängigkeit von ursprünglich ausgesäter Zellzahl, gemessenen Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*) ($n = 1$)

Experimentelle Bestimmung der minimalen Einsaatdichte						
Zellzahl	0. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
1.000	53.516	33.156	13.580	29.742	9.045	47.731
2.000	83.083	43.596	15.036	13.556	19.624	50.195
3.000	123.941	104.150	58.012	33.856	48.858	54.820
5.000	182.439	155.545	112.090	113.881	105.505	91.332
10.000	300.589	464.771	484.869	412.927	468.260	592.828
20.000	595.006	710.633	718.115	967.764	1.120.630	1.425.509
50.000	1.231.049	1.340.820	1.815.628	1.212.224	1.711.120	1.850.384

Tabelle 31: Zusammenstellung der jeweils an den 5 Versuchstagen, in Abhängigkeit von ursprünglich ausgesäter Zellzahl, gemessenen Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*) ($n = 1$)

Experimentelle Bestimmung der minimalen Einsaatdichte						
Zellzahl	0. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
20.000	739.006	1.073.999	845.542	747.162	766.767	1.177.231
50.000	1.883.566	2.228.334	3.441.164	3.430.152	3.492.684	4.678.851

Abbildung 68 (Patient 1) und Abbildung 69 (Patient 2) stellen anschaulich die jeweils aus Tabelle 30 und Tabelle 31 resultierende Zellproliferation im zeitlichen Verlauf als Liniendiagramm dar.

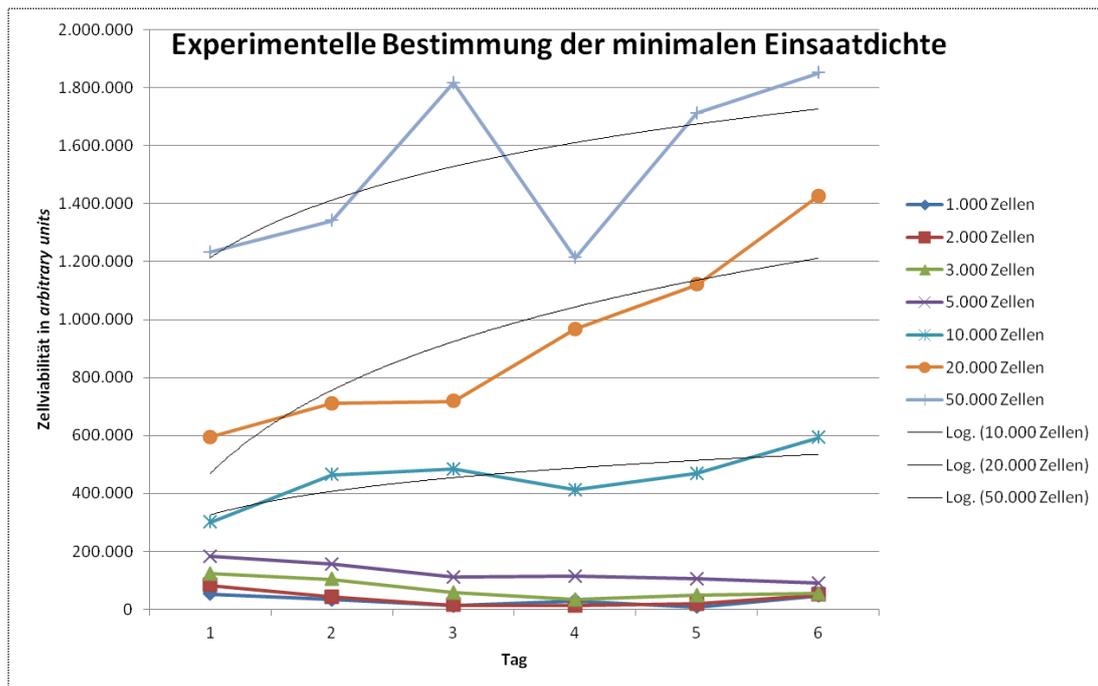


Abbildung 68: Zellproliferation in Abhängigkeit von ursprünglich ausgesäter Zellzahl

Legende 68: Durch besagte mehrtägige Bestimmung der Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*), wurde auf die Zellproliferation in Abhängigkeit von der ursprünglich ausgesäten Zellzahl im zeitlichen Verlauf geschlossen. Zur Visualisierung sind die logarithmischen Trendlinien für die 3 höchsten ausgesäten Zellzahlen dargestellt.

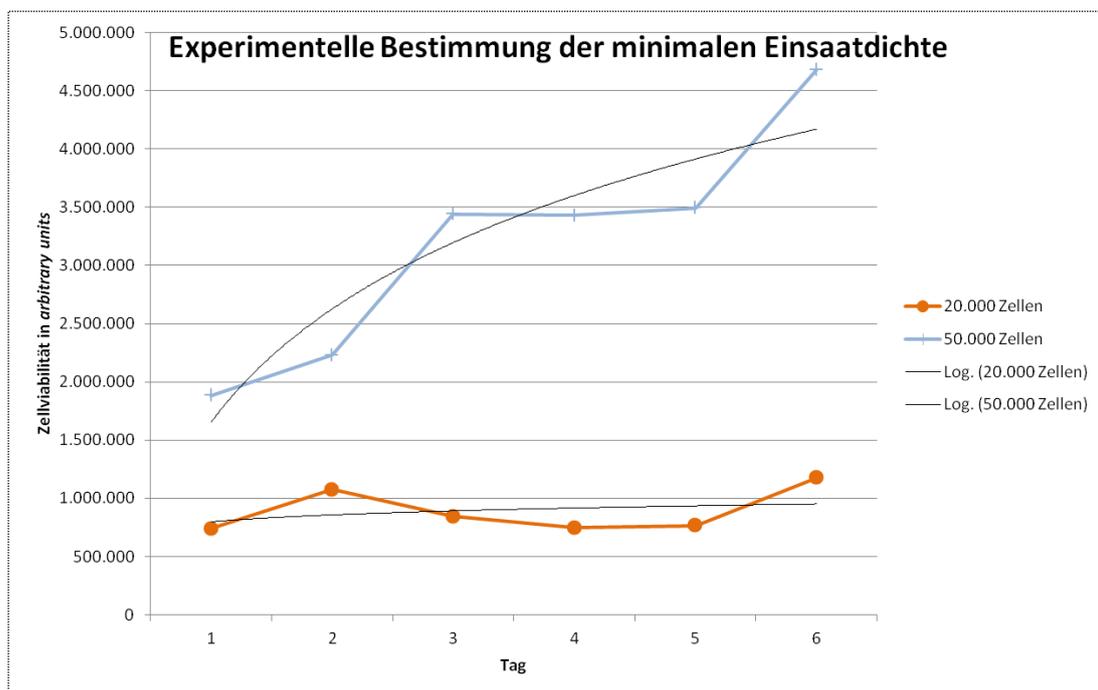


Abbildung 69: Zellproliferation in Abhängigkeit von ursprünglich ausgesäter Zellzahl

Legende 69: Durch besagte mehrtägige Bestimmung der Zellviabilität (angegeben in *arbitrary units*), wurde auf die Zellproliferation in Abhängigkeit von der ursprünglich ausgesäten Zellzahl im zeitlichen Verlauf geschlossen. Zur Visualisierung sind die logarithmischen Trendlinien dargestellt.

Für Patient 1 wurde aus Tabelle 30 und Abbildung 68 deutlich, dass bei Betrachtung des 5-tägigen Versuchszeitraums lediglich ab einer ausgesäten Zellzahl von 10 000 eine zelluläre Proliferation vorlag.

Der gemessene Wert der Zellviabilität lag für eine ausgesäte Zellzahl von 10 000 zu Versuchsbeginn an Tag 0 bei 300 589 (Angabe in *arbitrary units*) zu Versuchsende an Tag 5 bei 592 828 (Angabe in *arbitrary units*). Für eine ausgesäte Zellzahl von 20 000 waren es entsprechend 595 006 (Angabe in *arbitrary units*) und 1 425 509 (Angabe in *arbitrary units*) und für 50 000 ausgesäte Zellen 1 231 049 (Angabe in *arbitrary units*) und 1 850 384 (Angabe in *arbitrary units*).

Für die besagten 3 höchsten Zellzahlen, welche für die geplanten Versuche infrage kamen, sind zur Visualisierung auch die logarithmischen Trendlinien dargestellt (vgl. Abbildung 68).

Für Patient 2 wurde aus Tabelle 31 und Abbildung 69 deutlich, dass bei Betrachtung des 5-tägigen Versuchszeitraums für beide ausgesäte Zellzahlen, 20 000 wie 50 000, eine zelluläre Proliferation vorlag.

Der gemessene Wert der Zellviabilität lag für die ausgesäte Zellzahl von 20 000 zu Versuchsbeginn an Tag 0 bei 739 006 (Angabe in *arbitrary units*) zu Versuchsende an Tag 5 bei 1 177 231 (Angabe in *arbitrary units*). Für die ausgesäte Zellzahl von 50 000 waren es entsprechend 1 883 566 (Angabe in *arbitrary units*) und 4 678 851 (Angabe in *arbitrary units*). Zur Visualisierung sind die logarithmischen Trendlinien dargestellt (vgl. Abbildung 69).

Letztlich wurde hstl. der auszusäenden Zellzahl die Niedrigste ausgewählt, welche bei der Untersuchung mittels *beider* Patienten zu einer deutlichen Proliferation führte. Dies waren somit 20 000 Zellen. Bei der ausgesäten Zellzahl von 10 000 erschien der Proliferation im zeitlichen Verlauf nicht deutlich genug, sodass nicht sicher von einem Überleben der Zellen ausgegangen werden konnte. Zudem war diese ausgesäte Zellzahl nur anhand eines Patienten untersucht worden.

Danksagung

Danken möchte ich dem Betreuer meiner Promotion, **Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph Viktor Suschek**, Leiter des Zell- und Molekularbiologischen Forschungslabors der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie am Universitätsklinikum Düsseldorf, **Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf**, Direktor der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie am Universitätsklinikum Düsseldorf, sowie **Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Christian Opländer**, welche mich bei meinem Promotionsvorhaben im wissenschaftlichen Austausch unterstützten.

Mein persönlicher Dank gilt **Herrn Dr. med. Volker Müller-Mattheis**, Geschäftsführender Direktor und Oberarzt der Klinik für Urologie am Universitätsklinikum Düsseldorf a.D., sowie **Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Lars Christian Rump**, Direktor der Klinik für Nephrologie am Universitätsklinikum Düsseldorf, welche mich durch ihr ärztliches Handeln prägten und welche ich als vorbildhaft für meine ärztliche Tätigkeit erachte.

Um die Dankbarkeit und tiefe Verbundenheit gegenüber meinen Eltern, **Frau Sanda-Maria Tomescu und Herrn Dr. med. Johann Tomescu**, auszudrücken, reichen Worte nicht aus.

Sie prägten mich durch Vermittlung humanistischer Werte und ermöglichten mir eine freie Entwicklung, sodass ich nun mein Schaffen und meine Kraft im Sinne des Gemeinwohls einsetzen kann.