

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. Joachim Windolf

**Der Einfluss von blauem Licht einer Wellenlänge von 453nm auf die
Proliferation endothelialer Zellen und deren Fähigkeit zur *in-vitro*
und *in-vivo* Gefäßbildung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ben Hannes Thalmann

2021

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek

Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka

Hamid: „Was ist das?“

Rambo: „Das ist blaues Licht.“

Hamid: „Und was macht es?“

Rambo: „Es leuchtet blau.“

Doudi Shoua als *Hamid*, Sylvester Stallone als *John Rambo* im Spielfilm ***Rambo III***

I. ZUSAMMENFASSUNG

Alternative und additive Therapiekonzepte bekommen in der modernen Medizin mehr und mehr Bedeutung. Lichttherapie hat zwar in einigen Bereichen großen Stellenwert erlangt, allerdings nicht für den blauen Bereich des Lichtspektrums. Hier konnte bereits gezeigt werden, dass blaues Licht mit einer Wellenlänge von 453 nm durch das Generieren reaktiver Sauerstoffspezies modulativen Einfluss auf unterschiedliche Zellarten hat. Untersuchungen an Endothelzellen gibt es bis dato nicht. Da Angiogenese ein essentieller Bestandteil der Organentwicklung, ein kontinuierlich in unserem Organismus stattfindender Prozess und dadurch auch zentraler Bestandteil vieler (v.a. maligner) Erkrankungen ist, war das Ziel meiner Arbeit den Einfluss einer Bestrahlung auf Endothelzellen und die Angiogenese zu untersuchen. Hierzu wurden Endothelzellen mit einem festen Regime an Bestrahlungsintensitäten bestrahlt und die Auswirkung auf einzelne Stufen der Angiogenese betrachtet. Einzeln untersucht wurde der Einfluss auf die Proliferation der Endothelzellen mittels Zellviabilitätsmessung, die Toxizität mittels Propidium-Jodid-Färbung, die VEGF-Produktion der Zellen und deren Gefäßformation *in-vitro* und *in-vivo*. Die wiederholte Bestrahlung der Endothelzellen konnte zeigen, dass die Proliferationsrate der Zellen mit steigender Bestrahlungsintensität signifikant reduziert wurde, während die Toxizität mit steigender Bestrahlungsintensität zunahm. Trotz einer Induktion der VEGF-Produktion durch die Bestrahlung, zeigte sich in der Untersuchung der Gefäßformation eine signifikante Reduktion der entstehenden Gefäße durch die Bestrahlung mit blauem Licht. Die Übertragung der Ergebnisse auf ein *in vivo*-Modell erbrachte keine aussagekräftigen Ergebnisse. Die molekulare Grundlage der Beobachtungen basiert höchstwahrscheinlich auf einer erhöhten Licht-induzierten Generierung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies

Mit der hier vorgestellten Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass die Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm die Proliferation von Endothelzellen und deren Gefäßbildung signifikant inhibiert. Dies bietet unserer Meinung nach enormes Potential in der Therapie aller Erkrankungen, die von Reduktion der Angiogenese profitieren und einer Lichttherapie zugänglich sind. Hier sehen wir vor allem Möglichkeiten in der Therapie oberflächlicher Tumoren und Gefäßmalformationen.

II. ABSTRACT

Alternative and additive therapy concepts are becoming more and more important in modern medicine. Light therapy with different light sources has achieved great importance in some areas but not the blue part of the light spectrum. It has already been shown that blue light with a wavelength of 453 nm has a modulative influence on different cell types by generating reactive oxygen species. To date, there has been no study focusing on the influence on endothelial cells. Since angiogenesis is an essential part of organ development, a complex process that takes place continuously in our organism and therefore also is a central component of many (especially malignant) diseases, the aim of my work was to investigate the influence of radiation on endothelial cells and on angiogenesis.

For this purpose, the central stages of angiogenesis were examined and irradiated with a fixed regime of irradiation intensities. The influence on the proliferation of the endothelial cells via cell-viability, the toxicity, the VEGF production of the cells and their vascular formation *in-vitro* and *in-vivo* were examined individually.

We were able to show that the repeated irradiation of the endothelial cells reduced the proliferation rate of the cells significantly with increasing irradiation intensity. The toxicity increased with increasing irradiation intensity. Despite the induction of VEGF production by the irradiation, the examination of the vascular formation showed a significant reduction in the number of vessels created by the irradiated cells. Transferring the results into an *in-vivo* model did not yield any meaningful results. The molecular basis of the observations is most likely based on an increased light-induced generation of intracellular reactive oxygen species.

Our study was able to show for the first time that irradiation with blue light with a wavelength of 453 nm significantly inhibits the proliferation of endothelial cells and their vascularization.

In our opinion, this offers enormous potential in the treatment of all diseases that benefit from a reduction in angiogenesis and are accessible to light therapy. Here we see above all possibilities in the therapy of superficial tumors and vascular malformations.

III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AIDS	Aquired immun deficianty syndrom
BBT	Bebrütungstag
CAM-Modell	Chorioallantoin-Membran-Model
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTB	Cell-Titer-Blue
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DPBS	Dulbeccos's phosphate-buffered saline
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	fetal calf serum
FGF	Fibroblast growth factor
HIF-1 α	Hypoxie-induziertem-Faktor-1 α
HMVEC	Human microvascular endothelial cell
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
IL-1	Interleukin-1
LED	Light-emitting diode
LLLT	Low level laser therapie
NADPH	Hydroxiliertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
ns	nicht signifikant
PBS	Phosphat buffered saline

PGF	Placental growth factor
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
SOD	Superoxid Dismutase
SOP	Standard operating procedure
u.a.	unter anderem
UV	Ultra violett
UV-A	Ultraviolett Typ A
UV-B	Ultraviolett Typ B
v.a.	vor allem
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor A
VEGF-B	Vascular endothelial growth factor B
VEGF-C	Vascular endothelial growth factor C
VEGF-D	Vascular endothelial growth factor D
VEGF-E	Vascular endothelial growth factor E
VEGF-F	Vascular endothelial growth factor F
VEGFR-1	Vascular endothelial growth factor rezeptor 1
VEGFR-2	Vascular endothelial growth factor rezeptor 2
z.B.	zum Beispiel

IV. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 Tumorwachstum durch gesteigerte Angiogenese.....	3
Abbildung 2 Versuchsablauf 2.4.1	24
Abbildung 3 Versuchsablauf 2.4.6	28
Abbildung 4 Absorption der EA-HY-926 Zelllinie im CTB-Assay nach Bestrahlung im blauem Licht als Indikator der Zellproliferation (Initiale Zellzahl 10.000; n=9)	30
Abbildung 5 Relative Absorption der EA-HY-926 Zelllinie im CTB-Assay nach Bestrahlung im blauem Licht (Initiale Zellzahl 10.000; n=9; *=Signifikant zur Kontrolle mit $p < 0,05$; ***=Signifikant zur Kontrolle mit $p < 0,001$)	35
Abbildung 6 Hellfeldaufnahme der Kontrollgruppe ohne Bestrahlung nach 5 Bestrahlungs-Zyklen	36
Abbildung 7 Hellfeldaufnahme der mit 10 Joule bestrahlten Zellen nach 5 Bestrahlungs-Zyklen	36
Abbildung 8 Hellfeldaufnahme der mit 80 Joule bestrahlten Zellen nach 5 Bestrahlungs-Zyklen	37
Abbildung 9 PJ-Färbung der Kontrollgruppe ohne Bestrahlung nach 4 Bestrahlungs- Zyklen	39
Abbildung 10 PJ-Färbung der 10 Joule Gruppe nach 4 Bestrahlungs-Zyklen.....	39
Abbildung 11 PJ-Färbung der 80 Joule Gruppe nach 4 Bestrahlungs-Zyklen.....	40
Abbildung 12 Graphische Darstellung der vitalen vs apoptotischen Zellen nach 4 Bestrahlungs-Zyklen	40
Abbildung 13 Graphische Darstellung der mittels ELISA gemessenen VEGF- Konzentrationen	42
Abbildung 14 Lichtmikroskopische Aufnahme Kontrollgruppe (0 Joule) zum Visualisierungszeitpunkt	44
Abbildung 15 Lichtmikroskopische Aufnahme 5 Joule-Gruppe zum Visualisierungszeitpunkt	44
Abbildung 16 Lichtmikroskopische Aufnahme 10 Joule-Gruppe zum Visualisierungszeitpunkt	45
Abbildung 17 Lichtmikroskopische Aufnahme 40 Joule-Gruppe zum Visualisierungszeitpunkt	45

Abbildung 18 Lichtmikroskopische Aufnahme 80 Joule-Gruppe zum Visualisierungszeitpunkt	46
Abbildung 19 Lichtmikroskopische Aufnahme 100 Joule-Gruppe zum Visualisierungszeitpunkt	46
Abbildung 20 Graphische Darstellung der Absorption in Kontrollgruppe, Suramin-Gruppe (Negativkontrolle) und VEGF-Gruppe (Positiv-Kontrolle).....	47
Abbildung 21 Hellfeldaufnahmen der Gefäßstrukturen des V2a-Kits (links ohne Bestrahlung, rechts nach Bestrahlung mit 40 Joule blauen Lichtes alle 48h über 14 Tage)	49
Abbildung 22 Eier der 0 Joule Gruppe vor und nach Bestrahlung.....	52
Abbildung 23 Eier der 5 Joule Gruppe vor und nach Bestrahlung.....	53
Abbildung 24 Eier der 10 Joule Gruppe vor und nach Bestrahlung.....	54
Abbildung 25 Eier der 40 Joule Gruppe vor und nach Bestrahlung.....	55
Abbildung 26 Eier der 80 Joule Gruppe vor und nach Bestrahlung.....	56
Abbildung 27 Entwicklung der Gefäße im CAM-Modell unter Bestrahlung mit 5 Joule	57
Abbildung 28 Entwicklung der Gefäße im CAM-Modell unter Bestrahlung mit 40 Joule	57
Abbildung 29 Schematische Darstellung der Induktion der VEGF-Produktion durch blaues Licht	63
Abbildung 30 Schematische Darstellung der Schädigung der Zelle durch einen Überschuss an ROS durch die Bestrahlung mit blauem Licht, resultierend in einer Inhibition von Proliferation und Differenzierung	63

V. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 Absolute Absorption der EA-HY-926 Zelllinie im CTB-Assay nach Bestrahlung im blauem Licht als Indikator der Zellproliferation (Initiale Zellzahl 10.000; n=9; *=Signifikant zur Kontrolle mit $p < 0,05$; ***=Signifikant zur Kontrolle mit $p < 0,001$)	32
Tabelle 2 Relative Absorption der EA-HY-926 Zelllinie im CTB-Assay nach Bestrahlung im blauem Licht als Indikator der Zellproliferation (Initiale Zellzahl 10.000; n=9; *=Signifikant zur Kontrolle mit $p < 0,05$; ***=Signifikant zur Kontrolle mit $p < 0,001$)	32
Tabelle 3 Absorption der EA-HY-926 Zelllinie – Signifikanzen zur 0 Joule – Kontrollgruppe (*=Signifikant zur Kontrolle mit $p < 0,05$; ***=Signifikant zur Kontrolle mit $p < 0,001$)	33
Tabelle 4 Absorption der EA-HY-926 Zelllinie – Signifikanzen zur 5 Joule – Gruppe (*=Signifikant zur 5 Joule – Gruppe mit $p < 0,05$; ***=Signifikant zur 5 Joule – Gruppe mit $p < 0,001$)	33
Tabelle 5 Absorption der EA-HY-926 Zelllinie – Signifikanzen zur 10 Joule – Gruppe (*=Signifikant zur 10 Joule – Gruppe mit $p < 0,05$; ***=Signifikant zur 10 Joule – Gruppe mit $p < 0,001$)	34
Tabelle 6 Absorption der EA-HY-926 Zelllinie – Signifikanzen zur 40 Joule – Gruppe (*=Signifikant zur 40 Joule – Gruppe mit $p < 0,05$; ***=Signifikant zur 40 Joule – Gruppe mit $p < 0,001$)	34
Tabelle 7 Zellzahl (vital, apoptotisch und gesamt) in den Bestrahlungsgruppen 0, 10 und 80 Joule nach 4 Bestrahlungszyklen und prozentualer Anteil der apoptotischen Zellen	41
Tabelle 8 Mittelwerte der mittels ELISA gemessenen VEGF-Konzentrationen abhängig vom Tag der Bestrahlung (n=2 / Bestrahlungsintensität).....	41
Tabelle 9 Absorption in den unterschiedlichen Versuchsgruppen.....	48

VI. INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Angiogenese.....	1
1.1.1. Vascular Endothelial Growth Factor.....	2
1.1.2. Endothelzellen.....	3
1.2. Licht.....	4
1.2.1. Einfluss von Licht auf zelluläre Prozesse	5
1.2.2. Einfluss von UV-Licht auf zelluläre Prozesse	5
1.2.3. Einfluss von sichtbarem Licht auf zelluläre Prozesse.....	6
1.2.4. Effekte von blauem Licht auf zelluläre Prozesse.....	7
1.2.5. Einfluss von sichtbarem Licht auf Angiogenese und Wundheilung.....	8
1.2.6. Einfluss von blauem Licht auf Angiogenese und Wundheilung.....	9
1.3. Ziel der Arbeit.....	9
2. MATERIAL UND METHODEN	11
2.1. Material.....	11
2.1.1. Laborgeräte	11
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	13
2.1.3. Substanzen.....	15
2.1.4. Kommerzielle Testsysteme	17
2.1.5. Biologisches Material.....	17
2.1.6. Nährmedien.....	17
2.1.7. Zytokine & Zytostatika	18
2.1.8. Software	18
2.2. Methoden der Zellkultur	18

2.2.1.	Auftauen der Zellen.....	18
2.2.2.	Mediumwechsel	19
2.2.3.	Zellkulturen teilen	19
2.2.4.	Bestimmung der Zellzahl	20
2.3.	Mess- und Analyseinstrumente.....	20
2.3.1.	CellTiter-Blue ®	20
2.3.2.	Propidiumjodid-Hoechst-Färbung.....	21
2.4.	Versuche	22
2.4.1.	Einfluss von blauem Licht auf die Zellviabilität als Indikator der Proliferation und Stoffwechselaktivität.....	22
2.4.2.	Einfluss von blauem Licht auf die Vitalität anhand einer Propidiumiodid/Hoechst-Färbung.....	24
2.4.3.	Einfluss von blauem Licht auf die Produktion von VEGF	24
2.4.4.	Einfluss von blauem Licht auf die Bildung von gefäßähnlichen Strukturen 25	
2.4.5.	Einfluss von blauem Licht auf die Angiogenese anhand des V2a-Kits der Firma Cellworks.....	26
2.4.6.	Einfluss von blauem Licht auf die Gefäßbildung in einem kurz bebrüteten Hühnerei (CAM-Modell)	27
3.	ERGEBNISSE	29
3.1.	Einfluss von blauem Licht auf die Zellproliferation.....	29
3.2.	Differenzierung des Einflusses von blauem Licht auf die Proliferation anhand von Propidiumjodid-Hoechst-Färbung	37
3.3.	Einfluss von blauem Licht auf die Synthese von VEGF	41
3.4.	Einfluss von blauem Licht auf die endothelabhängige Pseudogefäßbildung in MatriGel®.....	42
3.5.	Einfluss von blauem Licht auf die Angiogenese in-vitro	47

3.6. Einfluss von blauem Licht auf die Ausbildung von Gefäßen in kurz bebrüteten Hühnereiern	49
4. DISKUSSION	58
5. KRITISCHE BETRACHTUNG DER ARBEIT	67
6. SCHLUSSFOLGERUNG	68
7. DANKSAGUNG	69
ANHANG/LITERATURVERZEICHNIS	70

1. EINLEITUNG

1.1. Angiogenese

Eine der Grundlagen für menschliches Leben ist die stete Versorgung des Organismus mit Sauerstoff zur Energiegewinnung. Dafür unerlässlich ist ein funktionierendes Gefäßnetz. Vor Allem während der Embryonalzeit, der Entwicklung der Organe und des späteren Wachstums, aber auch beim ausgewachsenen Menschen, etwa bei der Wundheilung, spielt die Entstehung adäquater Gefäßstrukturen eine zentrale Rolle (1).

Als Angiogenese wird das Wachstum und die Neubildung kleiner Blutgefäße (Kapillaren) bezeichnet (2). Dies geschieht überwiegend durch Sprossung aus dem vorbestehenden Kapillarsystem. Im Unterschied hierzu wird die Entstehung von Gefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen als Vaskulogenese bezeichnet.

Doch nicht nur in physiologischen Prozessen, sondern auch im Pathomechanismus einer Vielzahl von Erkrankungen spielt die Angiogenese eine wichtige Rolle. Diese Erkrankungen lassen sich grundlegend in zwei unterschiedliche Gruppen unterteilen. Eine Gruppe, deren Grundlage ein Mangel an funktionstüchtigen Gefäßen ist (Arteriosklerose, Myokardinfarkt), und eine zweite Gruppe, deren Pathologie maßgeblich mit einer gesteigerten Angiogenese einhergeht (Retinopathien, Tumorwachstum) (3). Diese grundsätzliche Einteilung zeigt, dass jegliche Beeinflussung der Angiogenese, sowohl positiv als auch negativ, für gewisse Krankheitsbilder und Therapien von Interesse sein können (4) (5) (6).

Wie alle biologischen Prozesse ist auch die Angiogenese ein komplexer Vorgang, an dem viele unterschiedliche Substanzen und Faktoren beteiligt sind. Eine besondere Rolle kommt hierbei den Endothelzellen zu, die die Gefäße auskleiden und die sich während der Angiogenese immer wieder teilen und differenzieren müssen (2). Weitere wichtige Komponenten der Angiogenese sind periendotheliale Bestandteile der Gewebe und die sogenannten Wachstumsfaktoren. Als periendotheliale Bestandteil bezeichnet man beispielsweise die Basalmembran, die sich während der Angiogenese kurzzeitig zurückbilden muss, um eine Migration der Endothelzellen zu ermöglichen. Im Anschluss muss sie sich dann wieder neu bilden, um die neu entstandenen Gefäße zu umhüllen (7). Als wichtigster Wachstumsfaktor der Angiogenese wird der *Vascular*

Endothelial Growth Factor (8) angesehen. Die genauen molekularen Mechanismen des Einflusses von VEGF auf die Angiogenese sind Inhalt aktueller Forschung und bisweilen nicht gänzlich aufgedeckt, allerdings wurden die VEGF-Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 bisher ausschließlich auf Endothelzellen nachgewiesen und das Hormon vorwiegend in Angiogenese-aktiven Geweben gefunden (9) (10).

1.1.1. Vascular Endothelial Growth Factor

Der *Vascular Endothelial Growth Factor* (8) gilt als das relevanteste Hormon der Angiogenese (10). Auch wenn neben VEGF noch andere Hormone an der Angiogenese beteiligt sind (IL-1, FGF u.a.), gilt VEGF als das zentrale Hormon (11). Zur VEGF-Familie gehören die Hormone VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F und PGF (Placental Growth Factor) (12)

Diese zentrale Rolle spiegelt sich insbesondere in aktuellen Untersuchungen zur Angiogenese vor allem in Tumorgewebe wieder. Schon 1971 postulierte Judah Folkman, dass das Wachstum von Tumoren über die Größe von 2 mm maßgeblich auf einer gesteigerten Angiogenese des Tumors basiert. Eine vermehrte Expression von VEGF, in expansiv wachsenden Tumorzellen, führt zu einem überschießenden Angebot an VEGF im Bereich des Tumors. Dieses VEGF bindet an bereits bestehende Gefäße und führt somit letztendlich zu einer vermehrten Versorgung des Tumors, was wiederum dessen Überleben, Proliferation sowie Metastasierung ermöglicht (13) (14) (15).

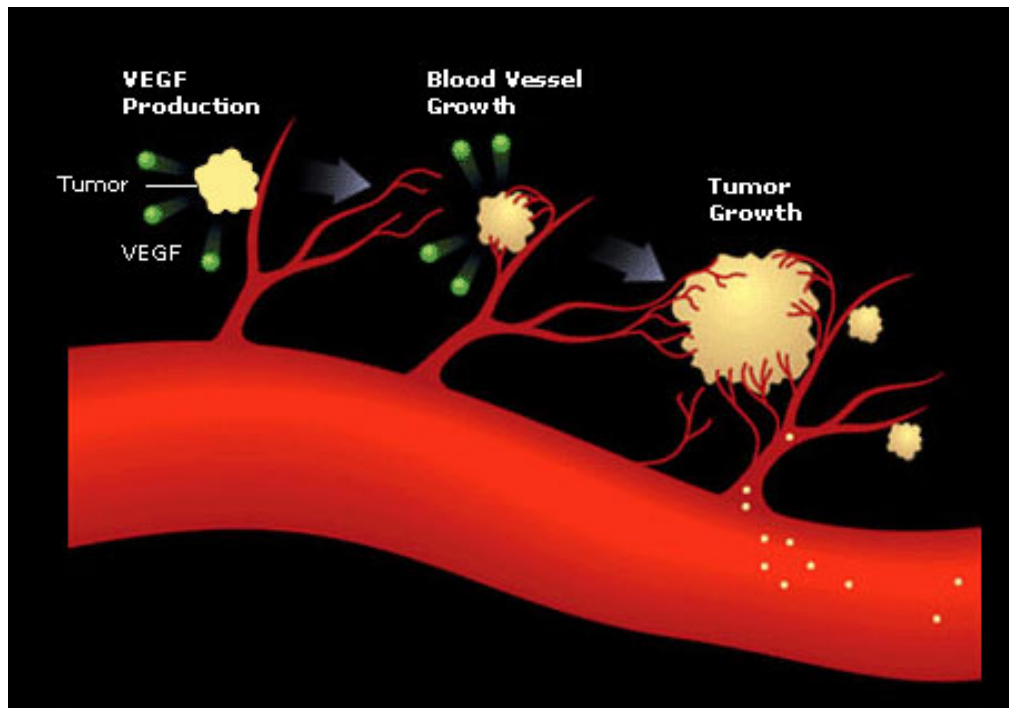


Abbildung 1 Tumorwachstum durch gesteigerte Angiogenese¹

VEGF gilt deshalb als Zielpunkt für die medikamentöse Therapie von Tumoren mit einer überschießenden Gefäßversorgung und wird häufig in Kombination mit anderen Chemotherapeutika verabreicht (16) (17). Da der häufig verwendete monoklonale Antikörper Bevacizumab, der selektiv den VEGF-Rezeptor blockiert, jedoch mit einigen starken Nebenwirkungen, wie z.B. Nierenschädigung, verbunden ist (18), sind alternative VEGF-Inhibitoren, aber auch gänzlich andere Inhibitoren der Angiogenese Teil intensiver Forschung.

1.1.2. Endothelzellen

Die Verwendung von Endothelzellen hat in der Angiogeneseforschung immer größeren Stellenwert erlangt. Die Verwendung der Zellen stellt neben der Anwendung von Tiermodellen, die sowohl durch den Tierschutz als auch aus methodischer Sicht in die Kritik gekommen sind, eine sehr gute Alternative dar (19)

¹ NAPOLEONE. F. 2012, Angiogenesis. Genetec.
<http://www.gene.com/gene/research/focusareas/oncology/angiogenesis.html>

Hierfür werden Endothelzellen aus Organen isoliert und hiernach *in-vitro* gezüchtet. Zur Untersuchung der sogenannten *in-vitro*-Angiogenese eignen sich besonders gut humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMVEC).

Durch die Verwendung von z.B. HMVEC kann *in-vitro* sowohl die Migration und Proliferation als auch durch Verwendung sog. Matri-Gele, die die extrazelluläre Matrix imitieren, die Bildung gefäßähnlicher Strukturen beobachtet werden (20).

Neben den HMVEC gibt es auf dem Markt weitere Endothelzellen, die sich ebenfalls zur laborchemischen Untersuchung eignen. Hierzu gehören die HUVEC Zellen (Human umbilical vein endothelial cells), welche in einem mehrstufigen Verfahren aus menschlichen Umbilicalvenen isoliert und kultiviert werden können (21).

Eine weitere Zelllinie die verwendet werden kann, ist die sog. EA-HY-926 (22) eine Hybridzelllinie, die durch Fusion von HUVEC Zellen mit der permanenten humanen Zelllinie A549 entsteht (23). Diese ist durch die Fusion mit der permanenten Zelllinie A549 sehr einfach zu kultivieren.

1.2.Licht

Das Licht ist ein den Menschen schon immer beschäftigendes und allgegenwärtiges Phänomen. Von der Antike bis hin in die Neuzeit gab es viele Theorien und auch viele namenhafte Forscher, so z. B. auch Galileo Galilei oder Isaac Newton, haben sich darüber Gedanken gemacht. Zum heutigen Zeitpunkt ist Licht in der Physik ein Quantenobjekt, was in diesem Sinne gewisse Eigenschaften einer Welle und eines Teilchens in sich vereint, hierbei spricht man auch von elektromagnetischer Strahlung.

Auf der Erde eintreffende elektromagnetische Strahlung hat ein Spektrum von 200-10000 nm. Aus diesem Spektrum sind Wellenlängenbereiche von 400–700 nm für das menschliche Auge sichtbar und entsprechen dem im Volksmund gebräuchlichen „Licht“. Für das menschliche Auge nicht sichtbar sind Gamma-, Röntgen, UV- und Infrarotstrahlung, sowie Radio- und Mikrowellen. Die auf der Erdoberfläche ankommende Sonnenstrahlung besteht zu 3-7% aus UV-Strahlen (Wellenlängen 290 – 400 nm), 44% aus sichtbarem Licht (Wellenlängen 400 – 700 nm) und 53% aus Infrarotstrahlung (700 – 1440 nm) (24).

1.2.1. Einfluss von Licht auf zelluläre Prozesse

Mehrere Variablen bestimmen den Einfluss von Licht, elektromagnetischer Strahlung im physikalischen Sinne, auf zellbiologische Prozesse. Wenn ein Körper bzw. Körperteil oder ein Gewebe bestrahlt wird, kommt es zum Eintreten von Photonen in das jeweilige Gewebe. Diese treffen auf molekulare Bestandteile im Gewebe und reagieren mit diesen. Hier gibt es multiple Möglichkeiten der Energieübertragung. Licht wird absorbiert und überträgt so seine Energie auf das das Licht absorbierende Milieu. Das führt zur Anregung von Elektronen. Dies kann wiederum, durch Veränderungen von elektromagnetischen Anziehungskräften, zur Veränderung von Bindungen führen, reaktive Spezies können generiert oder molekulare Bindungen verändert werden. In Folge dessen kann es zu Konformationsveränderungen und somit zu Funktionsmodifikationen von Molekülen und Strukturen kommen. Somit kann es u.a. zur Schädigung von Genmaterial kommen oder, z.B. durch Anregung von Photosensibilatoren, zur Bildung von freien Radikalen oder reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (25) (26). Die entscheidenden Faktoren sind die Wellenlänge (λ), die Irradianz oder Lichtenergie ($h\nu$ in W/cm^2) und die Dosis (J/cm^2). Für die Dosis ist wiederum die Bestrahlungs- bzw. Expositionszeit ein entscheidender Faktor.

1.2.2. Einfluss von UV-Licht auf zelluläre Prozesse

Es ist allseits bekannt, dass bestimmte Wellenlängen des sichtbaren und auch des nicht sichtbaren Lichtes, Einfluss auf den menschlichen Körper und die Differenzierung unserer Körperzellen haben.

So muss man kein medizinisches Fachwissen besitzen, um z.B. zu wissen, dass zu langes Sonnenbaden einen Sonnenbrand hervorruft. Dieser sog. Sonnenbrand ist pathophysiologisch auf eine durch UV-Strahlung hervorgerufene Entzündungsreaktion der Haut mit den typischen Zeichen einer auf Vasodilatation beruhenden Rötung und Ödembildung zurückzuführen (27).

Auf molekularer Ebene betrachtet, liegen der Hautschädigung durch UV-Strahlung mehrere Mechanismen zugrunde. So induziert kurzzeitige UVB-Bestrahlung mutagene

Photoprodukte und DNA-Läsionen durch die Dimerbildung zwischen z.B. Thymin- oder Cytosin-Resten (28) (29). Die entstandenen DNA-Mutationen führen allerdings nicht zwangsläufig zur Entstehung von mutierten Zellen. Alle dermalen Zellen sind mit verschiedenen Kontrollmechanismen zur Reparatur bzw. Apoptoseinduktion von mutierten Zellen ausgestattet. Eine zentrale Rolle hierbei spielt das Protein p53 (30), welches DNA-Schäden erkennt und einen Zellarrest induziert oder den Übergang der Zelle in Apoptose einleitet (31). Ein weiterer maßgeblicher Mechanismus der Hautschädigung ist die durch UV-Strahlung induzierte Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Photonen, die in die Haut eindringende UV-A- und UV-B-Strahlen, reagieren mit endogenen Photosensibilisatoren und führen so zu einer Überproduktion von ROS. Die von den Zellen als Reaktion gebildeten antioxidativ wirkenden Proteine, wie Glutathion oder die Superoxiddismutasen (SOD) u.v.m., können das Übergewicht an ROS nicht mehr abfangen und es entsteht der sog. „oxidative Stress“ (25). Oxidativer Stress bewirkt durch Reaktion der ROS mit DNA, Proteinen, Enzymen und Lipiden eine Schädigung dieser, resultierend in Funktions- und Energieverlust der Zelle (32).

1.2.3. Einfluss von sichtbarem Licht auf zelluläre Prozesse

Doch nicht nur die für das menschliche Auge unsichtbare UV-Strahlung hat modulativen Einfluss auf zellbiologische Prozesse. Auch Teile des für das menschliche Auge sichtbaren Lichtes vermögen es, Einfluss auf zelluläre Prozesse zu nehmen.

Während UV-Strahlung und deren Einfluss auf zelluläre und molekulare Prozesse schon seit langer Zeit Bestandteil intensiver Forschungen ist, ist die Betrachtung der Auswirkungen sichtbaren Lichts auf eben solche Prozesse noch Teil jüngerer Investigation.

Hier konnte gezeigt werden, dass z. B. die so genannte „*low level laser therapie*“ (LLLT) Einfluss auf sämtliche Gewebsarten hat. Dabei stehen vor allem der rote und infrarote Teil des sichtbaren Lichtes (570 – 950 nm) im Mittelpunkt des Interesses. So führte die Bestrahlung mit Licht im o.g. Spektrum zu einer signifikanten Steigerung

der Proliferation u.a. von Fibroblasten (33) (34), Keratinozyten (35), Osteoblasten (36) sowie mesenchymalen und kardialen Stammzellen (37).

Diese Effekte sind zu großen Teilen auf den Eingriff in die mitochondriale Atmungskette und somit auf die intrazellulären Abläufe zurückzuführen (38). Im Endeffekt münden alle diese Prozesse in einer Veränderung des regulären Zellzyklus.

1.2.4. Effekte von blauem Licht auf zelluläre Prozesse

Erste Hinweise auf einen bestehenden Effekt blauen Lichtes auf zelluläre Prozesse konnten im Jahr 2004 von der Arbeitsgruppe um Wataha erlangt werden. Diese konnten eine verminderte Zellverdopplungszeit bei aus Mäusen gewonnenen Lungenfibroblasten beobachten, nachdem diese mit blauem Licht bestrahlt wurden. Dieser Effekt zeigte sich auch bei humanen Mammakarzinomzellen und Keratinozyten (39) (40).

2008 untersuchten Taoufik *et al.* den Effekt von blauem Licht auf Gingivafibroblasten und konnten ebenfalls eine Hemmung der Proliferation beobachten (41). Auch Arbeitsgruppen um Opländer und Liebmann untersuchten einen möglichen toxischen Effekt von blauem Licht auf das Zellwachstum. Hierzu wurden Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen verwendet und mit Wellenlängen von 410 nm, 420 nm, 453 nm und 480 nm bestrahlt. Hier führten Bestrahlungen im unteren Wellenlängenbereich (410 nm und 420 nm) zu der erwarteten Verringerung des Zellwachstums. Während Licht mit 453 nm Wellenlänge keinen und Licht bei 480 nm Wellenlänge sogar positiven Einfluss, d.h. eine Steigerung der Zellproliferation zu Folge hatte (42) (43). In einer anderen experimentellen Studien konnte keine signifikante Änderung der Zellzahl von Keloidfibroblasten nach der Bestrahlung mit blauem Licht festgestellt werden (44).

Allerdings konnten Godley *et al.* schon 2005 zeigen, dass die Bestrahlung von Pigmentepithelzellen mit blauem Licht für diese nicht nur toxisch ist, sondern auch zu mitochondrialen Schäden, Generierung von ROS, Superoxidanionen und Hydroxylradikalen führt (45). Außerdem besteht ein eindeutiger toxischer Effekt auf Rinderepithelzellen und Epithelzellen aus Mäusemelanomen (46).

Ebenfalls konnte eine gesteigerte Generierung von ROS nach der Bestrahlung dermalen Fibroblasten mit Licht der Wellenlängen 410 nm, 415 nm und 420 nm nachgewiesen werden (42) (47). Hierbei konnte nicht nur die erhöhte ROS-Konzentration in den Zellen beobachtet werden, sondern auch eine gesteigerte nicht-enzymatische Synthese von Stickstoffmonoxid (NO), was wiederum Keratinozytendifferenzierung anregte (43).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass blaues Licht die Sekretion von Angiogenin aus retinalen Pigmentepithelzellen vermindert (48).

1.2.5. Einfluss von sichtbarem Licht auf Angiogenese und Wundheilung

Der Einfluss von Licht und Lichttherapie auf die Wundheilung ist schon seit langem Teil intensiver Forschung vor allem im Gebiet der Dermatologie. Hier wird ein positiver Einfluss von Licht vermutet, wenn gleich fundierte Daten lange Zeit fehlten (49).

In einer 2001 veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass LED-Lichttherapie (welche ursprünglich zur Verbesserung von Pflanzenwachstum im Weltall gedacht war) die Wundheilung von im Training verwundeten Navy-Seals um 40% beschleunigt (50). Diese Erkenntnis konnte durch intensivere experimentelle Studien an Ratten mit transplantierten Hautlappen bestätigt werden. Durch Bestrahlung mit rotem Licht einer Wellenlänge von 830nm konnte eine deutlich bessere Einheilungs- und Überlebensrate der transplantierten Hautlappen beobachtet werden (51).

Auch bei Fokussierung des Interesses auf den Einfluss von „*low level light therapy*“ (LLLT) auf zellulärer Ebene konnten bestätigende Ergebnisse erzielt werden (52) (53). So konnte eine Arbeitsgruppe um Rohringer zeigen, dass rotes und grünes Licht die Proliferation sowie 3D Migration von HUVECs (human umbilical vein endothelial cell) zu steigern vermag (54). Diese Erkenntnisse konnten durch Bestrahlung befruchteter Hühnereier im Chorioallantois-Membran-Modell (CAM-Modell) mittels Licht der Wellenlänge 635 nm (rotes Licht) bestätigt werden. Hier zeigte sich sowohl

eine gesteigerte Proliferation der verwendeten Endothelzellen, als auch eine vermehrte Anzahl an ausgebildeten Kapillaren im Vergleich zur Kontrolle (55).

1.2.6. Einfluss von blauem Licht auf Angiogenese und Wundheilung

Ein positiver Effekt auf die Wundheilung konnte ebenfalls für die Anwendung von blauem Licht (Wellenlänge 470 nm) festgestellt werden. So konnte eine Arbeitsgruppe um Dungal zeigen, dass die Bestrahlung einer ischämischen Wunde eines abdominalen Hautlappens zu einer signifikant besseren Wundheilung führte. Dies wurde auf die durch blaues Licht induzierte NO-Freisetzung aus Nitrosylhämoglobin und mitochondrialen Proteinkomplexen zurückgeführt. Diese NO-Freisetzung führte zu einer signifikant besseren subepithelialen Revaskularisierung im Bereich der früheren Wunde und zu einer besseren Durchblutung des Gewebes. Dies hat wiederum signifikant weniger Gewebnekrosen zur Folge (56). Weitere Studien an Ratten mit transplantierten Hautlappen stützen diese Beobachtungen (57) (58). Hier zeigte sich eine deutliche Verbesserung der Heilung durch die Bestrahlung.

Im Gegensatz hierzu zeigte sich in o.g. Studie von Rohringer *et al.* im Vergleich zur Bestrahlung mit rotem und grünem Licht weder eine Steigung der Proliferation noch eine verbesserte 3D-Migration von HUVECs unter Einfluss von blauem Licht (Wellenlänge 475 nm) (54).

1.3. Ziel der Arbeit

Wie bereits beschrieben, treten nicht-invasive Therapiealternativen zur Modulation der Angiogenese in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus des Interesses. So konnten auch auf dem Gebiet der Lichttherapie deutliche Fortschritte gemacht werden. In Hinsicht auf Lichttherapie im sichtbaren Teil des verfügbaren Lichtspektrums haben sich bisherige Anstrengungen hauptsächlich auf den roten und infraroten Teil des Lichtspektrums konzentriert. Obgleich auch die kurzwelligeren Teile des

sichtbaren Lichtes erforscht werden, gibt es noch große Felder, die bis dato nicht verstanden sind.

Meine Arbeit hat das Ziel, den Einfluss von blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm auf Endothelzellen zu erforschen. Speziell betrachtet werden sollte:

- 1) Der Einfluss verschiedener Intensitäten auf die Zellproliferation,
- 2) Der Einfluss verschiedener Intensitäten auf die Zellvitalität,
- 3) Der Einfluss auf die Synthese von VEGF,
- 4) Der Einfluss auf die Ausbildung von Gefäßstrukturen anhand von zwei Modellen zur Gefäßbildung aus Endothelzellen,
- 5) Der Einfluss auf die Gefäßbildung *in-vivo* mit Hilfe des sog. CAM-Modells

2. MATERIAL UND METHODEN

Alle Arbeiten wurden im Zell- und molekularbiologischen Labor der Klinik für Unfall- und Handchirurgie der Universitätsklinik Düsseldorf durchgeführt. Soweit nicht anders gekennzeichnet, handelt es sich bei allen Methoden um etablierte Verfahren, deren genauer Ablauf innerhalb des Institutes mittels Standard Operating Procedures (SOPs) festgelegt wurde. Somit entsprechen viele der hier beschriebenen Abläufe denen bereits veröffentlichter Arbeiten. Alle Versuche wurden eigenständig nach bestem Wissen und Gewissen, wie unten beschrieben, durchgeführt. Hier wurden alle Tätigkeiten, die dies verlangten, unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom vollzogen. Biologische Proben mit Verdacht auf mögliche Kontamination wurden umgehend vom Versuch ausgeschlossen.

2.1. Material

2.1.1. Laborgeräte

Abzug	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen im Allgäu, Deutschland
Autoklav	Autoklav Dx-90, Systec GmbH, Osnabrück, Deutschland
Brutmaschine	WilTec Wildanger GmbH, Eschweiler, Deutschland
Brutschrank	HERAcell® 150, Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika
Kryo-Einfriergerät	Cryo-Einfriergerät Mr. Frosty, Schmidt Laborgeräte und Umweltsimulationen, Pressbaum, Österreich
Licht	LED-Array 453 nm, Philips GmbH,

	Amsterdam, Niederlande
Heizbad	Drybath, Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika
Magnetrührer	RET Control/t IKAMAG® safty control, IKA®, Staufen im Breisgau, Deutschland
Mikroskop	Axiovert, Zeiss, Oberkochen, Deutschland Axioplan Epi-Fluoreszenz, Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Multipipette	Eppendorf Multipipette® plus, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettboy	accu-jet® pro, BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Research® fix 10-100 µl, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Eppendorf Research® fix 100-1000 µl, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Eppendorf Research® fix 0,5-10 µl, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Thermo Scientific DH09306, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika
Tauml-Rollenmischer	RM5-V 1750, Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau, Deutschland RM5-V80 1752, Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau, Deutschland
Multiplattenlesegerät	VICTOR3™ V Multilabel Counter model 1420, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika
Werkbank	HERAsafe®, Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika

Zentrifuge	Haraeus Fresco 17 Centrifuge, Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika
	Haraeus Megafuge 16 R, Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika
	Haraeus Pico 17 Microcentrifuge, Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Einfrierröhrchen	Bio-one Cryo.s® Einfrierröhrchen 2 ml™, Greier Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Einmalhandschuhe	Micro-Touch® Nitrat-Tex®, Ansell GmbH, München, Deutschland
Falcons	15 ml bio-one, Greier Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich 50ml bio-one, Greier Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Filter (steril) 0,22 µM	MERCK Millipore, Burlington, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika
Flaschen	250/500/1000 ml, Schott AG, Mainz, Deutschland
Neubauer Zählkammer	LO Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland
Pasteurpipetten aus Glas	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pasteurpipetten aus Plastik	3 ml Makro, graduiert, 150 mM, unsteril, Box a 500, Ratiolab GmbH, Dreieich,

	Deutschland
Pipettenspitzen (mit Filter)	<p>10/20 µl STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg, Deutschland</p> <p>200 µl STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg, Deutschland</p> <p>1000 µl STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg, Deutschland</p>
Reaktionsgefäße	<p>Safe-Lock Tubes™ 0,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</p> <p>Safe-Lock Tubes™ 1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</p> <p>Safe-Lock Tubes™ 2,0 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</p>
Stripette	<p>Costar® 2 ml Shorty Stripette® Serological Pipets, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten</p> <p>Costar® 5 ml Shorty Stripette® Serological Pipets, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten</p> <p>Costar® 12 ml Shorty Stripette® Serological Pipets, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten</p> <p>Costar® 25 ml Shorty Stripette® Serological Pipets, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten</p>
Zellkulturflasche	<p>CELLSTAR® Cell Culture Flask 25 cm² red filter cap, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich</p> <p>CELLSTAR® Cell Culture Flask 75 cm² red filter cap, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich</p>

	CELLSTAR® Cell Culture Flask 150 cm ² red filter cap, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturplatte	<p>6-Well CELLSTAR® Tissue Culture Plates, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich</p> <p>12-Well CELLSTAR® Tissue Culture Plates, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich</p> <p>24-Well CELLSTAR® Tissue Culture Plates, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich</p> <p>48-Well CELLSTAR® Tissue Culture Plates, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich</p> <p>96-Well CELLSTAR® Tissue Culture Plates, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich</p>
Zellschaber	40 cm, blau, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich

2.1.3. Substanzen

Aqua dest. (steril)	Aqua B. Braun, 1000ml, B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland
Bisbenzimid (Hoechst 33342)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
CellTiter Blue	Cell-Titer-Blue® Cell Viability Assay, Promega, Madison, Wisconsin, Vereinigte Staaten von Amerika
DMEM (4,5 g/l Glucose)	PAN P04-03500, PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline, Fisher Scientific, Waltham,

	Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika
Entwickler-Lösung	Clarity Western ECL, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Ethanol zur Desinfektion	100974 Ethanol denatured with about 1% methyl ethyl ketone for analysis EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaCl 0,9%	B. Braun NaCl 0,9%-Spüllösung, B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland
PBS	PBS Phosphate Buffered Saline (Dulbecco), Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Propidiumiodid	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Trypanblau	Trypan Blue Solution 0,4 %, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Trypsin/EDTA	Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % / 0,02 %) in PBS, ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Wasser (entionisiert, 10 l)	Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland

2.1.4. Kommerzielle Testsysteme

AngioKit	Cellworks, Buckingham, Großbritannien
V2a Angiogenese - Kit	Cellworks, Buckingham, Großbritannien

2.1.5. Biologisches Material

HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells)	Aus dem Bestand des Institutes
EA-HY-926	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
HMVEC (humane mikrovascular endothelial cells)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Hühnereier	VALO BioMedia GmbH, Osterholz-Scharmbeck, Deutschland

2.1.6. Nährmedien

Endopan 3 – Complete Medium for endothelial cells – w: 3% FBS w: L-Glutamine + 1% Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland	für HUVEC
DMEM-Medium + 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland	für EA-HY-926 und HMVEC
Matri-Gel	Corning ® Matrigel® Matrix	Für Gefäßassay

2.1.7. Zytokine & Zytostatika

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Suramin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten

2.1.8. Software

EndNote X7	Literaturverzeichnis
GraphPad Prism 5.0	Datenauswertung
MS Office 2011	Text- & Graphikverarbeitung
Wallac 1420 Workstation	Photometrische Messungen

2.2. Methoden der Zellkultur

2.2.1. Auftauen der Zellen

Alle verwendeten Zellen wurden primär aus Kryokonservierung aufgetaut und zur weiteren Kultivierung nach folgendem Protokoll in Petrischalen überführt.

Nachdem die Sterilbank auf Sauberkeit und Funktionsfähigkeit überprüft wurde, wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff genommen und auf Eis zur Sterilbank gebracht. Nachdem sie bei Raumtemperatur langsam aufgewärmt wurden, wurden die Zellen in mit 10 ml Nährmedium gefüllte Falcons überführt und anschließend für 5 Minuten bei 300g zentrifugiert. Der entstandene Zellpallet wurde anschließend, nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes, mit 1ml frischem Nährmedium resuspendiert und in eine mit 15 ml Nährmedium vorbereitete Petrischale überführt.

Nach ordnungsgemäßer Beschriftung wurden die jeweiligen Kulturen bei 37 °C und in einer Atmosphäre mit 95 % Luft und 5 % CO₂ kultiviert.

2.2.2. Mediumwechsel

Ein Mediumwechsel wurde alle 2 - 3 Tage durchgeführt, um eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen zu gewährleisten. Hierfür wurde das alte Medium abgesaugt, ohne den Boden der Petrischale und somit die Zellen zu berühren und anschließend 15 ml neues Nährmedium hinzugegeben.

2.2.3. Zellkulturen teilen

Um eine ausreichende Anzahl an Zellen zu erlangen, wurden die Zellen kontinuierlich weiter kultiviert. Die Kulturen wurden täglich unter dem Mikroskop inspiziert und die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 90% geteilt.

Hierzu wurde im ersten Schritt das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, um somit mögliches Restmedium, welches das Trypsin neutralisieren könnte, zu entfernen. Im Anschluss daran wurde das PBS abgesaugt und 4 ml 1% Trypsin auf die Petrischale gegeben. Es wurde darauf geachtet, dass die komplette Schale mit einem leichten Film aus Trypsin bedeckt war. Anschließend wurde die Petrischale bei 37 °C und 5% CO₂ für 2-3 Minuten inkubiert. Um sicher zu gehen, dass sich alle Zellen von der Unterlage gelöst haben, wurde dies unter dem Mikroskop kontrolliert und das Lösen der Zellen mit dem so genannten „shake-off“-Verfahren (leichtes Schlagen gegen die Kante des Kulturbehältnisses) unterstützt. Im Anschluss wurde durch Zugabe von 6 ml Nährmedium das Trypsin inaktiviert, die Zellsuspension für 5 Minuten bei 300g zentrifugiert und der Flüssigkeitsüberstand abgesaugt. Nach dem Absaugen wurde das übrig gebliebene Zellpallet mit 1 ml Nährmedium resuspendiert und zu gleichen Teilen auf neue, vorbereitete, mit 15 ml Medium befüllte Petrischalen verteilt. Diese wurden wiederum beschriftet und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.2.4. Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden die Zellen mit der Neubauer-Zählkammer gezählt. Hierzu wurden die Zellen nach dem Zentrifugieren ebenfalls mit 1 ml Nährmedium resuspendiert. Im Anschluss daran wurden 50 µl der Zellsuspension mit ebenfalls 50 µl Trypanblau gemischt und in die Neubauer-Zählkammer überführt. Nach dem auszählen aller 4 Großquadrate errechnete sich die Zellzahl nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl (/ml): } \frac{\text{Gezählte Zellen}}{4} * 2 * 10^4$$

/4 = Mittelwert der gezählten Zellen

*2 = Verdünnungsfaktor

*10⁴ = Volumen der Zählkammer 0,1 µl → 1 ml

Das Ergebnis der Rechnung entspricht der Zahl gelöster Zellen in dem bestehenden 1 ml Zellsuspension.

2.3. Mess- und Analyseinstrumente

2.3.1. CellTiter-Blue®

Zur Messung der Zellviabilität wurde die CellTiter-Blue®-Messung (im weiteren als CTB-Messung bezeichnet) angewandt. Er gilt also als relative Maßeinheit für die Anzahl bzw. Menge an lebendigen, stoffwechselaktiven Zellen.

CellTiter- Blue® detektiert die metabolische Aktivität von Zellen. Geht man davon aus, dass blaues Licht die metabolische Aktivität von Zellen nicht tangiert, dann ist der Farbumschlag der Substanz eine Funktion der Zellzahl (ein hoher Wert spiegelt viele Zellen wieder und umgekehrt). Somit kann man die Toxizität einer Behandlung in einer Zellkultur bestimmen, wenn gesichert ist, dass die Zellen sich nicht stark teilen, wenn z.B. die Wells konfluent bewachsen sind. Sät man jedoch (wie in unserem Fall) wenig Zellen aus, sodass sie sich weiter im Zellkulturbehälter teilen können, stellt eine zeitliche Erhöhung des CellTiter-Blue-Signals die Funktion der Proliferation dar.

CellTiter-Blue® bezeichnet den Farbstoff Resazurin. Dieser Farbstoff erscheint in seinem normalen Zustand tief blau. Allerdings wird Resazurin von lebendigen, also stoffwechsel-aktiven Zellen relativ schnell zum pink erscheinenden Resorufin reduziert. Dieser Farbumschlag kann dann mit Hilfe eines Fluoroskops (579 nm Exzitation / 584 nm Emission) gemessen werden und lässt somit Rückschlüsse auf die Stoffwechselaktivität der Zellen zu.

In der Durchführung des CellTiter-Blue®-Assays wurde im ersten Schritt eine Lösung mit CTB-Farbstoff und DMEM-Medium (5% FCS; 1% Penicillin/Streptomycin) im Verhältnis 1:20 hergestellt (im Weiteren als CTB-Lösung bezeichnet).

Im Weiteren wurde das Medium der zu messenden Zellkultur abgesaugt und 1ml CTB-Lösung in die entsprechenden Wells gegeben und diese anschließend für 60 min bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Daran angeschlossen wurden jeweils 100 µl der zu messenden CTB-Lösung wieder entnommen, in eine 96-Well-Platte überführt (mind. in Doppelbestimmung) und die Absorptions- bzw. Fluoreszenzveränderung in einem Photometer (Perkin Elmer Victor3™ V) quantifiziert.

2.3.2. Propidiumjodid-Hoechst-Färbung

Um die CellTiter-Blue®-Ergebnisse weiter differenzieren zu können und unterscheiden zu können, ob es sich um wirklichen Zelltod oder eventuell eine Einschränkung in der Stoffwechselaktivität der Zellen ohne echten Zelluntergang handelte, wurden Färbungen mit Propidiumjodid und dem Hoechst-Farbstoff durchgeführt.

Hoechst bzw. Hoechst 33342 (2'-(4-Ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihydrochlorid) ist ein Fluoreszenz-Farbstoff, der in die DNA von Zellen interkaliert. Unter UV-Licht emittiert der Farbstoff blaues Licht, was dem Experimentator erlaubt, die Kernmorphologie von Zellen zu untersuchen und gegebenenfalls einen apoptotischen Zelltod in Form fragmentierter und/oder pyknotischer Kerne zu erkennen.

Propidiumjodid (59) dagegen, welches ebenfalls an die DNA bindet und dort als Nukleinsäureinterkalator wirkt, kann nur perforierte Zellmembranen, also Zellmembranen nekrotischer Zellen passieren. Da es nach der Bindung an die DNA unter fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung rotes Licht emittiert, dient es als Indikator der Nekrose und eignet sich gut für eine Kombinationsfärbung mit Hoechst 33342.

Beobachtet man nach einer Doppelfärbung schöne runde und geordnete Hoechst-gefärbte Kernstrukturen und keine Rotfärbung, so geht es der Zelle gut.

Beobachtet man fragmentierte oder geschrumpfte oder schattige Kerne, jedoch keine Rotfärbung, so sehen wir eine Apoptose.

Sehen wir eine Rotfärbung beim intakten Kern, so handelt es sich um eine nekrotische Zelle.

Sehen wir hingegen apoptotische Kerne und eine Rotfärbung, so handelt es sich um eine „sekundäre Nekrose“, also eine Zelle, die mit der Apoptose begonnen hat, der jedoch irgendwann im wahrsten Sinne des Wortes die Energie (60) für die Durchführung der Apoptose ausgegangen ist.

2.4. Versuche

2.4.1. Einfluss von blauem Licht auf die Zellviabilität als Indikator der Proliferation und Stoffwechselaktivität

Um einen ersten Anhaltspunkt zu erhalten, wie sich blaues Licht auf die Endothelzellen auswirkt, wurden im ersten Schritt der Arbeit Zellen der EA-HY-926 Endothelzelllinie mit blauem Licht bestrahlt und die Auswirkungen der Bestrahlung auf die Vitalität der Zellen mittels CellTiter-Blue® quantifiziert.

Der gesamte Versuch erstreckte sich hierbei über insgesamt sieben Tage.

Am ersten Tag wurden die Zellen ausgesät. Es wurden 10.000 Zellen je Well auf einer 12-Well Platte mit 2 ml Medium ausgesät und pro Platte jeweils nur die mittleren 6

Wells besetzt. Pro Versuch wurden fünf 12-Well-Platten verwendet, die jeweils mit unterschiedlichen Dosen (0, 5, 10, 40 und 80 Joule) blauen Lichtes bestrahlt wurden.

(Die angegebene Zellzahl wurde in vorausgegangenen Versuchen ermittelt. Sie wurde ausgewählt, da es sich hierbei um jene Zahl handelt, bei der unbeeinflusste Zellen über den Versuchszeitraum kontinuierlich proliferieren können, ohne dass das Well während des Versuches vollwächst).

Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ ruhen gelassen.

Der Ablauf der folgenden Versuchstage 2 bis 6 gestaltete sich identisch. Es wurde jeweils nach 24 Stunden „Ruhe“ eine CellTiter-Blue® Messung aus einem der 6 Wells vorgenommen und dieses anschließend verworfen. Direkt nach der Messung wurde dann die Bestrahlung vorgenommen. Diese wurde unterteilt in 0, 5, 10, 40 und 80 Joule. Um die Zellen bestrahlen zu können, wurde das Medium aus allen Wells abgesaugt und 2 ml DPBS zugegeben. Dies soll die Zellen vor Austrocknung schützen und dafür sorgen, dass sie sich nicht ablösen. Dann wurden die Zellen bestrahlt. Um identische Bedingungen (hinsichtlich Temperatur und Luftzusammensetzung) für alle Zellen zu schaffen, wurden alle Platten für die Zeit der Bestrahlung aus dem Inkubationsschrank genommen und unter der Sterilbank gehalten. Anschließend an die Bestrahlung wurde das DPBS wieder aus den Wells abgesaugt und die Zellen mit 2 ml Medium bis zum nächsten Tag bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank gelagert.

Aus den 6 beimpften Wells ergibt sich so eine Anzahl von 5 Bestrahlungen an 5 aufeinander folgenden Tagen. Tag 7 des Bestrahlungsversuchs bestand daran anschließend dann nur noch aus einer abschließenden CellTiter-Blue® Messung.

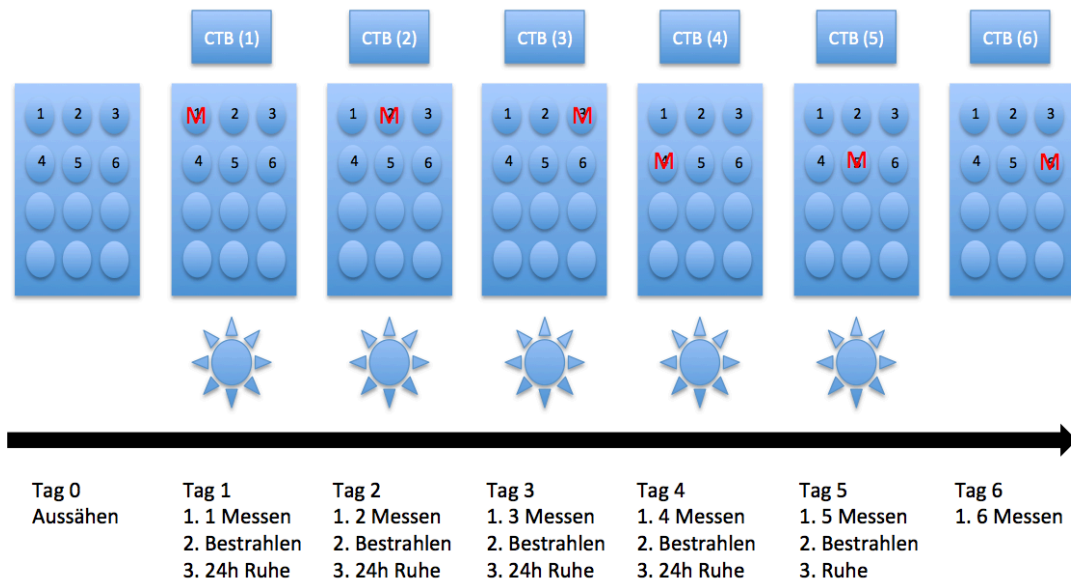


Abbildung 2 Versuchsablauf 2.4.1

2.4.2. Einfluss von blauem Licht auf die Vitalität anhand einer Propidiumjodid/Hoechst-Färbung

Um eine genauere Differenzierung und Beurteilbarkeit der in 2.4.1. erlangten Ergebnisse zu erreichen, wurde im nächsten Schritt eine Beurteilung anhand einer Kombinationsfärbung mit Propidiumjodid und Hoechst33342 durchgeführt.

Hierzu wurden die Zellen, wie auch in 2.4.1 in Kultur gebracht. Nach 5 Tagen Bestrahlung wurden die Zellen dann mit der Kombinationsfärbung angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und abfotografiert.

Zur Auswertung der Bilder wurden jeweils blaue (vitale) und rote (apoptotische) Zellkerne gezählt.

2.4.3. Einfluss von blauem Licht auf die Produktion von VEGF

Um den Einfluss von blauem Licht auf die Stoffwechselproduktivität der Zellen zu ermitteln wurden, wie auch schon in 2.4.1. beschrieben, Ea-HY-926 Endothelzellen

mit blauem Licht bestrahlt und im Anschluss mittels ELISA-Test die vorhandene Menge VEGF im Medium gemessen.

Der gesamte Versuch erstreckte sich über insgesamt 5 Tage.

Am ersten Tag wurden die Zellen ausgesät. Es wurden, wie auch in 2.4.1., 10.000 Zellen je Well auf einer 12-Well Platte mit 2 ml Medium ausgesät und auch hier nur die mittleren 6 Wells pro Platte besetzt. Im Anschluss wurden die Zellen für 24 h inkubiert.

Analog zu Versuch 2.4.1. wurden die Zellen dann an den weiteren 4 Versuchstagen bestrahlt. Auch hier erfolgte eine Einteilung in Gruppen unterschiedlicher Bestrahlungsintensität (0, 5, 10, 40 und 80 Joule). Allerdings wurde das Medium, in dem die Zellen für 24 h geruht hatten, abgenommen und in 2 ml Eppendorf-Röhrchen eingefroren.

Das abgenommene Medium wurde nach Beendigung der Bestrahlungsphase dann mittels VEGF-Elisa auf das Vorhandensein von VEGF hin untersucht.

2.4.4. Einfluss von blauem Licht auf die Bildung von gefäßähnlichen Strukturen

Um den Einfluss von blauem Licht auf die Fähigkeit der Zellen, gefäßähnliche Strukturen zu bilden, zu erforschen, wurde im ersten Schritt ein Versuchsmodell entwickelt, in dem die nun hier verwendeten Endothelzellen (HMVEC = human microvascular endothelial cells) ein stabiles Zellnetz bilden.

Hierzu wurden am ersten Tag 48-Well Platten mit MatriGel beimpft. 100 µl Corning MatriGel wurden bei unter 4 °C mit Hilfe vorgekühlter Pipettenspitzen in eine ebenfalls vorher auf 4 °C abgekühlte Platte gebracht und mit Hilfe des Vortex so gerüttelt, dass sich ein dünner Film über das gesamte Well verteilen konnte. Bei der gesamten Arbeit wurde intensiv darauf geachtet, dass das MatriGel sich zu keinem Zeitpunkt erwärmt und somit frühzeitig polymerisieren konnte.

Im Anschluss daran wurden die verwendeten Platten für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Während dieser Zeit verfestigte sich das flüssige MatriGel zu einem festen Gel.

Im Folgenden wurden die jeweiligen Platten mit den Endothelzellen beimpft. Es wurden jeweils 50.000 Zellen pro Well ausgesät und das Well mit Nährmedium aufgefüllt. Anschließend wurden die Zellen für 4 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach 4 Stunden im Brutschrank folgte dann die Bestrahlung. Auch hier wurden die vorher etablierten Bestrahlungsintensitäten 0, 5, 10, 40 und 80 Joule verwendet. Für die Zeit der Bestrahlung wurde das Medium durch DPBS ersetzt, anschließend neues Medium auf die Zellen gegeben und die Zellen für weitere 18 Stunden im Brutschrank ruhen gelassen.

24 Stunden nach dem Aussäen wurden die gefäßähnlichen Strukturen unter dem Mikroskop begutachtet und bildlich festgehalten.

(Auch in diesem Versuchsteil waren multiple Vorversuche, wie auch in Teil 2.4.1., notwendig um die optimalen Mengenverhältnisse zu detektieren. Die Kombination aus 48-Well-Platte, 100 µl MatriGel, 50.000 Zellen/Well, einer initialen Inkubationszeit von 4 h bis zur Bestrahlung und 24 h bis zur Visualisierung zeigten hier die besten Ergebnisse hinsichtlich der entstehenden Gefäßstrukturen.)

2.4.5. Einfluss von blauem Licht auf die Angiogenese anhand des V2a-Kits der Firma Cellworks

In diesem Versuchs-Kit werden menschliche Endothelzellen in einer Co-Kultur mit weiteren Endothelzellen in einem speziell entwickelten Medium gehalten, welches ähnlich dem Versuch 2.4.4 den Zellen die Möglichkeit bietet, gefäßähnliche Strukturen zu bilden.

Anders als in den Versuchen zuvor erfolgt die Ausbildung dieser Strukturen, nicht innerhalb von wenigen Stunden, sondern über einen Zeitraum von 2 Wochen.

Weiterhin sind in dem Versuchskit positiv und negativ Referenzkits enthalten. Bei der positiv Referenzmischung handelt es sich um eine 2 µg/ml VEGF-Lösung und bei der negativ Kontrolle um eine 1mM Suramin-Lösung. Suramin ist ein Potenter Inhibitor des VEGF-Rezeptors.

Der Versuchsaufbau erlaubt es reproduzierbare Ergebnisse bezüglich eines möglichen inhibitorischen als auch eines möglichen induktiven Einflusses von blauem Licht auf die Angiogenese detektieren.

Durchgeführt wurde der Versuch exakt nach Herstellerangaben (Kit-Beschreibung siehe Anhang). Die Bestrahlung wurde alle 48 h durchgeführt und im Rahmen dessen neues Medium hinzugegeben. Nach insgesamt 14 Tagen wurde der Test gestoppt. Und nach den Angaben des Herstellers fixiert, gefärbt und ausgewertet.

2.4.6. Einfluss von blauem Licht auf die Gefäßbildung in einem kurz bebrüteten Hühnerei (CAM-Modell)

Um den Einfluss von blauem Licht nicht nur *in-vitro*, sondern auch in einem *in-vivo* Modell zu testen, wurden im letzten Versuch der Arbeit kurz bebrütete Hühnereier bestrahlt und der Einfluss der Lichtexposition auf die Angiogenese der Eier charakterisiert.

Die Eier wurden käuflich erworben und vom 6. Bis zum 11. Bebrütungstag (BBT) behandelt und beobachtet

Zuerst (6. BBT) wurde ein im Durchmesser etwa 1,5 cm großes Fenster in das untere, dicke Ende der Eier geschnitten. Hierzu wurden die Eier eine Zeit lang mit dem dicken Ende des Eis nach oben gelagert, um sicher zu stellen, dass sich dort die Luftkammer befindet. Dann wurde die Schale mit Hilfe eines Skalpell durchstoßen und die Schale mit einer Pinzette so weit entfernt, dass ein 1,5 cm großes Loch entstand. Im Anschluss wurde die Schalenmembran sehr vorsichtig entfernt. Um die Infektions- und Austrocknungsgefahr für die Eier etwas zu senken, wurde die Öffnung mit einem klaren, durchsichtigen Klebestreifen verschlossen.

Auch bei den Hühnereiern, genauso wie bei den Versuchen zuvor, fand die Einteilung in die bekannten (0, 5, 10, 40 und 80 Joule) Bestrahlungsgruppen statt.

Die Eier wurden von 7. BBT bis 10. BBT täglich zur gleichen Zeit bestrahlt und die restliche Zeit im Dunklen, in einer mobilen Brutmaschine [...] gelagert. Vor jeder Bestrahlung wurden Fotos des aktuellen Gefäßstatus angefertigt. Für die Zeit der Bestrahlung wurde das Loch mit einem 10 x 15mm großen Mikroskopierdeckglas bedeckt und nach der Bestrahlung die Eier schnellstmöglich mit einem klaren, durchsichtigen Klebestreifen wieder verschlossen und zurück in die Bruteinheit gelegt.

Am 11. BBT wurden die Eier nur noch einmal fotografiert und im Anschluss daran entsorgt.

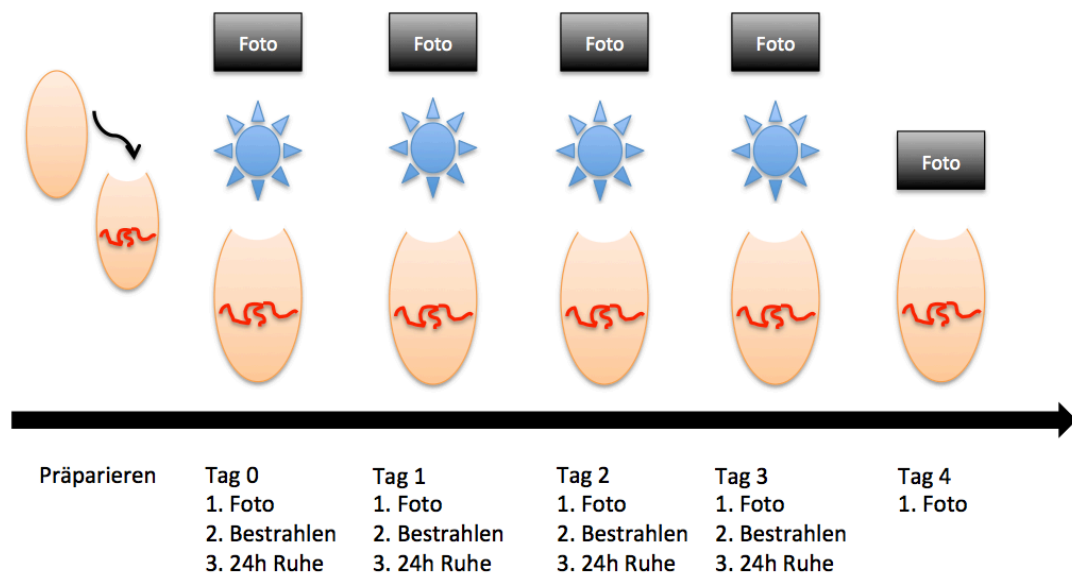


Abbildung 3 Versuchsablauf 2.4.6

3. ERGEBNISSE

3.1. Einfluss von blauem Licht auf die Zellproliferation

Versuch 2.4.1 wurde durchgeführt, um den Einfluss von blauem Licht auf die Zellproliferation zu untersuchen. Hierzu wurden wie oben bereits beschrieben Zellen der EA-HY-926 Endothelzelllinie mit blauem Licht bestrahlt und die Auswirkungen der Bestrahlung auf die Vitalität der Zellen mittels CellTiter-Blue® quantifiziert.

Ein Versuchsdurchlauf dauerte sieben Tage.

Am ersten Tag wurden 10.000 Zellen je Well auf einer 12-Well Platte ausgesät. Pro Versuch wurden fünf 12-Well-Platten verwendet (jeweils 6 Wells wurden verwendet), die jeweils mit unterschiedlichen Dosen (0, 5, 10, 40 und 80 Joule) blauen Lichtes bestrahlt wurden. Der genaue Ablauf der Bestrahlung wird unter 2.4.1 beschrieben.

Insgesamt ergaben sich aus dem gewählten Versuchsaufbau 6 Mess-Zeitpunkte:

- An Tag 1, nach 0 Bestrahlungen
- An Tag 2, nach einer Bestrahlung
- An Tag 3, nach zwei Bestrahlung
- An Tag 4, nach drei Bestrahlung
- An Tag 5, nach vier Bestrahlung
- An Tag 6, nach fünf Bestrahlung

Die Ergebnisse der jeweiligen CellTiter-Blue ® - Messungen werden im Folgenden dargestellt.

Absorption der EA-HY-926 Zelllinie im CTB-Assay nach Bestrahlung im blauem Licht als Indikator der Zellproliferation

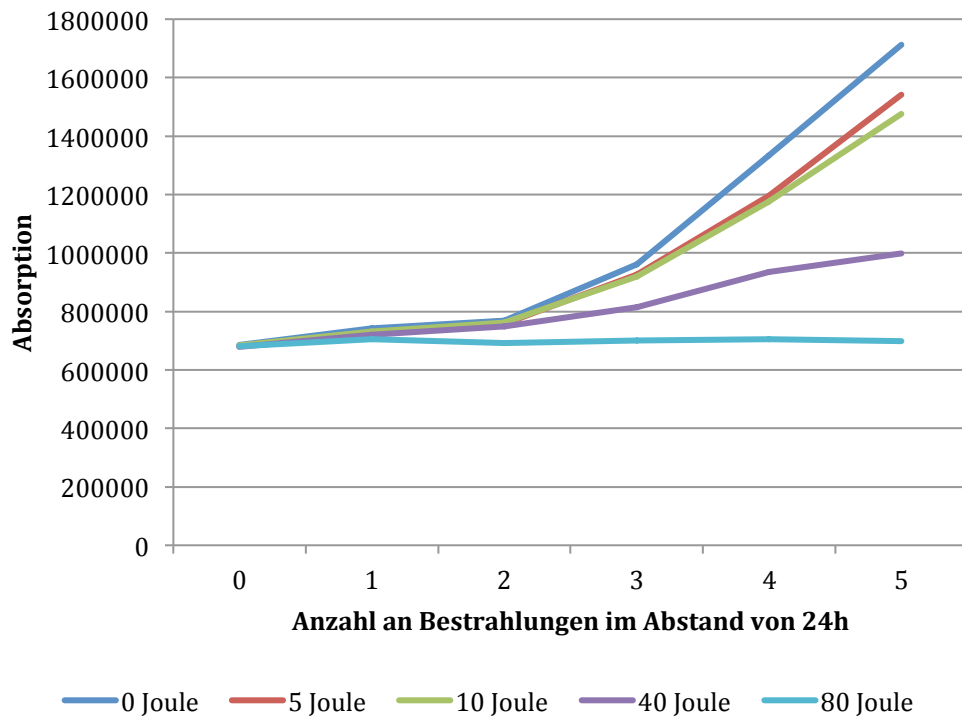


Abbildung 4 Absorption der EA-HY-926 Zelllinie im CTB-Assay nach Bestrahlung im blauem Licht als Indikator der Zellproliferation (Initiale Zellzahl 10.000; n=9)

Nach fünf durchgeführten Bestrahlungen über einen Zeitraum von 6 Tagen zeigen sich deutliche Unterschiede in der mittels CellTiter-Blue® gemessenen Zellviabilität.

Da man davon ausgehen muss, dass jede Zelle zu jedem Zeitpunkt eine nahezu identische Stoffwechsellage hat, stellen die Werte somit den Stoffwechsel aller Zellen dar. Die mit der Zeit ansteigenden Werte der Zellviabilität stellen daher eine Zellzahlzunahme dar, also eine Funktion der Zellteilung.

In der Kontrollgruppe, in der die Zellen nicht bestrahlt wurden, stieg die Zellviabilität von einem Ausgangswert von 685371 an Tag 1 auf einen Wert von 1711361,7 an Tag 6 an. Dies entspricht einer Steigerung der Zellzahl auf das etwa 2,5-fache.

Die Zellen der Gruppe, die mit 5 Joule bestrahlt wurden, steigerten ihren CellTiter-Blue ®-Wert von einem Ausgangswert von 681387 auf 1542173,6. Dies entspricht einer Steigerung um etwa das 2,26-fache. Hier ergibt sich kein signifikanter Unterschied.

Die Zellen der 10 Joule Bestrahlungsgruppe hingegen steigern ihren Wert von 683920 auf 1474905,8. Dies entspricht einer Steigerung um das 2,16-fache. Hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Zellen der 40 Joule Bestrahlungsgruppe steigerten ihren CellTiter-Blue ®-Wert von 678882 auf 999246,4, was einer Steigerung um das 1,47-fache entspricht. Hier zeigt sich ein hoch signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zur Kontrollgruppe. Dieser hoch signifikante Unterschied besteht bereits am 5. Tag, d.h. nach 4 Bestrahlungen. Auch im Vergleich zur 5 Joule Bestrahlungsgruppe besteht eine signifikante Reduktion der Zellviabilität also der Proliferationsrate an Tag 5 von ($p < 0,05$) und eine hoch signifikante Reduktion an Tag 6 ($p < 0,001$). Die hoch signifikante Reduktion der Zellviabilität an Tag 6 besteht ebenfalls im Vergleich zur 10 Joule Bestrahlungsgruppe ($p < 0,001$).

Die letzte untersuchte Gruppe, die mit 80 Joule bestrahlten Zellen, zeigen lediglich eine Steigerung des Wertes von 680683 auf 699282, eine minimale Steigerung um das 1,03-fache des Ausgangswertes. Hier zeigt sich eine signifikante Reduktion der Zellviabilität ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrollgruppe bereits an Tag 4 also nach 3 Bestrahlungen.

Tabellarische Darstellung der Absorption der EA-HY-926 Zelllinie im CTB-Assay nach Bestrahlung im blauem Licht in absoluten und relativen Zahlen

	0 Joule	5 Joule	10 Joule	40 Joule	80 Joule
0	685370,92	681386,94	683920,42	678882,25	680682,94
1	743209,56	727427,75	731361,92	720931,81	705630,14
2	767700,89	758058,67	761901,25	748678,78	692617,19
3	962098,92	927186,53	918926,50	814657,08	701251,61*
4	1332559,97	1196595,86	1176120,50	934057,22***	705729,69***
5	1711361,72	1542173,64	1474905,81*	999246,42***	699282,06***

Tabelle 1 Absolute Absorption der EA-HY-926 Zelllinie im CTB-Assay nach Bestrahlung im blauem Licht als Indikator der Zellproliferation (Initiale Zellzahl 10.000; n=9; *=Signifikant zur Kontrolle mit $p < 0,05$; ***=Signifikant zur Kontrolle mit $p < 0,001$)

	0 Joule	5 Joule	10 Joule	40 Joule	80 Joule
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
1	1,08	1,07	1,07	1,06	1,04
2	1,12	1,11	1,11	1,10	1,02
3	1,40	1,36	1,34	1,20	1,03*
4	1,94	1,76	1,72	1,38***	1,04***
5	2,50	2,26	2,16*	1,47***	1,03***

Tabelle 2 Relative Absorption der EA-HY-926 Zelllinie im CTB-Assay nach Bestrahlung im blauem Licht als Indikator der Zellproliferation (Initiale Zellzahl 10.000; n=9; *=Signifikant zur Kontrolle mit $p < 0,05$; ***=Signifikant zur Kontrolle mit $p < 0,001$)

Ab Tag 5 ist der Unterschied dann hoch signifikant ($p < 0,001$). Sowohl im Vergleich zur 5 Joule als auch zu 10 Joule Bestrahlungsgruppe zeigt sich ab dem 5. Tag eine hoch signifikante Reduktion der Zellviabilität ($p < 0,001$). Und am 6. Tag eine signifikante Reduktion der Zellviabilität ($p < 0,05$) im Vergleich zur 40 Joule Bestrahlungsgruppe.

Den ersten signifikanten Unterschied in der Proliferationsbeeinflussung zeigt also die 80 Joule Gruppe bereits nach der dritten Bestrahlung, also einer aufgewandten kumulativen Dosis von 240 Joule/cm² aufgeteilt auf drei Einheiten.

Nach der vierten Bestrahlungseinheit gibt es bereits zwei Gruppen von Zellen die sich signifikant unterscheiden – die Zellen der Kontrollgruppe, der 5 Joule und der 10 Joule Bestrahlungsgruppe unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) von den Zellen der 40

Joule Bestrahlungsgruppe und hoch signifikant ($p < 0,001$) von den Zellen der 80 Joule Bestrahlungsgruppe.

Nach der fünften Bestrahlungseinheit lassen sich 4 Gruppen unterscheiden. Während sich Kontrollgruppe und 5 Joule Bestrahlungsgruppe nicht signifikante unterscheiden, unterscheidet sich die 10 Joule Bestrahlungsgruppe signifikant ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe (allerdings nicht zur 5 Joule Bestrahlungsgruppe). Sowohl 40 Joule als auch 80 Joule Bestrahlungsgruppe zeigen eine hoch signifikante Reduktion der Zellviabilität ($p < 0,001$) zu den Bestrahlungsgruppen geringerer Intensität. Zusätzlich zeigt die 80 Joule Bestrahlungsgruppe eine wiederum hoch signifikante Reduktion der Zellviabilität ($p < 0,001$) im Vergleich zu 40 Joule Bestrahlungsgruppe.

Tabellarische Darstellung der Unterschiede der Absorption der EA-HY-926 Zelllinie im CTB-Assay nach Bestrahlung mit blauem Licht unter den einzelnen Gruppen

	0 Joule	5 Joule	10 Joule	40 Joule	80 Joule
0		ns	ns	ns	ns
1		ns	ns	ns	ns
2		ns	ns	ns	ns
3		ns	ns	ns	*
4		ns	ns	***	***
5		ns	ns	***	***

Tabelle 3 Absorption der EA-HY-926 Zelllinie – Signifikanzen zur 0 Joule – Kontrollgruppe
 (*=Signifikant zur Kontrolle mit $p < 0,05$; ***=Signifikant zur Kontrolle mit $p < 0,001$)

	5 Joule	10 Joule	40 Joule	80 Joule
0		ns	ns	ns
1		ns	ns	ns
2		ns	ns	ns
3		ns	ns	ns
4		ns	*	***
5		ns	***	***

Tabelle 4 Absorption der EA-HY-926 Zelllinie – Signifikanzen zur 5 Joule – Gruppe
 (*=Signifikant zur 5 Joule – Gruppe mit $p < 0,05$; ***=Signifikant zur 5 Joule – Gruppe mit $p < 0,001$)

	10 Joule	40 Joule	80 Joule
0		ns	ns
1		ns	ns
2		ns	ns
3		ns	ns
4		ns	***
5		***	***

Tabelle 5 Absorption der EA-HY-926 Zelllinie – Signifikanzen zur 10 Joule – Gruppe
 (*=Signifikant zur 10 Joule – Gruppe mit $p < 0,05$; ***=Signifikant zur 10 Joule – Gruppe mit $p < 0,001$)

	40 Joule	80 Joule
0		ns
1		ns
2		ns
3		ns
4		ns
5		*

Tabelle 6 Absorption der EA-HY-926 Zelllinie – Signifikanzen zur 40 Joule – Gruppe
 (*=Signifikant zur 40 Joule – Gruppe mit $p < 0,05$; ***=Signifikant zur 40 Joule – Gruppe mit $p < 0,001$)

Relative Absorption der EA-HY-926 Zelllinie im CTB-Assay nach Bestrahlung im blauem Licht

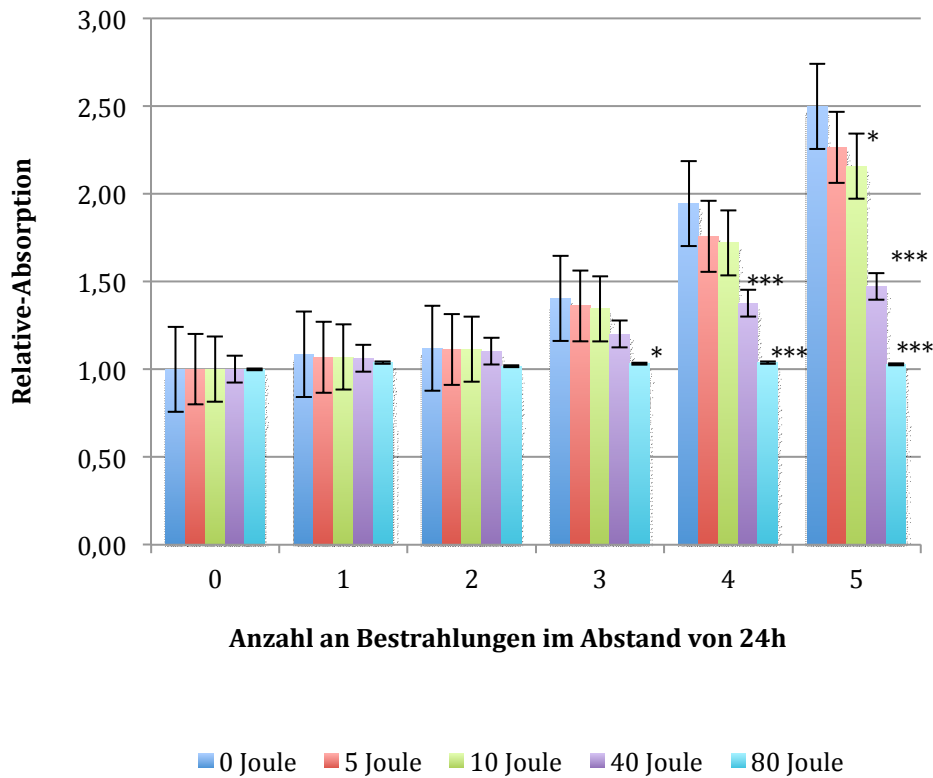


Abbildung 5 Relative Absorption der EA-HY-926 Zelllinie im CTB-Assay nach Bestrahlung im blauem Licht (Initiale Zellzahl 10.000; n=9; *=Signifikant zur Kontrolle mit $p < 0,05$; ***=Signifikant zur Kontrolle mit $p < 0,001$)

Nachfolgend werden Hellfeldaufnahmen der Wells nach 5 Bestrahlungen gezeigt. Diese zeigen einen deutlichen Unterschied in der Zellzahl nach 5 Bestrahlungszyklen. Das Well der Kontrollgruppe, die nicht bestrahlt wurde, hat einen vollständigen Zellrasen gebildet.

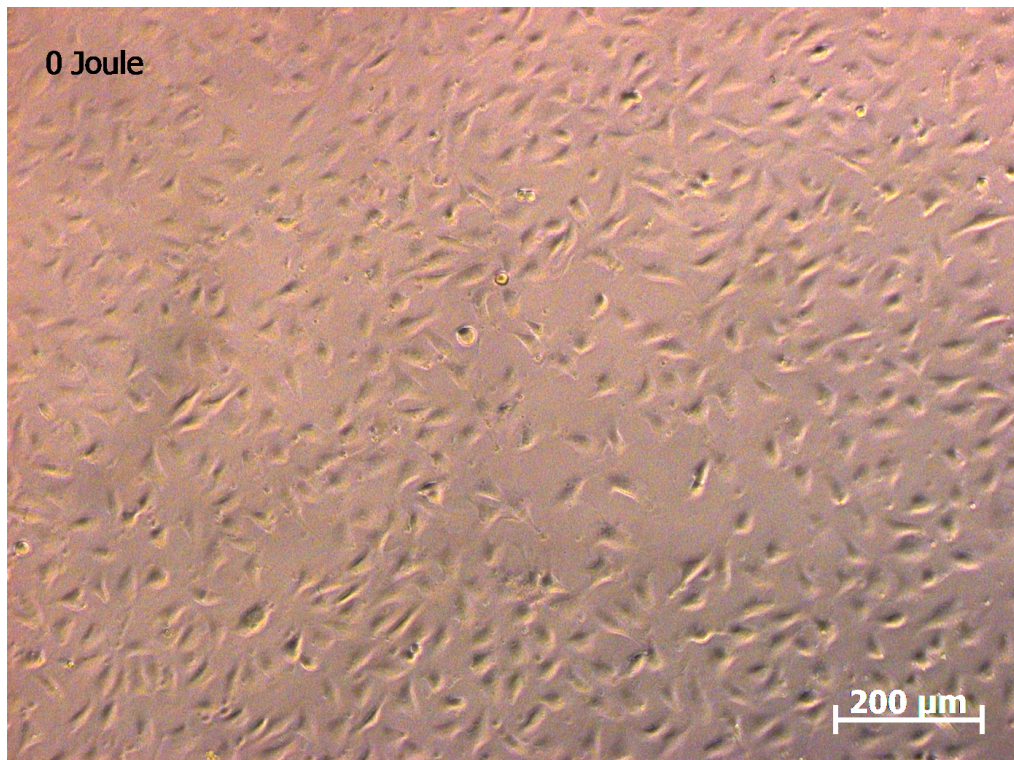


Abbildung 6 Hellfeldaufnahme der Kontrollgruppe ohne Bestrahlung nach 5 Bestrahlungs-Zyklen

Das Well der 10 Joule Gruppe zeigt noch kleine Lücken. Vereinzelt sind hier auch abgerundete, tote Zellen zu erkennen.

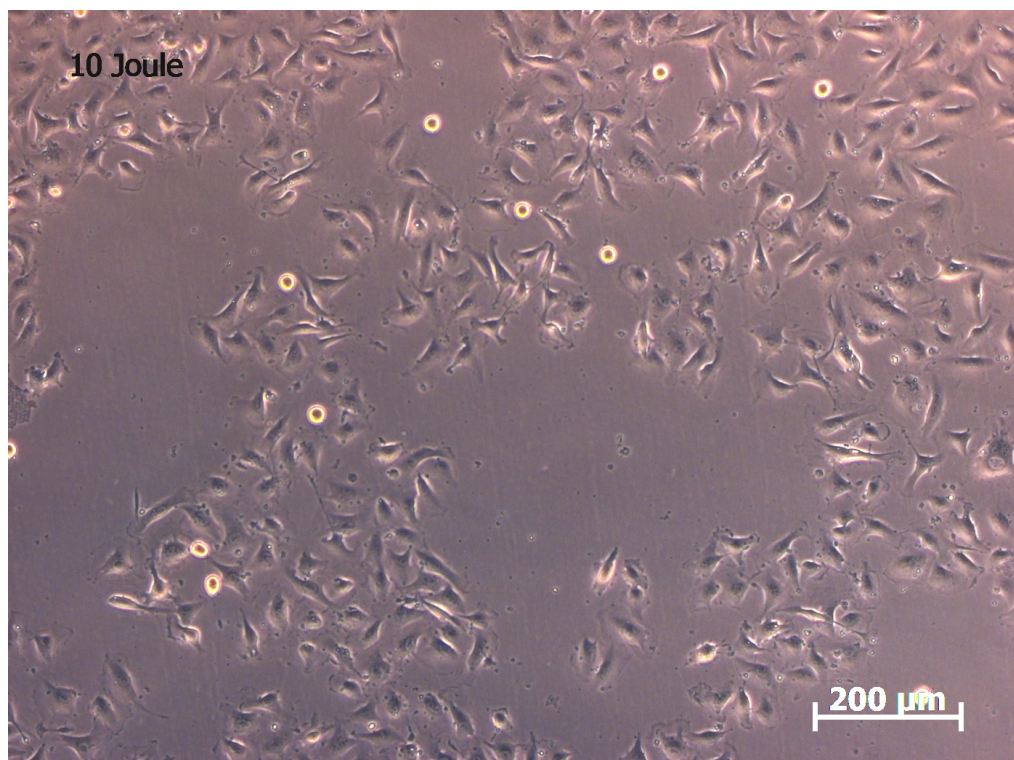


Abbildung 7 Hellfeldaufnahme der mit 10 Joule bestrahlten Zellen nach 5 Bestrahlungs-Zyklen

In der Aufnahme der mit 80 Joule bestrahlten Zellen sind noch deutlich weniger Zellen erkennbar. Im Vergleich zur 10 Joule Gruppe ist außerdem auch der Anteil der abgerundeten, toten Zellen im Verhältnis zur gesamten Zellzahl größer.

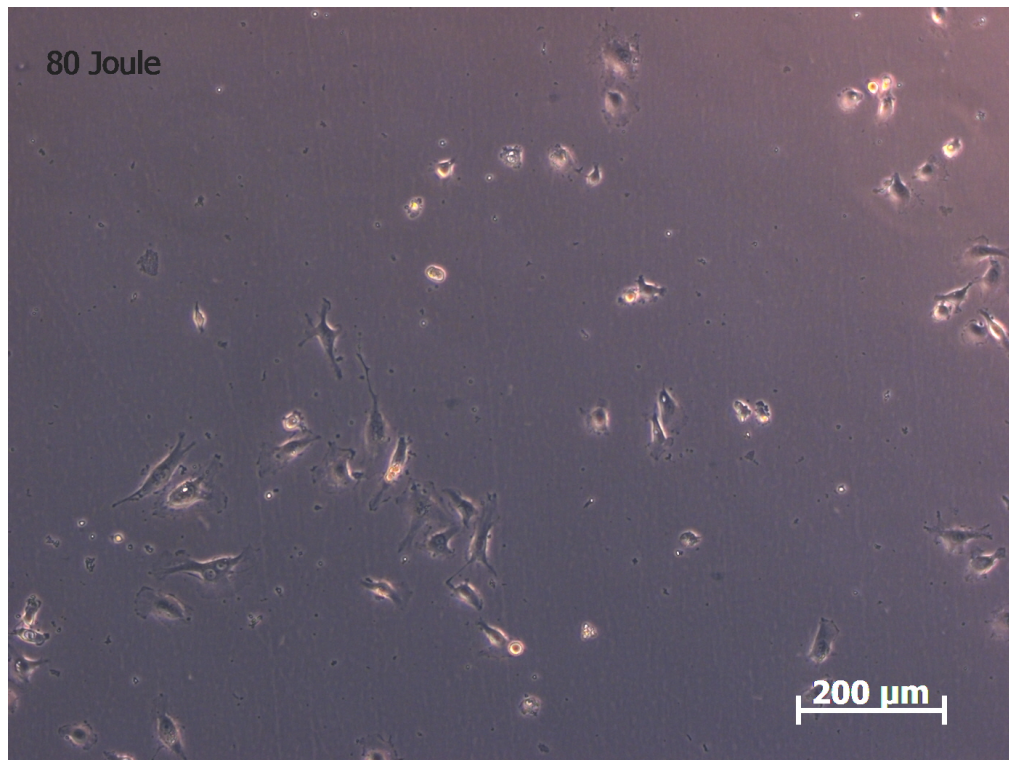


Abbildung 8 Hellfeldaufnahme der mit 80 Joule bestrahlten Zellen nach 5 Bestrahlungs-Zyklen

3.2. Differenzierung des Einflusses von blauem Licht auf die Proliferation anhand von Propidiumjodid-Hoechst-Färbung

Um die Ergebnisse aus 3.1. differenzieren zu können, wurde im nächsten Schritt (Versuch 2.4.2.) eine Kombinationsfärbung mit Propidiumjodid und Hoechst33342 durchgeführt. Diese lässt eine Differenzierung zwischen vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen zu. Im Folgenden werden die Ergebnisse des Versuches 2.4.2 dargestellt.

In der Propidiumjodid-Hoechst-Färbung zeigen sich zwei Effekte des mutmaßlichen Einflusses von blauem Licht, die beide mit den Ergebnissen aus der CellTiter-Blue® Messung und den Hellfeldaufnahmen einhergehen.

Der Versuch wurde 2 Mal durchgeführt und repräsentative Bildausschnitte gezählt. Daher sollten hier keine absoluten Zahlen interpretiert werden, sondern nur das Verhältnis der einzelnen Zahlen zueinander.

Der erste Effekt des blauen Lichtes äußert sich in einer deutlich reduzierten Zellzahl bei den mit 80 Joule bestrahlten Zellen. Die totale Zahl der mit 80 Joule bestrahlten Zellen liegt in repräsentativen Bildausschnitten im Mittel bei 141 Zellen (22% im Vergleich zur Kontrolle). Im Mittel sind 651 Zellen (101% im Vergleich zur Kontrolle) in der mit 10 Joule bestrahlten Gruppe zu zählen und 643 Zellen (100%) in der nicht bestrahlten Gruppe.

Der maßgebliche Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der mit 10 Joule/cm² bestrahlten Gruppe zeigt sich in dem Verhältnis zwischen vitalen und avitalen Zellen. Während bei den unbestrahlten Zellen (gesamt 643) 159 Zellen tot sind. Sind es in der 10 Joule/cm² Gruppe schon 199 von 651 und in der 80 Joule Gruppe bereits 46 von 141.

Nach 5 Tagen sind also 25% der Zellen der Kontrollgruppe in Apoptose gegangen, 30% der Zellen, die mit 10 Joule bestrahlt wurden, und 33% der 80 Joule Gruppe.

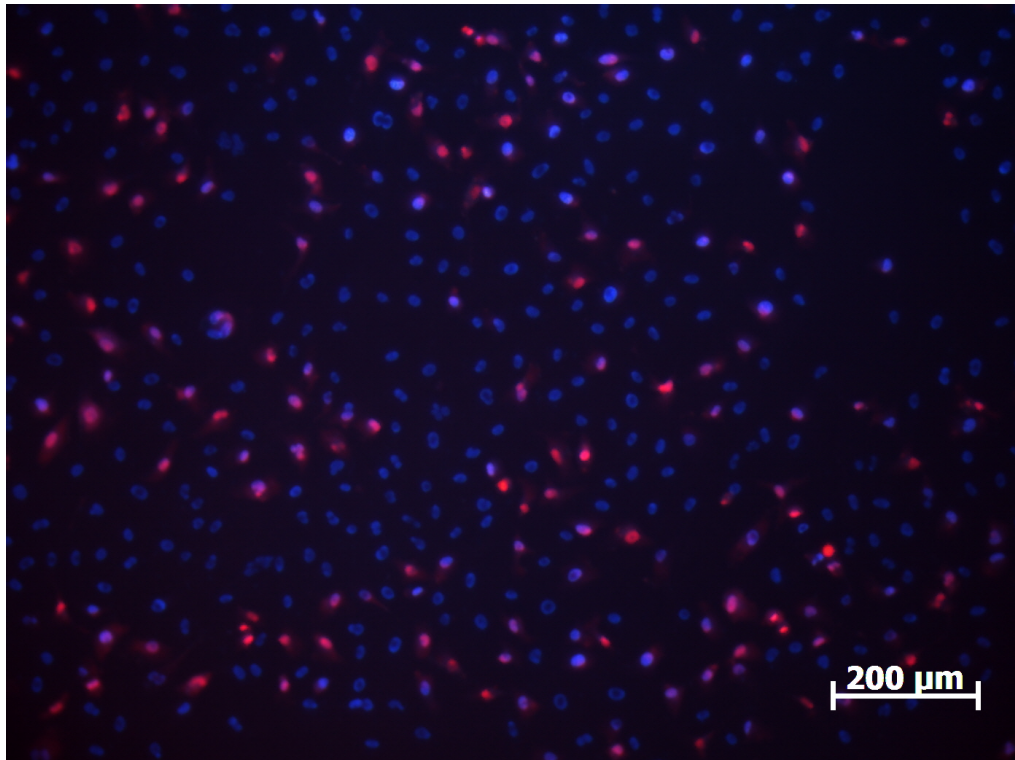


Abbildung 9 PJ-Färbung der Kontrollgruppe ohne Bestrahlung nach 4 Bestrahlungs-Zyklen

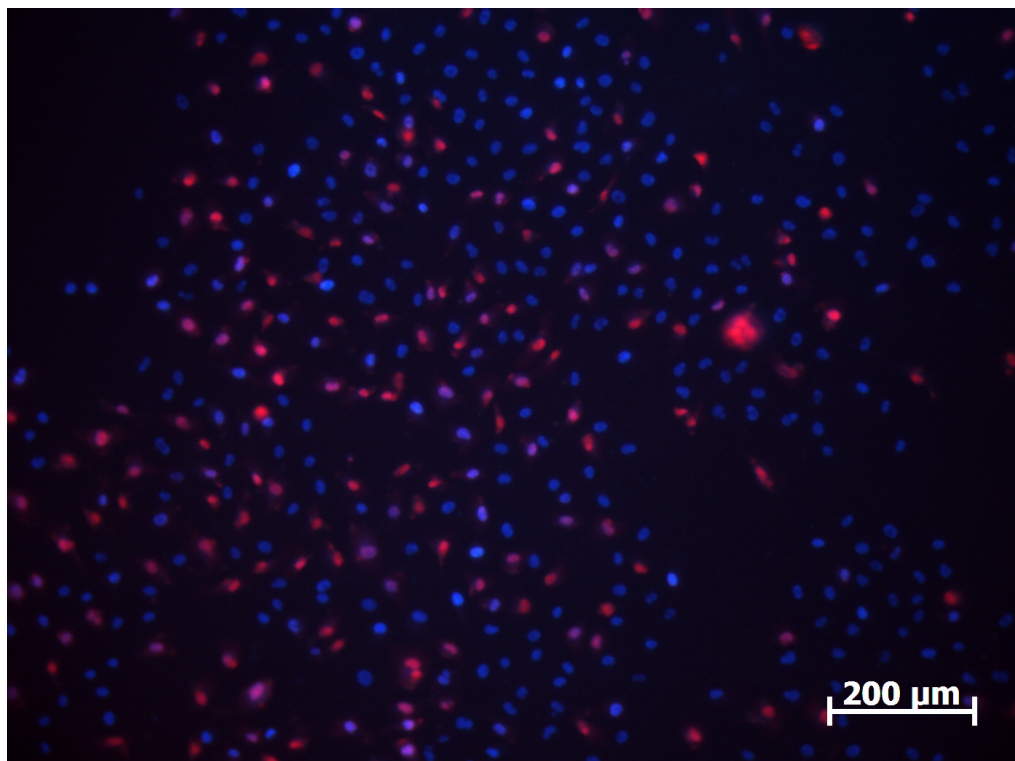


Abbildung 10 PJ-Färbung der 10 Joule Gruppe nach 4 Bestrahlungs-Zyklen

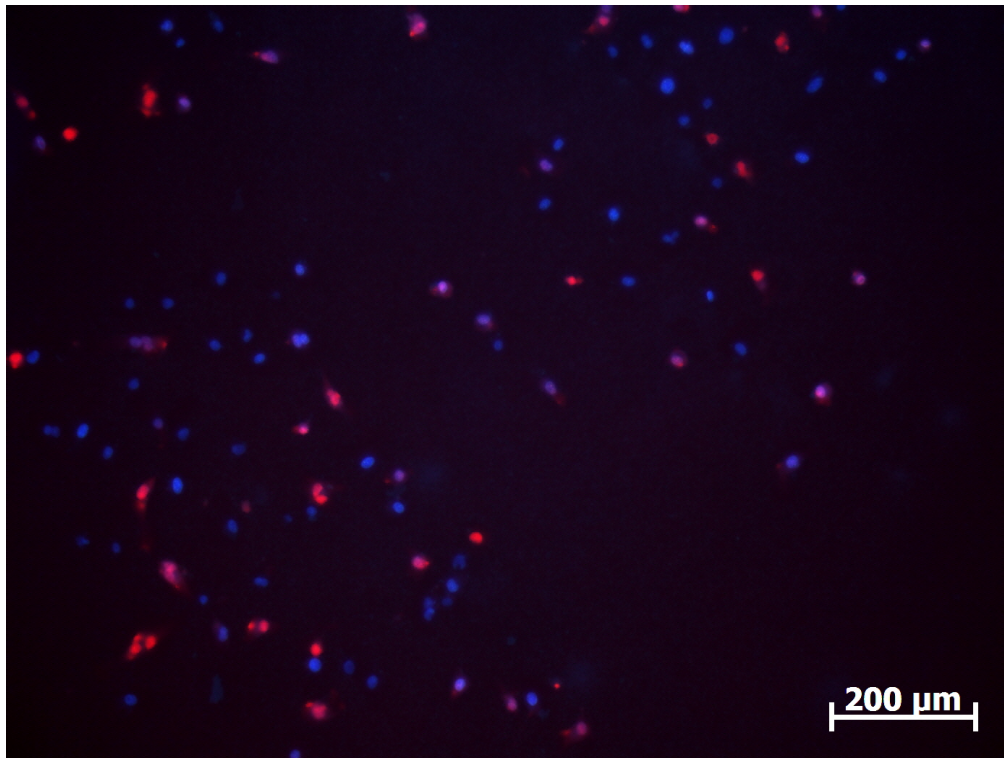


Abbildung 11 PJ-Färbung der 80 Joule Gruppe nach 4 Bestrahlungs-Zyklen

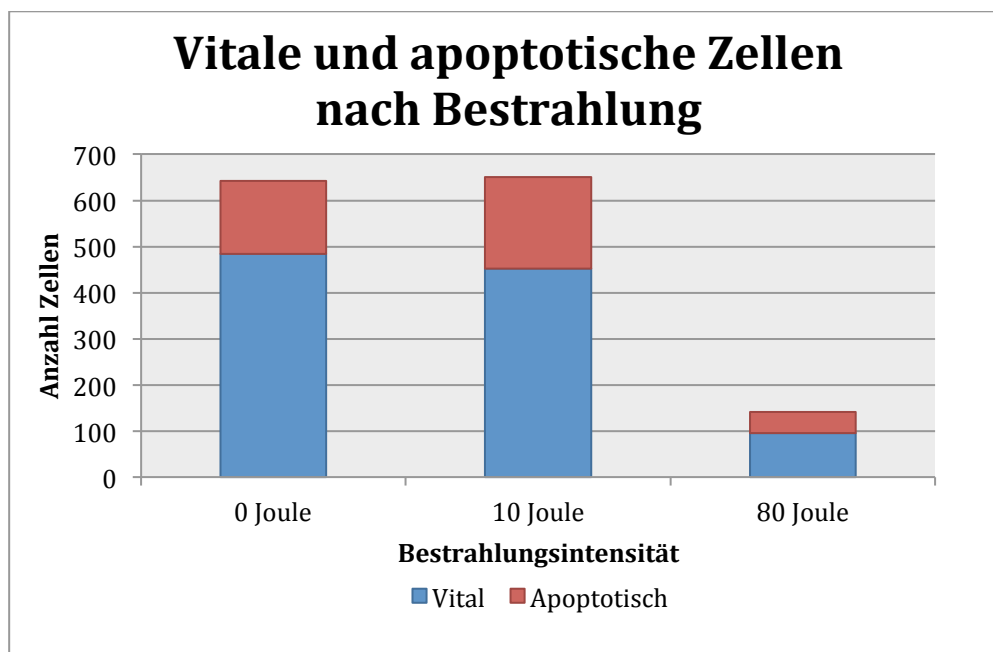


Abbildung 12 Graphische Darstellung der vitalen vs apoptotischen Zellen nach 4 Bestrahlungs-Zyklen

	0 Joule	10 Joule	80 Joule
Apoptotisch	159	199	46
Vital	484	452	95
Gesamt	643	651	141
Apoptotisch %	24,7	30,6	32,62

Tabelle 7 Zellzahl (vital, apoptotisch und gesamt) in den Bestrahlungsgruppen 0, 10 und 80 Joule nach 4 Bestrahlungszyklen und prozentualer Anteil der apoptotischen Zellen

3.3. Einfluss von blauem Licht auf die Synthese von VEGF

Nach Bestrahlung der Zellen und Analyse des Zellmediums auf das Vorhandensein von VEGF, welches durch die Zellen produziert wird, ergaben sich folgende Ergebnisse.

	0 Joule	5 Joule	10 Joule	40 Joule	80 Joule
0	0	3,18	18,15	20,35	10,19
1	0	10,46	18,04	17,24	13,98
2	0	0	16,63	16,23	15,46
3	0	0	16,29	14,17	21,02

Tabelle 8 Mittelwerte der mittels ELISA gemessenen VEGF-Konzentrationen abhängig vom Tag der Bestrahlung (n=2 / Bestrahlungsintensität)

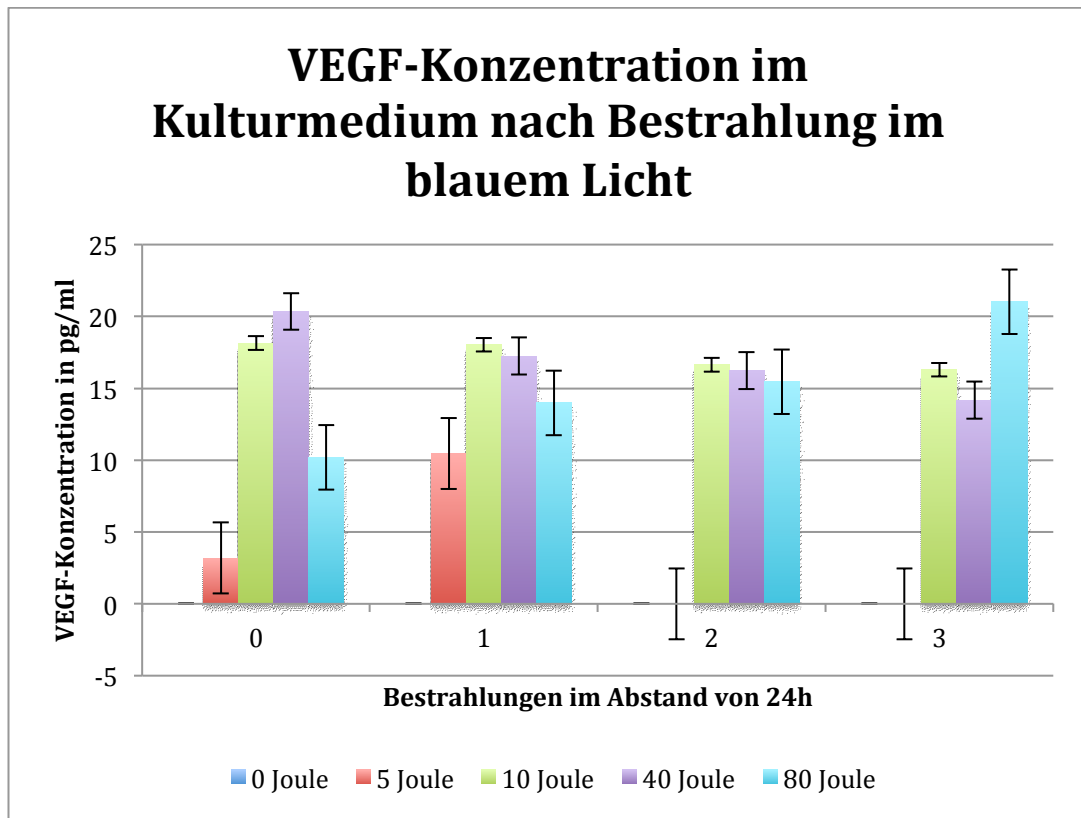


Abbildung 13 Graphische Darstellung der mittels ELISA gemessenen VEGF-Konzentrationen

Es zeigt sich eine Aktivierung der VEGF-Produktion ab einer Bestrahlungsintensität von 10 Joule. Diese besteht ab der ersten Bestrahlung. Für die Zellen der Kontrollgruppe war in unserem Versuchsaufbau zu keinem Zeitpunkt eine mittels ELISA festzustellende Produktion von VEGF vorhanden. Währenddessen Zellen, die bestrahlt wurden, nachweisbare Mengen VEGF produzierten. Hier ist noch einmal zwischen der 5 Joule Gruppe und den höheren Intensitäten zu unterscheiden.

3.4. Einfluss von blauem Licht auf die endothelabhängige Pseudogefäßbildung in MatriGel®

Um sich der tatsächlichen Gefäßbildung wie sie *in-vivo* stattfindet anzunähern, wurde Versuch 2.4.4 durchgeführt. In den bis dato durchgeführten Versuchen wurden ausschließlich Funktionen der Zelle an sich untersucht. Proliferation, Zelltod, Synthese von VEGF.

Versuch 2.4.4 sollte nun einen ersten Anhaltspunkt für die nächste Stufe der Angiogenese geben. Beeinflusst die Bestrahlung mit blauem Licht die Fähigkeit der Endothelzellen sich untereinander zu vernetzen?

Der Versuchsaufbau zur Erzeugung gefäßähnlicher Strukturen gestaltete sich allerdings schwierig.

Die zu Beginn der Versuchsreihe verwendeten Ea-HY-926 Endothelzellen bildeten auch nach Induktion mittels VEGF nur sehr unregelmäßig die gewünschten Strukturen. Hier fanden mehrere Versuchsdurchläufe mit unterschiedlichen Dosen VEGF statt.

HMVEC (human microvascular endothelial cells) bildeten diese hingegen regelhaft und reliabel aus, ohne Induktion durch VEGF.

Nach mehrfachen Versuchsdurchläufen zur Detektierung des zeitlichen Ablaufs der Bildung der gefäßähnlichen Strukturen, welche im mikroskopischen Bild an Spinnennetze erinnern, zeigte sich der optimale Visualisierungszeitpunkt nach 24 Stunden.

24 Stunden nach Aussaat auf Matri-Gel bilden die HMVEC regelhaft gefäßähnliche Strukturen aus.

In dem von uns gewählten Versuchsaufbau konnte kein direkter Einfluss der Bestrahlung mit blauem Licht auf die Bildung gefäßähnlicher Strukturen nachgewiesen werden.

Diese ausgebildeten Strukturen unterscheiden sich in ihrer Größe und der Anzahl der Abzweigungen nicht zwischen den unterschiedlichen Intensitäts-Gruppen.

Bei rein subjektiver Betrachtung erscheint es dem Betrachter allerdings, dass die entstandenen Strukturen – mutmaßlich aufgrund der Strahlentoxizität - mit gesteigerter Bestrahlungsintensität dünner oder „brüchiger“ werden.

Die nachfolgenden mikroskopischen Hellhellfeldaufnahmen zeigen repräsentative Bilder der Gefäßnetze in Abhängigkeit von der Bestrahlungsintensität.

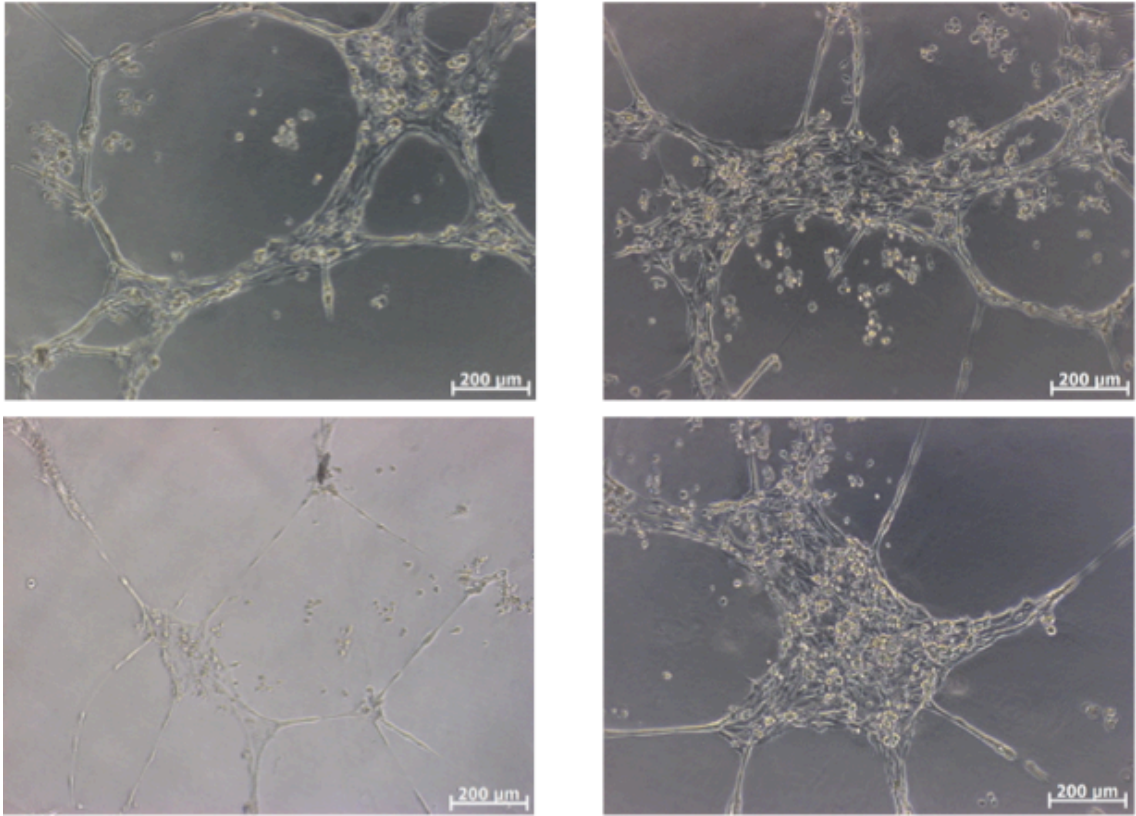


Abbildung 14 Lichtmikroskopische Aufnahme Kontrollgruppe (0 Joule) zum Visualisierungszeitpunkt

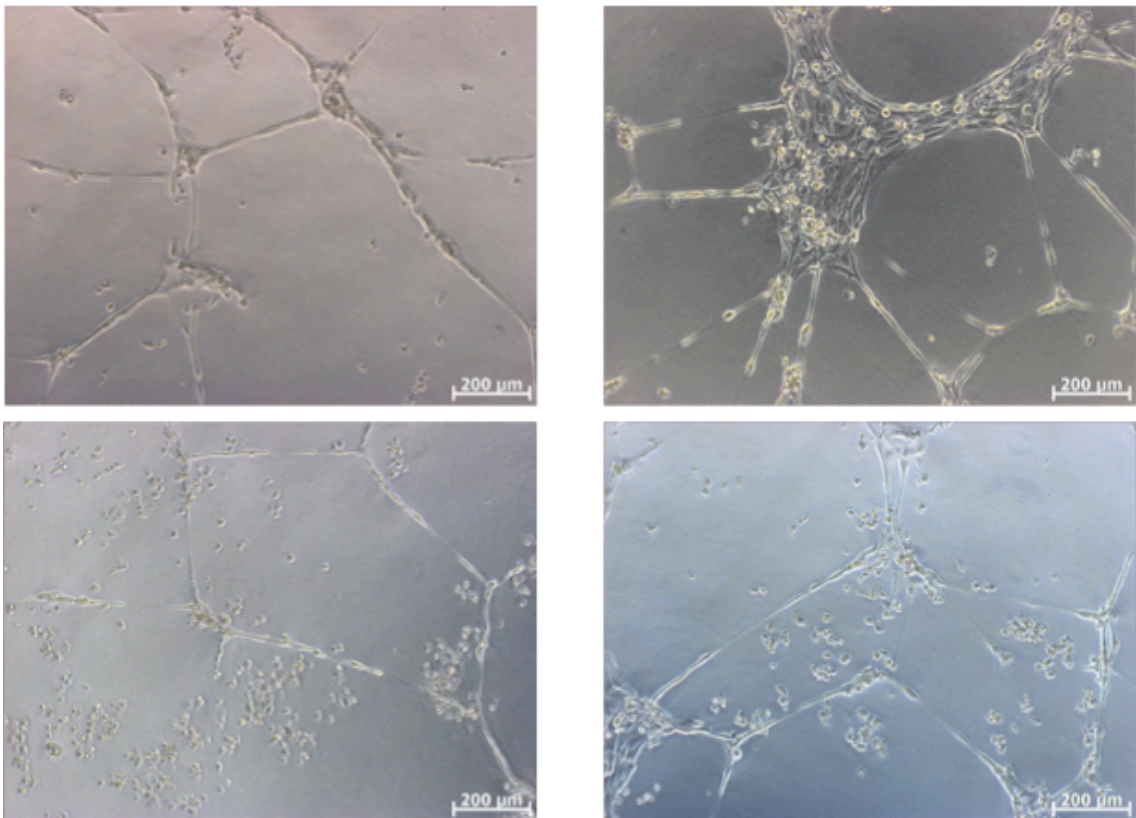


Abbildung 15 Lichtmikroskopische Aufnahme 5 Joule-Gruppe zum Visualisierungszeitpunkt

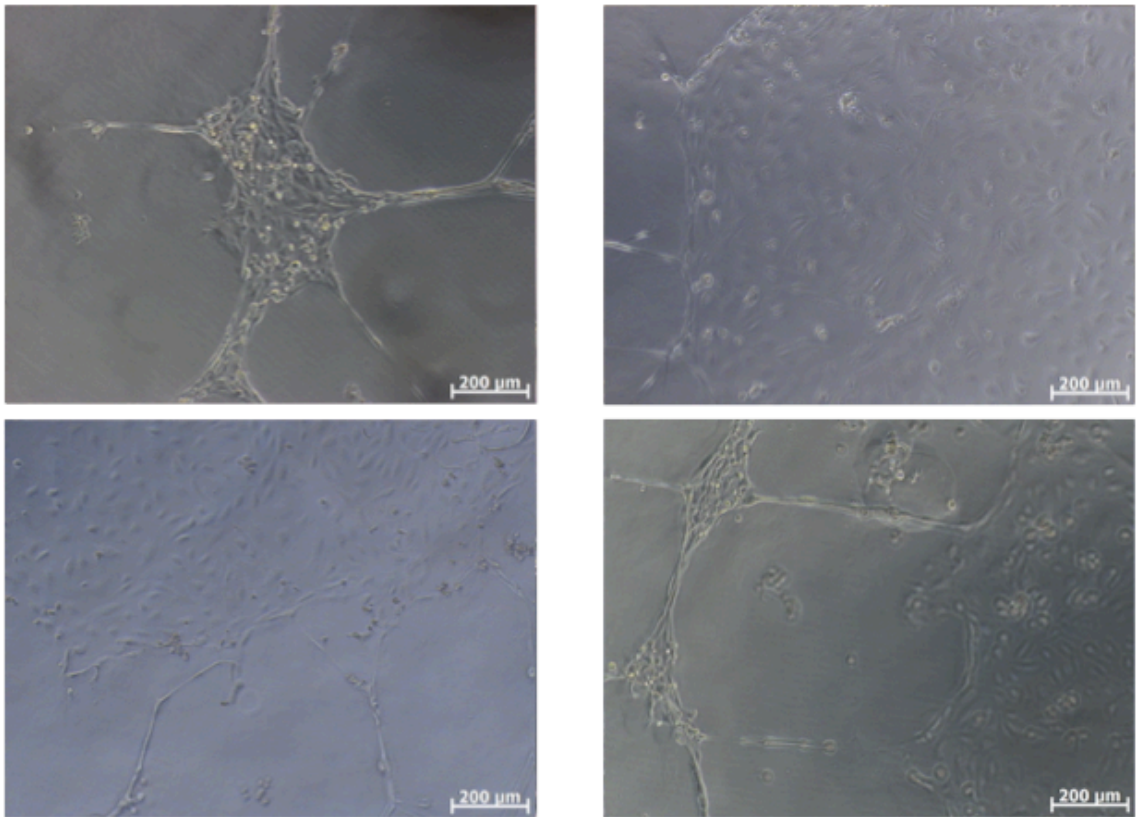


Abbildung 16 Lichtmikroskopische Aufnahme 10 Joule-Gruppe zum Visualisierungszeitpunkt

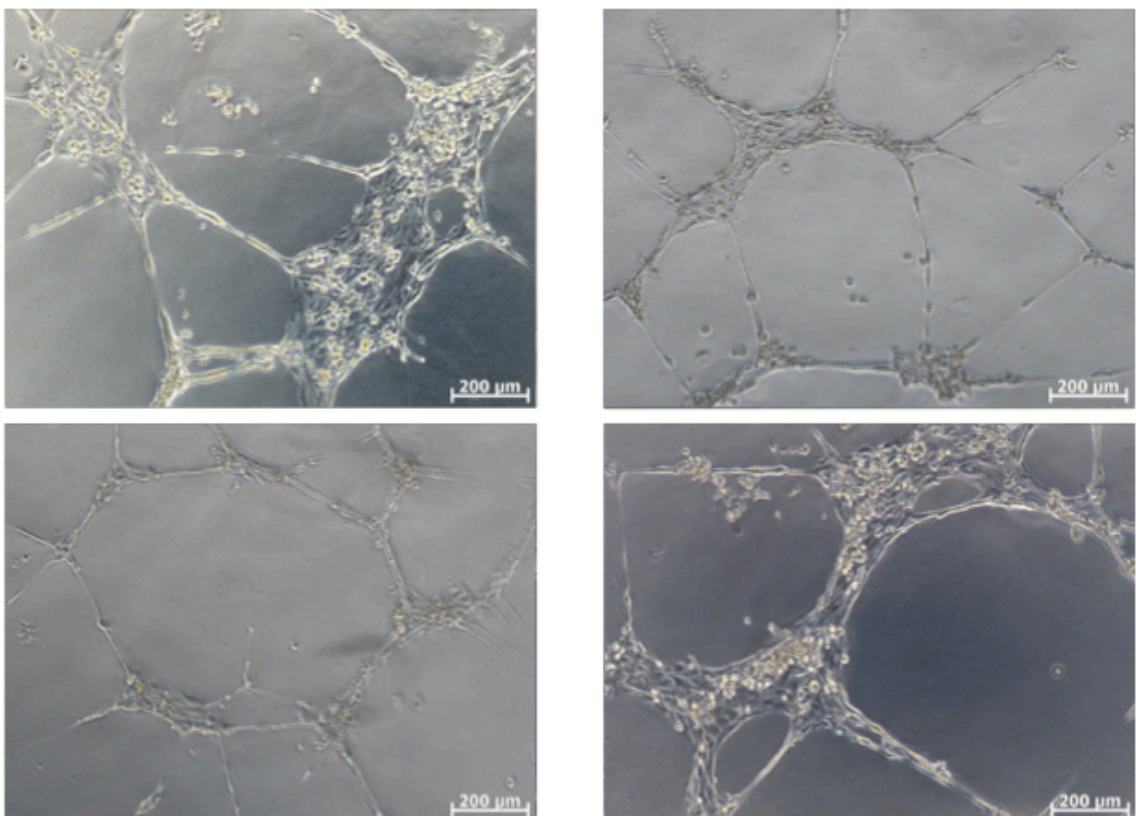


Abbildung 17 Lichtmikroskopische Aufnahme 40 Joule-Gruppe zum Visualisierungszeitpunkt

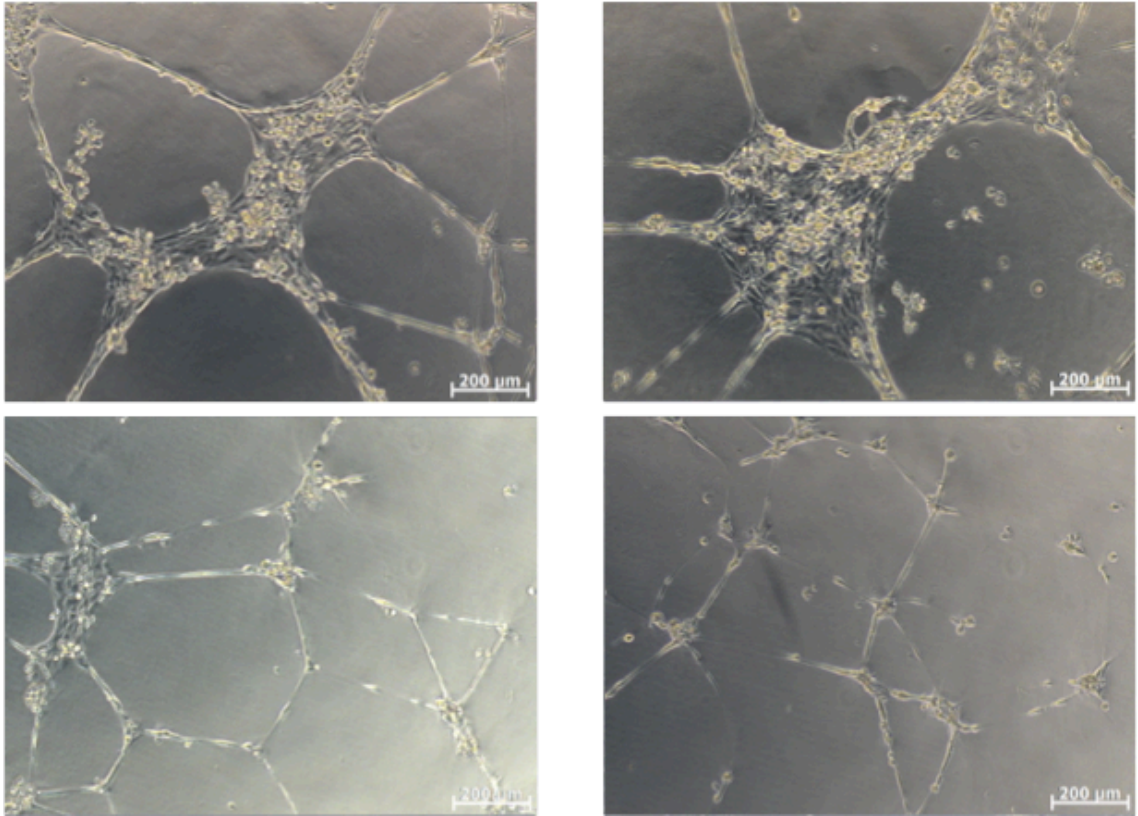


Abbildung 18 Lichtmikroskopische Aufnahme 80 Joule-Gruppe zum Visualisierungszeitpunkt

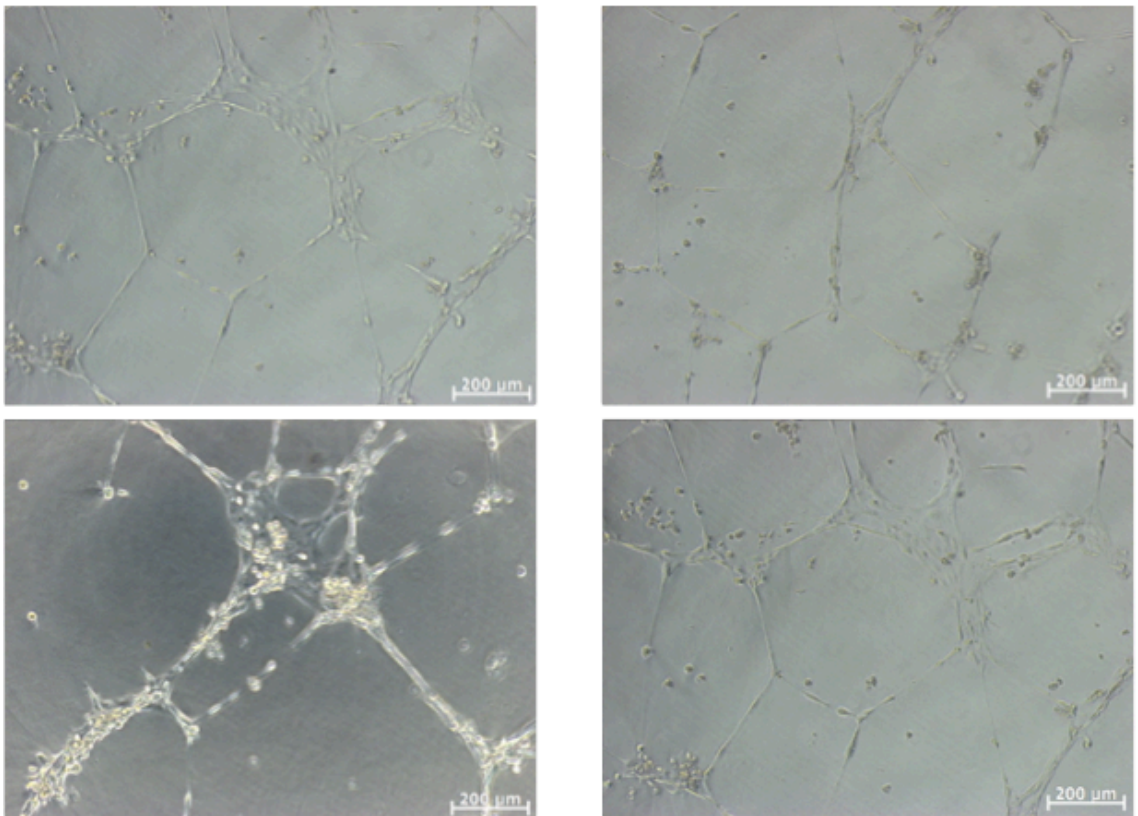


Abbildung 19 Lichtmikroskopische Aufnahme 100 Joule-Gruppe zum Visualisierungszeitpunkt

3.5. Einfluss von blauem Licht auf die Angiogenese in-vitro

Da Versuch 2.4.4. die Frage, ob die Bestrahlung mit blauem Licht die Fähigkeit der Endothelzellen sich untereinander zu vernetzen beeinflusst, nur unzureichend beantworten konnte, führten wir einen zweiten Versuch zur Beantwortung eben dieser Frage durch.

Hierzu bedienten wir uns des V2a-Kits der Firma Cellworks.

Das V2a-Kits ermöglicht im Gegensatz zu den vorher erhobenen, nur schwer objektivierbaren Ergebnissen, eine objektive, numerische Auswertung des Einflusses. Außerdem ermöglicht der Versuchsaufbau mehrfache Bestrahlungen der Zellen über einen Zeitraum von insgesamt 2 Wochen.

Die folgende Grafik zeigt die Ergebnisse des Versuchs. Untersucht wurde so der Einfluss einer Bestrahlung mit 40 Joule alle 48 Stunden über einen Zeitraum von 2 Wochen auf eine Kontrollgruppe, eine Positivkontrolle (VEGF-Gruppe) und eine Negativkontrolle (Suramin-Gruppe).

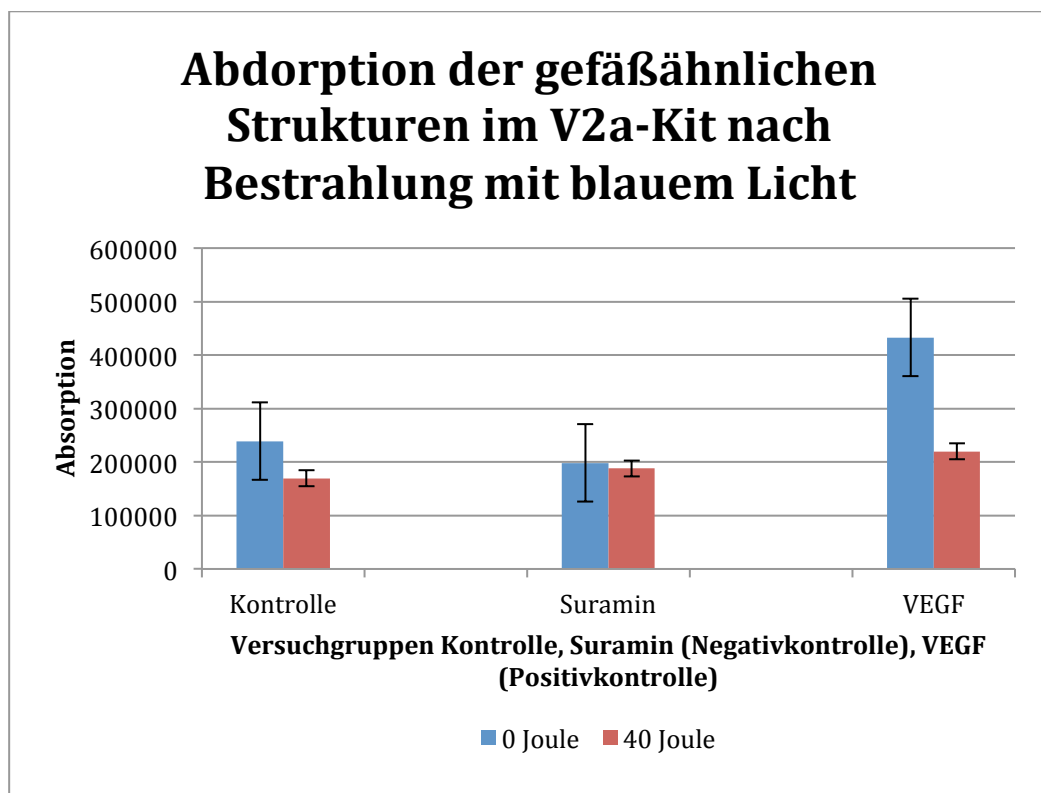


Abbildung 20 Graphische Darstellung der Absorption in Kontrollgruppe, Suramin-Gruppe (Negativkontrolle) und VEGF-Gruppe (Positiv-Kontrolle)

Die Ergebnisse der Versuche zeigten in jeder der Versuchsgruppen eine Reduktion der Absorption (als Korrelat der Gefäßbildung) durch die Bestrahlung mit blauem Licht.

In der Kontrollgruppe (spontane Gefäßbildung ohne Induktor (VEGF) oder Suppressor (Suramin)) war nach Versuchsabschluss ohne Bestrahlung ein Absorptionswert von 238678 zu messen. Der Wert der bestrahlten Kontrollgruppe lag bei 169455,5. Es kam also zu einer Reduktion auf 70% im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle.

In der durch Suramin supprimierten Gruppe (Suramin-Gruppe) lag der Absorptionswert nach Versuchsabschluss bei 198248,5. Somit konnte gezeigt werden, dass Suramin im gewählten Versuchsaufbau die Bildung der gefäßähnlichen Strukturen inhibiert (Reduktion im Vergleich zur nicht-bestrahlten Kontrollgruppe auf 83%). Der Wert der mit 40 Joule bestrahlten Zellen der Suramin-Gruppe lag bei 187810. Dies entspricht einer Reduktion im Vergleich zur nicht-bestrahlten Suramin-Gruppe auf 95%.

In der durch VEGF induzierten Gruppe (VEGF-Gruppe) lag der Absorptionswert nach Versuchsabschluss bei 432988,5. Somit konnte gezeigt werden, dass VEGF im gewählten Versuchsaufbau die Bildung der gefäßähnlichen Strukturen induziert (Induktion im Vergleich zur nicht-bestrahlten Kontrollgruppe auf 181%). Der Wert der mit 40 Joule bestrahlten Zellen der VEGF-Gruppe lag bei 219913. Dies entspricht einer Reduktion im Vergleich zur nicht-bestrahlten VEGF-Gruppe auf 51%. Außerdem entspricht dies einer Reduktion im Vergleich zur nicht-bestrahlten Kontrollgruppe auf 92%. Der inhibitorische Effekt der Bestrahlung überwog also den induktiven Effekt des VEGFs.

	0 Joule	40 Joule
Kontrolle	238678	169455,5
	100%	70%
Suramin	198248,5	187810
	100%	95%
VEGF	432988,5	219913
	100%	51%

Tabelle 9 Absorption in den unterschiedlichen Versuchsgruppen

Dies ist auch optisch nachvollziehbar.

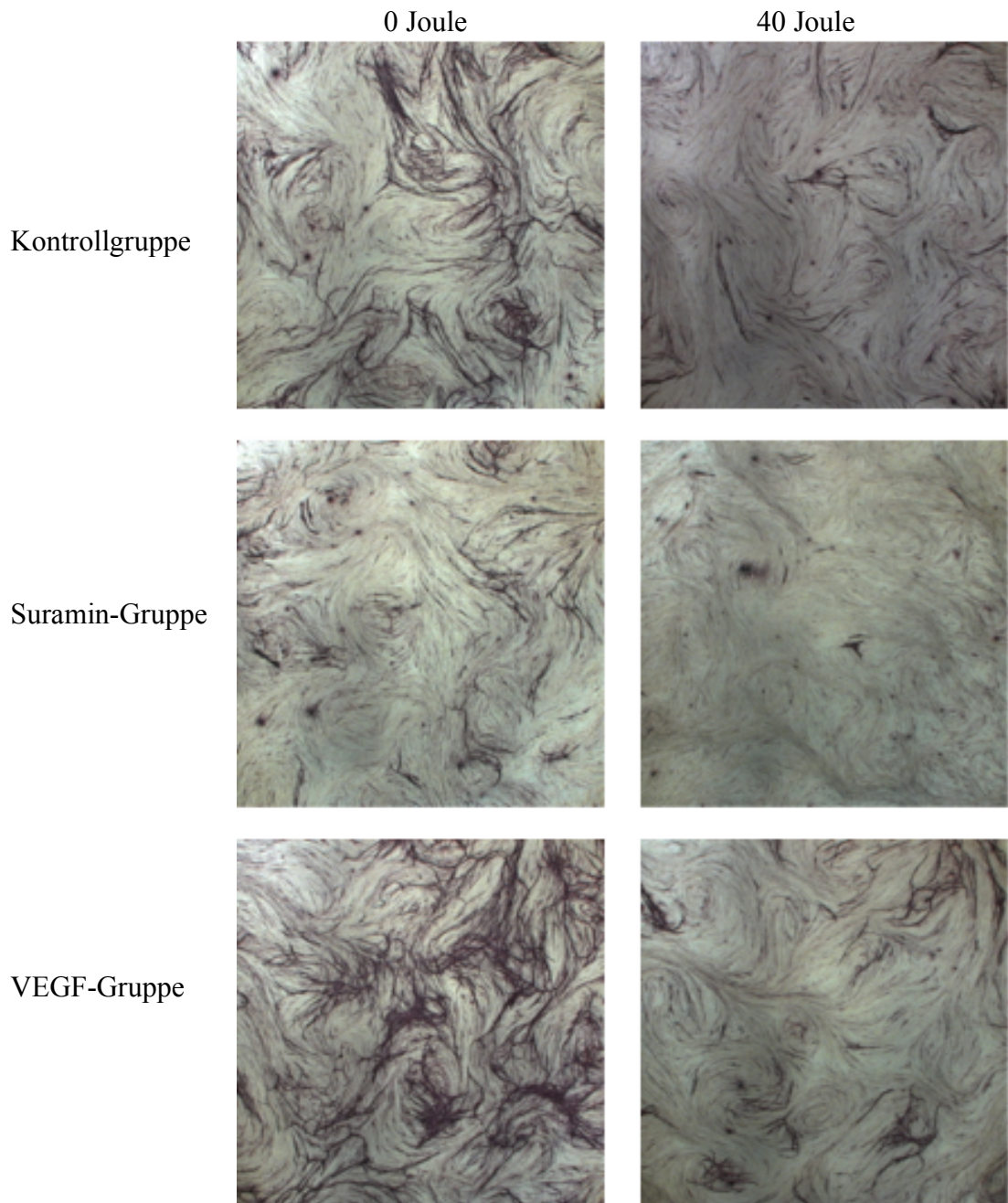


Abbildung 21 Hellfeldaufnahmen der Gefäßstrukturen des V2a-Kits (links ohne Bestrahlung, rechts nach Bestrahlung mit 40 Joule blauen Lichtes alle 48h über 14 Tage)

3.6. Einfluss von blauem Licht auf die Ausbildung von Gefäßen in kurz bebrüteten Hühnereiern

Das CAM-Modell zur Evaluation des Einflusses von blauem Licht auf die *in-vivo* Angiogenese soll eine Verbindung der *in-vitro* gesammelten Ergebnisse auf eine Anwendung am lebendigen Organismus schaffen. Auch hier ist die Auswertung aufgrund des komplexen Versuchsaufbaus und der Individualität jedes Eis erschwert und die Aussagekraft dadurch stark eingeschränkt.

Der Versuch wurde mit insgesamt 57 Eiern durchgeführt. Von den 57 Eiern/Embryos überlebten die volle Versuchszeit 19 Eier/Embryos. Die restlichen 38 Eier/Embryos (66%) verstarben frühzeitig. Hier ist allerdings kein direkter Zusammenhang zwischen der Intervention und dem Versterben zu finden. Die Eier/Embryos verstarben willkürlich über die Versuchsgruppen verteilt, was am ehesten auf eine Verletzung der Membran während der Präparation und ein damit verbundenes erhöhtes Risiko der Austrocknung zurückzuführen war.

Ähnlich wie in der bildlichen Darstellung der Gefäßstrukturen in 2.3. bzw. 3.3. lässt auch dieser Versuchsaufbau nur schwierig eine objektive bzw. quantitative Auswertung zu, sondern kann allenfalls subjektiv betrachtet werden.

Mutmaßlich scheinen Eier, die mit einer niedrigen Intensität bis zu 5 Joule bestrahlt wurden, ihr Kapillarnetz durch die Entstehung von neuen, kleinen Kapillaren zu erweitern. Im Gegensatz dazu scheint sich bei Eiern, die mit einer höheren Intensität bestrahlt wurden, dieses Netz kleinster Kapillaren nicht auszubilden, sondern die bereits bestehenden Gefäße ihren Umfang zu vergrößern und somit eine ausreichende Perfusion des Gewebes zu ermöglichen.

Die folgenden Bildreihen zeigen jeweils den Zustand des Gefäßnetzes der Eier/Embryos an Tag 0, also kurz nach Eröffnung der Eischale (links) und nach 4 Bestrahlungen mit der jeweiligen Intensität (rechts).

Fotographie der mit blauem Licht bestrahlten Eier

Im Folgenden werden jeweils 4 Bildpaare der untersuchten Bestrahlungsgruppen gezeigt. Gezeigt werden jeweils der Ausgangsbefund links und der Befund nach 4 Bestrahlungen der jeweiligen Intensität rechts. Bei den mit einem „X“ belegten Bildern handelt es sich um Eier bzw. Embryos, die im Rahmen der Prozedur Schaden genommen haben und daher verstorben sind.

Fotographien der Kontrollgruppe

0 Bestrahlungen

4 Bestrahlungen

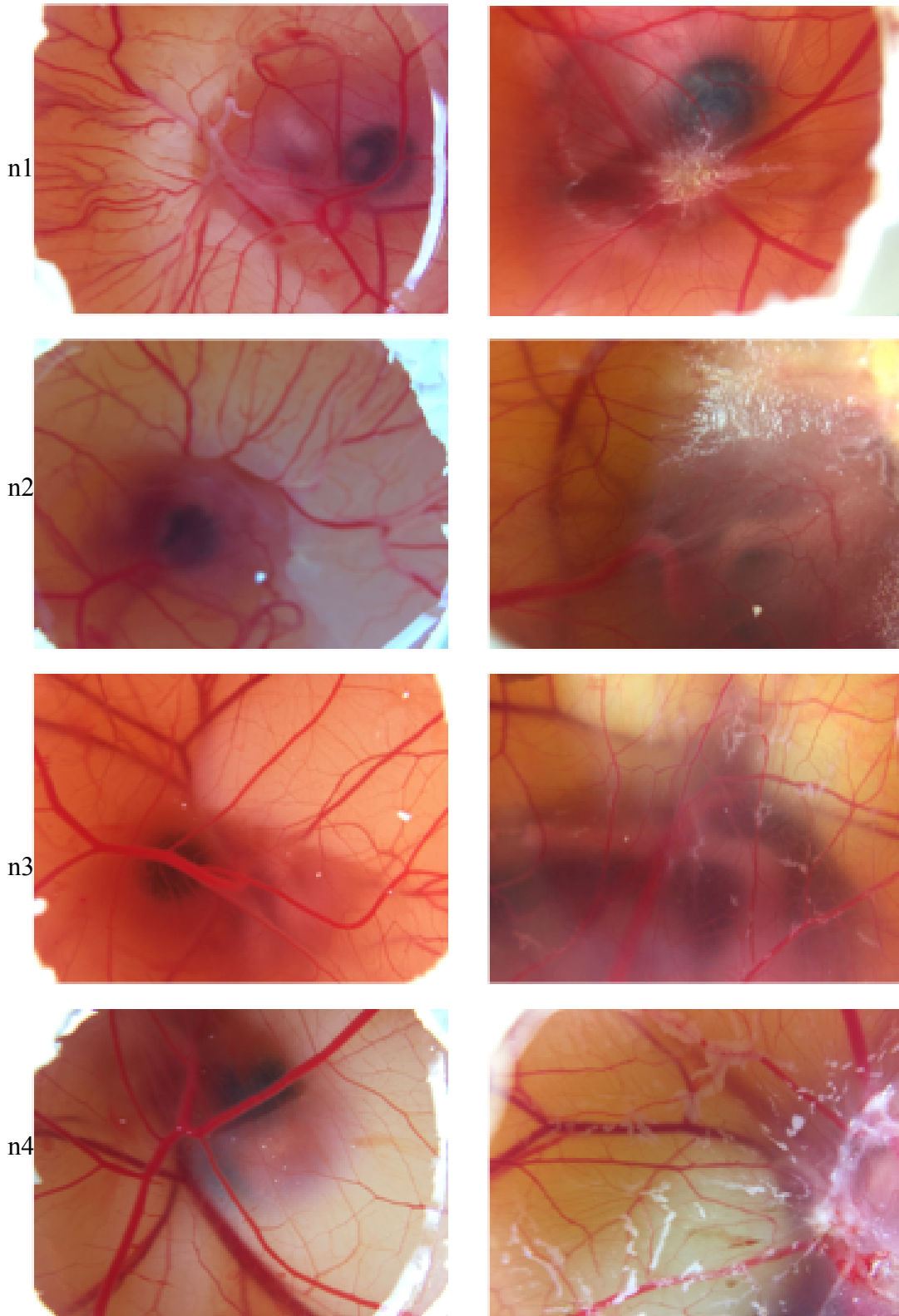


Abbildung 22 Eier der 0 Joule Gruppe vor und nach Bestrahlung

Fotographien der 5 Joule - Gruppe

0 Bestrahlungen

4 Bestrahlungen

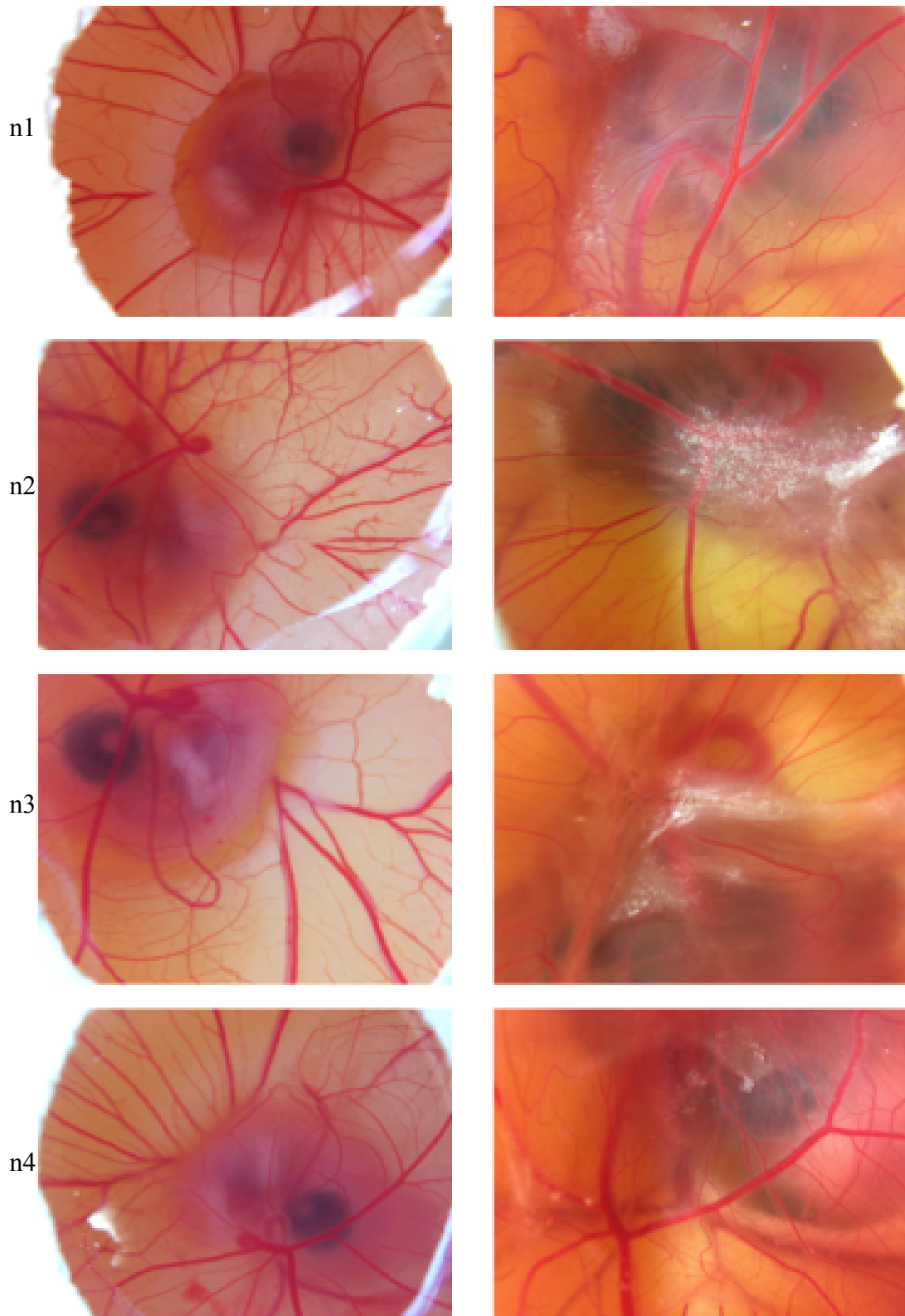


Abbildung 23 Eier der 5 Joule Gruppe vor und nach Bestrahlung

Fotographien der 10 Joule - Gruppe

0 Bestrahlungen

4 Bestrahlungen

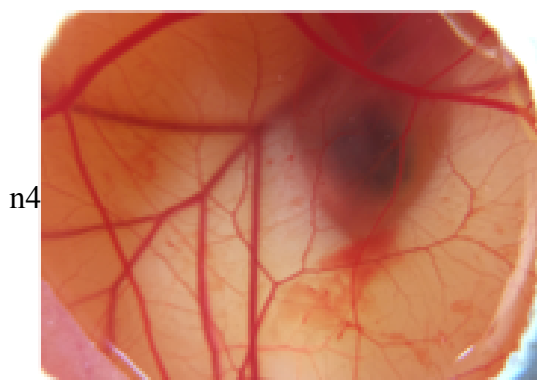
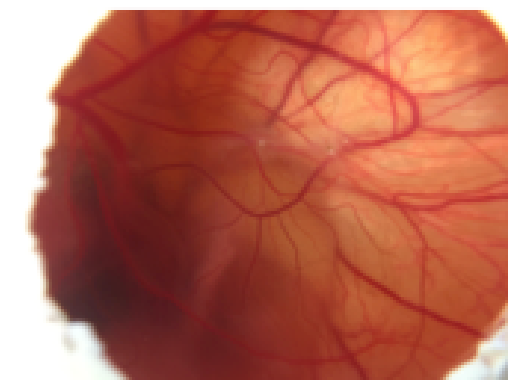
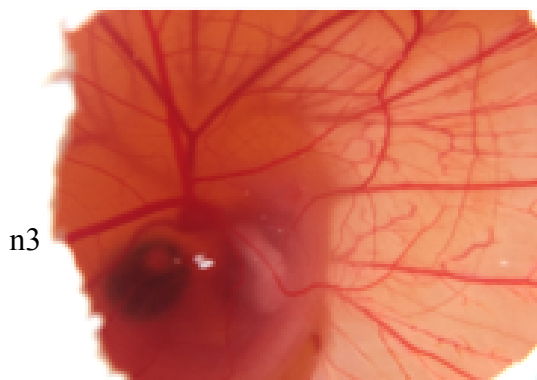
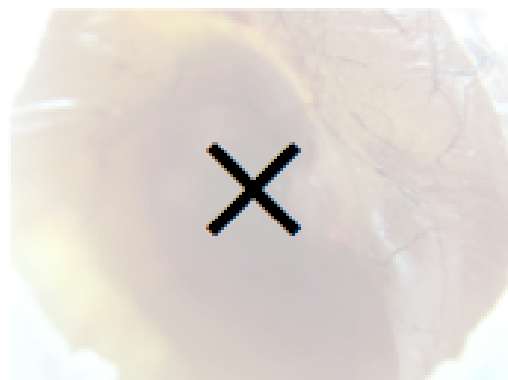
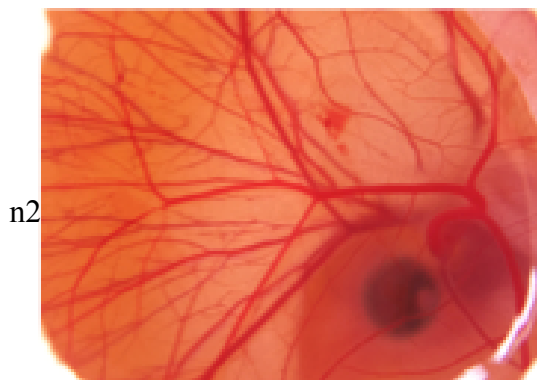
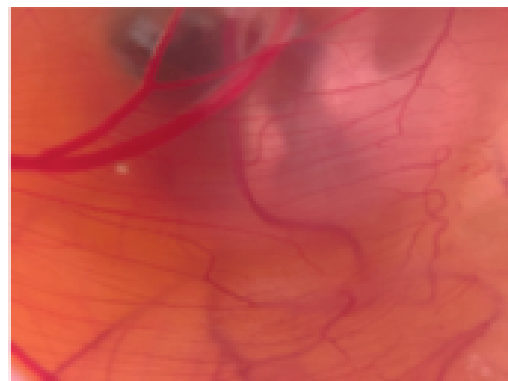
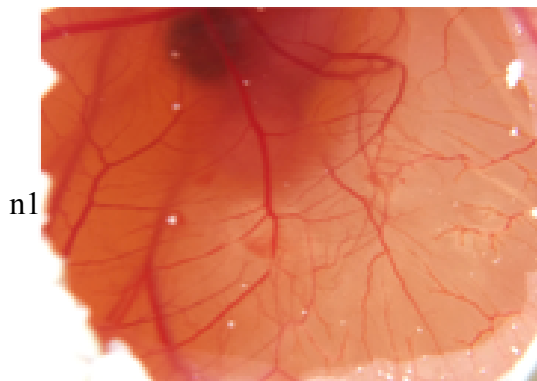


Abbildung 24 Eier der 10 Joule Gruppe vor und nach Bestrahlung

Fotographien der 40 Joule - Gruppe

0 Bestrahlungen

4 Bestrahlungen

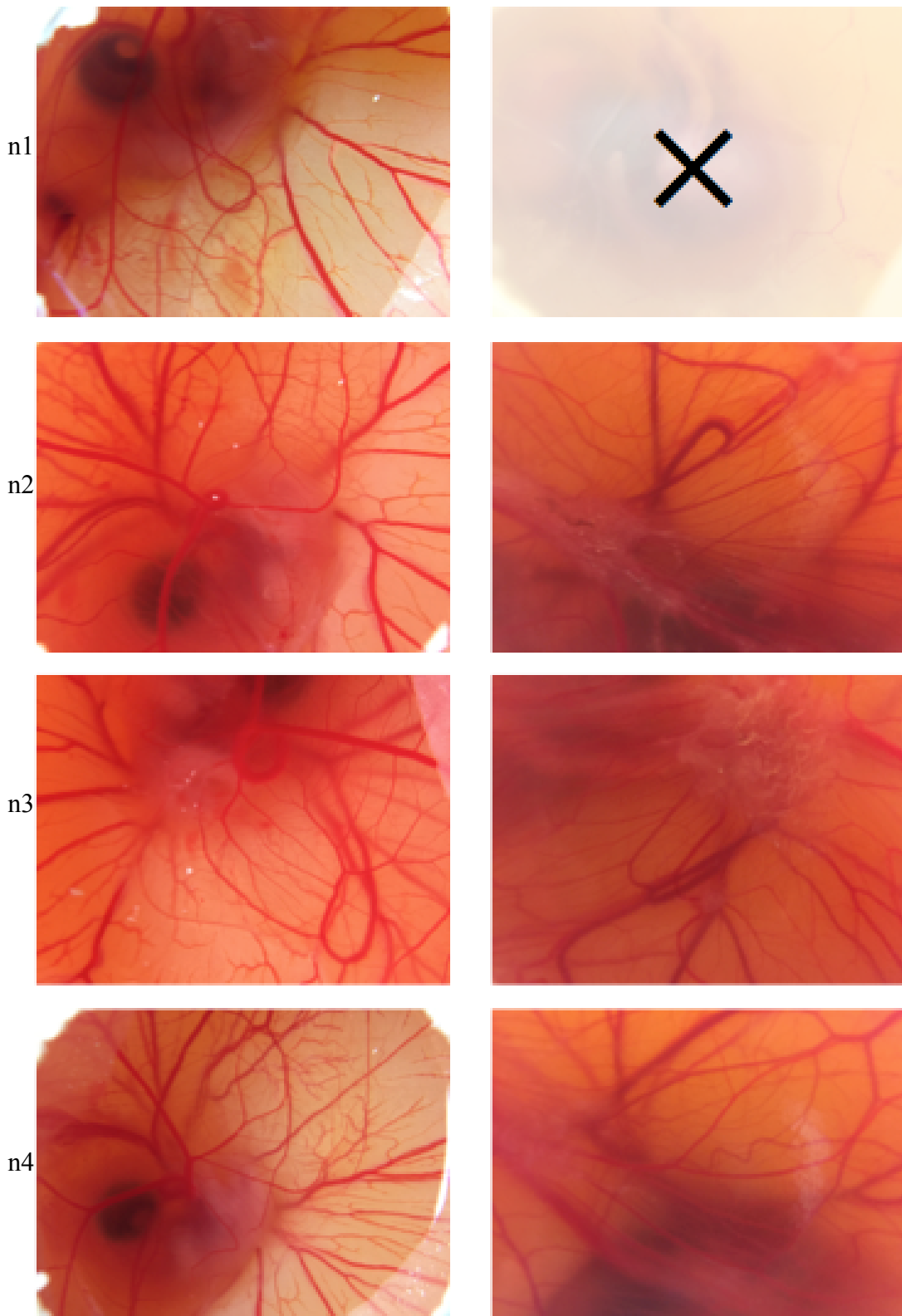


Abbildung 25 Eier der 40 Joule Gruppe vor und nach Bestrahlung

Fotographien der 80 Joule - Gruppe

0 Bestrahlungen

4 Bestrahlungen

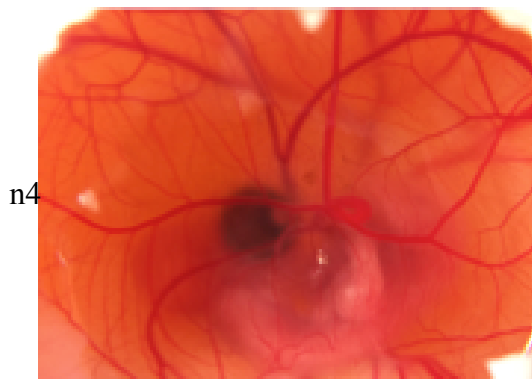
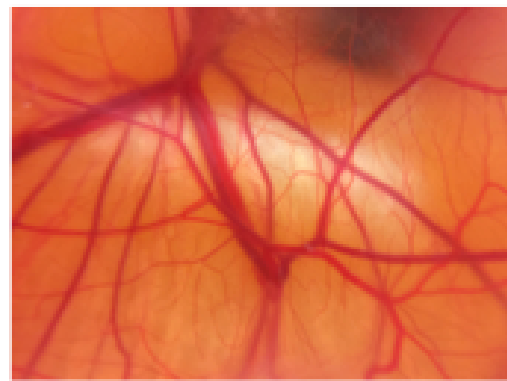
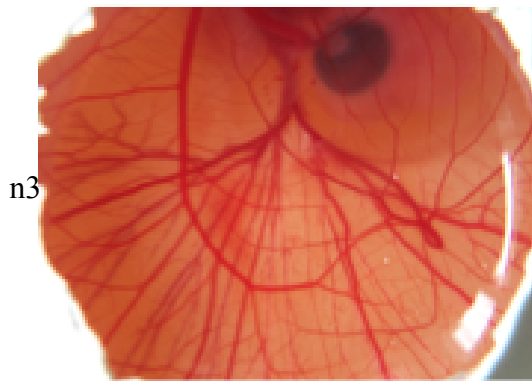
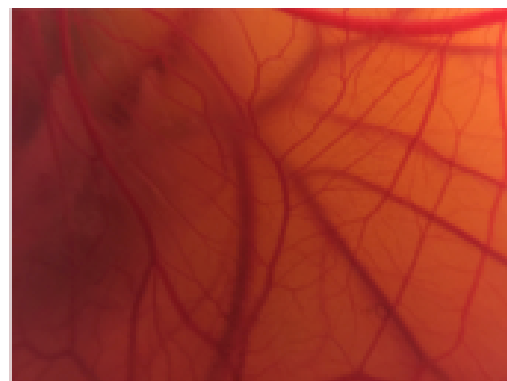
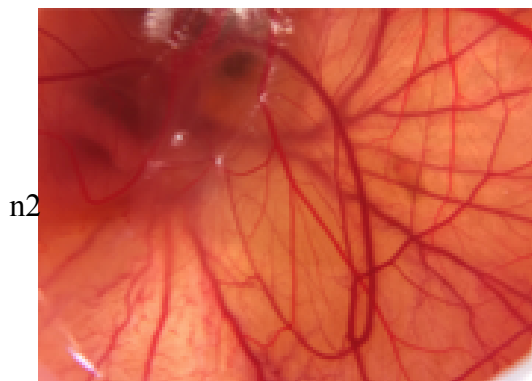
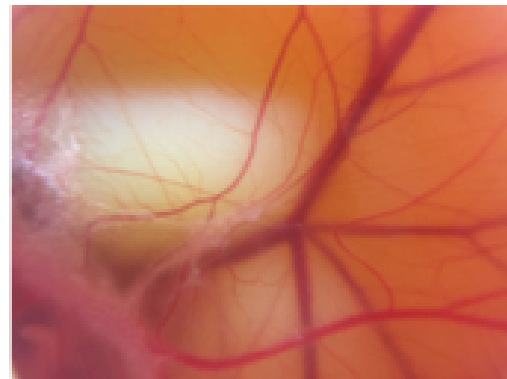
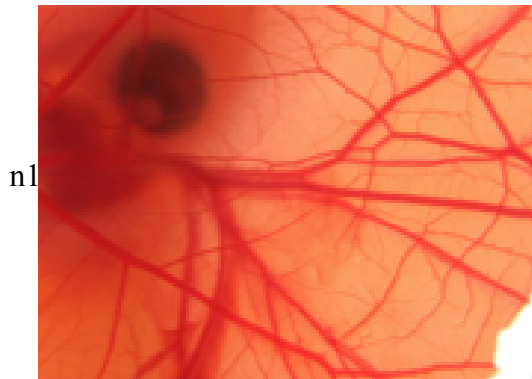


Abbildung 26 Eier der 80 Joule Gruppe vor und nach Bestrahlung

Die folgenden zwei Bilderreihen sollen die o.g. Beobachtung, anhand eines repräsentativen Ausschnittes aus dem gesamten Bildmaterial, verdeutlichen.

Eine objektive Auswertung lassen die Bilder, aufgrund der sich bewegenden Embryos, der unterschiedlich schnellen Austrocknung der Eier und des Sterbens von 2/3 der Embryos während der Versuchsphase, nicht zu. Dennoch hat der Betrachter den subjektiven Eindruck, dass sich bei den Eiern, die mit geringer (5 Joule und 10 Joule) Intensität bzw. nicht bestrahlt wurden, ein feines Gefäßnetz neu bildet. Diese, so der subjektive Eindruck, scheint sich bei den Eiern, die mit höherer Intensität bestrahlt wurden nicht zu bilden.



Abbildung 27 Entwicklung der Gefäße im CAM-Modell unter Bestrahlung mit 5 Joule



Abbildung 28 Entwicklung der Gefäße im CAM-Modell unter Bestrahlung mit 40 Joule

4. DISKUSSION

In der hier vorgelegten Arbeit konnte ich zeigen, dass die Bestrahlung mit blauem Licht die Proliferation von Endothelzellen in einer Endothelzellkultur dosisabhängig inhibiert.

Ich konnte ebenfalls zeigen, dass die Bestrahlung von Endothelzellkulturen mit blauem Licht zu einer erhöhten Apoptoserate führte.

Ein Einfluss der Lichtexposition auf die Synthese des Signalmoleküls VEGF konnte nicht eindeutig detektiert werden.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine einmalige Bestrahlung von aktivierten Endothelzellkulturen *in-vitro* mit blauem Licht keinen Einfluss auf die Bildung gefäßähnlicher Strukturen hatte, eine wiederholte Bestrahlung die Bildung gefäßähnlicher Strukturen hingegen supprimieren konnte.

Der Einfluss auf die *in-vivo* - Gefäßbildung in einem CAM-Modell konnte aufgrund methodologischer Probleme nicht eindeutig aufgeklärt werden, auch wenn deutliche Hinweise auf eine Reduktion der Angiogenese vorliegen.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte ich somit zeigen, dass die Proliferation von Endothelzellen und die Entstehung von Gefäßähnlichen Strukturen durch die Bestrahlung mit blauem Licht inhibiert werden können. Somit kann blaues Licht eine pharmafreie Therapieoption für alle Pathologien darstellen bei denen ein anti-angiogenetischer Effekt erwünscht ist.

Angiogenese ist ein wichtiger Bestandteil der Organentwicklung. Blutgefäße bilden die ersten Organe der Embryonalphase und im Weiteren das große Gefäßnetz des Körpers. Dieses entsteht durch die Differenzierung von endothelialen Progenitorzellen, welche sich durch einen physiologischen Reiz zu arteriellen oder venösen Endothelzellen differenzieren und an einen bestehenden Gefäßplexus anlagern (61). Wenn dieser Prozess allerdings dysreguliert abläuft, kann eine gestörte Angiogenese die Entstehung einer Vielzahl von Erkrankungen (Malignome, ischämische Erkrankungen, entzündliche Erkrankungen, u.a.) begünstigen (61) (62) (3).

Lichtbasierte Therapieformen sind keine Neuigkeit in der medizinischen Welt. Vor allem auf dem Gebiet der Dermatologie werden lichtbasierte Therapieformen seit Jahren erfolgreich angewendet (63) (64). Für blaues Licht konnte bis dato vor allem ein anti-inflammatorischer Effekt nachgewiesen werden. Dieser wird z.B. in der Behandlung der Akne vulgaris (65) oder von Patienten mit Psoriasis genutzt (66). Die Behandlung dermatologischer Krankheiten mit Licht ist naheliegend, da diese dem Licht gut zugänglich sind.

Leider ist das Therapiefenster für die Bestrahlung mit blauem Licht, aufgrund der geringen Eindringtiefe von wenigen Millimetern unter die Haut, klein. Dennoch ist es erstrebenswert dieses möglichst weit auszuschöpfen. Hier könnten z.B. oberflächliche Hauttumoren, Gefäßmalformationen o.ä. mögliche Anwendungsgebiete sein.

Das Ziel der Arbeit war es also herauszufinden, ob die Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 453nm einen Einfluss auf die Angiogenese hat. Hierzu wurden einzelne Stufen/Bestandteil der Angiogenese isoliert untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit konnte ich den Einfluss auf Ebene der Endothelzelle untersuchen. Hier konnte ich zeigen, dass die Proliferationsrate mit steigender Bestrahlungsintensität sinkt. Während sich die Zellzahl der Kontrollgruppe innerhalb von 6 Tagen auf das etwa 2,5-fache vergrößerte, konnten die mit einer Lichtdosis von 40 J/cm^2 bestrahlten Zellkulturen ihre Zahl nur etwa um das 1,5-fache steigern. Das Zellwachstum der mit 80 J/cm^2 bestrahlten Gruppe stagnierte wie o.g. im Bereich ihres Ausgangswertes. Diese Beobachtung ist kongruent zu den bisherigen Untersuchungsergebnissen hinsichtlich des Einflusses von blauem Licht auf die Proliferation verschiedener Zellarten. Ähnliche Ergebnisse, d.h. eine Inhibition der Proliferation, konnten bereits für menschliche Keratinozyten (43), Fibroblasten (47) (41) und mesenchymale Stammzellen (67) erarbeitet werden.

Mit Hilfe der Propidium-Jodid-Färbung konnte ich zeigen, dass nicht nur die Proliferationsrate mit steigender Bestrahlungsintensität sank, sondern dass auch der Anteil der apoptotischen Zellen anstieg. Auch diese Beobachtung passt zu den bisherigen Erkenntnissen bezüglich anderer Zellarten. So konnten die gleichen Beobachtungen bei aus Knochenmark gewonnenen mesenchymalen Stammzellen (67), kolorektalen Tumorzellen (68), malignen Melanomzellen (69) und retinalen Ganglionzellen (70) gemacht werden.

Die Toxizität des blauen Lichtes allein erklärt allerdings die Reduktion der Proliferationsrate nicht. Da der beobachtete inhibitorische Effekt im Proliferationsversuch wesentlich größer ist als die Zunahme der Apoptose, welche in der Propidium-Jodid-Färbung detektiert werden konnte. Dieses wird durch die bestehende Literatur ebenfalls nahegelegt. Da toxische Effekte vor allem bei Wellenlängen zwischen 400 und 440 nm beobachtet werden konnten. Nicht aber für 453 nm (42). Zu vermuten ist, dass die Bestrahlung Einfluss auf mehrere Stationen im Zellzyklus, mehrere Zellorganellen und Signalwege hat. Sie scheint einerseits die Zellteilung zu inhibieren, andererseits die Einleitung des Zelltodes zu induzieren. Schlüsselmoleküle an dieser Stelle scheinen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu sein. Hierzu finden sich einige Hinweis in der Literatur, wenn auch erneut für andere Gewebsarten. So konnte die Arbeitsgruppe um Lockwood *et al.* zeigen, dass die Bestrahlung mit blauem Licht zu einer dosis-abhängigen interzellulären ROS Steigerung sowohl in normalen Epithelzellen, als auch in Zellen des oral squamösen Carcinoms führt (71). Gleiches konnte für Zellen der Gingiva gezeigt werden. Hier konnte folgerichtig nicht nur eine Steigerung der intrazellulären ROS-Konzentration detektiert werden, sondern auch, daraus folgend, eine signifikante Reduktion der intrazellulären Glutathionmenge als eines der wichtigsten intrazellulären Antioxidantien (72).

Durch Bestrahlung mit blauem Licht reagieren endogene Photorezeptoren, wie die Cytochrom C Oxidase (73) (74), flavinhaltige Photosensoren (75) und Lipofuscin (76) mit den Photonen des blauen Lichtes. Hierbei werden die o.g. reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Reduktion der Photorezeptoren generiert. Krassovka *et al.* konnten zeigen, dass für blaues Licht mit einer Wellenlänge von 453nm vor allem das Coenzym Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) sein Absorptionsmaximum aufweist. Dieses FAD wird intrazellulär als Co-Faktor von vielen Flavoproteinen und –Enzymen (z.B. NADPH-Oxidase) genutzt (77). Diese sind wiederum zu großen Teilen in metabolische Abläufe wie die Atmungskette, den Citratzyklus oder die beta-Oxidation involviert. Es konnte gezeigt werden, dass FAD durch die Bestrahlung mit blauem Licht reduziert wird (78) (79). Als Folge kann es zu einer Entkopplung der Flavinhaltigen Enzyme kommen, die mit einer erhöhten Produktion von ROS assoziiert sein kann, da im Rahmen einer im Dunkeln stattfindenden Elektronenrekombination photoreduzierte Flavine verstärkt Superoxid und H₂O₂ generieren können (80).

Es ist zu vermuten, dass oxidativer Stress und ROS Grundlagen für die beobachteten Effekte der Bestrahlung sind (81). Einstrahlendes, nicht toxisches blaues Licht der Wellenlänge 453 nm interagiert mit intrazellulären flavinhaltigen oder flavinabhängigen Proteinen. Dies führt zu einem Anstieg der intrazellulären ROS und zu oxidativem Stress. Der unphysiologische hohe Gehalt an ROS kann nicht mehr durch die zelleigenen Antioxidantien neutralisiert werden und führt so zu Schäden an Zellorganellen, Proteinen, DNA und Zellmembran. Hierdurch werden Proliferation und Differenzierung der Endothelzelle inhibiert.

Die Versuchsergebnisse der VEGF-Produktion legen ebenfalls nahe, dass ROS eine zentrale Rolle bei der Bestrahlung mit blauem Licht spielen. Unsere Versuchsergebnisse legen nahe, dass die Bestrahlung mit blauem Licht die VEGF-Produktion der Endothelzellen ROS-vermittelt induziert bzw. aktiviert. Dies ist kongruent zu bereits veröffentlichten Untersuchungen. So konnte eine ROS-vermittelte VEGF-Produktion durch die Arbeitsgruppe um Zou *et al.* demonstriert werden. Diese untersuchten die VEGF-Produktion im Rahmen der Erforschung des akuten Herzinfarktes an einem Mausmodell, indem sie einen akuten Herzinfarkt durch Verschluss der linken Koronararterie herbeiführten. Die im Anschluss daran gemessenen Konzentrationen u.a. von VEGF-A und ROS, legten eine durch ROS vermittelte Steigerung der VEGF-Produktion nahe (82). Gleiche Beobachtungen konnten auch in der Erforschung von Brustkrebs gemacht werden. Hier konnte gezeigt werden, dass 27-Hydroxycholesterol als selektiver Östrogen-Rezeptor-Modulator in der Lage ist ROS zu generieren und es in dessen Folge zu einer über ROS vermittelten Induktion von VEGF und somit zur gesteigerten Angiogenese kommt (83).

Hier gibt es wohl zwei Wirkungsmechanismen, die letztendlich in einer Erhöhung der VEGF-Produktion münden. Die Erhöhung des intrazellulären ROS führt einerseits zu einer Aktivierung von NF- κ B (84) (85). NF- κ B seinerseits induziert die Bildung von VEGF (86) (87). Andererseits kommt es ROS-vermittelt zur Produktion von Hypoxie-induziertem-Faktor-1 α (HIF-1 α), welcher wiederum die autokrine Produktion von VEGF induziert (88).

Bezüglich der Entstehung gefäßähnlicher Strukturen wurden zwei unterschiedliche Versuchsmodelle verwendet. Im Matri-Gel-Versuch konnte kein Einfluss der Bestrahlung mit blauem Licht auf die Bildung gefäßähnlicher Strukturen detektiert

werden. Die einmalige Bestrahlung mit blauem Licht, unabhängig von der Bestrahlungsintensität, hatte also keinen Einfluss auf die Bildung von gefäßähnlichen Strukturen. Dieses Ergebnis ist kongruent zu den Proliferationsversuchen zu Beginn unserer Arbeit, bei denen ebenfalls kein Einfluss auf die Proliferationsrate der Endothelzellen nach einmaliger Bestrahlung festgestellt werden konnte. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ein Effekt der Bestrahlung einer gewissen Wiederholung der Bestrahlungen und damit Akkumulation der Intensitäten bedarf und dass eine einzige Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm auch höherer Dosis keinen Einfluss auf die Proliferation und Tubeformation hat.

Aus diesem Grunde wurde ein weiterer Versuch zur Untersuchung der Auswirkungen von blauem Licht auf die Formation gefäßähnlicher Strukturen durchgeführt. An dieser Stelle wurde sich für den oben beschriebenen V2a-Versuch entschieden, da dieser eine Bestrahlung über insgesamt 2 Wochen ermöglicht. Wie die Ergebnisse des Versuches deutlich zeigen, führte die mehrfache Bestrahlung mit blauem Licht auf Endothelzellen im oben beschriebenen Versuchsaufbau zu einer Reduktion der entstehenden gefäßähnlichen Strukturen im V2a-Versuch. Auch diese Beobachtung steht in direktem Zusammenhang mit der Entstehung von ROS durch die Bestrahlung. Unter physiologischen Bedingungen wirkt ROS über die Phosphorylierung des VEGF-Rezeptors 2 und die Induktion Redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren (u.a. NF- κ B) pro-angiogenetisch (89) (90). Allerdings ist zu vermuten, dass durch die Bestrahlung mit blauem Licht über den oben beschriebenen Wirkmechanismus ein Überangebot an ROS entsteht, welche durch die zelleigenen Antioxidantien nicht mehr reguliert werden kann und so zu Schäden an Zellproteinen, Zellmembranen und DNA führt.

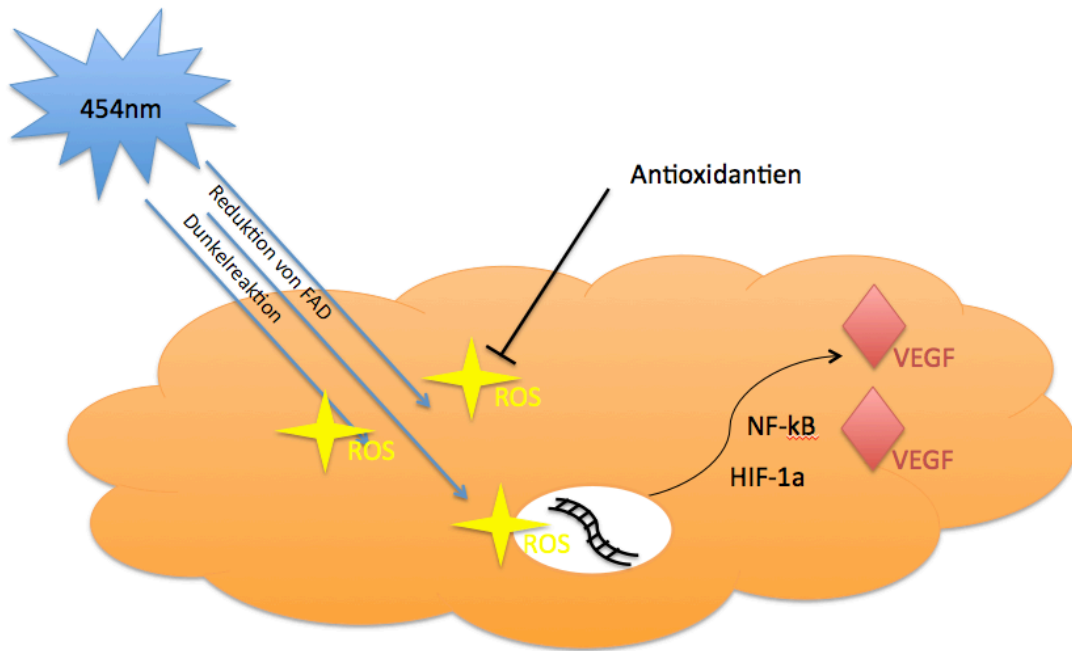


Abbildung 29 Schematische Darstellung der Induktion der VEGF-Produktion durch blaues Licht

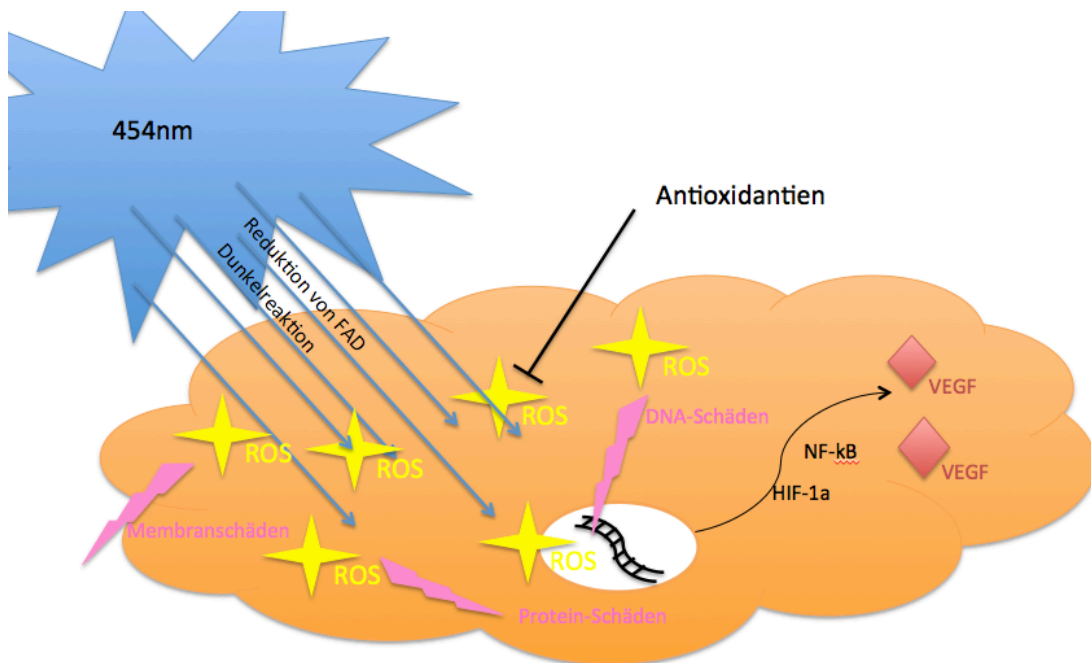


Abbildung 30 Schematische Darstellung der Schädigung der Zelle durch einen Überschuss an ROS durch die Bestrahlung mit blauem Licht, resultierend in einer Inhibition von Proliferation und Differenzierung

Im letzten Teil der Arbeit sollten die *in-vitro*-Ergebnisse in einem *in-vivo*-Modell überprüft werden. Dies gestaltete sich mit der Verwendung der kurz bebrüteten Hühnereier und des CAM-Modells als schwierig. Durch das Öffnen des Eis und die Bestrahlung durch die geschaffene Öffnung hindurch, sollte der Einfluss auf das Kapillarnetz eines lebenden Organismus in seinem natürlichen Milieu untersucht werden. Durch eine chronologische Fotodokumentation hätte man dann in der Auswertung die Anzahl der Gefäße, deren Abzweigungen und Ausmaß messen und auswerten können. Allerdings hat die Präparation der Eier dazu geführt, dass die Mehrzahl (etwa 2/3 der verwendeten Eier) vor Ende des Versuches ausgetrocknet sind oder anderweitig zu Schaden gekommen waren. Diese Problematik konnte durch das Bedecken der Öffnung mit einem Mikroskopier-Deckglas reduziert werden. Ein weiteres Problem war die Bewegung des Embryos im Ei, wodurch sich auch das Gefäßnetz immer bewegte. So war eine chronologische Fotodokumentation mit Dokumentation der gleichen Gefäßnetzabschnitte nur eingeschränkt möglich.

Folglich war eine objektive Auswertung, wie initial geplant, nicht möglich. Nichts desto trotz hat der Betrachter den subjektiven Eindruck, dass blaues Licht die Entstehung von kleinsten und kleinen Gefäßen auch in diesem Modell unterdrückt.

Betrachtet man unsere Ergebnisse hinsichtlich unterschiedlicher Möglichkeiten der klinischen Verwendung von blauem Licht, so konnten wir deutlich zeigen, dass blaues Licht durch die Reduktion der Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen eine mögliche Therapieoption solcher Pathologien sein könnte, die auf einer überschießenden Gefäßneubildung beruhen oder mit dieser verbunden sind. Eine therapeutische Anwendung bei Erkrankungen, die mit einer Minderdurchblutung des Gewebes assoziiert sind, wie z.B. bei kritischen Wunden zur Verbesserung der Wundheilung scheint vom momentanen Wissenstand kontraindiziert. Eine Vielzahl der kritischen Wunden beruht auf einer gestörten Angiogenese. (91). Vor Allem auf dem Feld der chronischen Wunden von Diabetikern konnte gezeigt werden, dass diese durch ein Induzieren der Angiogenese eine verbesserte Wundheilungstendenz aufweisen (92). Dieser Ansatz steht also im Gegensatz zu den von uns generierten Ergebnissen einer Suppression der Angiogenese durch die Bestrahlung mit blauem Licht.

Bei der klinischen Anwendung zur Suppression von Angiogenese sehen wir allerdings einige Möglichkeiten des blauen Lichtes.

Vor allem in der Therapie schnell wachsender Tumore ist einer der zentraler Angriffspunkte die Angiogenese des Tumorgewebes (93, 94) (95). Besonders schnell wachsende Tumore zeichnen sich außerdem durch eine hohe Konzentration bzw. Synthese von VEGF und VEGF-Rezeptoren aus (96) (97). Als Konsequenz hieraus kommt es zu einem schnellen Wachstum des Tumors und einer frühzeitigen Metastasierung (98) (99), was wiederum mit einer schlechten Prognose für die/den Patientin/Patienten einhergeht (100). Vor diesem Hintergrund konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der Angiogenese des Tumors nicht nur zu einer Verlangsamung des Tumorwachstums führt (101), sondern auch die Metastasierung des Tumors inhibiert und somit von großem therapeutischen Nutzen für die Patienten wäre (100). Da die Bestrahlung mit blauem Licht einen zentralen Punkt dieser Kaskade, nämlich die gesteigerte Angiogenese angreift, sehen wir hier ein mögliches klinisches Anwendungsgebiet.

Allerdings gibt es auch hier therapeutische Einschränkungen. So muss das zu bestrahlende Gewebe einer mehrmaligen Lichttherapie zugänglich sein. In erster Linie sehen wir hier Chancen bei kutanen Gefäßtumoren, da diese oberflächlich gelegen und somit einer Lichttherapie zugänglich sind und des Weiteren auf einer Dysregulation der Angiogenese beruhen (102). Ein gutes Beispiel hierfür ist das infantile Hämangiom, die häufigste Neoplasie bei Neugeborenen (103). Hierbei handelt es sich um einen angeborenen Defekt der Angiogenese mit Verlust der Angiogenese-Inhibition. In Folge dessen kommt es lokal zum Auftreten von vaskulären Tumoren, die in den ersten Tagen bis Wochen nach der Geburt ein starkes Wachstum aufweisen (104). Obwohl es sich um meist benigne Tumoren handelt, die sich in der Mehrzahl mit dem weiteren Leben (7-10 Jahre) spontan zurückbilden, stellen sie aufgrund ihrer Größe, der häufigen Lokalisation im Kopf-/Halsbereich (105) und möglichen Komplikationen (wie narbige Verheilung und Ulcerationen) eine deutliche Einschränkung der Lebensqualität der Betroffenen dar (106). Aktuell findet hier eine Behandlung je nach Lokalisation des Tumors chirurgisch, medikamentös oder abwartend statt (107) (108) (109). Hier könnte die Bestrahlung mit blauem Licht eine gute und weniger invasive Therapieoption sein. Aber auch bei anderen kutanen Tumoren könnte blaues Licht als zusätzliche Therapieoption genutzt werden. Hier

könnte blaues Licht eine zusätzliche Möglichkeit in der neoadjuvanten Therapie hoch maligner Tumoren, wie z.B. das kutane Angiosarkom (110), das Haemangioendotheliom (111) oder das AIDS-assoziierte Karposi-Sarkom (112) sein. Bezüglich der Zugänglichkeit für eine Lichttherapie kommen natürlich auch Tumoren andere Fachrichtungen wie der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie (Mundbodenkarzinome), der Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde (Pharynx- & Larynx-Karzinome), der Urologie (Prostata-Karzinome) oder der Gynäkologie (Mamma-Karzinome, Zervix-Karzinome) infrage.

Bevor es allerdings zu klinischen Studien und einer klinischen Anwendung kommen kann, sind weitere Untersuchungen notwendig. Vor Allem hinsichtlich der Auswirkung von Bestrahlung mit blauem Licht auf das umliegende Gewebe und auf andere Zellarten. Hier sind bereits einige Auswirkungen in der Literatur beschrieben. Diese beziehen sich vorrangig auf die Auswirkung der Bestrahlung mit blauem Licht auf Bindegewebszellen. Hier führt die Bestrahlung ebenfalls zum Anstieg von intrazellulärem oxidativen Stress in dermalen Fibroblasten (42), zur Inhibition der Proliferation von Fibroblasten (41) (47) und zu DNA-Schäden in Epithelzellen (45). Auch diese Auswirkungen scheinen primär für die Bestrahlung von Tumoren von Vorteil. Außerdem sollten die molekularen Grundlagen unserer Ergebnisse erforscht werden. Naheliegend ist hier wie bereits skizziert die zentrale Rolle reaktiver Sauerstoffspezies, welche durch die Bestrahlung mit blauem Licht frei werden und, wie schon oben ausführlich erwähnt, zu den beschriebenen Effekten führen.

5. KRISTISCHE BETRACHTUNG DER ARBEIT

In diesem Kapitel sollen Schwächen der Arbeit erwähnt werden. Grundsätzlich muss gesagt werden, dass alle Versuche nach bestem Wissen und Gewissen, nach Protokoll und unter den notwendigen Rahmenbedingungen durchgeführt wurden. Dennoch gibt es methodologische Schwächen, die sich aufgrund der Gegebenheiten nicht vermeiden ließen.

Die Verwendung von Zelllinien bietet dem Anwender sowohl Vor- als auch Nachteile. Vorteil ist, dass Zelllinien, wenn man sie kultiviert, im Grunde in unendlicher Menge zur Verfügung stehen. Somit war es möglich in Vorversuchen den optimalen Versuchsaufbau für die einzelnen Versuche zu ermitteln (hinsichtlich Zellzahl, Bestrahlungsintervall, Well-Größe, etc.). Allerdings können Zelllinien nur zu einem gewissen Grad die Primärzelle des Organismus widerspiegeln. Daher ist eine direkte Übertragung unserer Ergebnisse auf den menschlichen Organismus schwierig, da die Zelle im Menschen zahlreichen Einflüssen ausgesetzt ist, die so in einer Zellkultur nicht erzeugt werden kann.

Gleiches gilt für die Anwendung von MatriGel und dem V2a-Angiogenese-Kit. Auch hier handelt es sich um artifizielle Produkte. Diese sind zwar der Extrazellulärmatrix des menschlichen Organismus nachempfunden, verhalten sich aber nicht 1:1 wie die Kollagenumgebung im menschlichen Körper.

Die Verwendung der kurz bebrüteten Hühnereier und des CAM-Modells zur Übertragung der *in-vitro*-Ergebnisse auf ein *in-vivo*-Modell gestaltete sich schwierig. Hier muss konstatiert werden, dass sich das ausgewählte Modell für den Zweck nur bedingt eignet, was aus unserer Sicht mehrere Gründe hat. In nur 1/3 der Fälle erreichte das Versuchsobjekt den Endpunkt. Dies ist sicherlich einerseits der händischen Präparation, andererseits der Versuchsdauer und somit der Austrocknungsgefahr anzulasten. Des Weiteren ist der Blick auf das Gefäßnetz aufgrund der Bewegung des Embryos nicht konstant der Gleiche. Dies macht eine objektive Auswertung (z.B. durch Zählen der Kollateralen, Zählen der Abzweigungen, o.ä.) unmöglich. Somit ist der gewählte Versuch nicht geeignet valide Ergebnisse zu liefern und kann maximal auf subjektiver Basis die Ergebnisse der vorhergegangenen Versuche bestätigen.

6. SCHLUSSFOLGERUNG

In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass die Bestrahlung mit blauem Licht einer Wellenlänge von 453 nm Endothelzellen und deren Angiogenese beeinflusst.

Ich konnte zeigen, dass es durch die Bestrahlung mit blauem Licht zu einer Inhibition der Proliferation von Endothelzellen kommt. Außerdem konnte ich zeigen, dass die Proliferation bei höherer Intensität der Bestrahlung stärker inhibiert wird.

Es konnte bestätigt werden, dass Bestrahlung mit blauem Licht zu einer Induktion der Apoptose der lichtexponierten Endothelzellen führte.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Bestrahlung mit blauem Licht einen inhibitorischen Einfluss auf die Formierung gefäßähnlicher Strukturen hat.

Die Übertragung der Ergebnisse auf ein *in-vivo*-Modell gestaltete sich allerdings nicht zufriedenstellend und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Die molekulare Grundlage der Beobachtungen basiert höchstwahrscheinlich auf einer erhöhten Licht-induzierten Generierung von intrazellulären ROS und oxidativem Stress. Die genauen molekularen Grundlagen sollten Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Für die klinische Anwendung gibt es meiner Meinung nach großes Potential für oberflächliche Pathologien. Hierzu zählen aus meiner Sicht v.a. alle oberflächlichen Hauttumoren (z.B. das maligne Melanom) und Gefäßmalformationen (z.B. infantile Hämangiome, aber auch Tumoren die über eine physiologische Körperöffnung zugänglich wären wie z.B. Mundbodenkarzinome, Prostata-Karzinome, Zervixkarzinome u.v.m.

7. DANKSAGUNG

Bedanken werde ich mich persönlich.

Hier alle Menschen, denen ich besonderen Dank schulde:

Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek, Dr. Julia Krassovka, Samira Seghrouchni,
Jutta Schneider, Christa Wilkens – für die Hilfe

Meinen Kolleginnen und Kollegen – für den Ansporn

Meiner Familie und meiner Freundin – für die Möglichkeit und mein wundervolles
Leben

ANHANG/LITERATURVERZEICHNIS

1. Norrby K. In vivo models of angiogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2006;10(3):588-612. Epub 2006/09/23. PubMed PMID: 16989723; PubMed Central PMCID: PMCPMC3933145.
2. Folkman J. Toward a new understanding of vascular proliferative disease in children. *Pediatrics*. 1984;74(5):850-6. PubMed PMID: 6208529.
3. Timar J, Dome B, Fazekas K, Janovics A, Paku S. Angiogenesis-dependent diseases and angiogenesis therapy. *Pathology oncology research : POR*. 2001;7(2):85-94. Epub 2001/07/18. PubMed PMID: 11458270.
4. Mateescu RB, Bastian AE, Nichita L, Marinescu M, Rouhani F, Voiosu AM, et al. Vascular endothelial growth factor - key mediator of angiogenesis and promising therapeutical target in ulcerative colitis. *Rom J Morphol Embryol*. 2017;58(4):1339-45. PubMed PMID: 29556626.
5. Alvarez Arroyo MV, Caramelo C, Angeles Castilla M, Gonzalez Pacheco FR, Martin O, Arias J. Role of vascular endothelial growth factor in the response to vessel injury. *Kidney Int Suppl*. 1998;68:S7-9. PubMed PMID: 9839275.
6. Demeule M, Regina A, Annabi B, Bertrand Y, Bojanowski MW, Beliveau R. Brain endothelial cells as pharmacological targets in brain tumors. *Mol Neurobiol*. 2004;30(2):157-83. doi: 10.1385/MN:30:2:157. PubMed PMID: 15475625.
7. Helisch A, Schaper W. Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries. *Microcirculation*. 2003;10(1):83-97. doi: 10.1038/sj.mn.7800173. PubMed PMID: 12610665.
8. Shubbar E, Vegfors J, Carlstrom M, Petersson S, Enerback C. Psoriasis (S100A7) increases the expression of ROS and VEGF and acts through RAGE to promote endothelial cell proliferation. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;134(1):71-80. doi: 10.1007/s10549-011-1920-5. PubMed PMID: 22189627.
9. Yehya AHS, Asif M, Petersen SH, Subramaniam AV, Kono K, Majid A, et al. Angiogenesis: Managing the Culprits behind Tumorigenesis and Metastasis. *Medicina (Kaunas)*. 2018;54(1). doi: 10.3390/medicina54010008. PubMed PMID: 30344239; PubMed Central PMCID: PMCPMC6037250.
10. Kiso M, Tanaka S, Saji S, Toi M, Sato F. Long isoform of VEGF stimulates cell migration of breast cancer by filopodia formation via NRP1/ARHGAP17/Cdc42 regulatory network. *Int J Cancer*. 2018;143(11):2905-18. doi: 10.1002/ijc.31645. PubMed PMID: 29971782; PubMed Central PMCID: PMCPMC6282968.

11. Ferrara N, Gerber HP. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol.* 2001;106(4):148-56. doi: 10.1159/000046610. PubMed PMID: 11815711.
12. Otrrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol Dis.* 2007;38(3):258-68. doi: 10.1016/j.bcmd.2006.12.003. PubMed PMID: 17344076.
13. Banys-Paluchowski M, Witzel I, Riethdorf S, Pantel K, Rack B, Janni W, et al. The clinical relevance of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) in correlation to circulating tumor cells and other serum biomarkers in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2018. doi: 10.1007/s10549-018-4882-z. PubMed PMID: 30003393.
14. Liu D, Wang N, Sun Y, Guo T, Zhu X, Guo J. Expression of VEGF with tumor incidence, metastasis and prognosis in human gastric carcinoma. *Cancer Biomark.* 2018;22(4):693-700. doi: 10.3233/CBM-171163. PubMed PMID: 29914006.
15. Assareh E, Mehrnejad F, Mansouri K, Esmaeili Rastaghi AR, Naderi-Manesh H, Asghari SM. A cyclic peptide reproducing the alpha1 helix of VEGF-B binds to VEGFR-1 and VEGFR-2 and inhibits angiogenesis and tumor growth. *Biochem J.* 2019. doi: 10.1042/BCJ20180823. PubMed PMID: 30700502.
16. Ferrara N. VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology.* 2005;69 Suppl 3:11-6. doi: 10.1159/000088479. PubMed PMID: 16301831.
17. Morabito A, De Maio E, Di Maio M, Normanno N, Perrone F. Tyrosine kinase inhibitors of vascular endothelial growth factor receptors in clinical trials: current status and future directions. *Oncologist.* 2006;11(7):753-64. doi: 10.1634/theoncologist.11-7-753. PubMed PMID: 16880234.
18. Frumovitz M, Sood AK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway as a therapeutic target in gynecologic malignancies. *Gynecol Oncol.* 2007;104(3):768-78. doi: 10.1016/j.ygyno.2006.10.062. PubMed PMID: 17306693; PubMed Central PMCID: PMC1851902.
19. Auerbach R, Akhtar N, Lewis RL, Shinnars BL. Angiogenesis assays: problems and pitfalls. *Cancer Metastasis Rev.* 2000;19(1-2):167-72. PubMed PMID: 11191056.
20. Folkman J, Haudenschild C. Angiogenesis in vitro. *Nature.* 1980;288(5791):551-6. PubMed PMID: 6160403.
21. Gentile MT, Pastorino O, Bifulco M, Colucci-D'Amato L. HUVEC Tube-formation Assay to Evaluate the Impact of Natural Products on Angiogenesis. *J Vis Exp.* 2019(148). doi: 10.3791/58591. PubMed PMID: 31282895.
22. Vrekoussis T, Stathopoulos EN, De Giorgi U, Kafousi M, Pavlaki K, Kalogeraki A, et al. Modulation of vascular endothelium by imatinib: a study on the EA.hy 926 endothelial cell line. *J Chemother.* 2006;18(1):56-65. doi: 10.1179/joc.2006.18.1.56. PubMed PMID: 16572895.

23. Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(12):3734-7. doi: 10.1073/pnas.80.12.3734. PubMed PMID: 6407019; PubMed Central PMCID: PMCPMC394125.
24. Mahmoud BH, Hexsel CL, Hamzavi IH, Lim HW. Effects of visible light on the skin. *Photochem Photobiol*. 2008;84(2):450-62. doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00286.x. PubMed PMID: 18248499.
25. Svobodova A, Walterova D, Vostalova J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2006;150(1):25-38. PubMed PMID: 16936899.
26. Pattison DI, Davies MJ. Actions of ultraviolet light on cellular structures. *EXS*. 2006(96):131-57. PubMed PMID: 16383017.
27. Guerra KC, Crane JS. Sunburn. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2018.
28. Tornaletti S, Pfeifer GP. UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. *Bioessays*. 1996;18(3):221-8. doi: 10.1002/bies.950180309. PubMed PMID: 8867736.
29. Lanza A, Tornaletti S, Rodolfo C, Scanavini MC, Pedrini AM. Human DNA topoisomerase I-mediated cleavages stimulated by ultraviolet light-induced DNA damage. *J Biol Chem*. 1996;271(12):6978-86. PubMed PMID: 8636127.
30. Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol*. 1999;187(1):112-26. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199901)187:1<112::AID-PATH250>3.0.CO;2-3. PubMed PMID: 10341712.
31. Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004;195(3):298-308. doi: 10.1016/j.taap.2003.08.019. PubMed PMID: 15020192.
32. Halliday GM. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. *Mutat Res*. 2005;571(1-2):107-20. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.09.013. PubMed PMID: 15748642.
33. Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med Sci*. 2003;18(2):95-9. doi: 10.1007/s10103-003-0262-x. PubMed PMID: 12928819.
34. Pereira AN, Eduardo Cde P, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med*. 2002;31(4):263-7. doi: 10.1002/lsm.10107. PubMed PMID: 12355572.
35. Grossman N, Schneid N, Reuveni H, Halevy S, Lubart R. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. *Lasers Surg Med*. 1998;22(4):212-8. PubMed PMID: 9603282.

36. Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(2):161-6. doi: 10.1089/pho.2005.23.161. PubMed PMID: 15910179.
37. Tuby H, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers Surg Med.* 2007;39(4):373-8. doi: 10.1002/lsm.20492. PubMed PMID: 17457844.
38. Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci.* 2009;16:4. doi: 10.1186/1423-0127-16-4. PubMed PMID: 19272168; PubMed Central PMCID: PMCPMC2644974.
39. Wataha JC, Lewis JB, Lockwood PE, Hsu S, Messer RL, Rueggeberg FA, et al. Blue light differentially modulates cell survival and growth. *J Dent Res.* 2004;83(2):104-8. doi: 10.1177/154405910408300204. PubMed PMID: 14742645.
40. Wataha JC, Lockwood PE, Lewis JB, Rueggeberg FA, Messer RL. Biological effects of blue light from dental curing units. *Dent Mater.* 2004;20(2):150-7. PubMed PMID: 14706798.
41. Taoufik K, Mavrogonatou E, Eliades T, Papagiannoulis L, Eliades G, Kletsas D. Effect of blue light on the proliferation of human gingival fibroblasts. *Dent Mater.* 2008;24(7):895-900. doi: 10.1016/j.dental.2007.10.006. PubMed PMID: 18164382.
42. Oplander C, Hidding S, Werners FB, Born M, Pallua N, Suschek CV. Effects of blue light irradiation on human dermal fibroblasts. *J Photochem Photobiol B.* 2011;103(2):118-25. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2011.02.018. PubMed PMID: 21421326.
43. Liebmann J, Born M, Kolb-Bachofen V. Blue-light irradiation regulates proliferation and differentiation in human skin cells. *The Journal of investigative dermatology.* 2010;130(1):259-69. Epub 2009/08/14. doi: 10.1038/jid.2009.194. PubMed PMID: 19675580.
44. Bonatti S, Hochman B, Tucci-Viegas VM, Furtado F, Pinfieldi CE, Pedro AC, et al. In vitro effect of 470 nm LED (Light Emitting Diode) in keloid fibroblasts. *Acta Cir Bras.* 2011;26(1):25-30. PubMed PMID: 21271200.
45. Godley BF, Shamsi FA, Liang FQ, Jarrett SG, Davies S, Boulton M. Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells. *J Biol Chem.* 2005;280(22):21061-6. doi: 10.1074/jbc.M502194200. PubMed PMID: 15797866.
46. Sparsa A, Faucher K, Sol V, Durox H, Boulinguez S, Doffoel-Hantz V, et al. Blue light is phototoxic for B16F10 murine melanoma and bovine endothelial cell lines by direct cytotoxic effect. *Anticancer Res.* 2010;30(1):143-7. PubMed PMID: 20150629.
47. Mamalis A, Garcha M, Jagdeo J. Light emitting diode-generated blue light modulates fibrosis characteristics: fibroblast proliferation, migration speed, and reactive oxygen species generation. *Lasers Surg Med.* 2015;47(2):210-5. doi: 10.1002/lsm.22293. PubMed PMID: 25655579; PubMed Central PMCID: PMCPMC4990457.

48. Vila N, Siblino A, Esposito E, Bravo-Filho V, Zoroquiain P, Aldrees S, et al. Blue-light filtering alters angiogenic signaling in human retinal pigmented epithelial cells culture model. *BMC Ophthalmol.* 2017;17(1):198. doi: 10.1186/s12886-017-0592-2. PubMed PMID: 29096624; PubMed Central PMCID: PMC5667496.
49. Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg.* 2005;31(3):334-40. PubMed PMID: 15841638.
50. Whelan HT, Smits RL, Jr., Buchman EV, Whelan NT, Turner SG, Margolis DA, et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *J Clin Laser Med Surg.* 2001;19(6):305-14. doi: 10.1089/104454701753342758. PubMed PMID: 11776448.
51. Kubota J. Effects of diode laser therapy on blood flow in axial pattern flaps in the rat model. *Lasers Med Sci.* 2002;17(3):146-53. doi: 10.1007/s101030200024. PubMed PMID: 12181629.
52. Mirsky N, Krispel Y, Shoshany Y, Maltz L, Oron U. Promotion of angiogenesis by low energy laser irradiation. *Antioxid Redox Signal.* 2002;4(5):785-90. doi: 10.1089/152308602760598936. PubMed PMID: 12470506.
53. Schindl A, Merwald H, Schindl L, Kaun C, Wojta J. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. *Br J Dermatol.* 2003;148(2):334-6. PubMed PMID: 12588388.
54. Rohringer S, Holnthoner W, Chaudary S, Slezak P, Priglinger E, Strassl M, et al. The impact of wavelengths of LED light-therapy on endothelial cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):10700. doi: 10.1038/s41598-017-11061-y. PubMed PMID: 28878330; PubMed Central PMCID: PMC5587748.
55. Winter R, Dungal P, Reischies FMJ, Rohringer S, Slezak P, Smolle C, et al. Photobiomodulation (PBM) promotes angiogenesis in-vitro and in chick embryo chorioallantoic membrane model. *Sci Rep.* 2018;8(1):17080. doi: 10.1038/s41598-018-35474-5. PubMed PMID: 30459437; PubMed Central PMCID: PMC56244005.
56. Dungal P, Hartinger J, Chaudary S, Slezak P, Hofmann A, Hausner T, et al. Low level light therapy by LED of different wavelength induces angiogenesis and improves ischemic wound healing. *Lasers in Surgery and Medicine.* 2014;46(10):773-80. doi: 10.1002/lsm.22299.
57. Mittermayr R, Osipov A, Piskernik C, Haindl S, Dungal P, Weber C, et al. Blue laser light increases perfusion of a skin flap via release of nitric oxide from hemoglobin. *Mol Med.* 2007;13(1-2):22-9. doi: 10.2119/2006-00035.Mittermayr. PubMed PMID: 17515954; PubMed Central PMCID: PMC1869628.

58. Adamskaya N, Dungal P, Mittermayr R, Hartinger J, Feichtinger G, Wassermann K, et al. Light therapy by blue LED improves wound healing in an excision model in rats. *Injury*. 2011;42(9):917-21. PubMed PMID: 22081819.
59. Wongjampa W, Ekalaksananan T, Chopjitt P, Chuerduangphui J, Kleebkaow P, Patarapadungkit N, et al. Suppression of miR-22, a tumor suppressor in cervical cancer, by human papillomavirus 16 E6 via a p53/miR-22/HDAC6 pathway. *PLoS One*. 2018;13(10):e0206644. doi: 10.1371/journal.pone.0206644. PubMed PMID: 30379969; PubMed Central PMCID: PMC6209303.
60. Zaminy A, Ragerdi Kashani I, Barbarestani M, Hedayatpour A, Mahmoudi R, Farzaneh Nejad A. Osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells: melatonin as a differentiation factor. *Iran Biomed J*. 2008;12(3):133-41. PubMed PMID: 18762816.
61. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003;9(6):653-60.
62. Folkman J. Angiogenesis-dependent diseases. *Seminars in oncology*. 2001;28(6):536-42. Epub 2001/12/12. PubMed PMID: 11740806.
63. Pei S, Inamadar AC, Adya KA, Tsoukas MM. Light-based therapies in acne treatment. *Indian Dermatol Online J*. 2015;6(3):145-57. doi: 10.4103/2229-5178.156379. PubMed PMID: 26009707; PubMed Central PMCID: PMC4439741.
64. Alexis AF. Lasers and light-based therapies in ethnic skin: treatment options and recommendations for Fitzpatrick skin types V and VI. *Br J Dermatol*. 2013;169 Suppl 3:91-7. doi: 10.1111/bjd.12526. PubMed PMID: 24098905.
65. Omi T, Bjerring P, Sato S, Kawana S, Hankins RW, Honda M. 420 nm intense continuous light therapy for acne. *J Cosmet Laser Ther*. 2004;6(3):156-62. doi: 10.1080/14764170410023785. PubMed PMID: 15545101.
66. Weinstabl A, Hoff-Lesch S, Merk HF, von Felbert V. Prospective randomized study on the efficacy of blue light in the treatment of psoriasis vulgaris. *Dermatology*. 2011;223(3):251-9. doi: 10.1159/000333364. PubMed PMID: 22105015.
67. Yuan Y, Yan G, Gong R, Zhang L, Liu T, Feng C, et al. Effects of Blue Light Emitting Diode Irradiation On the Proliferation, Apoptosis and Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2017;43(1):237-46. doi: 10.1159/000480344. PubMed PMID: 28854417.
68. Yan G, Zhang L, Feng C, Gong R, Idiatullina E, Huang Q, et al. Blue light emitting diodes irradiation causes cell death in colorectal cancer by inducing ROS production and DNA damage. *Int J Biochem Cell Biol*. 2018;103:81-8. doi: 10.1016/j.biocel.2018.08.006. PubMed PMID: 30125666.
69. Hiruma H, Katakura T, Takenami T, Igawa S, Kanoh M, Fujimura T, et al. Vesicle disruption, plasma membrane bleb formation, and acute cell death caused by illumination with

- blue light in acridine orange-loaded malignant melanoma cells. *J Photochem Photobiol B*. 2007;86(1):1-8. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2006.08.003. PubMed PMID: 16982198.
70. Del Olmo-Aguado S, Nunez-Alvarez C, Osborne NN. Blue Light Action on Mitochondria Leads to Cell Death by Necroptosis. *Neurochem Res*. 2016;41(9):2324-35. doi: 10.1007/s11064-016-1946-5. PubMed PMID: 27216620.
71. Lockwood DB, Wataha JC, Lewis JB, Tseng WY, Messer RL, Hsu SD. Blue light generates reactive oxygen species (ROS) differentially in tumor vs. normal epithelial cells. *Dent Mater*. 2005;21(7):683-8. doi: 10.1016/j.dental.2004.07.022. PubMed PMID: 15978279.
72. Yoshida A, Shiotsu-Ogura Y, Wada-Takahashi S, Takahashi SS, Toyama T, Yoshino F. Blue light irradiation-induced oxidative stress in vivo via ROS generation in rat gingival tissue. *J Photochem Photobiol B*. 2015;151:48-53. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.07.001. PubMed PMID: 26163948.
73. Karu TI, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. A novel mitochondrial signaling pathway activated by visible-to-near infrared radiation. *Photochem Photobiol*. 2004;80(2):366-72. doi: 10.1562/2004-03-25-RA-123. PubMed PMID: 15362946.
74. Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. *Photochem Photobiol Sci*. 2004;3(2):211-6. doi: 10.1039/b306126d. PubMed PMID: 14872239.
75. Losi A. Flavin-based Blue-Light photosensors: a photobiophysics update. *Photochem Photobiol*. 2007;83(6):1283-300. doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00196.x. PubMed PMID: 18028200.
76. Boulton M, Rozanowska M, Rozanowski B, Wess T. The photoreactivity of ocular lipofuscin. *Photochem Photobiol Sci*. 2004;3(8):759-64. doi: 10.1039/b400108g. PubMed PMID: 15295632.
77. Lienhart WD, Gudipati V, Macheroux P. The human flavoproteome. *Arch Biochem Biophys*. 2013;535(2):150-62. doi: 10.1016/j.abb.2013.02.015. PubMed PMID: 23500531; PubMed Central PMCID: PMC3684772.
78. Massey V, Stankovich M, Hemmerich P. Light-mediated reduction of flavoproteins with flavins as catalysts. *Biochemistry*. 1978;17(1):1-8. doi: 10.1021/bi00594a001. PubMed PMID: 618535.
79. Kutta RJ, Archipowa N, Scrutton NS. The sacrificial inactivation of the blue-light photosensor cryptochrome from *Drosophila melanogaster*. *Phys Chem Chem Phys*. 2018;20(45):28767-76. doi: 10.1039/c8cp04671a. PubMed PMID: 30417904; PubMed Central PMCID: PMC6250122.
80. Krassovka JM, Suschek CV, Prost M, Grotheer V, Schiefer JL, Demir E, et al. The impact of non-toxic blue light (453 nm) on cellular antioxidative capacity, TGF-beta1

- signaling, and myofibrogenesis of human skin fibroblasts. *J Photochem Photobiol B*. 2020;209:111952. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2020.111952. PubMed PMID: 32659647.
81. Rezatabar S, Karimian A, Rameshknia V, Parsian H, Majidinia M, Kopi TA, et al. RAS/MAPK signaling functions in oxidative stress, DNA damage response and cancer progression. *J Cell Physiol*. 2019. doi: 10.1002/jcp.28334. PubMed PMID: 30811039.
82. Zou J, Fei Q, Xiao H, Wang H, Liu K, Liu M, et al. VEGF-A promotes angiogenesis after acute myocardial infarction through increasing ROS production and enhancing ER stress-mediated autophagy. *J Cell Physiol*. 2019;234(10):17690-703. doi: 10.1002/jcp.28395. PubMed PMID: 30793306.
83. Zhu D, Shen Z, Liu J, Chen J, Liu Y, Hu C, et al. The ROS-mediated activation of STAT-3/VEGF signaling is involved in the 27-hydroxycholesterol-induced angiogenesis in human breast cancer cells. *Toxicol Lett*. 2016;264:79-86. doi: 10.1016/j.toxlet.2016.11.006. PubMed PMID: 27856279.
84. Ali F, Sultana S. Repeated short-term stress synergizes the ROS signalling through up regulation of NFkB and iNOS expression induced due to combined exposure of trichloroethylene and UVB rays. *Mol Cell Biochem*. 2012;360(1-2):133-45. doi: 10.1007/s11010-011-1051-7. PubMed PMID: 21947658.
85. Liu Z, Huang Y, Jiao Y, Chen Q, Wu D, Yu P, et al. Polystyrene nanoplastic induces ROS production and affects the MAPK-HIF-1/NFkB-mediated antioxidant system in *Daphnia pulex*. *Aquat Toxicol*. 2020;220:105420. doi: 10.1016/j.aquatox.2020.105420. PubMed PMID: 31986404.
86. Novotny NM, Markel TA, Crisostomo PR, Meldrum DR. Differential IL-6 and VEGF secretion in adult and neonatal mesenchymal stem cells: role of NFkB. *Cytokine*. 2008;43(2):215-9. doi: 10.1016/j.cyto.2008.05.015. PubMed PMID: 18621544.
87. Leychenko A, Konorev E, Jijiwa M, Matter ML. Stretch-induced hypertrophy activates NFkB-mediated VEGF secretion in adult cardiomyocytes. *PLoS One*. 2011;6(12):e29055. doi: 10.1371/journal.pone.0029055. PubMed PMID: 22174951; PubMed Central PMCID: PMC3236775.
88. Calvani M, Comito G, Giannoni E, Chiarugi P. Time-dependent stabilization of hypoxia inducible factor-1alpha by different intracellular sources of reactive oxygen species. *PLoS One*. 2012;7(10):e38388. doi: 10.1371/journal.pone.0038388. PubMed PMID: 23144690; PubMed Central PMCID: PMC3483303.
89. Tuttle JL, Sanders BM, Burkhart HM, Fath SW, Kerr KA, Watson WC, et al. Impaired collateral artery development in spontaneously hypertensive rats. *Microcirculation*. 2002;9(5):343-51. doi: 10.1038/sj.mn.7800151. PubMed PMID: 12375172.
90. Ushio-Fukai M, Nakamura Y. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Lett*. 2008;266(1):37-52. doi:

10.1016/j.canlet.2008.02.044. PubMed PMID: 18406051; PubMed Central PMCID: PMCPMC2673114.

91. Chen YJ, Wu SC, Wang HC, Wu TH, Yuan SF, Lu TT, et al. Activation of Angiogenesis and Wound Healing in Diabetic Mice Using NO-Delivery Dinitrosyl Iron Complexes. *Mol Pharm.* 2019;16(10):4241-51. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00586. PubMed PMID: 31436106.
92. Wang M, Wang C, Chen M, Xi Y, Cheng W, Mao C, et al. Efficient Angiogenesis-Based Diabetic Wound Healing/Skin Reconstruction through Bioactive Antibacterial Adhesive Ultraviolet Shielding Nanodressing with Exosome Release. *ACS Nano.* 2019;13(9):10279-93. doi: 10.1021/acsnano.9b03656. PubMed PMID: 31483606.
93. Gasparini G, Longo R, Toi M, Ferrara N. Angiogenic inhibitors: a new therapeutic strategy in oncology. *Nat Clin Pract Oncol.* 2005;2(11):562-77. doi: 10.1038/ncponc0342. PubMed PMID: 16270097.
94. Banys-Paluchowski M, Witzel I, Riethdorf S, Pantel K, Rack B, Janni W, et al. The clinical relevance of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) in correlation to circulating tumor cells and other serum biomarkers in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2018;172(1):93-104. doi: 10.1007/s10549-018-4882-z. PubMed PMID: 30003393.
95. Khromova N, Kopnin P, Rybko V, Kopnin BP. Downregulation of VEGF-C expression in lung and colon cancer cells decelerates tumor growth and inhibits metastasis via multiple mechanisms. *Oncogene.* 2012;31(11):1389-97. doi: 10.1038/onc.2011.330. PubMed PMID: 21804602.
96. Caye-Thomasen P, Werther K, Nalla A, Bog-Hansen TC, Nielsen HJ, Stangerup SE, et al. VEGF and VEGF receptor-1 concentration in vestibular schwannoma homogenates correlates to tumor growth rate. *Otol Neurotol.* 2005;26(1):98-101. PubMed PMID: 15699727.
97. Werther K, Nielsen HJ. [Significance of vascular endothelial growth factor--VEGF--in tumor angiogenesis. Therapeutic possibilities in solid tumors]. *Ugeskr Laeger.* 2000;162(37):4916-20. PubMed PMID: 11002739.
98. Mukherjee T, Kumar A, Mathur M, Chattopadhyay TK, Ralhan R. Ets-1 and VEGF expression correlates with tumor angiogenesis, lymph node metastasis, and patient survival in esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2003;129(7):430-6. doi: 10.1007/s00432-003-0457-3. PubMed PMID: 12851814.
99. Zhang J, Lu A, Beech D, Jiang B, Lu Y. Suppression of breast cancer metastasis through the inhibition of VEGF-mediated tumor angiogenesis. *Cancer Ther.* 2007;5:273-86. PubMed PMID: 18548129; PubMed Central PMCID: PMCPMC2424245.
100. Bekes I, Friedl TW, Kohler T, Mobus V, Janni W, Wockel A, et al. Does VEGF facilitate local tumor growth and spread into the abdominal cavity by suppressing endothelial

- cell adhesion, thus increasing vascular peritoneal permeability followed by ascites production in ovarian cancer? *Mol Cancer*. 2016;15:13. doi: 10.1186/s12943-016-0497-3. PubMed PMID: 26868378; PubMed Central PMCID: PMC4751711.
101. Zhou Z, Mao W, Li Y, Qi C, He Y. Myricetin Inhibits Breast Tumor Growth and Angiogenesis by Regulating VEGF/VEGFR2 and p38MAPK Signaling Pathways. *Anat Rec (Hoboken)*. 2019. doi: 10.1002/ar.24222. PubMed PMID: 31266091.
102. Requena L, Sanguenza OP. Cutaneous vascular anomalies. Part I. Hamartomas, malformations, and dilation of preexisting vessels. *J Am Acad Dermatol*. 1997;37(4):523-49; quiz 49-52. doi: 10.1016/s0190-9622(97)70169-5. PubMed PMID: 9344191.
103. Ye X, Abou-Rayyah Y, Bischoff J, Ritchie A, Sebire NJ, Watts P, et al. Altered ratios of pro- and anti-angiogenic VEGF-A variants and pericyte expression of DLL4 disrupt vascular maturation in infantile haemangioma. *J Pathol*. 2016;239(2):139-51. doi: 10.1002/path.4715. PubMed PMID: 26957058; PubMed Central PMCID: PMC4869683.
104. Greenberger S, Bischoff J. Pathogenesis of infantile haemangioma. *Br J Dermatol*. 2013;169(1):12-9. doi: 10.1111/bjd.12435. PubMed PMID: 23668474; PubMed Central PMCID: PMC3707963.
105. Heaton P, Kennedy C, Amin S. Severe infantile haemangioma: complications and treatment. *J Paediatr Child Health*. 2014;50(4):325, 30. doi: 10.1111/jpc.12539. PubMed PMID: 24698064.
106. Qiu M, Qi X, Dai Y, Wang S, Quan Z, Liu Y, et al. Infantile haemangioma: a complicated disease. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2015;20:1004-16. doi: 10.2741/4353. PubMed PMID: 25961539.
107. Goelz R, Poets CF. Incidence and treatment of infantile haemangioma in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2015;100(1):F85-91. doi: 10.1136/archdischild-2014-306197. PubMed PMID: 25352093.
108. Yang K, Peng S, Chen L, Chen S, Ji Y. Efficacy of propranolol treatment in infantile hepatic haemangioma. *J Paediatr Child Health*. 2019;55(10):1194-200. doi: 10.1111/jpc.14375. PubMed PMID: 30628130.
109. Chik KK, Luk CK, Chan HB, Tan HY. Use of propranolol in infantile haemangioma among Chinese children. *Hong Kong Med J*. 2010;16(5):341-6. PubMed PMID: 20889997.
110. Cooper PH. Angiosarcomas of the skin. *Semin Diagn Pathol*. 1987;4(1):2-17. PubMed PMID: 3313596.
111. Requena L, Kutzner H. Hemangioendothelioma. *Semin Diagn Pathol*. 2013;30(1):29-44. doi: 10.1053/j.semmp.2012.01.003. PubMed PMID: 23327728.
112. Tappero JW, Conant MA, Wolfe SF, Berger TG. Kaposi's sarcoma. Epidemiology, pathogenesis, histology, clinical spectrum, staging criteria and therapy. *J Am Acad Dermatol*. 1993;28(3):371-95. doi: 10.1016/0190-9622(93)70057-z. PubMed PMID: 8445054.

