

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

**Die Effekte der 420 nm Blaulicht-Bestrahlung auf die  
Proliferation und Vitalität humaner dermaler  
Fibroblasten**

Dissertation

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

vorgelegt von  
Peter Christopher Jansen

2023

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

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka

## **Danksagung**

Für die gesamte Unterstützung bei der Planung, Verfassung und Korrektur meiner Dissertation möchte ich mich ganz herzlich bei allen Beteiligten bedanken.

Ein besonderes Dankeschön gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. rer. nat. Christian Opländer für die tatkräftige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Zusätzlich danke ich auch besonders Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph Suschek als Leiter des Labors, dem gesamten Forschungsteam und Herrn Prof. Dr. med. Joachim Windolf als Direktor der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie der Universitätsklinik Düsseldorf.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und meiner Verlobten bedanken, die mir zu jeder Zeit tatkräftig und geduldig zur Seite standen. Vielen Dank, ohne euch wäre das ganze Projekt nicht möglich gewesen.

## I. Zusammenfassung

Blaulicht zählt zum Spektrum des sichtbaren Lichtes. Wie bereits in zahlreichen Vorversuchen gezeigt werden konnte, besitzt es vielfältige Effekte auf humane Zellen. Durch das Licht werden bestimmte Photoakzeptoren in den Zellen aktiviert und dadurch ein intrazellulärer Signalweg ausgelöst. Die Wirkung ist dabei abhängig von der Wellenlänge und Dosis der applizierten Lichtquelle sowie von der Art der behandelten Körperzelle. Kurzzeitigen Bestrahlungen mit geringen Intensitäten wird ein proliferationsfördernder Effekt zugeschrieben, wohingegen sich höhere Intensitäten und längere Bestrahlungszeiten eher proliferationshemmend und toxisch auswirken. Somit bietet die Blaulichtbestrahlung bereits in vielen medizinischen Bereichen eine Therapiealternative. Im Rahmen dieser Arbeit habe ich mich mit dem Einfluss von LED-Blaulichtbestrahlung der Wellenlänge 420 nm auf humane dermale Fibroblasten beschäftigt. Dabei wurden insbesondere die Wirkung verschiedener Strahlenintensitäten auf die Viabilität der Fibroblasten, die Reaktion der Zellen auf oxidativen Stress durch Hinzugabe von Wasserstoffperoxid sowie der Einfluss der begleitenden Temperaturentwicklung während einer Bestrahlung untersucht. Des Weiteren wurde die Zellkernmorphologie mittels Fluoreszenzmikroskopie im Hinblick auf weitere Erkenntnisse bezüglich der Form des Zelltodes untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Zellviabilität humaner dermaler Fibroblasten mit steigender Strahlenintensität sinkt. Somit bestätigen sie die bereits erwähnte Dosisabhängigkeit. Hierbei bestehen zudem Unterschiede zwischen der Bestrahlung proliferierender und ruhender Fibroblasten. Die Viabilität proliferierender Fibroblasten sinkt nach Niedrigdosisbestrahlung ( $8,5 \text{ J/cm}^2$ ) an Tag 1 um 18,5 % und erreicht nach Hochdosisbestrahlung ( $102 \text{ J/cm}^2$ ) einen Abfall um 100 %. Der Viabilitätsabfall der ruhenden Fibroblasten ist mit 9,6 % bei  $8,5 \text{ J/cm}^2$  und 96,4 % bei  $102 \text{ J/cm}^2$  geringer. Jedoch ergibt sich aus der einmaligen Bestrahlung mit blauem Licht kein langfristiger proliferationshemmender Effekt. Die Untersuchungen zeigen einen erneuten Anstieg der Zellviabilität an späteren Messzeitpunkten nach einmaliger Bestrahlung. Des Weiteren konnte ich zeigen, dass der Abbau von exogen zugeführtem Wasserstoffperoxid mit zunehmender Strahlenintensität abnimmt. So reduziert sich der Abbau von exogen zugeführtem  $\text{H}_2\text{O}_2$  nach einer Bestrahlung mit  $17 \text{ J/cm}^2$  um etwa 30 % im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Durch die gezeigten Ergebnisse lässt sich die Blaulichtbestrahlung als mögliche sinnvolle Therapieoption bei der Behandlung von fibrotischen Erkrankungen wie hypertrophen Narben oder Keloidbildung heranziehen.

## II. Summary

Blue light belongs to the spectrum of the visible light. A lot of research studies underline the various effects of blue light on human cells. Blue light affects certain photoacceptors in the skin and induces an intracellular signaling pathway. The effect depends on the applied wavelength and dose of the irradiation as well as the affected cell type. Recent studies show a boost in proliferation of certain cells after short term irradiation with lower intensity whereas long term irradiation with higher intensity shows an inhibition of proliferation or toxic effects. In total, one can say that blue light irradiation indicates a useful option in different medical fields. In the course of this dissertation, I examined the effect of 420 nm LED-blue light irradiation on human dermal fibroblasts. I especially focused on the change in effect of varying radiation intensities on cell viability, the response to oxidative stress through adding hydrogen peroxide and the role of temperature development during irradiation. In addition, I examined the changes in nucleus morphology after blue light irradiation regarding the possible type of cell death occurring. The results show a decreasing viability of the fibroblasts with higher radiation intensities which underlines the findings of recent studies. There is a difference regarding the irradiation of proliferating and resting fibroblasts. Cell viability of proliferating fibroblasts decreases after low-dose irradiation ( $8.5 \text{ J/cm}^2$ ) measured on day 1 after irradiation by 18.5 % and reaches a reduction of 100 % after high-dose irradiation ( $102 \text{ J/cm}^2$ ). The decrease in viability of resting fibroblasts is minor (9.6 % after  $8.5 \text{ J/cm}^2$  and 96.4 % after  $102 \text{ J/cm}^2$  irradiation). Furthermore, single blue light irradiation does not lead to a permanent inhibition of fibroblast proliferation. The results show an increase in cell viability at later measuring points after singular irradiation. The depletion of exogenous added hydrogen peroxide decreases when looking at increasing radiation intensities. After  $17 \text{ J/cm}^2$  irradiation, the reduction of hydrogen peroxide decreases by around 30 % compared to the unirradiated control. To support the establishment of blue light irradiation in clinical routine, more basic research is required. Anyway, the results mentioned indicate that blue light irradiation could be an option in treating hypertrophic scars or keloids.

### III. Abkürzungsverzeichnis

<b><math>\alpha</math></b>	Alpha
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	<i>Alpha smooth muscle actin</i>
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ALA</b>	<i>Aminolaevulinacid</i> (= Aminolävulinsäure)
<b>AP-1</b>	Aktivator Protein 1
<b>Aqua dest.</b>	Destilliertes Wasser
<b><math>\beta</math></b>	Beta
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>bzw.</b>	Beziehungsweise
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Calciumchlorid
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>cm<sup>2</sup></b>	Quadratcentimeter
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	<i>Desoxyribonucleinacid</i> (= Desoxyribonukleinsäure)
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EZM</b>	Extrazellulärmatrix
<b>FCS</b>	Fetales Kälberserum
<b>FDA</b>	Fluoresceindiacetat

$\gamma$	Gamma
<b>GAG</b>	Glykosaminoglykane
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Wasserstoffperoxid
<b>HDF</b>	Humane dermale Fibroblasten
<b>IGF</b>	<i>Insulin-like growth factor</i> (= insulinähnlicher Wachstumsfaktor)
<b>J/cm<sup>2</sup></b>	Joule pro Quadratcentimeter
<b>KCl</b>	Kaliumchlorid
<b>Ko</b>	Kontrolle
$\lambda$	Lamda (= Wellenlänge)
<b>LED</b>	<i>Light-emitting diode</i> (= lichtemittierende Diode)
<b>LW</b>	Leerwell
<b><math>\mu\text{m}</math></b>	Mikrometer
<b><math>\mu\text{mol}</math></b>	Mikromol
<b>M</b>	Molare Masse
<b>m</b>	Meter
<b>Mm</b>	Millimolar
<b>MAP-Kinase</b>	<i>Mitogen-activated Protein</i>
<b>mg</b>	Milligramm
<b>min</b>	Minuten
<b>ml</b>	Milliliter
<b>ms</b>	Millisekunden

<b>mW/cm<sup>2</sup></b>	Milliwatt pro Quadratcentimeter
<b>n</b>	Zahl der durchgeführten Versuchsansätze
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>nm</b>	Nanometer
<b>O<sub>2</sub></b>	Sauerstoff
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Superoxidradikal
<b>OH</b>	Hydroxyl-Radikal
<b>o.g.</b>	Oben genannte
<b>p</b>	<i>Probability</i> (= Wahrscheinlichkeit)
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i> (= Phosphat-gepufferte Lösung)
<b>PDGF</b>	<i>Platelet derived growth factor</i> (= von Blutplättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor)
<b>PEN</b>	Penicillin
<b>pH</b>	Pondus hydrogenii (Potential des Wasserstoffs)
<b>PI</b>	Propidiumiodid
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i> (= reaktive Sauerstoffspezies)
<b>rpm</b>	<i>Revolutions per minute</i> (= Umdrehungen pro Minute)
<b>Strep</b>	Streptomycin
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TGF</b>	<i>Transforming growth factor</i> (= transformierender Wachstumsfaktor)



<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>U/ml</b>	<i>Units per millilitre</i> (= Einheiten pro Milliliter)
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>V</b>	Volt
<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (= vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
<b>Vgl.</b>	Vergleich
<b>vWF</b>	Von-Willebrand-Faktor

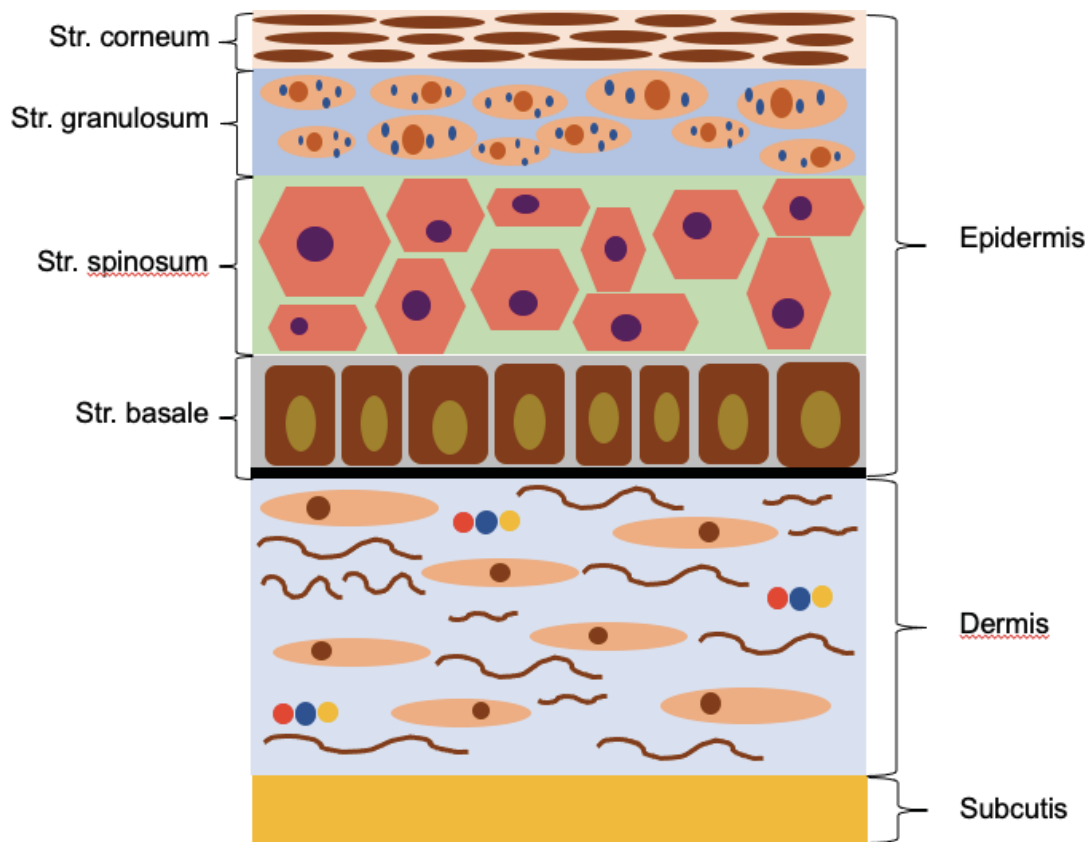
## IV. Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Aufbau der Haut	1
1.2	Wundheilung	3
1.3	Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress	8
1.4	Elektromagnetisches Spektrum und sichtbares Licht	9
1.4.1	Die Wirkung von UV-Strahlung	9
1.4.2	Toxische und proliferationshemmende Effekte von Blaulicht auf humane Zellen	10
1.4.3	Klinische Anwendungsbereiche von sichtbarem Licht	13
1.4.4	LED-Systeme als Lichtquelle	15
1.5	Ziele der Arbeit	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Material	18
2.1.1	Zellen	18
2.1.2	Geräte	18
2.1.3	Materialien	19
2.1.4	Substanzen	20
2.1.5	Software	21
2.2	Methoden	22
2.2.1	Zellisolation	22
2.2.2	Zellkultivierung der Fibroblasten	23
2.2.3	Passagierung der Zellen	24
2.2.4	Kryokonservierung	25
2.2.5	Messung der Temperatur unter der LED-Blaulichtlampe während der Bestrahlung	26
2.2.6	Messung der Bestrahlungsintensität (mW/cm <sup>2</sup> ) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer	26
2.2.7	Blaulichtbestrahlung der humanen dermalen Fibroblasten	27
2.2.8	CellTiter-Blue® Zellviabilitätsmessung	27
2.2.9	Wasserstoffperoxid-Photometrie	28
2.2.10	Fluoreszenzmikroskopie	30
2.2.11	Statistische Analyse	30
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>31</b>

3.1	Maße der LED-Blaulichtlampe _____	31
3.2	Bestrahlungsintensitäten im verwendeten Versuchsbereich _____	32
3.3	Entwicklung der Strahlungsintensität während der LED-Blaulichtbestrahlung _____	33
3.4	Temperaturentwicklung während der Blaulichtbestrahlung _____	34
3.5	Blaulichtbestrahlung verursacht intensitätsabhängige Toxizität in proliferierenden Fibroblasten _____	36
3.6	Blaulichtbestrahlung verursacht intensitätsabhängige Toxizität in konfluenten Zellkultur-Petrischalen _____	39
3.7	Blaulichtbestrahlung führt zu einem verminderten Abbau von Wasserstoffperoxid durch humane dermale Fibroblasten _____	43
3.8	Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Zellviabilität steigender Bestrahlungsintensitäten _____	45
3.9	Veränderungen in der Zellkernmorphologie nach erfolgter Blaulichtbestrahlung _____	49
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> _____	<b>51</b>
4.1	Allgemeines _____	51
4.2	Die Wärmeentwicklung während der LED-Blaulichtbestrahlung als zusätzlicher Einflussfaktor _____	51
4.3	Intensitätsabhängige Toxizität der Blaulichtbestrahlung auf humane dermale Fibroblasten _____	52
4.4	Die durch 420 nm Blaulichtbestrahlung hervorgerufenen Formen des Zelltodes anhand der Fluoreszenzmikroskopie _____	53
4.5	Intensitätsabhängiger Einfluss der Blaulichtbestrahlung auf die Wasserstoffperoxid-Konzentration in humanen dermalen Fibroblasten _____	54
4.6	LED-Blaulichtbestrahlung als Therapieoption im klinischen Alltag _____	55
<b>5</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis</b>	

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau der Haut



**Abb. 1 Schematische Darstellung der Hautschichten.**

Die Abbildung zeigt schematisch die Schichtung der menschlichen Haut. Diese besteht aus der Epidermis und der Dermis. Darunter befindet sich das Unterhautfettgewebe (Subcutis).

Eigene Abbildung modifiziert nach (Aumüller, 2007).

Die Haut, als größtes Organ des menschlichen Körpers, besteht aus drei Schichten: Die Epidermis bildet die äußerste, nicht-vaskularisierte Hautschicht mit einer Dicke von bis zu maximal 600  $\mu\text{m}$ . Darunter befindet sich die Dermis. Die hier vorherrschende Zellart sind die Fibroblasten, welche maßgeblich am Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix des Bindegewebes beteiligt sind (Balzer et al., 2015, Pieraggi et al., 1985). Unterhalb der Dermis liegt die sogenannte Subcutis. Diese Schicht besteht überwiegend aus Fettgewebe und verbindet die Haut mit darunterliegenden Skelettstrukturen (Tobin, 2006).

Die Epidermis besteht aus vier Schichten, die aus von Innen nach Außen immer weiter verhornenden Zellen, den Keratinozyten, aufgebaut sind. Die äußerste Schicht ist das *Stratum corneum*, welches aus bereits vollständig verhornten Zellen, den Korneozyten, besteht. Darunter liegt das *Stratum granulosum*, bestehend aus abgeflachten Zellen, die von

den sich vermehrenden Zellen darunter immer weiter in Richtung Hautoberfläche gedrückt werden. Im *Stratum spinosum* befinden sich teilweise mitotisch aktive Zellen. Die Regeneration der Epidermis finden in der untersten Schicht, dem *Stratum basale*, statt. Die hier befindlichen Keratinozyten sitzen einer nicht-zellulären Basalmembran auf, die die Epidermis von der darunterliegenden Dermis abgrenzt. Im *Stratum basale* sitzen zusätzlich zu den Keratinozyten weitere Zelltypen wie Merkelzellen (Tastsinn) und Melanozyten. Letztere produzieren das Pigment Melanin, welches eine wichtige Aufgabe in der Abwehr von UV-Strahlung einnimmt (Tobin, 2006).

Die Hauptaufgabe der *Epidermis* ist der äußere Schutz des Organismus vor Noxen wie mikrobiologischen, mechanischen, chemisch-physikalischen oder thermischen Einflüssen (Callaghan and Wilhelm, 2008b). Zudem ermöglicht sie eine gewisse Permeabilität. Bestimmte Stoffe können so über die Haut in den Organismus transportiert werden (Tobin, 2006, Baum and Arpey, 2005).

Unterhalb der Epidermis befindet sich die Dermis. Diese Schicht ist deutlich dicker als die Epidermis, enthält jedoch im Verhältnis deutlich weniger Zellen. Außerdem befinden sich hier weitere Strukturen wie Blutgefäße und Nerven, welche in eine amorphe und faserige Masse, die Extrazellulärmatrix (EZM), eingebettet sind. Hauptbestandteil der EZM sind Kollagen-Proteine. Es existieren etwa 25 Kollagen-Unterformen, von denen vor allem die Kollagentypen I, III und V in der Dermis vorkommen (Callaghan and Wilhelm, 2008b). Kollagen Typ VII hingegen befindet sich im oberen Teil der Dermis und fixiert als sogenannte Ankerfibrille die Basalmembran des darüber liegenden Epithels mit der Dermis (Tobin, 2006, Ma et al., 2001).

Das Elastin-Protein, ein weiterer wichtiger Bestandteil der EZM, sorgt für die Elastizität der Haut (Halper, 2021).

Der Hauptzelltyp der Dermis sind die Fibroblasten, welche maßgeblich am Auf- und Abbau der Extrazellulärmatrix und somit auch an der Reparatur der Dermis beteiligt sind (Callaghan and Wilhelm, 2008b). Dadurch nehmen sie auch bei der Wundheilung eine zentrale Stellung ein. Neben den Fibroblasten finden sich Makrophagen und Mastzellen in der Dermis. Letztere sind hauptsächlich bei der Auslösung allergischer Reaktionen beteiligt (Tobin, 2006).

## 1.2 Wundheilung

Wie oben bereits angedeutet ist die Haut ein wichtiges Abwehrorgan, welches den Körper vor allem vor äußeren Einflüssen schützt. Bei beschädigter Haut kann diese Abwehrfunktion beeinträchtigt sein. Aus diesem Grund ist eine gut funktionierende und intakte Wundheilung essentiell für die Gesundheit eines jeden Menschen Baum and Arpey (2005).

Der Ablauf der Wundheilung gliedert sich in drei Phasen, die jeweils in unterschiedlicher Dauer und teilweise überlappend ablaufen: Die Inflammationsphase, die Proliferationsphase und die Reifungsphase (Baum and Arpey, 2005).

### Inflammationsphase

Die erste Phase der Wundheilung ist die Inflammationsphase, welche sich wiederum in zwei Abschnitte einteilen lässt. Zu Beginn steht die Hämostase. In diesem initialen Abschnitt spielen auf zellulärer Ebene vor allem Fibrin, Thrombozyten (Blutplättchen) und Blutgefäße die entscheidende Rolle. Fibrin entsteht seinerseits durch Spaltung von Fibrinogen durch Thrombin. Die dabei entstehenden Fibrin-Monomere lagern sich mithilfe von Faktor XIII zusammen und binden direkt an Thrombozyten. Dadurch entsteht Innerhalb von Minuten nach einer stattgehabten Hautverletzung ein Koagel, bestehend aus Fibrin und Thrombozyten. Klinisch kommt es in dieser Phase auch zum Blutungsstillstand. Die Aktivierung der Thrombozyten erfolgt im Wesentlichen über die Bindung von Von-Willebrand-Faktor aus dem Endothel des verletzten Gefäßes an Glykoprotein Ib-Rezeptoren. Diese Rezeptoren werden auch als Von-Willebrand-Faktor-Rezeptoren (vWF-Rezeptoren) bezeichnet und befinden sich an der Oberfläche der Thrombozyten. Durch die Aktivierung der Thrombozyten setzen diese bestimmte Granula frei, die ihrerseits gerinnungsfördernde Proteine und Wachstumsfaktoren enthalten. Alpha-Granula enthalten Fibrinogen, Faktor V und Albumin. Zu den freigesetzten Wachstumsfaktoren gehören unter anderem die vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), die transformierenden Wachstumsfaktoren (*Transforming growth factor*, TGF), die von Blutplättchen abgeleiteten Wachstumsfaktoren (*Platelet-derived Growth Factor*, PDGF) sowie viele weitere (Baum and Arpey, 2005, Balzer et al., 2015). Diese freigesetzten Proteine und Wachstumsfaktoren beeinflussen ihrerseits weitere Zellen wie Fibroblasten (Jinnin, 2010), Endothelzellen und Keratinozyten während der Wundheilung. Im weiteren Verlauf der Hämostasephase kommt es zur Vasokonstriktion, also dem Verengen der Blutgefäße. Klinisch äußert sich dies als Abblassen der Wunde (engl. *blanching*). Eingeleitet

wird diese Vasokonstriktion durch aus verletzten Zellen freigesetzte vasoaktive Mediatoren wie Prostaglandine und Thromboxane. Des Weiteren spielen hierbei auch die Botenstoffe Adrenalin und Noradrenalin eine große Rolle, die aus sympathischen Nervenfasern freigesetzt werden.

Den zweiten Abschnitt der initialen Inflammationsphase stellt die namensgebende Inflammation, also die Entzündungsreaktion dar. Makroskopisch kommt es bei einer Entzündung zu den typischen Entzündungszeichen wie Schmerz, Rötung, Schwellung und Überwärmung. Grund hierfür ist eine Vasodilatation und eine erhöhte Permeabilität der Blutgefäße, die den Austritt von Flüssigkeit in das umliegende Wundgewebe erlaubt. Auf zellulärer Ebene sind auch an dieser Phase erneut zahlreiche Zellen, Wachstumsfaktoren, Zytokine sowie das Nervensystem beteiligt (Baum and Arpey, 2005). Eine entscheidende Rolle kommt hierbei Histamin zu, welches aus Mastzellen freigesetzt wird und sowohl direkt als auch indirekt über die Stimulation der Prostaglandinausschüttung an der Vasodilatation beteiligt ist. Neben seiner Rolle bei der initialen Hämostase erhöht auch Thrombin die Permeabilität der Blutgefäße. Polymorphkernige Zellen sind die ersten Zellen, die das Wundbett in der Inflammationsphase nach etwa 24 bis 48 Stunden erreichen. Dabei werden sie durch verschiedene Botenstoffe (Zytokine, PDGF) „angelockt“. Sie beseitigen Reste abgestorbener Zellen sowie Bakterien mittels Phagozytose aus der Wunde. Später werden die polymorphkernigen Zellen durch Makrophagen bei der Wundreinigung unterstützt. Letztere verbleiben für Tage bis Wochen im Wundbereich und halten den Entzündungsprozess über die Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Interleukinen und Tumornekrosefaktor (TNF) aufrecht. Des Weiteren induzieren *Makrophagen* über die Freisetzung von TGF und IGF (*insulin-like growth factor*) die Produktion von *Kollagen* durch Fibroblasten sowie deren Transformation über Protomyofibroblasten zu Myofibroblasten (Hinz, 2007). Myofibroblasten nehmen funktionell eine Stellung zwischen Fibroblasten und glatten Muskelzellen ein (Desmouliere et al., 2005). Freigesetzter VEGF stimuliert zudem die Angiogenese (Baum and Arpey, 2005). Eine wichtige Rolle bei der Regulation der komplexen Wundheilungsprozesse kommt den T-Lymphozyten mit ihren verschiedenen Subtypen zu. Studien zeigten bereits eine verminderte Wundheilung bzw. Wundstärke bei vorliegendem Mangel an T-Lymphozyten (Baum and Arpey, 2005).

## Proliferationsphase

An die initiale Inflammationsphase schließt sich die Proliferationsphase an. Etwa vier Tage nach einer stattgehabten Verletzung beginnt der Umbau der provisorisch-gebildeten Extrazellulärmatrix zu Granulationgewebe. Dieser morphologische Wandel basiert auf der Neubildung von Blutgefäßen sowie der Migration von Fibroblasten und Makrophagen, die einen permanenten Bestandteil der reparierten Dermis darstellen. Die wichtigsten Zellen in dieser Phase sind die Fibroblasten, die durch die Bildung von Kollagen den Hauptbestandteil der Extrazellulärmatrix synthetisieren (Balzer et al., 2015, Hinz, 2007). Um diese wichtige Aufgabe in der Proliferationsphase übernehmen zu können, müssen die Fibroblasten zunächst an den Ort der Wundheilung gelangen. Diese Migration wird erneut durch Zytokine und Wachstumsfaktoren gesteuert. Hierzu zählen unter anderem erneut PDGF, TGF und Fibronectin. Bereits differenzierte Fibroblasten gelangen so aus der unmittelbaren Wundumgebung an den Ort, wo sie benötigt werden. Neben bereits ausdifferenzierten Zellen werden auch undifferenzierte Mesenchymzellen zur Fibroblasten-Differenzierung angeregt.

Zu Beginn der Extrazellulärmatrix-Synthese steht die Produktion von Prokollagen, einer Kollagenvorstufe, durch Fibroblasten. Dies geschieht durch die Hydroxylierung von Lysin und Prolin im Endoplasmatischen Retikulum der Fibroblasten. Dieser Schritt benötigt zahlreiche Kofaktoren wie zum Beispiel Sauerstoff, Vitamin C und Eisenionen. Das fertige Prokollagen wird aus den Zellen sezerniert und extrazellulär durch enzymatische Prozesse zu Fibrillen umgebaut. Die Verbindung der einzelnen Fibrillen wird maßgeblich durch Proteoglykane gewährleistet, welche ihrerseits ebenfalls von Fibroblasten synthetisiert werden. Bei den Proteoglykanen handelt es sich um Polypeptide, die mit sogenannten Glykosaminoglykanen (GAG) versehen sind. Hierzu zählt vor allem die Hyaluronsäure. Neben der direkten Synthesefunktion regulieren Fibroblasten in dieser Phase auch weitere Prozesse der Wundheilung über die Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Zu diesen Prozessen gehören vor allem die Bildung von Blutgefäßen (Angiogenese) und die Regulation der Keratinozytenaktivität. Letztere nimmt zu einem späteren Zeitpunkt eine entscheidende Rolle bei der Reepithelialisierung der Wunde ein. Auf diese Weise sind die Fibroblasten sowohl direkt als auch indirekt an den wichtigsten Wundheilungsprozessen beteiligt und nehmen somit eine zentrale Aufgabe ein.

Die Angiogenese wird ebenfalls über mehrere Wege eingeleitet. Zum einen spielt die Wundumgebung hierbei eine wichtige Rolle. Durch zerstörte Blutgefäße und eine somit



verminderte Sauerstoffversorgung des lokalen Wundgewebes kommt es zu einer Erhöhung des Laktats und einer Verminderung des pH-Wertes. Diese Umgebungsbedingungen regen die Neubildung von Blutgefäßen bzw. das Einsprossen von Kapillaren an. Außerdem spielen auch hier wieder bestimmte Zytokine und Wachstumsfaktoren wie vor allem VEGF eine entscheidende Rolle. Bereits am zweiten Tag nach einer stattgehabten Verletzung beginnt die Migration von Endothelzellen in die Wundumgebung. Voraussetzungen hierfür ist zum einen das Vorhandensein einer Extrazellulärmatrix, entlang derer die Endothelzellen migrieren können. Zum anderen muss eine Kontaktunterbrechung zwischen benachbarten Endothelzellen vorliegen. Über bestimmte Integrine besteht eine Verbindung zwischen den Endothelzellen und der Extrazellulärmatrix. Mithilfe von bestimmten Enzymen, den Matrix-Metalloproteasen, gelingt eine Migration entlang der Fibrillen der Extrazellulärmatrix (Baum and Arpey, 2005).

Nachdem ausreichend Granulationsgewebe gebildet wurde, beginnt die Reepithelialisierung, also die Neubildung einer intakten Epithelschicht. Die hieran hauptsächlich beteiligten Zellen sind die Keratinozyten. Keratinozyten aus dem Bereich der Wundränder sowie aus umgebenden Haarfollikeln. Haarfollikel gelten als ein Reservoir für Keratinozyten-Stammzellen, welche in den Wundbereich migrieren und hier die Bildung des neuen Epithels bewerkstelligen können (Baum and Arpey, 2005).

### Reifungsphase

Klinisch ist die Reifungsphase der Wundheilung gekennzeichnet durch die Wundkontraktion, die Verminderung der Hautrötung, der Wunddicke und der Einziehung. Zudem zeigt sich eine Zunahme Widerstandsfähigkeit. Während der Prozess der Wundreifung über Wochen, Monate und sogar Jahre andauert, beginnt er bereits parallel zur Bildung des Granulationsgewebes in der Proliferationsphase. Wie auch schon die Proliferationsphase ist die Reifungsphase maßgeblich durch Fibroblasten geprägt.

Die Kontraktion der Wunde, also somit die Annäherung der Wundränder zueinander, wird durch Myofibroblasten ausgelöst, welche ihre kontraktile Eigenschaften über ein erhöhtes Vorkommen an Aktinfilamenten, vor allem Aktin alpha 2, im Vergleich zu „normalen“ Fibroblasten erhalten (Desmouliere et al., 2005, Darby et al., 2002, Gabbiani, 2003, Balzer et al., 2015, Hinz, 2007). Der entscheidende Promotor für die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und die damit einhergehende Ausbildung von Aktin alpha 2 ist der transformierende Wachstumsfaktor beta1 (TGF- $\beta$ 1) (Taflinski et al., 2014). Dabei

erfolgt die Transformation der Fibroblasten zu Myofibroblasten zunächst über eine Zwischenstufe, die Protomyofibroblasten. Diese enthalten im Gegensatz zu den ausgereiften Myofibroblasten nur  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aktinfilamente. Das Merkmal ausgereifter Myofibroblasten sind hingegen die  $\alpha$ -Aktinfilamente ( *$\alpha$ -smooth muscle actin*,  *$\alpha$ -SMA*) (Taflinski et al., 2014).

Die Zunahme der Widerstandsfähigkeit einer Wunde ist überwiegend durch den Abbau und die Neuordnung von Kollagen gekennzeichnet. Dieser Prozess ereignet sich in etwa in Woche drei bis sechs nach Verletzung. Zunächst besitzt die Wunde nach drei Wochen nur ca. 20 % der ursprünglichen Widerstandsfähigkeit. Durch die genannten Umbauprozesse steigt die Widerstandsfähigkeit auf bis zu 80 % des Ursprungswertes nach etwa sechs Monaten an.

Die Abnahme der Wundrötung begründet sich in einer Abnahme der Dichte an Kapillaren im Verlauf der Wundreifung. Neben den Blutgefäßen nimmt auch die Anzahl der Fibroblasten und Myofibroblasten in einer Wunde über den Zeitraum der Wundheilung ab, sodass reife Wunden letztendlich nur eine geringe Anzahl an Zellen enthalten (Baum and Arpey, 2005, Gabbiani, 2003). Die Abnahme der Zellzahl nach Abschluss der Reepithelialisierung in reifen Wunden ist mutmaßlich auf das Fehlen von Botenstoffen und den Umbau der Extrazellulärmatrix durch Matrix-Metalloproteasen zurückzuführen und folgt dem Mechanismus der *Apoptose* (Darby et al., 2002, Desmouliere et al., 2005, Gabbiani, 2003, Balzer et al., 2015, Hinz, 2007, Shin and Minn, 2004).

Nach abgeschlossener Wundheilung wird in Myofibroblasten normalerweise der Zelltod mittels Apoptose induziert. Eine Persistenz der Myofibroblasten über die abgeschlossene Wundheilung hinaus und somit eine Aufrechterhaltung der kontraktiven Eigenschaften wird als ein wichtiger Faktor in der Bildung von hypertrophen Narben oder Kontrakturen angesehen (Shin and Minn, 2004, Taflinski et al., 2014). Des Weiteren ist die überschüssige Bildung von Extrazellulärmatrix, vor allem Kollagenen, kennzeichnend für die Entstehung chronischer Hauterkrankungen wie Systemische Sklerose, hypertrophe Narbenbildung und Keloide (Mamalis et al., 2015).

### 1.3 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress

Reaktive Sauerstoffspezies sind wichtig für die zelluläre Homöostase und Bestandteil von Signalwegen. Sie sind toxische Substanzen, die in der Lage sind, beispielsweise Fetten, Proteinen oder Nukleinsäuren oxidativen Schaden zuzuführen (Black, 2002). Zu den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zählen unter anderem Sauerstoff ( $O_2$ ), das Hydroxyl-Radikal (OH-Radikal), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und das Superoxidradikal ( $O_2$ -Radikal) (Callaghan and Wilhelm, 2008a, Marek et al., 2019).

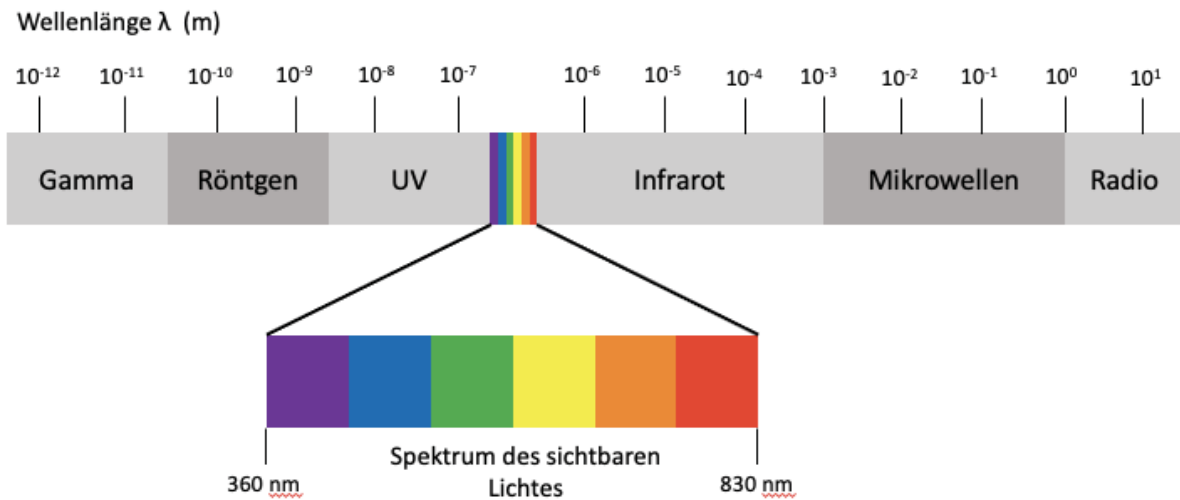
Zu den Entstehungsorten von reaktiven Sauerstoffspezies zählen die Mitochondrien, Phagozytosevorgänge, Prostaglandinsynthese, Cytochrom P450-Enzyme, nicht-enzymatische Sauerstoffreaktionen oder ionisierende Strahlung (Callaghan and Wilhelm, 2008a, Harman, 2003).

Enzyme, die oxidative Schäden minimieren, werden als Antioxidantien bezeichnet (Black, 2002). Hierzu zählen die Superoxiddismutase, Katalase, Glutathion-Peroxidase und Peroxidase. Nicht-enzymatische Antioxidantien/ freie Radikalfänger: Ascorbat, Glutathion, beta-Carotine (Callaghan and Wilhelm, 2008a), Tocopherol (Vitamin E) (Harman, 2003).

Freie Radikale besitzen eine hohe chemische Reaktivität und sind an der Zerstörung biologischer Systeme beteiligt (Harman, 2003). Antioxidantien agieren als Fänger von freien Radikalen mit der Intention, die durch sie ausgelösten Reaktionen zu unterbinden. So sind beta-Carotine beispielsweise in der Lage, Lipidperoxidationen zu verhindern. Die Lipidperoxidation beschreibt eine durch freie Radikale ausgelöste Kettenreaktion, bei der membranständige Fettsäuren oxidiert werden und somit zu Schädigungen von Zellen führen (Black, 2002).

Der natürliche Alterungsprozess wird durch chemische Reaktionen ausgelöst, die während des Metabolismus auftreten (Harman, 2003). So nimmt im Alter die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zu und die antioxidative Kapazität nimmt ab. So wird oxidativer Stress als eine wichtige Ursache des Alterungsprozesses gesehen. ROS sind ein wichtiger Bestandteil von MAP-Kinase Signalwegen und die Erhöhung von AP-1, einem Transkriptionsfaktor, steigert die Produktion von Matrix-Metalloproteasen, die ihrerseits an dem Abbau von Kollagen der EZM in alternder Haut verantwortlich sind (Callaghan and Wilhelm, 2008a).

## 1.4 Elektromagnetisches Spektrum und sichtbares Licht



**Abb. 2** Spektrum des sichtbaren Lichtes in Bezug auf das gesamte elektromagnetische Spektrum (Grafik modifiziert nach (Sloney, 2016)).

Die Abbildung verdeutlicht den kleinen Wellenlängenbereich, den das sichtbare Licht im Verhältnis zum gesamten elektromagnetischen Spektrum einnimmt.

Das sichtbare Licht nimmt einen kleinen Bereich des elektromagnetischen Spektrums ein. Es gibt keine exakte Ober- und Untergrenze, an der das sichtbare Licht von UV-Strahlung niedrigerer Wellenlänge ( $\lambda$ ) oder von Infrarotstrahlung höherer Wellenlänge abgegrenzt werden kann. Die Lichtwahrnehmung ist daher neben der Wellenlänge von mehreren Faktoren wie der Strahlkraft der Lichtquelle und der Empfindlichkeit des Beobachters abhängig (Sloney, 2016, Mahmoud et al., 2008). Insgesamt lässt sich das maximale Spektrum des sichtbaren Lichtes etwa in den Wellenlängenbereich zwischen 360 nm und 830 nm einordnen, wobei andere Quellen ein engeres Spektrum zwischen 400 nm und 760 nm zugrunde legen (Mamalis et al., 2015). Auf der Skala des elektromagnetischen Spektrums befinden sich unterhalb der Untergrenze die UV-Strahlung, die Röntgenstrahlung sowie die Gammastrahlung. Oberhalb der Obergrenze finden sich mit steigender Wellenlänge die Infrarotstrahlung, die Mikro- und Radiowellen (Sloney, 2016, Mahmoud et al., 2008).

### 1.4.1 Die Wirkung von UV-Strahlung

Das Sonnenlicht ist eine Zusammensetzung aus verschiedenen Strahlungsarten des elektromagnetischen Spektrums. Es setzt sich aus etwa 50 % Licht aus dem sichtbaren Spektrum, 45 % Infrarotstrahlung und 5 % ultravioletter Strahlung (UV-Strahlung)

zusammen. UV-Strahlung wiederum gliedert sich in zwei Unterformen, UV-B (280 – 315 nm) und UV-A-Strahlung (315 – 400 nm) (Taflinski et al., 2014).

Die hautschädigende Wirkung von UV-Strahlung ist bereits gut verstanden und Bestandteil vieler Studien (Oplander et al., 2011, Ma et al., 2001). Die Absorption von UV-Photonen in der Haut und die dadurch entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) führen zu vermehrter Faltenbildung, Laxheit, einem lederartigen Erscheinungsbild, gestörter Wundheilung, erhöhter Anfälligkeit der Haut gegenüber äußeren Einflüssen sowie schließlich zu einem erhöhten Hautkrebsrisiko (Ma et al., 2001, Callaghan and Wilhelm, 2008b, Kleinpenning et al., 2010, Mamalis et al., 2015, Taflinski et al., 2014, Weinstabl A, 2011). Die klinische Manifestation der Hautalterung basiert auf einer Atrophie der Extrazellulärmatrix durch die Reduktion von Fibroblasten (Callaghan and Wilhelm, 2008b) sowie dem Verlust von Kollagen und Ankerfibrillen im Bereich der Epidermis-Dermis-Verbindung (Ma et al., 2001). Im Bereich der Augen führt UV-Strahlung zu Schädigungen an der Linse mit folgender Vermehrung von Katarakten (Wataha et al., 2004).

#### 1.4.2 Toxische und proliferationshemmende Effekte von Blaulicht auf humane Zellen

Neben hochenergetischer, elektromagnetischer Strahlung wie zum Beispiel UV-Strahlung kann auch Licht aus dem sichtbaren Spektrum Einfluss auf Gewebe haben (Karu, 1999, Mahmoud et al., 2008, Mamalis et al., 2015). Die Photonen werden über bestimmte Photoakzeptoren wie zum Beispiel Chromophoren in der Haut absorbiert und leiten nachfolgend chemische Reaktionen ein. Zu den Photoakzeptoren zählen unter anderem Melanin, Riboflavin, Hämoglobin und Bilirubin (Mahmoud et al., 2008, Kielbassa et al., 1997, Kleinpenning et al., 2010, Lipovsky et al., 2008, Eichler et al., 2005). Im Wellenlängenbereich des blauen Lichtes sind bereits verschiedene Photoakzeptoren wie Flavoproteine oder Porphyrin-enthaltende Enzyme beschrieben (Hockberger et al., 1999, Liebmann et al., 2010, Lewis et al., 2005, Wataha et al., 2004).

Bereits in Vorstudien wurden schädigende Effekte von blauem Licht (400 – 500 nm) auf Zellen in Abhängigkeit von Wellenlänge und Strahlendosis beschrieben. Insgesamt lässt sich sagen, dass die zytotoxische Wirkung von blauem Licht auf Fibroblasten im Bereich kürzerer Wellenlänge (410 nm, 420 nm) größer ist als im höheren Wellenlängenbereich (453 nm, 480 nm) (Taflinski et al., 2014, Oplander et al., 2011).

Die Wirkung der Blaulichtbestrahlung tritt maßgeblich indirekt durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) nach Blaulichtbehandlung und die daraus resultierende DNA-Schädigung auf (Oplander et al., 2011, Mahmoud et al., 2008, Godley et al., 2005, Calabuig et al., 2016, Gorgidze et al., 1998, Kielbassa et al., 1997, Kleinpenning et al., 2010, Lipovsky et al., 2008). Hockberger et al. (1999) beschrieben bereits toxische Effekte von violett-blauem Licht auf zellulärer Ebene über die Bildung von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) in Peroxisomen und Mitochondrien von u.a. humanen Keratinozyten (Hockberger et al., 1999, Eichler et al., 2005). Godley et al. (2005) gelang der Nachweis der DNA-Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies induziert durch Blaulicht-Bestrahlung in retinalen Epithelzellen (Godley et al., 2005). Hiermit vergesellschaftet ist ein erhöhtes Risiko für altersbedingte Makuladegenerationen (Wataha et al., 2004). Eine Studie von Liebmann et al. aus dem Jahr 2010 beschreibt die o.g. toxischen Effekte von Blaulicht im Wellenlängenbereich von 412 bis 426 nm bei hoher Fluenz ( $66 - 100 J/cm^2$ ). Gleichzeitig beschrieben sie jedoch die fehlende toxische Wirkung von Blaulichtbestrahlung mit einer Wellenlänge von 453 nm auf Keratinozyten bis zu einer Strahlendosis von  $500 J/cm^2$  sowie eine vermehrte Differenzierung in Keratinozyten (Liebmann et al., 2010).

Taflinski et al. (2014) untersuchten die Wirkung von 420 nm Blaulichtbestrahlung auf humane dermale Fibroblasten (HDF) und fanden heraus, dass eine einfache Bestrahlung der HDF mit einer Strahlendosis von  $30 J/cm^2$  keine toxische Wirkung auf die Zellen hatte. Bei erhöhter Strahlendosis von 60 bzw.  $90 J/cm^2$  wurde wiederum eine toxische Wirkung mit konsekutiver Reduktion der Zahl vitaler Zellen beschrieben. Des Weiteren fanden sie heraus, dass HDF durch eine Blaulichtbestrahlung mit Strahlendosen von 15 bzw.  $30 J/cm^2$  anfälliger gegenüber oxidativem Stress, mit folgender erhöhter toxischer Wirkung, wurden. Die Zellen wurden in diesem Fall zunächst bestrahlt. Anschließend erfolgte der Zusatz von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) (Taflinski et al., 2014).

Lipovsky et al. (2008) beschrieben die Bildung von Sauerstoffradikalen durch Flavine nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht der Wellenlänge 400 – 500 nm (Lipovsky et al., 2008). Da Flavine ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge unterhalb von 500 nm haben (Eichler et al., 2005), wird neben der Wirkung über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ein weiterer Wirkungsmechanismus von Blaulicht über die Photostimulation der Flavingruppe in Komplex I, also der NAD(P)H-Oxidase, der Atmungskette (Elektronentransportkette) in Mitochondrien beschrieben (Mamalis et al., 2015, Eichler et al., 2005, Wataha et al., 2004).

Der Frage, ob die toxische Wirkung von blauem Licht durch Nekrose, also den vorzeitigen Zelltod, oder durch Apoptose, den programmierten, systematisch ablaufenden Zelltod, vermittelt wird, gingen Calabuig et al. (2016) nach. Sie fanden heraus, dass Blaulichtbestrahlung mit einer Wellenlänge von 473 nm einen mit der Nekrose vergleichbaren Zelltod herbeiführte. Im Gegensatz zur Apoptose, die durch initiale Volumenreduktion und Schrumpfung der Zelle, Bildung von Apoptosekörpern und Fragmentierung des Zellkerns sowie Kondensation von Chromatin gekennzeichnet ist, findet sich bei der Nekrose eine initiale Volumenzunahme und Schwellung der Zelle bei intaktem Zellkern und Integritätsverlust der Plasmamembran (Calabuig et al., 2016, Belloc et al., 1994). Dass Bestrahlung mit Licht aus dem blauen Spektrum, genauer gesagt mit Wellenlängen von 412 und 419 nm, die Apoptose in Keratinozyten induzieren kann, zeigten Liebmann et al. (2011) mittels Fluoreszenzmikroskopie (Liebmann et al., 2010).

Im Gegensatz zur toxischen Wirkung von Blaulicht wird eine proliferationshemmende Wirkung auf humane Endothelzellen, Keratinozyten (Liebmann et al., 2010), dermale Fibroblasten (Oplander et al., 2011, Taflinski et al., 2014), Fibroblasten der Gingiva (Taoufik et al., 2008) und Zellen aus Schweinenieren (Gorgidze et al., 1998) bei niedriger Fluenz im nicht-toxischen Bereich beschrieben. Im Fall der Fibroblasten zeigt sich dieser Effekt verstärkt bei proliferierenden humanen dermalen Fibroblasten im Vergleich zu Ruhenden, was eine erhöhte Strahlensensibilität gegenüber Blaulicht nahelegt. Der antiproliferative Effekt der Blaulichtbestrahlung ist einem Wellenlängenbereich zwischen 400 – 460 nm zugewiesen und abhängig von Wellenlänge und Strahlendosis (Oplander et al., 2011, Liebmann et al., 2010, Gorgidze et al., 1998). Gorgidze et al. (1998) zeigten in ihrer Studie die Wirkung von Blaulichtbestrahlung auf mitotische Zellen und den daraus folgenden Zellzyklusarrest (Gorgidze et al., 1998). Mamalis et al. (2015) untersuchten bereits die Effekte der LED-Blaulichtbestrahlung auf humane dermale Fibroblasten in Bezug auf das Proliferationsverhalten und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Es zeigte sich eine dosisabhängige Verringerung der Proliferationsrate sowie eine steigende Bildung reaktiver Sauerstoffspezies bei einer Bestrahlung mit 415 nm. Ein wichtiger Faktor ist die dabei beschriebene, fehlende signifikante Reduktion der Zellviabilität (Mamalis et al., 2015). Der proliferationshemmende Effekt bestätigt sich auch im Falle einer täglichen Bestrahlung von humanen dermalen Fibroblasten mit niedrigen Strahlendosen und einer Wellenlänge von 420 nm, ohne dabei eine toxische Wirkung auf die Zellen auszulösen (Taflinski et al., 2014). Mit dem proliferationshemmenden Effekt kommt es auch zu einer



verringerten, TGF- $\beta$ 1-abhängigen Umwandlung von humanen dermalen Fibroblasten zu Myofibroblasten. Dieser Effekt wird auch durch eine Studie von Taflinski et al. (2014) gestützt (Taflinski et al., 2014). Sie untersuchten die Expression von  $\alpha$ -Aktinfilamenten durch Fibroblasten nach erfolgter Bestrahlung mit Blaulicht der Wellenlänge 420 nm. Hier zeigte sich eine Reduktion der exprimierten  $\alpha$ -Aktinfilamenten, welche ein charakteristisches Merkmal von Myofibroblasten sind. Somit gelang der Nachweis, dass Bestrahlung mit blauem Licht in der Lage ist, die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten zu blockieren. Da Myofibroblasten durch ihre kontraktile Eigenschaften maßgeblich an der Entstehung hyperproliferativer Hauterkrankungen beteiligt sind, bietet die Bestrahlung mit 420 nm Blaulicht hier erneut eine Möglichkeit zur Therapie dieser Erkrankungen (Taflinski et al., 2014)

Aus klinischer Sicht ist die Blaulicht-Bestrahlung in Bezug auf den antiproliferativen Effekt Gegenstand weiterer Überlegungen zur Therapie hyperproliferativer Hauterkrankungen wie Akne (Shnitkind et al., 2006), Keratosen, Psoriasis, Hautkrebs (Liebmann et al., 2010), Keloiden oder der systemischen Sklerose (Mamalis et al., 2015, Taflinski et al., 2014). Ein wichtiges Merkmal dieser hyperproliferativen Hauterkrankungen ist die Überproduktion von Extrazellulärmatrix durch dermale Fibroblasten (Samarakoon et al., 2013).

#### 1.4.3 Klinische Anwendungsbereiche von sichtbarem Licht

Das offensichtliche Ziel von Lichttherapie wie zum Beispiel der klinischen Verwendung von Blaulicht ist das Erzielen eines größtmöglichen Nutzens bei kleinstmöglichen Nebenwirkungen. Das Prinzip besteht in der exogenen Zuführung von Strahlung – wie zum Beispiel sichtbarem Licht – und der daraus resultierenden Aktivierung endogener Mechanismen, zum Beispiel über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (Lipovsky et al., 2008).

Für viele Jahre war die Phototherapie mittels UV-Strahlung ein wichtiger Bestandteil in der Therapie dermatologischer Erkrankungen. Aufgrund der wissenschaftlich nachgewiesenen Nebenwirkungen wie Hautalterung oder der Erhöhung des Hautkrebsrisikos durch DNA-Schädigung bekam die Phototherapie mit Licht aus dem sichtbaren Spektrum immer mehr Aufmerksamkeit und war Bestandteil verschiedener Studien (Kleinpenning et al., 2010, Goldberg and Russell, 2006).



Um Blaulichtbestrahlung als festen Bestandteil der Lichttherapie in der Klinik zu etablieren, musste also zunächst das Nebenwirkungsprofil näher untersucht werden. Kleinpenning et al. (2010) fanden heraus, dass eine kurzzeitige Bestrahlung der Haut mit blauem Licht im Spektrum von 390 bis 460 nm neben einer gering vermehrten Melaninbildung keine Nebenwirkungen wie langfristige Hautalterung oder DNA-Schäden verursacht und somit eine sichere Therapieoption darstellen könnte (Kleinpenning et al., 2010). Auch Mamalis et al. (2015) beschrieben die fehlende DNA-Schädigungen, die in Zusammenhang mit der Entstehung von Hautkrebs oder Hautalterung stehen (Mamalis et al., 2015).

Zu den Anwendungsbereichen von Lichttherapie mittels blauen Lichts zählt aktuell unter anderem die Therapie der Acne vulgaris. In Studien wurde gezeigt, dass eine Kombination aus Blau- (415 nm) und Rotlichtbestrahlung (633 nm) sehr gute Effekte bei der Therapie milder und starker Acne vulgaris hat. Durch die Expression von Photoakzeptoren wie Protoporphyrin und Coproporphyrin im *Propionibacterium acnes*, die ein Absorptionsmaximum bei Wellenlängen zwischen 407 und 420 nm besitzen, kann die o.g. Strahlenkombination ihre Wirkung entfalten (Goldberg and Russell, 2006, Kleinpenning et al., 2010, Steinbauer et al., 2010). Auch die isolierte Bestrahlung mit 420 nm Blaulicht zeigte in einer klinischen Studie erfolgreiche Ergebnisse in der Therapie von Acne vulgaris (Omi et al., 2004).

Auch in der Therapie von Aktinischer Keratose findet die Blaulichtbestrahlung im Rahmen der photodynamischen Therapie, also dem zusätzlichen Zuführen eines externen Photosensibilisators (Mahmoud et al., 2008, Steinbauer et al., 2010, Babilas et al., 2006), Einsatz in den USA. Durch zusätzlich applizierte Photosensibilatoren wie Aminolävulinsäure (*aminolevulinic acid, ALA*) wird die Konzentration der dermalen Photoakzeptoren wie Protoporphyrinen erhöht und führt so zu einer verstärkten Strahlenwirkung (Kleinpenning et al., 2010, Steinbauer et al., 2010).

Ein weiterer dermatologischer Anwendungsbereich von Blaulichtbestrahlung ist die Therapie der Psoriasis vulgaris, einer chronisch-rezidivierenden immunvermittelten Hauterkrankung, die durch eine epidermale Hyperproliferation gekennzeichnet ist. In einer klinischen Studie wurde bereits die Wirksamkeit der Therapie mit blauem Licht erfolgreich untersucht. Weinstabl et al. (2011) therapierten 37 Psoriasis-Patienten mittels LED-Blaulichtbestrahlung der Wellenlängen 420 nm (Gruppe 1) oder 453 nm (Gruppe 2) und einer Strahlendosis von 90 J/cm<sup>2</sup> täglich für vier Wochen. Insgesamt zeigte sich klinisch

betrachtet ein deutlicher Rückgang der Psoriasis-Plaques in Bezug auf Rötung, Infiltration und Schuppung in beiden Studiengruppen. Neben einer geringen Hyperpigmentierung im Bereich der bestrahlten Hautareale, die im Abstand von zwei Wochen nach Beendigung der Therapie sistierten, kam es zu keinen weiteren Komplikationen oder Nebenwirkungen (Weinstabl A, 2011).

Bei der Therapie von bakteriell infizierten, chronischen Wunden spielt die Therapie mit sichtbarem Licht des Spektrums 400 bis 800 nm durch ihre bakterizide Wirkung eine wichtige Rolle. Durch Hochdosisbestrahlung mit Licht dieser Wellenlänge wurde eine signifikante Reduktion von Bakterienstämmen wie *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Serratia marcescens* in chronischen Wunden erzielt und stellt somit eine Alternative zu bisherigen Behandlungsmethoden dar (Lipovsky et al., 2008).

Ein weiteres Beispiel für die klinischen Anwendungsbereiche von Licht aus dem blauen Spektrum ist die Therapie der neonatalen Hyperbilirubinämie. Hier wird Licht des Spektrums 430 – 490 nm genutzt, um das gesteigerte Serumbilirubin zu senken (Mahmoud et al., 2008).

Potenziell kommt der Blaulichttherapie ebenfalls ein Nutzen im zahnmedizinischen Bereich zu. Der bereits genannte, proliferationshemmende Effekt der Bestrahlung mit blauem Licht zeigte sich auch bei der Behandlung von Zahnfleischfibroblasten, ohne dabei zu DNA-Doppelstrangbrüchen zu führen. Somit besteht hier ein weiteres mögliches und sicheres Anwendungsgebiet (Taoufik et al., 2008).

#### 1.4.4 LED-Systeme als Lichtquelle

Bei der Anwendung von sichtbarem Licht spielt die Lichtquelle eine entscheidende Rolle.

Zu den möglichen Lichtquellen zählen Breitband-Halogenlampen, LED-Systeme oder Plasmalampen. Die Lichtquellen unterscheiden sich im Wesentlichen in ihrer Strahlenintensität, Lebensdauer, Anschaffungskosten sowie in ihrem emittierten Lichtspektrum. Plasmalampen besitzen im Vergleich zu Halogenlampen eine hohe Strahlenintensität (1600 – 2100 mW/cm<sup>2</sup>). Ihre Lebensdauer ist mit 5000 Stunden deutlich höher als die von Halogenlampen, bei jedoch höheren Anschaffungskosten. Die Kosten für LED-Systeme sind vergleichbar mit denen einer Halogenlampe. Jedoch besitzen sie eine

nahezu unendliche Lebensdauer. Die Strahlenintensität beträgt bis zu  $1100 \text{ mW/cm}^2$  (Taoufik et al., 2008).

Schmalband-LED-Systeme besitzen den Vorteil, dass die Einstellung einer bestimmten Wellenlänge unter Aussparung benachbarter Wellenlängen wie UV- oder Infrarotstrahlung möglich ist (Mahmoud et al., 2008, Babilas et al., 2006). Im Gegensatz zu Breitband-Halogenlampen, bei denen zusätzlich zu den gewünschten Wellenlängen auch ungewünschte Spektren emittiert werden, erfolgt die Bestrahlung hier mit einer kontinuierlichen Dosis und Intensität. Hierdurch lassen sich definierte Absorptionsspektren gezielter stimulieren und Chromophoren mit einem bestimmten Absorptionsspektrum aktivieren. Aus diesem Grund wird kein zusätzlicher Filter benötigt (Tielemans et al., 2009). Ein weiterer Vorteil ist die fehlende Hyperthermieentwicklung und der damit verbundene Ausschluss weiterer Stör- bzw. Einflussfaktoren (Babilas et al., 2006, Tielemans et al., 2009). Bei der klinischen Anwendung von Blaulicht zur Behandlung der kindlichen Hyperbilirubinämie kommt dieser Eigenschaft eine besondere Bedeutung zu (Mahmoud et al., 2008).

Babilas et al. (2006) verglichen in ihrer Studie zwei verschiedene Lichtquellen im Anwendungsgebiet der photodynamischen Therapie der aktinischen Keratose miteinander. Als Ergebnis im Vergleich der Breitband-Halogenlampe mit dem LED-System ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Wirksamkeit der photodynamischen Therapie (zusammen mit Aminilävulinsäure). Auch in Bezug auf Nebenwirkungen wie Schmerzen während der Behandlung sahen sie keine signifikanten Unterschiede. Das kosmetische Ergebnis und die Patientenzufriedenheit waren vergleichbar (Babilas et al., 2006).

## 1.5 Ziele der Arbeit

Es gibt Hinweise darauf, dass Blaulichtbestrahlung das antioxidative System humaner Zellen hemmen kann. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit humane dermale Fibroblasten mit Blaulicht der Wellenlänge 420 nm in verschiedenen Intensitäten bestrahlt und auf ihre Reaktion gegenüber oxidativem Stress mittels Zugabe von Wasserstoffperoxid untersucht. Des Weiteren erfolgten Viabilitätsmessungen und die Beobachtung morphologischer Veränderungen nach erfolgter Blaulichtbestrahlung. Ziel dieser Arbeit ist es, mit den gewonnenen Ergebnissen ein besseres Verständnis für die Wirkung von Blaulichtbestrahlung auf menschliche Hautzellen zu erhalten und eine weitere Grundlage für die Etablierung der Blaulichtbestrahlung als klinische Therapieoption zu schaffen.

Bereits vorangegangene Forschungsprojekte konnten zeigen, dass Blaulicht je nach gewählter Bestrahlungsintensität unterschiedliche Auswirkungen auf menschliche Zellen haben kann. So führt eine Bestrahlung mit niedriger Intensität zu einem Proliferationsanreiz, wohingegen eine Bestrahlung mit höherer Intensität proliferationshemmend wirkt (Rossi et al., 2021). Des Weiteren konnten Vorstudien eine vermehrte Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies nach Blaulichtbestrahlung belegen (Marek et al., 2019).

Dennoch liegen bisher keine Studien vor, die eine längere Beobachtungszeit von humanen dermalen Fibroblasten nach erfolgter Blaulichtbestrahlung in Bezug auf die Zellviabilität und somit das langfristige Proliferationsverhalten miteinbezogen. Außerdem gibt es zum aktuellen Zeitpunkt keine weiteren Forschungsprojekte, die den Abbau von exogen zugeführtem Wasserstoffperoxid durch bestrahlte humane dermale Fibroblasten untersuchen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zellen

Humane dermale Fibroblasten	<p>Gewonnen aus Haut-Weichteil-Gewebe von 8 Patienten nach Hautstraffungsoperationen (Abdominoplastik).</p> <p>7 weibliche Patientinnen und ein männlicher Patient.</p> <p>39-75 Jahre, Mittelwert <math>52.4 \pm 15.3</math> Jahre.</p> <p>Verwendung mit Zustimmung der Spender und Genehmigung der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Studien-Nr. 3634).</p> <p>In Zusammenarbeit mit der Abteilung für Plastische und Ästhetische Chirurgie des Klinikums Köln-Merheim.</p>
-----------------------------	---

#### 2.1.2 Geräte

Name	Hersteller
Digitalthermometer GMH3230	Greisinger GHM Group (Remscheid, Germany)
Fluoreszenzmikroskop, Epifluoreszenz-Mikroskop	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
Gefrierschrank, Mr. Frosty	Schmidt "Laborgeräte und Umweltsimulation" Cryo-rate freezer Mr. Frosty (Pressbaum, Österreich)
Inkubator, NuAire DH AutoFlow CO2 Water-Jacketed Incubator	Nuair AutoFlow (Plymouth, USA)
Laborbank, HERAsafe®	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Lichtmikroskop, Axiovert 40	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Germany)
Niederfrequenz LED-Blaulicht Lampe, Wellenlänge 420 nm	Philips Research (Aachen, Deutschland)
pH-Elektrode, InLab-Micro	Mettler-Toledo (Gießen, Deutschland)
pH-Meter, Climatic 766	Knick (Berlin, Deutschland)
Photometer, Specord 205	Analytik Jena (Jena, Germany)
Pipetten, Research® Fix	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

Pipettierhilfe, Pipettboy Accu-jet® Pro	Brand (Wertheim, Deutschland)
Radiometer	Opsytec Dr. Gröbel GmbH; Ettlingen; Deutschland
Spektrofluorometer, VICTOR3™ V Multilabel Counter Model 1420	Perkin Elmer (Waltham, MA, USA)
Taumelrollenmischer, RM5-V 1750	Ingenieurbüro CAT M. Zipperer GmbH (Ballrechten-Dottingen, Deutschland)
Vortexmischer, IKA® RET	Heidolph (Schwabach, Germany)
Wärmebad, Drybath	Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA)
Wärmebad	Elma Transsonic TI-H15 MF2 (Singen, Deutschland)
Zentrifuge	Thermo Scientific Haraeus Pico 17 Microcentrifuge Thermo Scientific Haraeus Megafuge 16 R Thermo Electron Corporation Haraeus Fresco 17 Centrifuge
Zentrifuge, Thermo Scientific Haraeus Megafuge 16 R	Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA)

### 2.1.3 Materialien

Name	Hersteller
0,5 ml Röhrchen, Safe-Lock Tubes™	Eppendorf AG (Hamburg, Germany)
1,5 ml Röhrchen, Safe-Lock Tubes™	Eppendorf AG (Hamburg, Germany)
2 ml Röhrchen, Safe-Lock Tubes™	Eppendorf AG (Hamburg, Germany)
15 ml konisches Röhrchen, ART.-Nr : 188171	GREINER bio-one (Solingen, Germany)
50 ml konisches Röhrchen, ART.-Nr : 227261	GREINER bio-one (Solingen, Germany)
5 ml Stripette, Costar®	Sigma-Aldrich (Bensalem, PA, USA) 10 ml Costar® 5 ml shorty Stripette® Serological Pipettes 25 ml Costar® 5 ml shorty Stripette® Serological Pipettes
10 ml Stripette, Costar®	Sigma-Aldrich (Bensalem, PA, USA)
25 ml Stripette, Costar®	Sigma-Aldrich (Bensalem, PA, USA)
24-Well Platte, CELLSTAR® Tissue Culture Plates	GREINER bio-one (Solingen, Deutschland)
96-Well Platte, CELLSTAR® Tissue Culture Plates	GREINER bio-one (Solingen, Deutschland)
Chirurgische Pinzette	Medico Care B.V. (Numansdorp, Niederlande)
Chirurgische Schere	Medico Care B.V. (Numansdorp Niederlande)
Filter-Pipettenspitzen 50µl, TipOne®	Star lab group (Hamburg, Germany)

Filter-Pipettenspitzen 100µl, TipOne®	Star lab group (Hamburg, Germany)
Filter-Pipettenspitzen 200µl, TipOne®	Star lab group (Hamburg, Germany)
Gefrierröhrchen, Cryos™ 2ml	GREINER bio-one (Solingen, Deutschland)
Objektträger, Nr. 11101	Engelbrecht (Edermünde, Germany)
Pasteurpipette, ISO 7712	Brand GmbH CO KG (Wertheim, Deutschland)
Petrischale, Dish 100	SARSTEDT TC (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen, TipOne®	Star lab group (Hamburg, Deutschland)
Skalpell	Medico Care B.V. (Numansdorp, Niederlande)
Tropfenzähler	BRAND GmbH + CO KG Pasteur pipettes ISO 7712
Zählkammer, Neubauer	BRAND GmbH + CO KG (Wertheim, Deutschland)
Zellkulturflasche 75cm <sup>2</sup> CELLSTAR® Cell Culture Flasks Red Filter Cap	GREINER bio-one (Solingen, Deutschland)
Zellkulturflasche 175cm <sup>2</sup> CELLSTAR® Cell Culture Flasks Red Filter Cap	GREINER bio-one (Solingen, Deutschland)
Zellkultur-Petrischale 35 mm Thermo Scientific™ Nunc™	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

#### 2.1.4 Substanzen

Name	Hersteller
Aqua dest. 1000 ml	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA (Paschin, Austria)
CellTiter-Blue®	Promega CellTiter-Blue® Zellviabilitätsmessung (Madison, USA)
D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, USA)
Dispase II Lösung	Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, USA)
Dispase II Lösung (0,1% Dispase Typ II, 5% HEPES-Pufferlösung)	Roche (Basel, Schweiz)
DMEM 1g/L Glucose	PAN Biotech (Aidenbach, Germany)
Ethanol	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Fluoresceindiacetat (FDA)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
HEPES	Sigma (Bensalem, PA, USA)
Hoechst 33258	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe, Germany)
Katalase	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Kollagenase Typ CLS 255 U/mg	Biochrom (Berlin, Germany)
L-Glutamine 200 mM (100x)	Gibco (Karlsruhe, Germany)

Natriumchlorid (0,9%)	VWR (Radnor, PA, USA)
Penicillin (100x)	PAA (Paschin, Austria)
Phosphat-gepufferte Lösung	Invitrogen (Carlsbad, MA, USA)
Propidiumiodid (PI)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Salzsäure (1.0 N)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Schwefelsäure (1.0 N)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
SeraPlus Special Processed FBS	PAA (Paschin, Austria)
Streptomycin (100x)	PAA (Paschin, Austria)
Titaniumoxalat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trypsin/EDTA Lösung (10x)	Biochrom (Berlin, Germany)
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH +Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Zellviabilitätsmessung, CellTiter-Blue®	Promega (Madison, WI, USA)

### 2.1.5 Software

Name	Hersteller
ImageJ	Wayne Rasband, National Institutes of Health (Bethesda, USA)
Microsoft Excel	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Microsoft PowerPoint	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Microsoft Word	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Origin 8	OriginLab Corporation (Northampton, MA, USA)
PowerChrom™	eDAQ (Deinstone East, Australien)
Prism 8	GraphPad Software (San Diego, CA, USA)
ZeissAxioVision	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellisolation

Postoperativ wurde gewonnenes Haut-Weichteilgewebe in modifiziertes Medium überführt. Dieses wurde in sterilen Behältnissen gekühlt ins Labor transportiert.

Anschließend wurde das Medium entfernt, das Haut-Weichteilgewebe in Petrischalen transferiert und mit einem Skalpell zerkleinert. Die Proben wurden mit 5-10 ml Dispase II-Lösung in 50 ml Falcons gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C auf dem Taumelrollenmischer. Am nächsten Tag wurden Epidermis und Dermis voneinander separiert.

Die Dermis, welche die zu untersuchenden Fibroblasten enthält, wurde in ein weiteres 50 ml Falcon überführt. Für 45 – 60 Minuten erfolgte die Inkubation unter Schütteln bei 37 °C. Das Abstoppen der Reaktion wurde durch Zugabe des gleichen Volumens PBS eingeleitet. Bei 500 x g erfolgte die Zentrifugation für fünf Minuten. Im Anschluss an die Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt. 8 ml Kollagenasepuffer wurden jedem Falcon hinzugegeben. Die Falcons wurden für eine Stunde im Wasserbad bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

Der Inhalt des Falcons wurde anschließend durch ein Sieb filtriert und unter Stempeln in eine Petrischale überführt. Anschließend wurde das Sieb mit PBS durchgespült und erneut unter Druck gestempelt. Das gewonnene Filtrat wurde in ein weiteres Falcon transferiert und bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in Medium resuspendiert und anschließend in eine Zellkulturflasche gegeben. Das Kultivieren der Zellkulturflasche erfolgte unter Standardinkubationsbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

**Tab. 1 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen.**

Es werden die verschiedenen Substanzen sowie ihre Mengen in der Dispase-II-Lösung und dem Kollagenasepuffer angegeben. Eigene Darstellung modifiziert nach (Balzer, 2016)

<b>Lösung</b>	<b>Inhaltsstoffe</b>
Dispase II-Lösung	0.1 % Dispase Typ II 5 % 1M Hepes Pufferlösung 1 M (PAN) <i>ad.</i> PBS
Kollagenasepuffer	0,1 M Hepes 0,12 M NaCl 0,05 M KCl 0,001 M CaCl <sub>2</sub> 0,005 M Glucose <i>ad.</i> Aqua dest. Vor Gebrauch 0,2% Kollagenase I und 1,5% BSA dazugegeben

### 2.2.2 Zellkultivierung der Fibroblasten

Die Zellkultivierung erfolgte in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator unter Standardkultivierungsbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 90 % Luftfeuchtigkeit). Hierzu wurden die Fibroblasten in 75 – 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) transferiert. Die einzelnen Schritte der Zellkultivierung wurden unter der sterilen Laborbank durchgeführt. Die verwendeten Materialien für die Kultivierung waren steril oder wurden vor Gebrauch mit 121 °C autoklaviert.

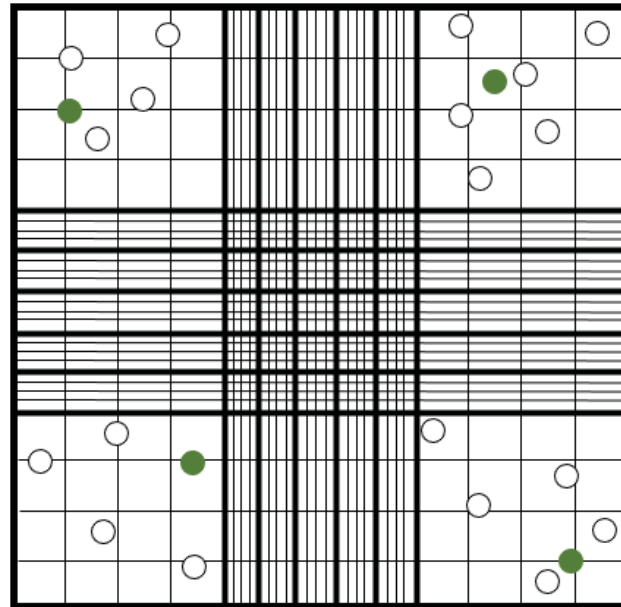
Zu den in den Zellkulturflaschen adhärent-wachsenden Fibroblasten wurden Dulbecco's modified Eagles's Medium (DMEM), 100 U/ml Penicillin (Pen), 100 µg/ml Streptomycin (Strep) und 10 % (v/v) fetales Kälberserum (FCS) gegeben. Der Wechsel des Zellmediums erfolgte alle drei Tage.

### 2.2.3 Passagierung der Zellen

Der Passagierungsprozess ermöglicht den Zellen das Fortsetzen des Wachstums in anderen Zellkulturflaschen oder auf 24-Well-Platten. Das verbrauchte Medium aus den Zellkulturflaschen wurde abgesaugt. Die adhärenen Zellen wurden zweimal mit calcium- und magnesiumfreier phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Anschließend erfolgte das Absaugen der Salzlösung und die Zugabe von 5 – 10 ml warmen Trypsin/EDTA zu den anhaftenden Fibroblasten. Dieser Schritt diente dem Ablösen der Zellen. Die Zellkulturflaschen wurden daraufhin für 5 – 7 Minuten unter Standardkultivierungsbedingungen im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. Zur Vermeidung des Zelltods musste eine längere Inkubationszeit vermieden werden. Die Zellablösung wurde anschließend mikroskopisch kontrolliert. Danach wurde zur Neutralisierung des Trypsin/EDTA fetales Kälberserum (FCS) hinzugegeben. Nach Überführung der Suspension in ein 50 ml Falcon wurde diese für fünf Minuten unter 400 x g zentrifugiert und anschließend der Überstand über dem Pellet abgesaugt. Das Pellet wurde mit einer 1000 µl-Pipette in 10 ml frischem FCS-Medium resuspendiert, bis eine nahezu klare Flüssigkeit entstand. Danach bestand die Möglichkeit des Auszählens der Zellen oder der Überführung in eine neue Zellkulturflasche, um einen weiteren Zellwachstumsprozess zu ermöglichen.

Zum Auszählen der Fibroblasten wurden 10 µl Zellsuspension auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Bestimmung der Zellzahl unter dem Mikroskop ergab sich durch Auszählen der Zellen in den vier Quadranten. Um die Menge an Fibroblasten in 10 µl Suspension zu berechnen, wurde der arithmetische Durchschnitt der vier Quadranten herangezogen. Zur exakten Zellzahlbestimmung erfolgte die Berechnung anhand folgender Formel:

$$\text{Zelldichte} = \text{Verdünnungskoeffizient} * \frac{\text{Zellzahl}}{4} * 10^4 * \text{ml}^{-1}$$



**Abb 3 Schematische Darstellung der Neubauer-Zählkammer** (modifiziert nach Balzer 2016: Effects of non-thermal atmospheric pressure plasma on the physiology of human dermal cells)

Nach der Auszählung wurden die Fibroblasten gleichmäßig auf eine 24-Well-Platte verteilt. War die Zellzahl niedriger als benötigt, so wurden die Fibroblasten erneut in eine Zellkulturflasche transferiert und mit Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) unter Standardkultivierungsbedingungen im CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert.

#### 2.2.4 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung der Fibroblasten wurde durchgeführt, um Zellen aus aktuellen Zelllinien weiterhin für zukünftige Versuche nutzen zu können. Hierzu wurden die Fibroblasten in 2 ml Cryo-Greiner-Röhrchen mit 10 % DMSO und 90 % FCS kryokonserviert. Zunächst wurden die Zellen passagiert. Anschließend erfolgte die Überführung von 500.000 – 1.000.000 Zellen in die o.g. Suspension. Die Röhrchen wurden anschließend in mit Isopropanol gefüllte Gefäße gegeben, um ein vorsichtiges Einfrieren zu gewährleisten. Bei -80 °C wurden die Cryo-Greiner-Röhrchen für vier Stunden eingefroren und anschließend in gewöhnliche Behältnisse gestellt, um über einen längeren Zeitraum gelagert zu werden.

Bereits kryokonservierte Zellkulturen wurden in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, um diese für weitere Versuche zu verwenden. Die Entfernung der Fibroblastenkulturen aus dem

Wasserbad erfolgte bei teilweise flüssiger Suspension. Bis zur vollständigen Verflüssigung wurde die teilweise noch gefrorene Flüssigkeit resuspendiert. Anschließend erfolgte die Hinzugabe von modifiziertem Medium. Danach wurden die Röhrchen nach o.g. Beschreibung zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Nach Resuspendierung des Pellet wurde dies auf 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 30 ml DMEM gegeben. Abschließend erfolgte die Lagerung der Zellkulturflaschen im CO<sub>2</sub>-Inkubator nach genannten Standardbedingungen.

#### 2.2.5 Messung der Temperatur unter der LED-Blaulichtlampe während der Bestrahlung

Eine Zellkultur-Petrischale wurde mit PBS gefüllt und mittig in den schraffierten Bereich unterhalb der LED-Blaulichtlampe platziert (s. Abb. 4 im Ergebnisteil). Ein Digitalthermometer wurde in der PBS-Lösung fixiert. Alle fünf Minuten erfolgte das Ablesen der Temperatur für insgesamt 75 Minuten. Die Versuchsdurchführung erfolgte sowohl mit als auch ohne Luftkühlung mittels elektrischen Ventilators (12 V). Dieser wurde unmittelbar hinter der Blaulichtlampe platziert.

#### 2.2.6 Messung der Bestrahlungsintensität (mW/cm<sup>2</sup>) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer

Zunächst erfolgte die Messung der Strahlenintensität in mW/cm<sup>2</sup> an verschiedenen Messpunkten innerhalb des Bestrahlungsbereiches. Eine Zellkultur-Petrischale mit 1,5 ml PBS wurde an unterschiedlichen Messpunkten platziert. Darunter befand sich ein Radiometer, dessen Messelektrode nach oben in Richtung LED-Lichtquelle gerichtet war. Die Strahlendosiswerte an den unterschiedlichen Messpunkten wurden notiert. Um die Entwicklung der Strahlenintensität im Verlauf einer längeren Bestrahlung bestimmen zu können, erfolgte die Kontrolle der Strahlenintensität über einen längeren Zeitraum. Hierzu wurde eine Petrischale mit PBS zentral im Bestrahlungsbereich platziert. Nach Anschalten der LED-Blaulichtlampe erfolgte das Ablesen der Strahlenintensität in mW/cm<sup>2</sup> jede Minute.

### 2.2.7 Blaulichtbestrahlung der humanen dermalen Fibroblasten

Für die Toxizitätsprüfung benötigte jeder Versuchsansatz sechs Zellkultur-Petrischalen bestehend aus einer unbestrahlten Petrischale ( $\cong 0 \text{ J/cm}^2$ , Kontrolle), einer für fünf Minuten ( $\cong 8,5 \text{ J/cm}^2$ ), einer für zehn Minuten ( $\cong 17 \text{ J/cm}^2$ ), einer für zwanzig Minuten ( $\cong 34 \text{ J/cm}^2$ ), einer für dreißig Minuten ( $\cong 51 \text{ J/cm}^2$ ) und einer für sechzig Minuten ( $\cong 102 \text{ J/cm}^2$ ) bestrahlten Zellkultur-Petrischale. Vor Beginn der Bestrahlung wurde das Medium einer jeden Petrischale abgesaugt und die Zellkultur-Petrischalen mit jeweils 1,5 ml PBS befüllt. Nach der o.g. Aufwärmphase zur Stabilisierung der Temperatur und Strahlenintensität der LED-Lampe werden bis auf die Kontrolle alle zu bestrahlenden Petrischalen mit den Fibroblasten in dem Bestrahlungsbereich unterhalb der Blaulichtlampe platziert. Die Kontrollschale wurde in einem gewissen Abstand von der LED-Lichtquelle platziert. Nach der jeweiligen Bestrahlungsdauer erfolgte die Entfernung der einzelnen Petrischalen. Das PBS wurde abgesaugt und jede bereits bestrahlte Petrischale mit 2 ml Medium befüllt und unter Standardinkubationsbedingungen im Brutschrank inkubiert. Die Platzierung der unter der LED-Blaulichtlampe verbliebenen Schalen wurden zufällig verändert, um einer Verfälschung durch unterschiedliche Strahlenintensitäten vorzubeugen. Die Kontrollschale wurde zusammen mit den für dreißig Minuten bestrahlten Fibroblasten zurück in den Brutschrank gestellt.

### 2.2.8 CellTiter-Blue® Zellviabilitätsmessung

Die CellTiter-Blue® Messung dient der Bestimmung der Lebensfähigkeit (Viabilität) von Zellen. Die Lösung enthält den Indikatorfarbstoff Resazurin, welches von lebenden Zellen zu Resorufin metabolisiert werden kann. Beide Farbstoffe haben unterschiedliche Absorptionsmaxima. Das verwendete Spektrofluorometer (VICTOR X Multilabel Plate Reader, Perkin Elmer, 590 nm) kann somit zwischen vitalen und avitalen Zellen unterscheiden.

Die Cell-Titer-Blue® Messung wurde verwendet, um die Toxizität nach Blaulicht-Bestrahlung durch Angabe einer relativen Zellzahl zu bestimmen sowie mögliche Proliferationsabweichungen darzulegen. Der Farbstoff wurde im Verhältnis 1:20 mit DMEM gemischt. Zunächst wurde das sich auf den Zellen befindliche Medium abgesaugt und jeweils 350  $\mu\text{l}$  der Cell-Titer-Blue®/DMEM-Lösung auf die Zellen gegeben. Es folgte

die 90-minütige Inkubation unter Standardinkubationsbedingungen. Anschließend erfolgte der Transfer von jeweils 100 µl Lösung aus jeder Probe auf zwei 96-Well-Platten. Es schloss sich die spektrofluorometrische Messung beider Platten an. Für den Toxizitätsversuch erfolgte die Cell-Titer-Blue® Messung am ersten, am vierten und am siebten Tag nach erfolgter Bestrahlung der humanen dermalen Fibroblasten.

Die Zellkulturen wurden abschließend mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt, um sie für weitere Untersuchungen zu verwenden.

### 2.2.9 Wasserstoffperoxid-Photometrie

Die humanen dermalen Fibroblasten wurden auf sechs Zellkultur-Petrischalen aufgeteilt. Für die anschließende Bestrahlung mit Blaulicht wurden die einzelnen Schalen mit 1,5 ml PBS gefüllt. Von den sechs Petrischalen waren zwei für die Kontrollgruppe (unbehandelte Zellen), zwei für die 5-minütige Bestrahlung ( $= 8,5 \text{ J/cm}^2$ ) und zwei weitere für die 10-minütige Bestrahlung ( $=17 \text{ J/cm}^2$ ) vorgesehen. Nach Bestrahlung der Zellen mit der o.g. Dauer erfolgte das Absaugen von PBS und die Befüllung der einzelnen Schalen mit 2 ml Medium. (DMEM). Die Petrischalen wurden anschließend für eine Stunde im Inkubator gelagert. In dieser Zeit erfolgte das Ansetzen von 354 mg Titanium-Oxalat mit 10 ml Schwefelsäure in einem 50 ml Falcon. Anschließend wurde das Falcon in den Vortexmischer gelegt. Es erfolgte die Verdünnung des Wasserstoffperoxids (9,88 M) bis  $1 \mu\text{M}$  (s. Tabelle 2).

**Tab. 2 Wasserstoffperoxid-Verdünnungsreihe.**

Die Tabelle zeigt die einzelnen Schritte der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Verdünnung und die sich daraus ergebene, entsprechenden Konzentrationen.

1. Falcon	10 ml PBS + 101,2 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 mM
2. Falcon	9 ml PBS + 1 ml aus 1. Falcon	10 mM
3. Falcon	9 ml PBS + 1 ml aus 2. Falcon	1 mM
4. Falcon	9 ml PBS + 1 ml aus 3. Falcon	100 µM
5. Falcon	9 ml PBS + 1 ml aus 4. Falcon	10 µM
6. Falcon	9 ml PBS + 1 ml aus 5. Falcon	1 µM

Die Verdünnungsreihe wurde anschließend nach Hinzugabe von 200 µl Titaniumoxalat und 100 µl PBS mit dem Spektrometer gemessen. Die Falcons mit der verdünnten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung wurden mit Alufolie umwickelt, sodass diese unbeeinflusst von Licht gelagert werden konnten. Nach einer Stunde Inkubation wurden die Schalen mit den Fibroblasten und dem Medium dreimal mit PBS gewaschen und jeweils 1 ml der auf 100 µM verdünnten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung in die Schalen gegeben. Danach wurden die Zellkultur-Petrischalen erneut für fünf Minuten inkubiert. Es wurden drei Versuchsreihen mit jeweils vier Eppendorf-Röhrchen vorbereitet. Jedes Röhrchen enthielt 200 µl Titaniumoxalat und 100 µl PBS. Jede Versuchsreihe bestand aus einem Leerwert-Röhrchen, einem Kontroll-Röhrchen, einem Röhrchen der mit 8,5 J/cm<sup>2</sup> bestrahlten und einem Röhrchen der mit 17 J/cm<sup>2</sup> bestrahlten Zellen. Nach Inkubation für fünf Minuten wurden 100 µl der inkubierten Schalen in die vorbereiteten Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Die spektrometrische Messung einer jeden Versuchsreihe wurde dreimal wiederholt. Nach Abschluss der Versuchsreihe wurden die Zellen auf den Zellkultur-Petrischalen unter dem Lichtmikroskop begutachtet und auf ihre Adhärenz an der Schale überprüft.



## 2.2.10 Fluoreszenzmikroskopie

Dieser Versuchsaufbau bestand aus neun Petrischalen mit humanen dermalen Fibroblasten. Die neun fibroblastenenthaltenden Petrischalen setzten sich zusammen aus drei unbestrahlten Kontrollschalen, drei mit  $17 \text{ J/cm}^2$  und drei mit  $34 \text{ J/cm}^2$  bestrahlten Fibroblasten-Petrischalen. Nach Bestrahlung der Fibroblasten mit der jeweiligen Dosierung in 1,5 ml PBS erfolgte zunächst die Inkubation unter Standardlaborbedingungen in 2 ml Medium. Die Fluoreszenzmessung fand an drei Messzeitpunkten in Bezug auf die Bestrahlung statt (nach einer Stunde, nach vier Stunden und nach zwanzig Stunden). Nach Entfernung der Zellen aus dem Brutschrank zum jeweiligen Messzeitpunkt wurde das Medium der drei Versuchsansätze mit drei verschiedenen Farbstoffen versehen (Dreifachansatz). Die Zellen des ersten Versuchsansatzes erhielten  $0,8 \mu\text{l}$  FDA. Die des zweiten Versuchsansatzes wurden mit  $5 \mu\text{l}$  Hoechst und die des dritten Versuchsansatzes mit  $5 \mu\text{l}$  PI versehen. Dabei wurde der Farbstoff direkt ins Medium gegeben. Nach einer fünfminütigen Inkubation wurden Medium mit darin enthaltenem Farbstoff abgesaugt und 1,5 ml PBS dazugegeben. Die Fluoreszenzmikroskopie der Schalen erfolgte ohne Deckel unter dem Epifluoreszenzmikroskop der Firma Carl Zeiss AG. Die erste Bearbeitung der Bilder erfolgte mittels ZeissAxioVision Software.

Für die Farbstoffe FDA und Hoechst wurde eine Belichtungszeit zwischen 430 und 460 ms gewählt, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Für den Farbstoff PI musste zur besseren Darstellbarkeit eine längere Belichtungszeit von knapp unter einer Sekunde gewählt werden.

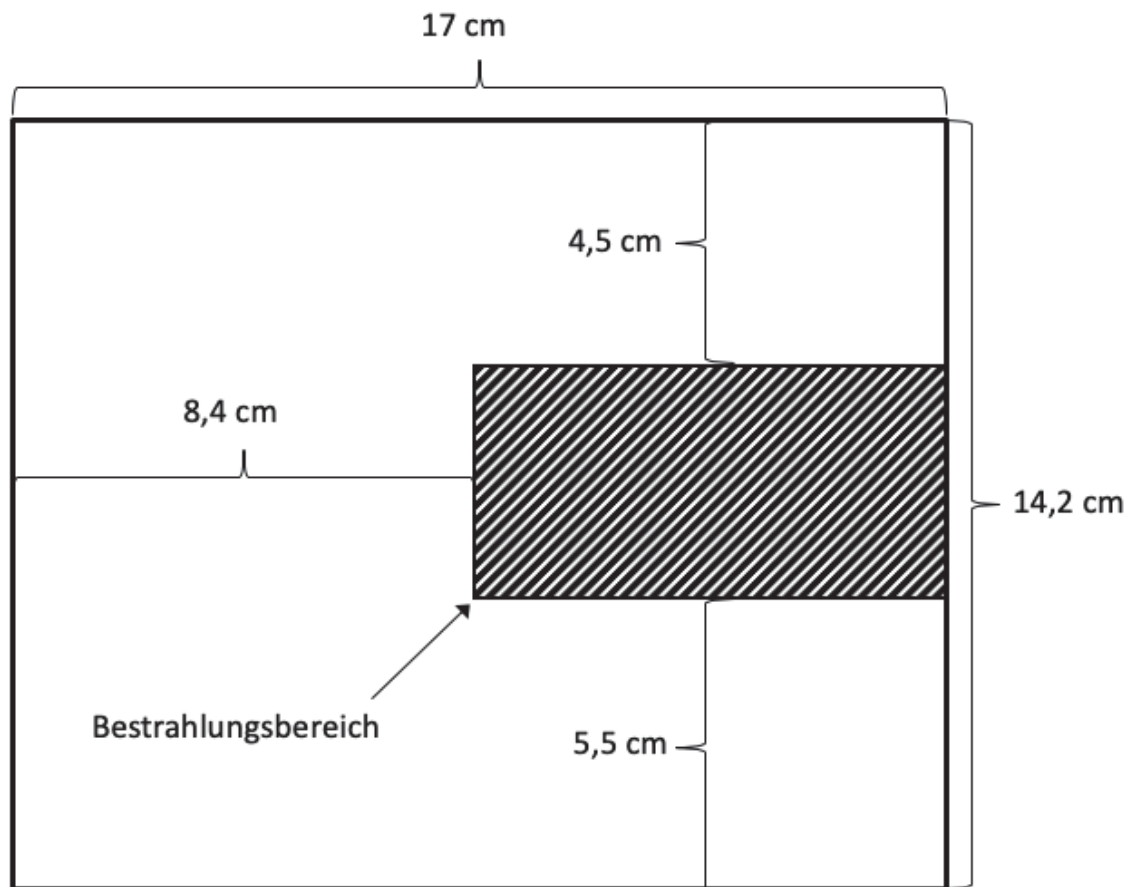
Die abschließende Auswertung und Zellzählung anhand der Fluoreszenzbilder erfolgte mit der Software *Image J*.

## 2.2.11 Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse wurde ein gepaarter zweiseitiger Student-t-Test oder ANOVA gefolgt von einem geeigneten post-hoc-Merfachvergleichstest (Turkey-Methode) herangezogen. Ein  $p < 0,05$  wurde als signifikant angesehen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Maße der LED-Blaulichtlampe



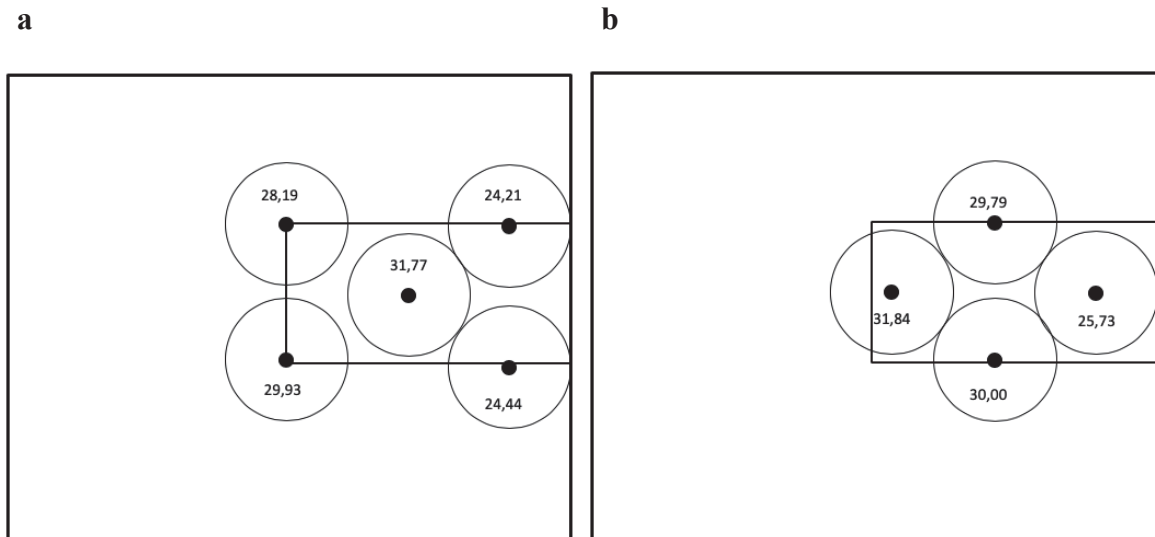
**Abb. 4 Abmessungen der LED-Blaulichtlampe.**

Die schraffierte Fläche zeigt den verwendeten Bereich, in dem die Petrischalen während der Bestrahlung platziert wurden, um eine möglichst identische Bestrahlungsintensität zu erhalten.

Die verwendete LED-Blaulichtlampe hat eine rechteckige Form mit den Maßen 17 x 14,2 cm (Länge x Breite). Um die Bestrahlungsintensitäten der Proben möglichst identisch und somit die Ergebnisse vergleichbar zu halten, wurde nur ein kleiner Bereich der insgesamt 241,4 cm<sup>2</sup> großen Fläche unterhalb der Lampe für die Blaulichtbestrahlung verwendet. Dieser Bereich ist in Abb. 4 schraffiert dargestellt und hat eine Größe von 8,6 x 4,2 cm (Länge x Breite), also eine Fläche von 36,12 cm<sup>2</sup>.

### 3.2 Bestrahlungsintensitäten im verwendeten Versuchsbereich

Um möglichst vergleichbare Bestrahlungsintensitäten und somit vergleichbare Versuchsergebnisse zu erhalten, wurden die Petrischalen mit den Fibroblasten bei der Blaulichtbestrahlung nur in einem bestimmten Bereich in unmittelbarer Nachbarschaft voneinander platziert. Dabei befand sich das Strahlendosimeter mit der Messelektrode nach oben gerichtet unterhalb der zu bestrahlenden Schale.

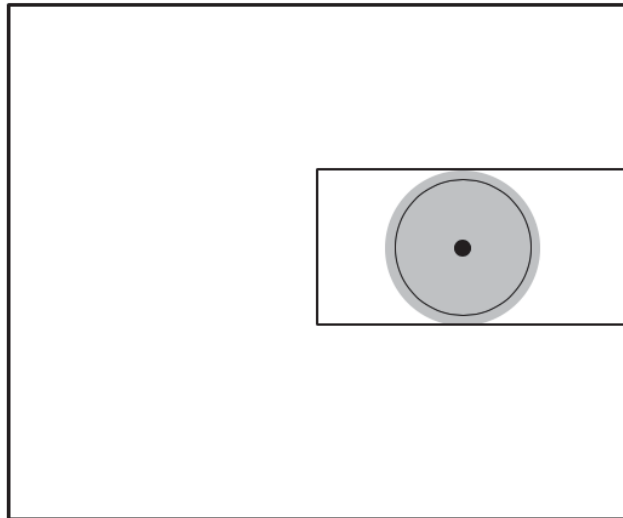


**Abb. 5 Bestrahlungsintensitäten im verwendeten Bestrahlungsbereich (mW/cm<sup>2</sup>).**

Die Abbildung zeigt die Bestrahlungsintensitäten im Zentrum der in unterschiedlichen Bereichen platzierten Petrischalen (Kreis mit zentralem Punkt).

Die Schale wurde bei der hier durchgeführten Testmessung nicht mit einem Deckel bedeckt. Insgesamt wurden maximal fünf Petrischalen parallel zur gleichen Zeit bestrahlt und, wie in Abb. 5 dargestellt, platziert.

Trotz der räumlichen Nähe zueinander ergab die Messung der Bestrahlungsintensität Unterschiede von bis zu 7,63 mW/cm<sup>2</sup>. Der niedrigste gemessene Wert beträgt 24,21 mW/cm<sup>2</sup>, der Höchste 31,84 mW/cm<sup>2</sup>.



**Abb. 6 Platzierung der mit einem Deckel abgedeckten Petrischale.**

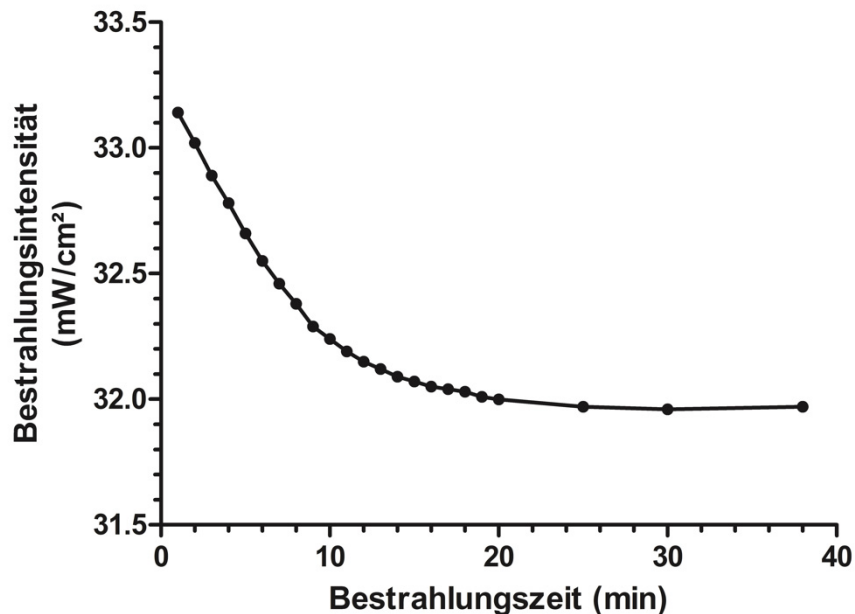
Die Abbildung zeigt die Platzierung der mit einem Deckel abgedeckten Petrischale im Zentrum des Bestrahlungsbereiches unterhalb der LED-Blaulichtlampe.

In den Zellversuchen wurden die Fibroblasten-Petrischalen mit einem Deckel abgedeckt. Hierzu musste in einem Vorversuch die Absorption durch den verwendeten Deckel bestimmt werden. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 6 dargestellt. Während die Strahlenintensität ohne Deckel  $32,12 \text{ mW/cm}^2$  betrug, lag sie mit der Abdeckung bei  $29,74 \text{ mW/cm}^2$ . Dies entspricht einer Absorption durch den verwendeten Deckel von 7,4 Prozent.

### 3.3 Entwicklung der Strahlungsintensität während der LED-Blaulichtbestrahlung

Um für alle zu bestrahlenden humanen dermalen Fibroblasten eine möglichst identische Strahlungsintensität und somit vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde die Entwicklung der Strahlungsintensität ( $\text{mW/cm}^2$ ) während einer 38-minütigen Blaulichtbestrahlung unter der LED-Lampe mittels Strahlendosimeter gemessen.

## Bestrahlungsintensität in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer



**Abb. 7 Strahlungsintensität (mW/cm<sup>2</sup>) während der Bestrahlung.**

Die Abbildung zeigt die Entwicklung der Strahlungsintensität während der LED-Blaulichtbestrahlung. Nach anfänglich hoher Strahlungsintensität von 33,14 mW/cm<sup>2</sup> nach einer Minute sinkt der Wert kontinuierlich, um nach etwa 20 Minuten einen gleichbleibenden Wert von etwa 32 mW/cm<sup>2</sup> zu erreichen.

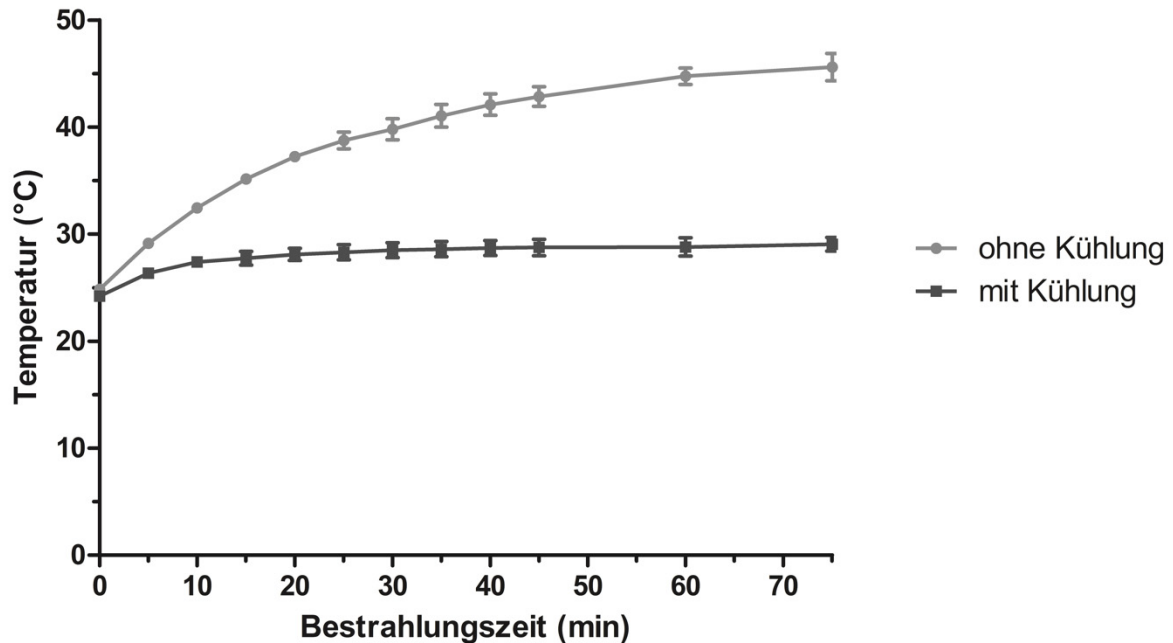
Die Petrischale mit der Messelektrode wurde hierbei zentral innerhalb der verwendeten Bestrahlungsfläche (s. Abb. 4) platziert.

Im Verlauf lässt sich ein stetiger Abfall der gemessenen Strahlungsintensität erkennen. Nach etwa 20 Minuten wird nahezu ein Plateau von 32 mW/cm<sup>2</sup> erreicht. An den drei darauffolgenden Messzeitpunkten sinkt die Strahlungsintensität kaum noch (31,97 mW/cm<sup>2</sup> nach 38 Minuten), sodass von einer gleichbleibenden Strahlungsintensität nach einer Run-Up-Phase von 20 Minuten ausgegangen wird.

### 3.4 Temperaturentwicklung während der Blaulichtbestrahlung

Um ein Absterben der bestrahlten Fibroblasten unter LED-Blaulichtbestrahlung durch zu hohe Temperaturentwicklung auszuschließen, wurde diese im vorliegenden Versuch über einen gesamten Bestrahlungszeitraum von 75 Minuten in regelmäßigen Abständen (5 – 15 Minuten) mithilfe eines Thermometers gemessen. In Abbildung 8 sind die Ergebnisse der Messung dargestellt.

### Temperaturentwicklung während der Bestrahlung ohne/mit Kühlung



**Abb. 8 Temperaturentwicklung unter der LED-Blaulichtlampe während der Bestrahlung.**

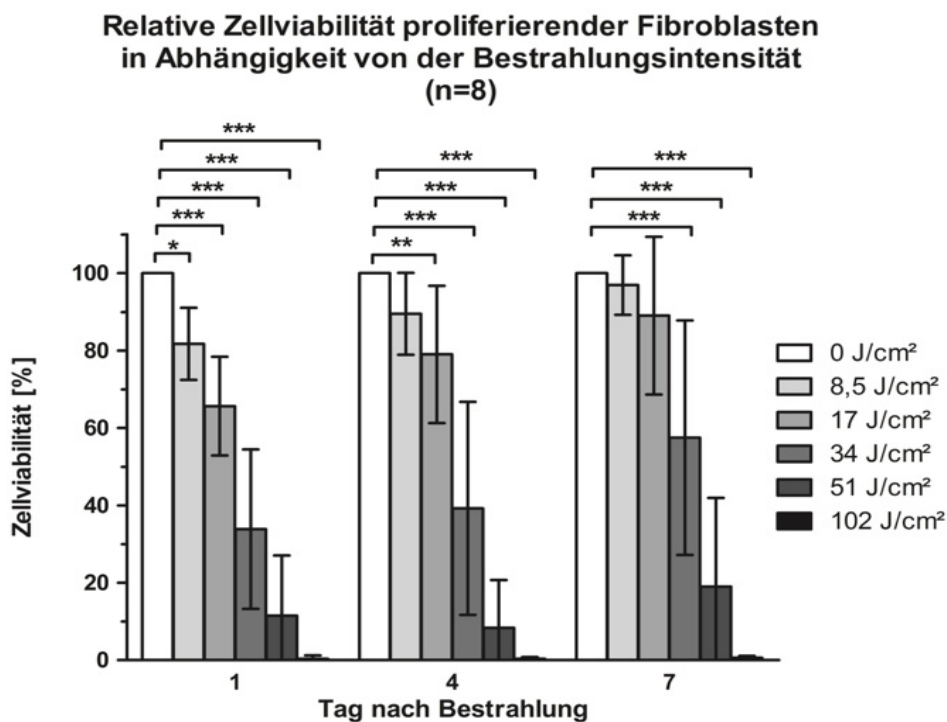
Die Abbildung zeigt die Entwicklung der Temperatur unter der Blaulichtlampe mit und ohne Ventilator-Kühlung. Über den gesamten Bestrahlungszeitraum von 75 Minuten erreicht die Temperatur ein Maximum von 29 °C und bleibt über einen Großteil des Zeitraums konstant. Im Vergleich dazu ist die Temperatur ohne Kühlung deutlich höher (Maximum bei 45,6 °C nach 75 Minuten) und im gesamten Verlauf stetig ansteigend.

Es zeigt sich, dass es ohne Kühlung (Ventilator) zu einer deutlich stärkeren Temperaturentwicklung zu allen angegebenen Messzeitpunkten kommt. Das Temperaturmaximum wird mit 45,6 °C in der durchgeführten Messreihe nach 75 Minuten erreicht. Trotz einer im Verlauf zunehmend langsamer ansteigenden Temperatur ist diese im Verlauf stetig ansteigend.

Betrachtet man die Temperaturentwicklung unter der Blaulichtlampe während der LED-Bestrahlung mit durchgehend laufender Kühlung, so erkennt man, dass die Temperaturen bei gleicher Ausgangstemperatur (Raumtemperatur im Mittel 24,5 °C) deutlich niedriger gehalten werden. Nach 75 Minuten erreicht die Temperatur ihr Maximum mit 29 °C. Auch an den unmittelbar vorangegangenen Messzeitpunkten hat die Temperatur bereits beinahe das Plateau von 29 °C erreicht (28,8 °C nach 45 Minuten und 28,8 °C nach 60 Minuten), sodass für alle Bestrahlungszeiten von einer ähnlichen Grundvoraussetzung ausgegangen werden kann. Die Temperaturdifferenz zwischen den relevanten Bestrahlungszeiten ( $8,5 \text{ J/cm}^2 = 5\text{-minütige Bestrahlung: } 26,3 \text{ °C}$ ,  $102 \text{ J/cm}^2 = 60\text{-minütige Bestrahlung: } 29 \text{ °C}$ ) beträgt somit maximal 2,7 °C.

### 3.5 Blaulichtbestrahlung verursacht intensitätsabhängige Toxizität in proliferierenden Fibroblasten

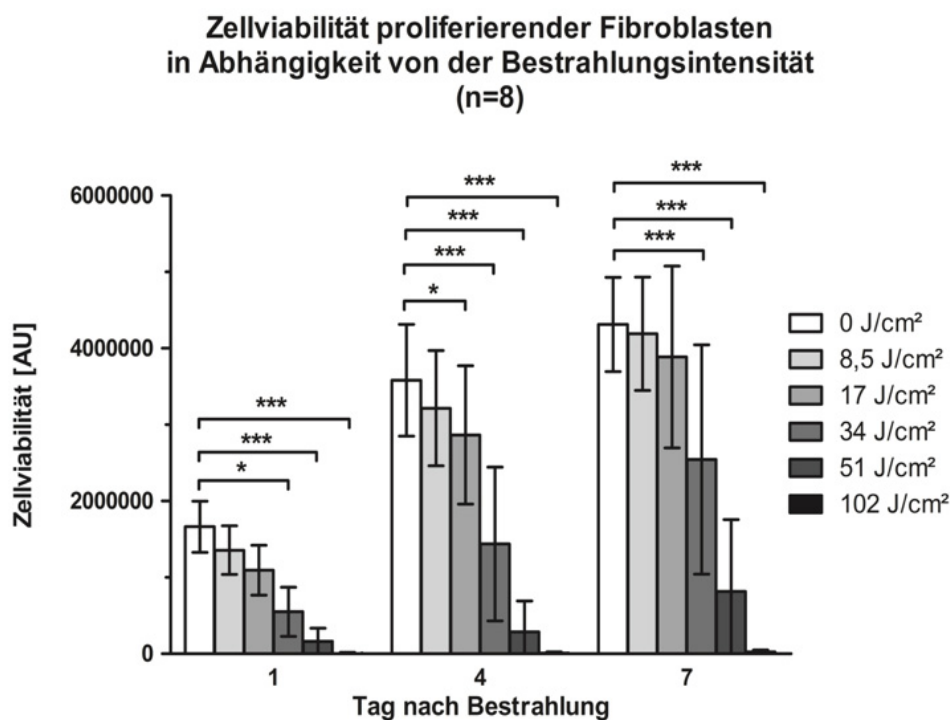
Um die Zellviabilität als indirektes Maß für die Zellzahl zu bestimmen, wurde die CellTiter-Blue®-Methode herangezogen. Hierzu wurden die proliferierenden, humanen dermalen Fibroblasten (HDF) an Tag 0 einer LED-Blaulicht-Bestrahlung mit unterschiedlichen Intensitäten (0 – 102 J/cm<sup>2</sup>) unterzogen. Dabei entspricht die angegebene Intensität 0 J/cm<sup>2</sup> der unbestrahlten Kontrolle. An den Tagen 1, 4 und 7 nach Bestrahlung fand die Zellviabilitätsmessung nach oben genannter Methode statt. Die genannten Zellviabilitätsunterschiede sind in Abbildung 9 – 11 dargestellt.



**Abb. 9** Blaulicht-Bestrahlung proliferierender Fibroblasten mit unterschiedlicher Intensität (0 – 102 J/cm<sup>2</sup>) in Relation zur unbestrahlten Kontrolle.

Die Abbildung zeigt, dass sich die Zellviabilität gemessen mit der CellTiter-Blue® -Methode in Abhängigkeit von der Bestrahlungsintensität reduziert. Dies zeigt sich relativ zur unbestrahlten Kontrolle (0 J/cm<sup>2</sup>) zu allen Messzeitpunkten (Tag 1, 4 und 7 nach Bestrahlung). Signifikante Unterschiede in der Zellviabilität bestehen an allen Tagen zwischen der Kontrolle und den mit 34, 51 und 102 J/cm<sup>2</sup> bestrahlten proliferierenden Fibroblasten sowie an Tag 1 und 4 nach Bestrahlung zwischen der unbestrahlten Kontrolle und den mit 17 J/cm<sup>2</sup> bestrahlten Fibroblasten. An Tag 1 der Messung besteht zudem ein signifikantes Ergebnis zwischen der Kontrolle und den mit 8,5 J/cm<sup>2</sup> bestrahlten Fibroblasten (n=8; \* = p < 0,05; \*\* = p < 0.01; \*\*\* = p < 0,001).

Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigt sich, dass die Zellviabilität mit steigender Bestrahlungsintensität abnimmt. Dies lässt sich an allen drei Messzeitpunkten darstellen. An Tag 1 nach Bestrahlung sinkt die Zellviabilität der mit  $8,5 \text{ J/cm}^2$  bestrahlten Fibroblasten um 18,5 %. Im Vergleich dazu kommt es bei einer Bestrahlung mit  $17 \text{ J/cm}^2$  zu einer Reduktion der Viabilität um 34,3 % bezogen auf die Kontrolle. Die Abnahme der Zellviabilität setzt sich mit steigender Bestrahlungsintensität fort, bis sie bei einer Intensität von  $34 \text{ J/cm}^2$  um 66,9 %, bei  $51 \text{ J/cm}^2$  um 90,2 % und schließlich bei einer Bestrahlungsintensität von  $102 \text{ J/cm}^2$  um 100 % gesunken ist. An den späteren Messpunkten (Tag 4 und Tag 7 nach Bestrahlung) besteht weiterhin eine dosisabhängige Abnahme der Zellviabilität.



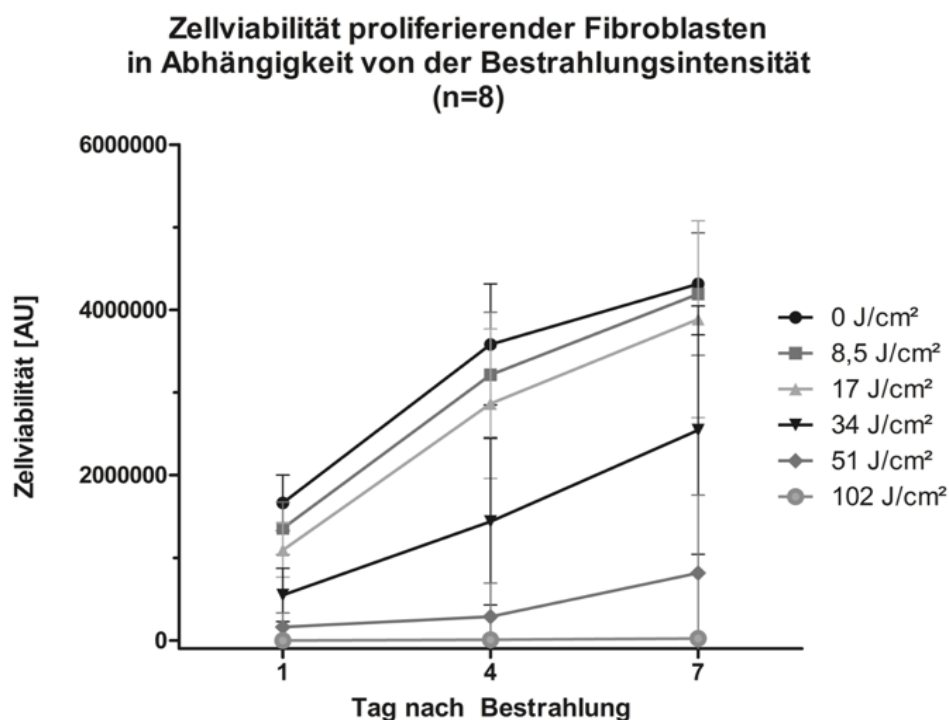
**Abb. 10** Blaulicht-Bestrahlung proliferierender Fibroblasten mit unterschiedlicher Intensität (0 –  $102 \text{ J/cm}^2$ ) in der Darstellung mit absoluten Zahlen.

Die Abbildung zeigt ebenfalls, dass sich die Zellviabilität gemessen mit der CellTiter-Blue® -Methode in Abhängigkeit von der Bestrahlungsintensität reduziert. Für die absolute Zellviabilitätsmessung ergeben sich vergleichen mit der relativen Darstellung aus Abb. 9 ähnliche Ergebnisse. Zudem zeigt sich ein erneuter stetiger Anstieg der Zellviabilität im Vergleich der einzelnen Messzeitpunkte an Tag 1, 4 und 7 nach Bestrahlung (n=8; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

Jedoch ist das Ausmaß der Reduktion der Zellviabilität bei Betrachtung der einzelnen Strahlenintensitäten in Bezug auf die Kontrolle kleiner als an Tag 1. An Tag 4 reduziert sich die Zellviabilität bei einer Bestrahlung mit  $8,5 \text{ J/cm}^2$  nur um 10,3 % und mit  $17 \text{ J/cm}^2$  um 20 % verglichen mit der unbestrahlten Kontrolle. An Tag 7 sinkt die Zellviabilität beim Vergleich der mit  $8,5 \text{ J/cm}^2$  bestrahlten Fibroblasten im Vergleich zur unbestrahlten



Kontrolle nur noch um 2,9 % sowie beim Vergleich der Intensität 17 J/cm<sup>2</sup> zur Kontrolle um 9,9 %. Bei Betrachtung der Intensität 34 J/cm<sup>2</sup> reduziert sich die Zellviabilität an Tag 4 um 59,9 % und an Tag 7 um 41 % bezogen auf die unbestrahlte Kontrolle. Dabei bestehen signifikante Zellviabilitätsunterschiede in Bezug auf die Kontrolle an allen drei Messzeitpunkten für eine Bestrahlungsintensität von 34, 51 und 102 J/cm<sup>2</sup>. Zudem bestehen an Tag 1 und 4 nach Bestrahlung signifikante Ergebnisse zwischen der unbestrahlten Kontrolle und den mit 17 J/cm<sup>2</sup> bestrahlten HDF. An Tag 1 zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle (0 J/cm<sup>2</sup>) und den mit niedrigster Intensität (8,5 J/cm<sup>2</sup>) bestrahlten proliferierenden Fibroblasten.



**Abb. 11 Blaulicht-Bestrahlung proliferierender Fibroblasten mit unterschiedlicher Intensität (0 – 102 J/cm<sup>2</sup>) im Liniendiagramm.**

Die Abbildung zeigt, dass sich die Zellviabilität gemessen mit der CellTiter-Blue® -Methode in Abhängigkeit von der Bestrahlungsintensität reduziert. Hier ist der Anstieg der absoluten Zellviabilität zwischen den einzelnen Messzeitpunkten (Tag 1, 4 und 7 nach Bestrahlung) im Liniendiagramm dargestellt. Der stetige Zellviabilitätsanstieg aus Abbildung 10 ist hier noch einmal verdeutlicht. Zudem lässt sich bei allen bestrahlten Fibroblasten ein stärkerer Anstieg der Zellviabilität zwischen Tag 4 und Tag 7 nach Blaulicht-Bestrahlung im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle erkennen (n=8; \* = p < 0,05; \*\* = p < 0.01; \*\*\* = p < 0,001).

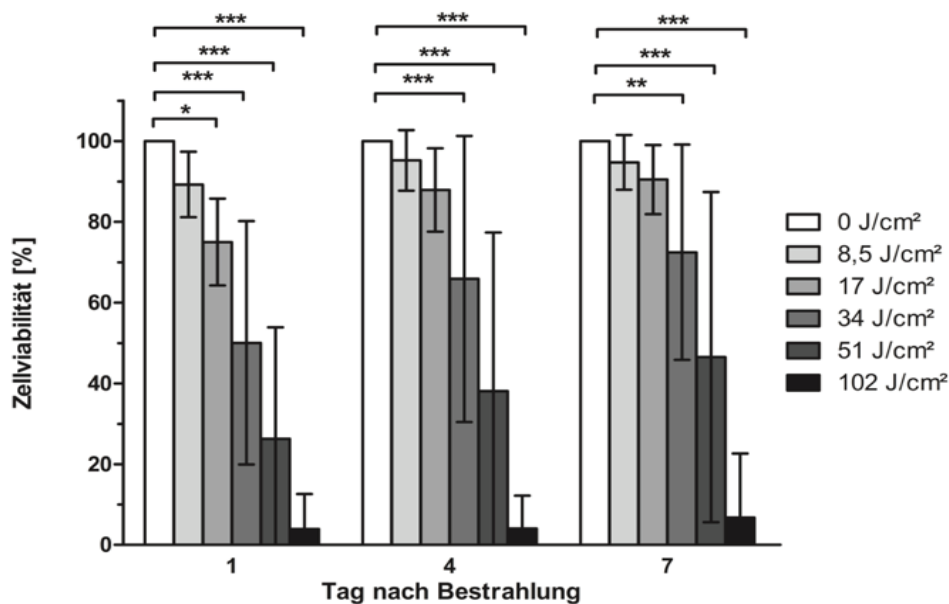
Ein weiteres Ergebnis ist der postradiogene kontinuierliche Zellviabilitätsanstieg aller HDF unabhängig von der Bestrahlungsintensität. Die Wachstumsgeschwindigkeit lässt sich besonders in Abbildung 11 beim Vergleich der einzelnen Werte zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten nachvollziehen. Der Anstieg der Zellviabilität zwischen Tag 1 und Tag 4 bezogen auf die Kontrolle sowie die Intensität 8,5 J/cm<sup>2</sup> verläuft nahezu parallel. Bei

Betrachtung der unbestrahlten Kontrolle ergibt sich hier ein Anstieg der Zellviabilität von 53,6 %. Der Anstieg der Viabilität beträgt bei 8,5 J/cm<sup>2</sup> 57,8 % und bei 17 J/cm<sup>2</sup> 61,9 %. Für die Intensitäten 34 J/cm<sup>2</sup> und 51 J/cm<sup>2</sup> beträgt der Anstieg der Zellviabilität 61,8 % bzw. 43,4 %. Im Gegensatz dazu sieht es zwischen Tag 4 und Tag 7 anders aus. Hier zeigt sich ein stärkerer Zellviabilitätsanstieg der mit 8,5 und 17 J/cm<sup>2</sup> bestrahlten HDF im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Die Zellviabilität der mit 8,5 J/cm<sup>2</sup> bestrahlten HDF erhöht sich zwischen Tag 4 und Tag 7 um 23,3 %. Im Gegensatz dazu steigt die Viabilität der mit 17 J/cm<sup>2</sup> behandelten Fibroblasten zwischen Tag 4 und Tag 7 um etwa 26,3 %. Die Viabilität der unbestrahlten Kontrolle erhöht sich zwischen Tag 4 und Tag 7 um nur 17 %. Somit ist der Anstieg der Zellviabilität der unbestrahlten Kontrolle im Vergleich zu den beiden niedrigsten getesteten Bestrahlungsintensitäten zwischen Tag 4 und Tag 7 deutlich geringer. Dieses Ergebnis trifft für den gleichen Zeitraum auch auf die Intensität 34 J/cm<sup>2</sup> zu. Hier steigt die Zellviabilität zwischen Tag 4 und Tag 7 um 43,5 % an. Für die Bestrahlungsintensität 51 J/cm<sup>2</sup> ergibt sich ein Zuwachs der Viabilität zwischen Tag 1 und Tag 4 von 43,4 % und zwischen Tag 4 und Tag 7 von 64,7 %. Lediglich die mit höchster Intensität (102 J/cm<sup>2</sup>) bestrahlten proliferierenden HDF zeigen im gesamten Beobachtungszeitraum einen nur geringen Anstieg der Zellviabilität bei niedrigen absoluten Werten. Insgesamt ergibt sich also in den gemessenen Zeiträumen bei Betrachtung aller Bestrahlungsintensitäten ein erneuter Anstieg der Zellviabilität nach initialer Abnahme im Anschluss an die erfolgte Bestrahlung. Die Zellviabilität reduziert sich zunehmend mit steigender Bestrahlungsintensität.

### 3.6 Blaulichtbestrahlung verursacht intensitätsabhängige Toxizität in konfluenten Zellkultur-Petrischalen

Auch bei diesem Versuchsansatz wurde die Zellviabilität nach oben genanntem Prinzip bestimmt. Die hier verwendeten HDF stammen aus denselben Zellreihen. Jedoch wurden sie vor Beginn der LED-Blaulicht-Bestrahlung länger unter Standardlaborbedingungen inkubiert, um eine lichtmikroskopische Konfluenz der verwendeten Petrischalen zu gewährleisten. Die Fibroblasten werden daher in diesem Abschnitt als ruhend bezeichnet. Der darauffolgende Versuchsablauf bestehend aus Bestrahlung und CellTiter-Blue® Zellviabilitätsmessung gestaltete sich identisch. Die gewonnenen Ergebnisse sind vergleichbar und in Abbildung 12 – 14 dargestellt.

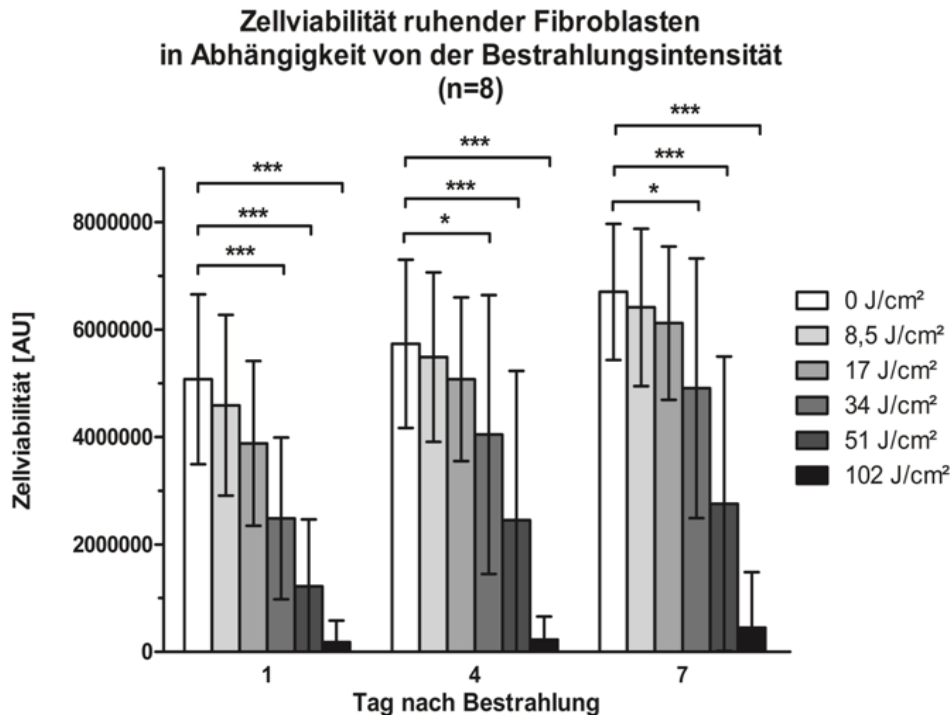
**Zellviabilität ruhender Fibroblasten  
in Abhängigkeit von der Bestrahlungsintensität  
(n=8)**



**Abb. 12 Blaulicht-Bestrahlung vollgewachsener (=konfluenter) Fibroblasten-Petrischalen mit unterschiedlicher Intensität (0 – 102 J/cm<sup>2</sup>) in Relation zur unbestrahlten Kontrolle.**

Die Abbildung zeigt, dass sich die Zellviabilität gemessen mit der CellTiter-Blue® -Methode in Abhängigkeit von der Bestrahlungsintensität reduziert. Dies zeigt sich relativ zur unbestrahlten Kontrolle (0 J/cm<sup>2</sup>) zu allen Messzeitpunkten (Tag 1, 4 und 7 nach Bestrahlung). Signifikante Unterschiede in der Zellviabilität bestehen an allen Tagen zwischen der Kontrolle und den mit 34, 51 und 102 J/cm<sup>2</sup> bestrahlten konfluente Fibroblasten sowie an Tag 1 nach Bestrahlung zwischen der unbestrahlten Kontrolle und den mit 17 J/cm<sup>2</sup> bestrahlten Fibroblasten (n=8; \* = p < 0,05; \*\* = p < 0.01; \*\*\* = p < 0,001).

Auch bei den bestrahlten konfluente Zellkultur-Petrischalen zeigt sich neben der deutlich höheren absoluten Zellviabilität eine zunehmende Reduktion der Zellviabilität mit steigender Bestrahlungsintensität. Im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle sinkt die Zellviabilität nach einer Bestrahlung mit 8,5 J/cm<sup>2</sup> an Tag 1 um 9,6 %. Bei 17 J/cm<sup>2</sup> beträgt diese Reduktion an Tag 1 23,5 %. Für die Intensitäten 34 J/cm<sup>2</sup>, 51 J/cm<sup>2</sup> und 102 J/cm<sup>2</sup> ergeben sich Abnahmen der Zellviabilität an Tag 1 von 51 %, 75,9 % und 96,4 %. Für die folgenden Messpunkte an Tag 4 und Tag 7 besteht weiterhin eine dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität ähnlich wie bei den proliferierenden Fibroblasten (vgl. Abschnitt 3.5). An Tag 4 ergibt sich für die Intensität 8,5 J/cm<sup>2</sup> eine Abnahme der Zellviabilität von 4,3 % sowie bei einer Intensität von 17 J/cm<sup>2</sup> um 11,5 % im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Auch bei der Zellviabilitätsuntersuchung der konfluente Zellkultur-Petrischalen zeigt sich, dass die Abnahme der Zellviabilität an den späteren Messpunkten (Tag 4 und Tag 7) im Vergleich zur Messung an Tag 1 geringer ausfällt. Repräsentativ zeigt sich bei der Bestrahlungsintensität 8,5 J/cm<sup>2</sup> an Tag 4 eine Reduktion der Zellviabilität von 4,3 %.



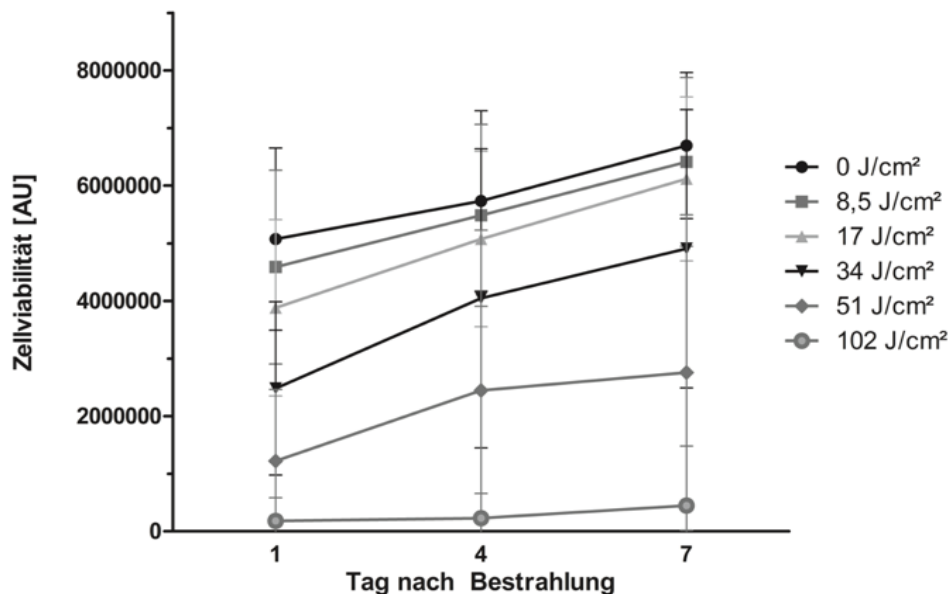
**Abb. 13** Blaulicht-Bestrahlung vollgewachsener (=konfluenter) Fibroblasten-Petrischalen mit unterschiedlicher Intensität (0 – 102 J/cm<sup>2</sup>) mit absoluten Zahlen.

Die Abbildung zeigt, dass sich die Zellviabilität gemessen mit der CellTiter-Blue® -Methode in Abhängigkeit von der Bestrahlungsintensität reduziert. Für die absolute Zellviabilitätsmessung ergeben sich vergleichbare Ergebnisse wie in Abb. 12. Zudem zeigt sich ein erneuter stetiger Anstieg der Zellviabilität im Vergleich der einzelnen Messzeitpunkte an Tag 1, 4 und 7 nach Bestrahlung (n=8; \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001).

An Tag 7 bleibt dieses Ergebnis in gleich (4,3 %). Für die Intensität 17 J/cm<sup>2</sup> erkennt man an Tag 4 eine Abnahme der Viabilität um 11,5 % und an Tag 7 um 8,7 %. Vergleicht man die Entwicklung der Zellviabilität der mit den Intensitäten 34, 51 und 102 J/cm<sup>2</sup> bestrahlten HDF mit der Entwicklung der unbestrahlten Kontrolle, so erkennt man auch hier eine signifikante Viabilitätsreduktion sowohl im Vergleich der absoluten sowie relativen Werte (Abb. 12 und 13). Zudem lässt sich dieses Ergebnis auch beim Vergleich der Kontrolle mit der Intensität 17 J/cm<sup>2</sup> an Tag 1 der relativen Werte (Abb. 12) erkennen.

Der Anstieg der Zellviabilität der bestrahlten konfluenter HDF (Abb. 14) verhält sich zwischen dem vierten und siebten Tag nach Bestrahlung abhängig von der Intensität unterschiedlich im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Der Anstieg der Zellviabilität beträgt für 8,5 J/cm<sup>2</sup> 14,4 % sowie für 17 J/cm<sup>2</sup> 17 %. Für die Intensität 34 J/cm<sup>2</sup> ist dieser auf 17,6 % zu beziffern. Nach einer Bestrahlung mit 51 J/cm<sup>2</sup> steigt die Zellviabilität der HDF zwischen dem vierten und siebten Tag um 11,2 % an. Somit ergibt sich bei dieser Bestrahlungsintensität der geringste Anstieg der Viabilität in dem genannten Zeitraum.

**Zellviabilität ruhender Fibroblasten  
in Abhängigkeit von der Bestrahlungsintensität  
(n=8)**



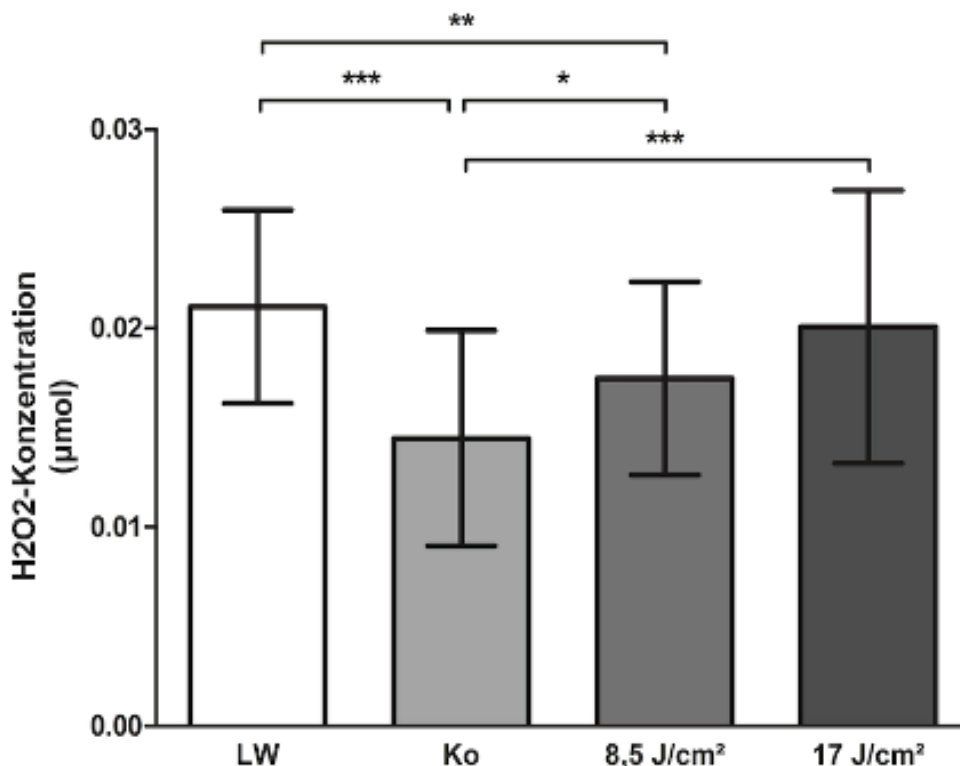
**Abb. 14** Blaulicht-Bestrahlung vollgewachsener (=konfluenter) Fibroblasten-Petrischalen mit unterschiedlicher Intensität (0 – 102 J/cm<sup>2</sup>) im Liniendiagramm.

Die Abbildung zeigt, dass sich die Zellviabilität gemessen mit der CellTiter-Blue® -Methode in Abhängigkeit von der Bestrahlungsintensität reduziert. Hier ist der Anstieg der absoluten Zellviabilität zwischen den einzelnen Messzeitpunkten (Tag 1, 4 und 7 nach Bestrahlung) im Liniendiagramm dargestellt. Der stetige Zellviabilitätsanstieg aus Abbildung 13 ist hier noch einmal verdeutlicht. Der in Abb. 11 dargestellte stärkere Anstieg der bestrahlten Fibroblasten im Vergleich zur Kontrolle zwischen Messtag 4 und 7 nach Bestrahlung lässt sich hier nicht nachweisen (n=8; \* = p < 0,05; \*\* = p < 0.01; \*\*\* = p < 0,001).

Der größte Zuwachs der Zellviabilität besteht im Gegensatz zur Viabilitätsmessung proliferierender Fibroblasten (vgl. Abschnitt 3.5, Abb. 11) bei der höchsten Bestrahlungsintensität (102 J/cm<sup>2</sup>). Dieser beträgt zwischen Tag 4 und Tag 7 48,7 %. Der Anstieg der unbestrahlten Kontrolle misst im gleichen Zeitraum 14,4 %. Es lässt sich sowohl zwischen Tag 1 und Tag 4 sowie zwischen Tag 4 und Tag 7 ein weiteres Zellwachstum bei allen Bestrahlungsintensitäten erkennen. Zwischen den Messzeitpunkten am ersten und vierten Tag nach Blaulicht-Bestrahlung zeigen sich bei 34 J/cm<sup>2</sup> (38,7 %) und 51 J/cm<sup>2</sup> (50,1 %) deutlich stärkere Anstiege der Zellviabilität verglichen mit allen anderen Dosen sowie der Kontrolle. Der drittgrößte Anstieg der Zellviabilität ergibt sich bei einer Bestrahlungsdosis von 17 J/cm<sup>2</sup> (23,5 %).

### 3.7 Blaulichtbestrahlung führt zu einem verminderten Abbau von Wasserstoffperoxid durch humane dermale Fibroblasten

In Abb. 15 ist das Ergebnis der photometrischen Messung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration dargestellt. Sie vergleicht die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen in der zellfreien Petrischale (Leerwell, LW) mit der Konzentration der unbehandelten Kontrolle (Ko) sowie den mit 8,5 J/cm<sup>2</sup> und 17 J/cm<sup>2</sup> behandelten Fibroblasten-Schalen.



**Abb. 15 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration in Abhängigkeit von der erhaltenen Strahlungsintensität.** Die Abbildung zeigt die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration in der zellfreien Petrischale (Leerwell, LW) im Vergleich zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration in unbehandelten, Fibroblasten enthaltenden Petrischale (Kontrolle, Ko) sowie in mit unterschiedlichen Strahlenintensitäten behandelten Fibroblasten enthaltenden Petrischalen (8,5 J/cm<sup>2</sup>, 17 J/cm<sup>2</sup>). Es zeigt sich, dass die Konzentration des hinzugegebenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in der unbehandelten Kontrolle niedriger als in den mit 8,5 J/cm<sup>2</sup> sowie 17 J/cm<sup>2</sup> behandelten Petrischalen ist (n = 7; n=8; \* = p < 0,05; \*\* = p < 0.01; \*\*\* = p < 0,001).

Während die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration in der zellfreien, unbehandelten Petrischale am höchsten ist, findet sich die niedrigste H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration in der Schale mit den unbehandelten Fibroblasten (Kontrolle).

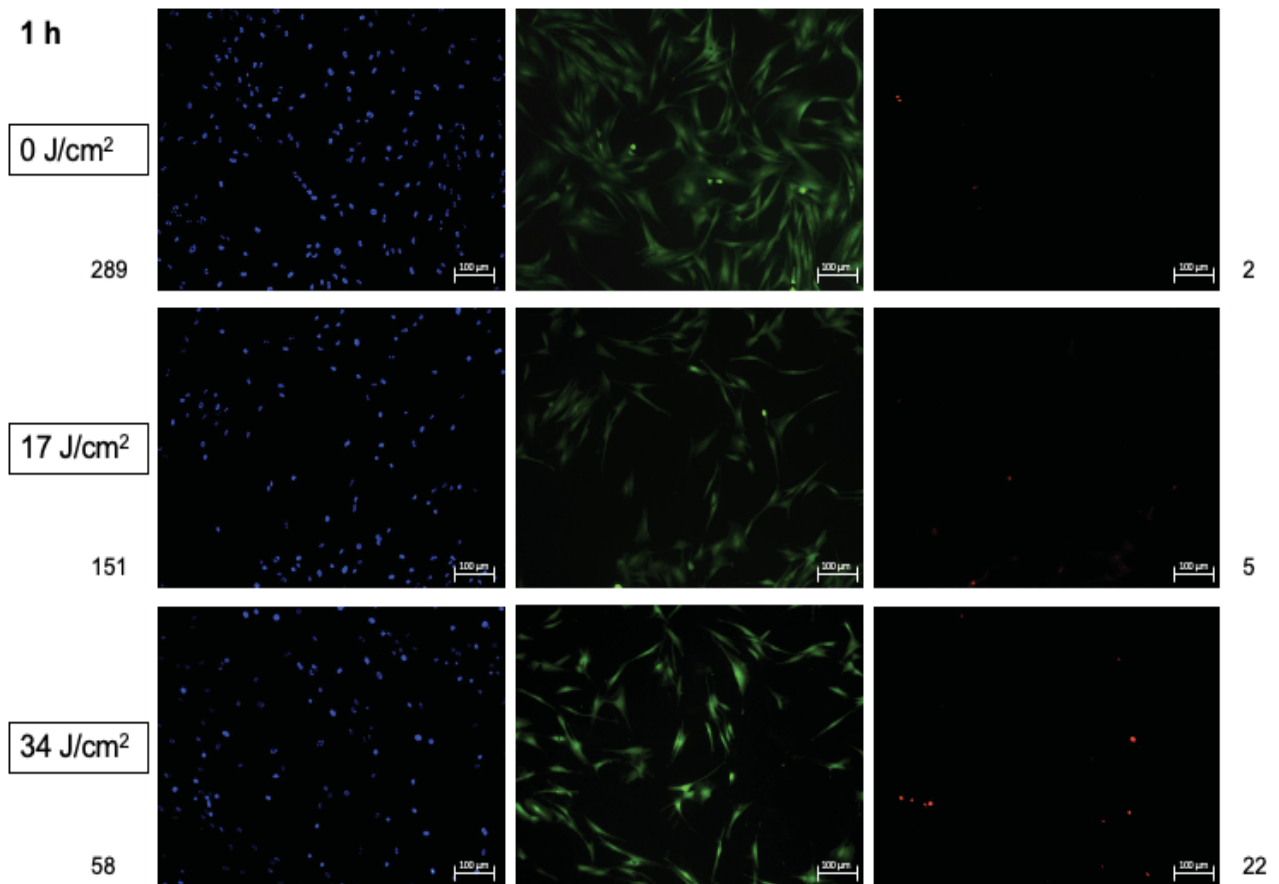
**Katalase-Reaktion:**



Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration steigt mit der Intensität der Behandlung an. Humane dermale Fibroblasten, die mit 8,5 J/cm<sup>2</sup> behandelt wurden, weisen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle einen höheren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Wert auf. Noch deutlicher wird dieser Effekt, wenn man die Kontrolle mit den Fibroblasten vergleicht, die mit 17 J/cm<sup>2</sup> behandelt wurden. Während die Kontrolle eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von etwa 0,014 µmol aufweist, liegt diese in der Petrischale der mit 17 J/cm<sup>2</sup> behandelten Fibroblasten bei etwa 0,02 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Somit ist der Wert annähernd so hoch wie in der Petrischale, welche keine Zellen enthält.

### 3.8 Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Zellviabilität steigender Bestrahlungsintensitäten

Um den Effekt der Bestrahlung mit 420 nm Blaulicht auf die Zellviabilität humaner dermaler Fibroblasten zu überprüfen, wurde die Fluoreszenzmikroskopie herangezogen. Hierbei wurden Fibroblasten wie oben beschrieben mit unterschiedlichen Intensitäten bestrahlt und nach Zusatz von drei verschiedenen Farbstoffen mit dem Fluoreszenzmikroskop evaluiert. Zu den verwendeten Farbstoffen gehören Hoechst (H), Propidiumiodid (PI) und Fluoresceindiacetat (FDA). Hoechst färbt die DNA in Zellkernen blau. Propidiumiodid hingegen passiert die perforierte Membran abgestorbener Zellen und macht somit avitale Zellen mit einer roten Färbung sichtbar. Fluoresceindiacetat ist ein grün-fluoreszierender Farbstoff, der zur Markierung vitaler Zellen herangezogen werden kann.

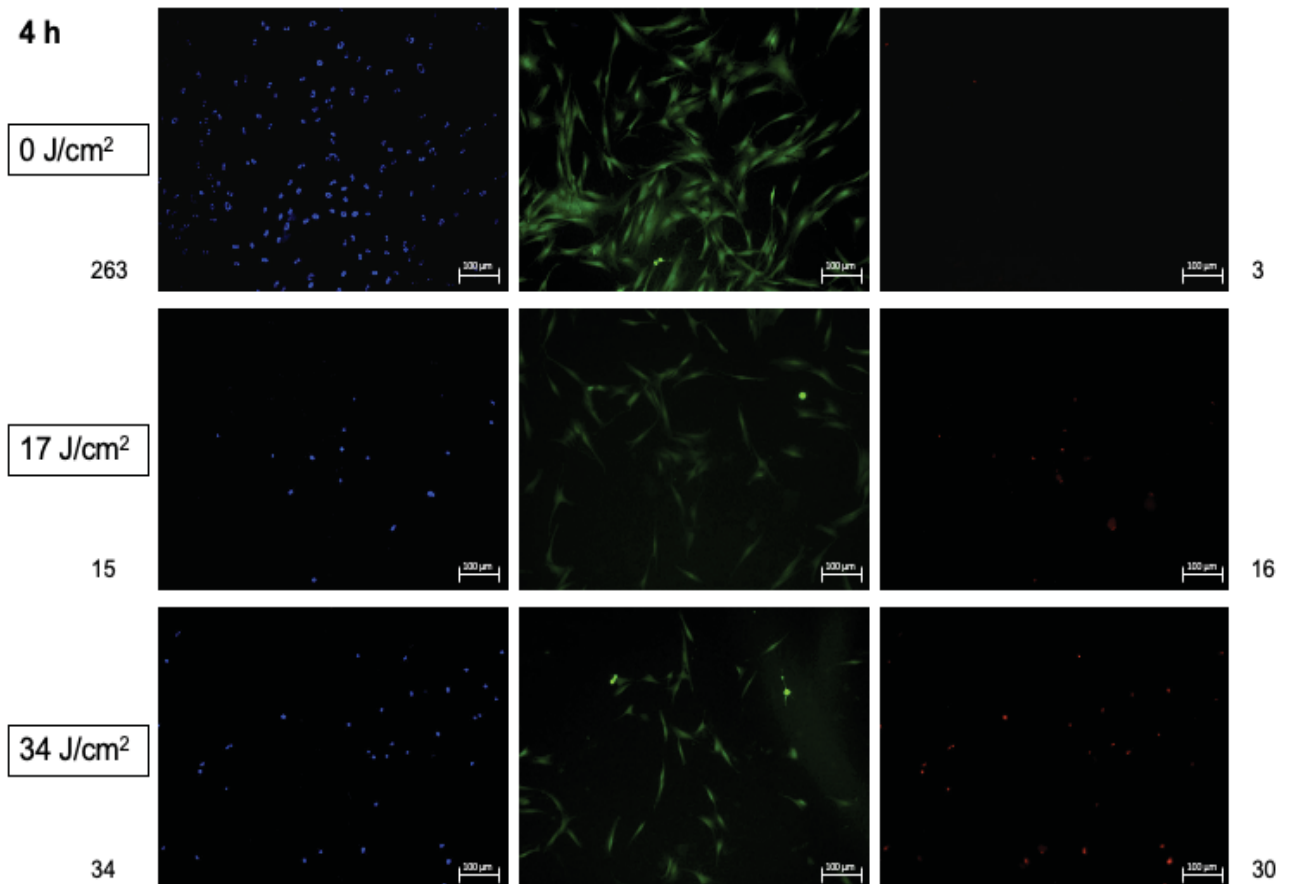


**Abb. 16** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung humaner dermaler Fibroblasten eine Stunde nach Bestrahlung mit 420 nm Blaulicht.

Abgebildet sind die mit unterschiedlichen Intensitäten bestrahlten Fibroblasten. Die Bilder wurden eine Stunde nach erfolgter Blaulichtbestrahlung angefertigt. Die Fibroblasten wurden mit drei verschiedenen Farbstoffen (Hoechst, FDA und PI) angefärbt.  $0 J/cm^2$  beschreibt hierbei die unbestrahlte Kontrolle,  $17 J/cm^2$  entspricht einer zehnminütigen Bestrahlung und  $34 J/cm^2$  entspricht einer zwanzigminütigen Bestrahlung mit Blaulicht. Für die Fluoreszenzbilder mit Hoechst- und PI-Färbung wurde jeweils die Zahl der im Ausschnitt abgebildeten Zellen bestimmt und unmittelbar neben dem jeweiligen Bild beschrieben (Vergrößerung 10x)



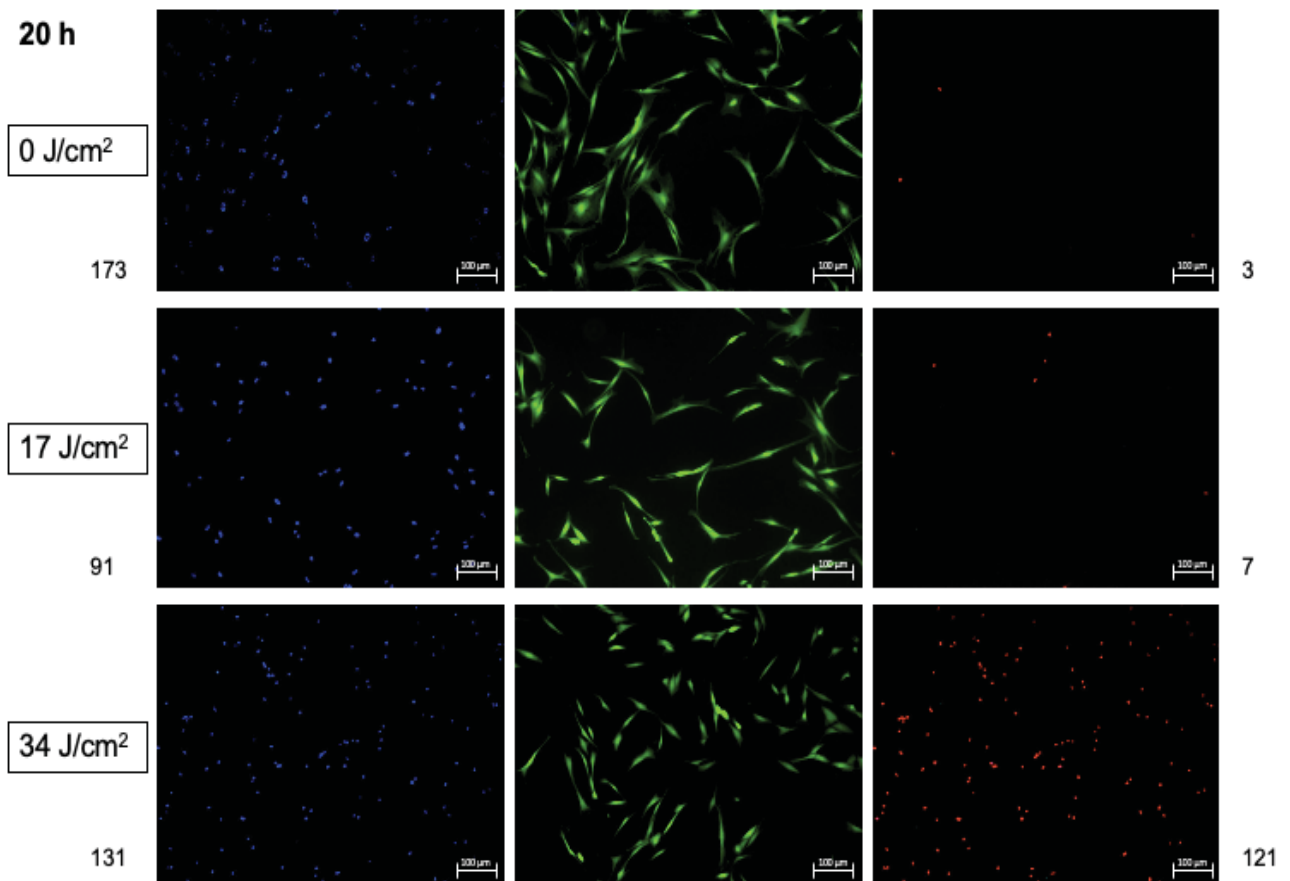
Betrachtet man die Darstellung der Zellkerne mittels Hoechst-Farbstoff in den gegebenen Bildausschnitten, ist zu erkennen, dass die Zahl der Fibroblasten in der unbehandelten Kontrolle ( $0 \text{ J/cm}^2$ ) an allen drei Messpunkten am höchsten ist. Am ersten Messzeitpunkt (eine Stunde nach Bestrahlung, s. Abb. 16) beträgt die Zahl der gezählten Fibroblastenzellkerne im abgebildeten Ausschnitt in der Hoechst-Färbung 289.



**Abb. 17 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung humaner dermaler Fibroblasten vier Stunden nach Bestrahlung mit 420 nm Blaulicht.**

Abgebildet sind die mit unterschiedlichen Intensitäten bestrahlten Fibroblasten. Die Bilder wurden vier Stunden nach erfolgter Blaulichtbestrahlung angefertigt. Die Fibroblasten wurden mit drei verschiedenen Farbstoffen (Hoechst, FDA und PI) angefärbt.  $0 \text{ J/cm}^2$  beschreibt hierbei die unbestrahlte Kontrolle,  $17 \text{ J/cm}^2$  entspricht einer zehnminütigen Bestrahlung und  $34 \text{ J/cm}^2$  entspricht einer zwanzigminütigen Bestrahlung mit Blaulicht. Für die Fluoreszenzbilder mit Hoechst- und PI-Färbung wurde jeweils die Zahl der im Ausschnitt abgebildeten Zellen bestimmt und unmittelbar neben dem jeweiligen Bild beschrieben (Vergrößerung 10x).

An den darauffolgenden Messzeitpunkten nach vier (263, s. Abb. 17) und nach zwanzig (173, s. Abb. 18) Stunden ist in den betrachteten Bildausschnitten eine kontinuierliche Abnahme der Zellkernzahl ohne erfolgte Bestrahlung zu erkennen.



**Abb. 18** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung humaner dermaler Fibroblasten zwanzig Stunden nach Bestrahlung mit 420 nm Blaulicht.

Abgebildet sind die mit unterschiedlichen Intensitäten bestrahlten Fibroblasten. Die Bilder wurden zwanzig Stunden nach erfolgter Blaulichtbestrahlung angefertigt. Die Fibroblasten wurden mit drei verschiedenen Farbstoffen (Hoechst, FDA und PI) angefärbt. 0 J/cm<sup>2</sup> beschreibt hierbei die unbestrahlte Kontrolle, 17 J/cm<sup>2</sup> entspricht einer zehnminütigen Bestrahlung und 34 J/cm<sup>2</sup> entspricht einer zwanzigminütigen Bestrahlung mit Blaulicht. Für die Fluoreszenzbilder mit Hoechst- und PI-Färbung wurde jeweils die Zahl der im Ausschnitt abgebildeten Zellen bestimmt und unmittelbar neben dem jeweiligen Bild beschrieben (Vergrößerung 10x).

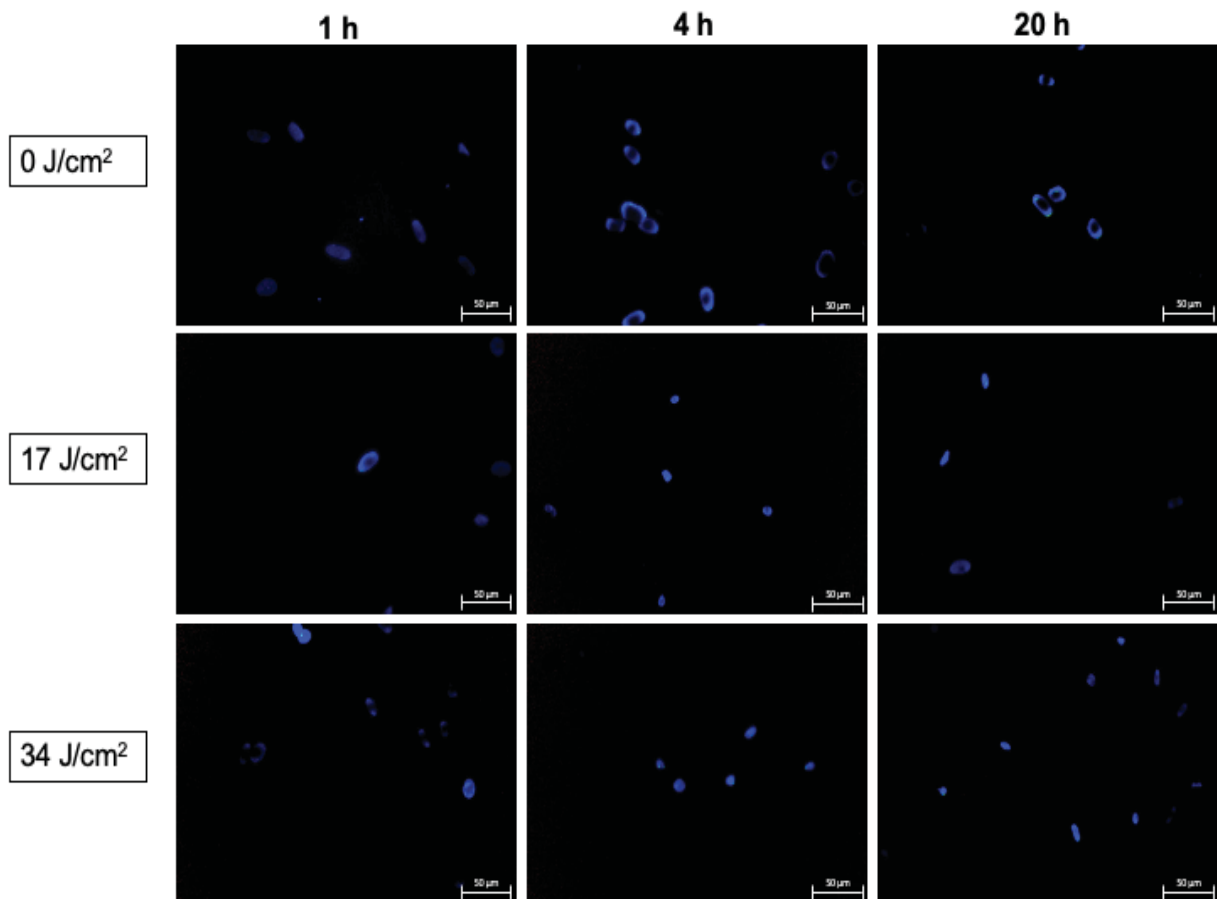
Vergleicht man die Anzahl der abgebildeten Zellkerne der unbestrahlten Kontrolle mit denen der bestrahlten Proben in den gezeigten Bildausschnitten, so lässt sich schnell erkennen, dass zu jedem Messzeitpunkt die Zahl der abgebildeten Fibroblastenzellkerne in der unbestrahlten Kontrolle höher ist als die in den bestrahlten Fibroblasten-Petrischalen. In der Gegenüberstellung der mit 17 J/cm<sup>2</sup> bestrahlten Fibroblasten (151) mit denen der unbestrahlten Kontrolle (289) lässt sich eine Abnahme der Zellkernzahl erkennen. Vergleicht man die Zellkernzahl der unbestrahlten Kontrolle im gegebenen Bildausschnitt mit der der mit 34 J/cm<sup>2</sup> bestrahlten Fibroblasten (58) am ersten Messpunkt (s. Abb. 16), so ergibt sich hieraus eine Abnahme der Zellkernzahl. Im Vergleich der mit 17 J/cm<sup>2</sup> und 34 J/cm<sup>2</sup> bestrahlten Fibroblasten zeigt sich eine Reduktion der Zellkernzahl im

abgebildeten Ausschnitt am ersten Messzeitpunkt (s. Abb. 16). Also erkennt man zum ersten Messzeitpunkt nach einer Stunde einen deutlichen Abfall der Anzahl abgebildeter Zellkerne mit steigender Bestrahlungsintensität. Diese Eigenschaft lässt sich jedoch nicht auf die folgenden Messzeitpunkten übertragen. Vier (s. Abb. 17) sowie zwanzig Stunden (s. Abb. 18) nach Bestrahlung ist die Anzahl abgebildeter Zellkerne in den mit  $34 \text{ J/cm}^2$  bestrahlten Schalen höher als in den mit nur  $17 \text{ J/cm}^2$  bestrahlten Schalen. Dennoch ergibt sich im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle ein deutlicher Abfall der Zahl der abgebildeten Zellkerne in den mit Hoechst angefärbten Ausschnitten. Übertragen auf die mit  $34 \text{ J/cm}^2$  bestrahlten Fibroblastenzellkerne (34) ergibt sich hierbei eine geringere Abnahme. Am dritten Messzeitpunkt nach zwanzig Stunden (s. Abb 18) ist die Abnahme der Zellkernzahl in den bestrahlten Proben verglichen mit der unbestrahlten Kontrolle insgesamt geringer als in den vorangegangenen Messzeitpunkten. Durch eine Bestrahlung mit  $17 \text{ J/cm}^2$  reduziert sich die Anzahl der Zellkerne von 173 (unbestrahlte Kontrolle) auf 91 sichtbare Fibroblasten in der Hoechst-Färbung. Die Anzahl der abgebildeten Zellkerne reduziert sich nach einer Bestrahlung mit  $34 \text{ J/cm}^2$  um einen geringeren Anteil.

Bei Betrachtung der Anzahl abgestorbener Zellen (dargestellt durch die PI-Färbung) ist ein kontinuierlicher Anstieg der gezählten Objekte an jedem der drei Messzeitpunkte zu erkennen. Hieraus ergibt sich eine zunehmende Zahl abgestorbener Zellen mit steigender Bestrahlungsintensität. Der größte Anstieg der Zahl abgestorbener Zellen ergibt sich bei Betrachtung der mit  $34 \text{ J/cm}^2$  bestrahlten Zellen zwanzig Stunden nach erfolgter Bestrahlung (121). Im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle am selben Messzeitpunkt entspricht dies einer deutlichen Zunahme der Zahl abgestorbener Zellen.

### 3.9 Veränderungen in der Zellkernmorphologie nach erfolgter Blaulichtbestrahlung

Um mögliche Veränderungen in der Zellkernmorphologie bestrahlter humaner dermaler Fibroblasten darstellen zu können, wurden die mit unterschiedlichen Intensitäten bestrahlten Fibroblasten, genauer gesagt ihre Zellkerne, mittels Hoechst-Farbstoff dargestellt und fluoreszenzmikroskopisch erfasst.



**Abb. 19** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Zellkernmorphologie bestrahlter humaner dermaler Fibroblasten

In dieser Abbildung sind die mit Hoechst-Farbstoff angefärbten Zellkerne humaner dermaler Fibroblasten an unterschiedlichen Messzeitpunkten (eine Stunde, vier Stunden und zwanzig Stunden nach erfolgter Bestrahlung) dargestellt. Es werden die Zellkerne der unbestrahlten Kontrollschale (0 J/cm<sup>2</sup>) mit denen der mit unterschiedlichen Intensitäten bestrahlten Petrischalen (17 J/cm<sup>2</sup> und 34 J/cm<sup>2</sup>) verglichen (Vergrößerung 40x).

In Abb. 19 sind die Zellkerne der mit unterschiedlichen Intensitäten bestrahlten Fibroblasten an verschiedenen Messzeitpunkten in 40-facher Vergrößerung dargestellt. Somit lässt sich die durch eine Blaulichtbestrahlung hervorgerufene Veränderung der Zellkernmorphologie gut evaluieren. Bei Betrachtung der dargestellten Zellkerne der unbehandelten Kontrolle

(0 J/cm<sup>2</sup>) an allen drei Messzeitpunkten lässt sich eine ovale Form der Zellkerne mit vermehrter randständiger Fluoreszenz erkennen. Das Zentrum der Zellkerne wirkt hier dunkler als der Randbereich. Insgesamt erscheinen die abgebildeten Zellkerne der unbestrahlten Kontrolle zu allen drei Messzeitpunkten in Form und Größe homogen mit einem klar abgrenzbaren Rand. Mit zunehmender Bestrahlungsintensität (17 und 34 J/cm<sup>2</sup>) wirken die abgebildeten Zellkerne in Form und Größe unterschiedlicher, was eine zunehmende Inhomogenität darstellt. Die meisten der dargestellten Zellkerne stellen sich kleiner dar. Die Form wandert vom ursprünglichen Oval in eine entweder rundliche oder längliche Form. Insgesamt verschwindet das zentral dunklere Areal der unbestrahlten Kontrollen und die bestrahlten Zellkerne wirken deutlich entrundet und zunehmend fluoreszierend. Außerdem ist der Rand der Zellkerne weniger klar definiert als bei der unbestrahlten Kontrolle.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Allgemeines**

Aufgrund der proliferationshemmenden Wirkung und der einfachen Anwendung gewann die Blaulichtbehandlung in den letzten Jahren zunehmend an Aufmerksamkeit in Bezug auf die klinische Anwendung. Das geringere Nebenwirkungsprofil macht die Methodik im Vergleich zu einer Therapie mit UV-Strahlung zunehmend interessant (Kleinpenning 2010; Goldberg Russell 2006).

Der klinische Anwendungsbereich ist dabei vielfältig und deckt neben dem onkologischen Spektrum vor allem auch die Bereiche Immunologie und Infektiologie ab (Lipovsky 2008; Weinstabl 2011; Omi 2004).

Um die klinische Nutzung von Blaulichtbestrahlung weiter vorantreiben zu können, bedarf es jedoch weiterer Grundlagenforschung, um ein umfassenderes Verständnis für die Wirkmechanismen und die Einflussfaktoren wie Wellenlänge und Bestrahlungsdauer zu bekommen.

Die erzielten Ergebnisse dieser Arbeit konnte den proliferationshemmenden Effekt von Blaulichtbestrahlung mit einer Wellenlänge von 420 nm auf dermale Fibroblasten unterstreichen und dabei eine intensitätsabhängige Toxizität nachweisen. So konnte gezeigt werden, dass die Viabilität von humanen dermalen Fibroblasten nach einmaliger Bestrahlung in Abhängigkeit von der Strahlenintensität reduziert wird. Weiterhin wurde der Einfluss einer einmaligen Blaulichtbestrahlung auf das Proliferationsverhalten von humanen Fibroblasten untersucht.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die von uns durchgeführten Versuche Teil der Grundlagenforschung sind und weitere Versuchsansätze für das genauere Verständnis der Wirkung von Blaulichtbestrahlung auf humane Fibroblasten notwendig sind.

### **4.2 Die Wärmeentwicklung während der LED-Blaulichtbestrahlung als zusätzlicher Einflussfaktor**

Es ist bekannt, dass eine zu starke Wärmeentwicklung zu einer Zellschädigung führen kann. Diese erfolgt in erster Linie durch die Inaktivierung von thermolabilen Proteinen und dem damit einhergehenden Funktionsverlust (Lepock, 2005). Um die Variable „Hyperthermie“

als mögliche Ursache für die toxischen Effekte der Blaulichtbestrahlung ausschließen zu können, untersuchten und dokumentierten wir die Temperaturentwicklung unter der LED-Lichtquelle während einer Bestrahlung. Die Ergebnisse zeigten eine konstante Temperaturabgabe im Verlauf der Blaulichtbestrahlung bis zu einer Behandlungszeit von 75 Minuten. Verglichen mit Vorstudien konnten wir zeigen, dass es im Verlauf einer Bestrahlung mit blauem Licht nicht zu einer steigenden Temperaturentwicklung kam (Babilas et al., 2006, Tielemans et al., 2009). Henderson et al. konnten zeigen, dass die zum Zelltod von humanen Fibroblasten führende Temperaturgrenze bei etwa 37 °C liegt. Mit steigender Temperatur kommt es zu einem zunehmenden Absterben der Fibroblasten, bis bei etwa 48 °C die Hälfte aller untersuchten Fibroblasten abgestorben sind (Henderson et al., 2022). Andere Quellen legen die Temperaturgrenze für den Zelltod von Fibroblasten bei etwa 45 °C und mehr bei einer Erwärmungsperiode von mehr als zehn Minuten fest (Birch et al., 1997). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die in unseren Experimenten gemessene Höchsttemperatur von 29 °C während der Blaulichtbestrahlung mit zusätzlicher Kühlung keinen zusätzlichen toxischen Effekt auf die bestrahlten Fibroblasten hat und somit nicht alleinig für die Abnahme der Zellviabilität von humanen dermalen Fibroblasten ursächlich ist. Dies bedeutet jedoch nicht, dass die in der Arbeit während der Blaulichtbestrahlung gemessene Temperatur keinen Einfluss auf die Viabilität von humanen dermalen Fibroblasten hat, jedoch im Vergleich zu den Effekten der Blaulichtbestrahlung wesentlich geringer ist. Um die Effekte von Temperaturschwankungen auf die Viabilität humaner dermalen Fibroblasten besser beschreiben zu können, sind weiterführende Untersuchungen erforderlich.

#### 4.3 Intensitätsabhängige Toxizität der Blaulichtbestrahlung auf humane dermale Fibroblasten

Wie bereits in vorangegangenen Studien zum Effekt von Blaulichtbestrahlung auf menschliche Zellen dargelegt wurde, konnten wir mit unseren Versuchsreihen die Intensitätsabhängigkeit der Bestrahlung bestätigen. Bereits Mamalis et al wiesen den intensitätsabhängigen Effekt von Blaulichtbestrahlung mit einer Intensität von 415 nm auf humane dermale Fibroblasten nach (Mamalis et al., 2015). Im Gegensatz zu den genannten Vorversuchen, bei denen die Zellviabilität mit steigender Intensität nahezu unverändert blieb, konnten wir eine deutliche Reduktion der Zellviabilität mit steigender

Bestrahlungsintensität nachweisen. Ebenfalls erfolgte in unserem Versuchsaufbau die wiederholte Messung der Zellviabilität an drei verschiedenen Zeitpunkten nach Blaulichtbestrahlung. Dieser Aufbau dient der Nachbeobachtung über einen längeren Zeitraum, um die Entwicklung der Fibroblastenproliferation besser einschätzen zu können. Hier zeigte sich, dass eine einmalige Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge 420 nm nicht zu einem dauerhaften Proliferationsstopp der Fibroblasten führt. Die Proliferationsrate von proliferierenden Fibroblasten ist im Gegensatz zu der von ruhenden Fibroblasten erhöht. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Proliferationsrate mit steigender Bestrahlungsintensität abnimmt.

#### 4.4 Die durch 420 nm Blaulichtbestrahlung hervorgerufenen Formen des Zelltodes anhand der Fluoreszenzmikroskopie

Einer der bei diesen Experimenten verwendete Farbstoff ist Propidiumiodid (PI). Dieser Farbstoff ist in der Lage, perforierte Zellmembranen zu passieren und somit absterbende oder abgestorbene Zellen anzufärben. Dies kann anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Somit nimmt PI eine wichtige Stellung in der fluoreszenzmikroskopischen Viabilitätsmessung von Zellen ein (Pintado et al., 2000). Bei der Nekrose kommt es im Gegensatz zur Apoptose zu einem Integritätsverlust der Plasmamembran (Calabuig et al., 2016, Belloc et al., 1994). Aufgrund der Eigenschaften von PI, perforierte Zellmembranen passieren zu können, werden mit diesem Farbstoff also die Zellen angefärbt, die durch Nekrose absterben (Mironova et al., 2007). Der Farbstoff Hoechst färbt die DNA in Zellkernen an und könnte bei Kondensation der DNA als potenzieller Marker apoptotischer Zellen herangezogen werden. Bei einer differenzierten Betrachtung der mit Hoechst und PI angefärbten Zellen, kann man auf die Art des Zellunterganges, daher den Unterschied zwischen Apoptose und Nekrose schließen (Liebmann et al., 2010). Anhand der Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie (vgl. Abschnitt 3.8) erkennt man, dass die Anzahl der mit PI angefärbten Zellen mit steigender Bestrahlungsintensität ansteigt. Dieser Anstieg ist schon bereits nach 1 h zu sehen. Diese Eigenschaft lässt sich am deutlichsten bei Betrachtung der mit  $34 \text{ J/cm}^2$  bestrahlten Fibroblasten erkennen. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass der durch eine mit 420 nm Blaulichtbestrahlung hervorgerufene Zelltod vermehrt durch Nekrose zustande kommt.



Bezüglich der Zellkernmorphologie nach erfolgter Blaulichtbestrahlung lassen sich anhand unserer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ebenfalls gewisse Schlussfolgerungen ziehen. Der Zelltod mittels Apoptose ist im Gegensatz zur Nekrose unter anderem durch eine Kondensation des Chromatins im Zellkern gekennzeichnet (Dobrucki and Darzynkiewicz, 2001, Kasibhatla et al., 2006). Die Kondensation der DNA bzw. des Chromatins zeigt sich in der Fluoreszenzfärbung mit dem Farbstoff Hoechst als fragmentiert und intensiver gefärbt. Im Gegensatz hierzu stellt sich der Zellkern einer nekrotischen Zelle in der Hoechst-Färbung nicht als kondensiert dar. Die Umrandung des Zellkerns ist in der nekrotischen Zelle nicht mehr klar abgrenzbar (Crowley et al., 2016).

In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen aus Abschnitt 3.9 sind Veränderungen in der Zellkernmorphologie nach erfolgter Blaulichtbestrahlung zu erkennen. Diese Veränderungen bestehen hauptsächlich aus einer inhomogenen Formänderung des Zellkerns sowie einer schlechteren Abgrenzbarkeit der Zellkerngrenzen. Vergleicht man die genannten Ergebnisse vorangegangener Studien mit den Ergebnissen unserer Untersuchungen, so lässt sich auch hier die Nekrose als vorherrschende Form des Zelltodes ausmachen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Abnahme der Zellviabilität mit steigender Bestrahlungsintensität auch in der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung zu erkennen ist. Diese lässt sich am Ehesten durch den nekrotischen Zelltod erklären. Somit stützt unsere Studie auch bereits beschriebene Untersuchungsergebnisse wie beispielsweise von Calabuig et al. (2016). Allerdings sind die gewonnenen Ergebnisse allein nicht ausreichend, um die Nekrose als einzige Form des Zelltodes nach erfolgter Blaulichtbestrahlung festzustellen.

#### 4.5 Intensitätsabhängiger Einfluss der Blaulichtbestrahlung auf die Wasserstoffperoxid-Konzentration in humanen dermalen Fibroblasten

Als mögliche Erklärung für die genannten proliferationshemmenden und viabilitätsmindernden Effekte der Blaulichtbestrahlung auf dermale Fibroblasten lässt sich der zunehmende oxidative Stress durch reaktive Sauerstoffspezies wie zum Beispiel Wasserstoffperoxid anführen (Yoshida et al., 2013). Weitere Studien beschreiben bereits eine vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch bestimmte menschliche Zellen nach erfolgter Blaulichtbestrahlung (Marek et al., 2019). Das Blaulicht wird von bestimmten Photoakzeptoren in den Fibroblasten absorbiert und dadurch ein intrazellulärer Signalweg aktiviert (Liebmann et al., 2010). Bei einer Bestrahlung von Photoakzeptoren wie

Riboflavin mit UV-Strahlung wurde bereits in Vorversuchen die Bildung von Wasserstoffperoxid und der daraus resultierende zytotoxische Effekt auf Fibroblasten beschrieben (Sato et al., 1995). Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Konzentration exogen zugeführten Wasserstoffperoxids mit zunehmender Bestrahlungsintensität zunimmt. Dieser Effekt lässt sich unter anderem auf eine gesteigerte Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies nach Blaulichtbestrahlung durch einen verminderten enzymatischen Abbau zurückführen (Marek et al., 2019). Das Enzym Katalase katalysiert den Abbau von Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) zu Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) und Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) und ist somit ein wichtiger antioxidativer Baustein. Daher konnten wir erstmals zeigen, dass die zelluläre Katalase unmittelbar durch Blaulicht gehemmt werden kann. Weitere Studien zeigten zudem eine durch Blaulichtbestrahlung induzierte verminderte Bildung von Katalase und eine damit verbundene Erhöhung des oxidativen Stress (Jusuf et al., 2022, Krassovka et al., 2020, Bruning et al., 2023). Die reduzierte antioxidative Kapazität und die damit einhergehende erhöhte Wasserstoffperoxidkonzentration führen folglich zu einer Zunahme des oxidativen Stress und können sogar die Apoptose in humanen Zellen induzieren (Zha et al., 2019).

#### 4.6 LED-Blaulichtbestrahlung als Therapieoption im klinischen Alltag

Lichttherapie und infolgedessen auch die Bestrahlung mit Blaulicht hat als zusätzliche Therapieoption bereits Einzug in viele verschiedene Bereiche gefunden. Hierzu zählen die Zahnmedizin (Taoufik et al., 2008), die Dermatologie (Omi et al., 2004, Steinbauer et al., 2010) und die Behandlung von Infektionen und Autoimmunerkrankungen (Lipovsky et al., 2008, Leder et al., 2022). Einige Studien zeigten bereits einen guten klinischen Nutzen von Blaulichtbestrahlung bei reduziertem Nebenwirkungsprofil und einfacherer Handhabung (Mamalis et al., 2015, Kleinpenning et al., 2010). Insbesondere bei der Behandlung von chronischen, infizierten Wunden kommt der Blaulichtbestrahlung eine besondere Bedeutung im Rahmen der Wundheilung zu (Leder et al., 2022, Purbhoo-Makan et al., 2022). Während einer Blaulichtbestrahlung mit höheren Dosen im Wellenlängenbereich von 410 – 430 nm antiproliferative Effekte zugesprochen werden, kann die Bestrahlung mit Blaulicht niedrigerer Dosen die Zellproliferation und damit die Wundheilung fördern (Rossi et al., 2021). Anhand unserer Versuchsergebnisse kann man festhalten, dass die Abnahme der Zellviabilität humaner dermaler Fibroblasten dosisabhängig ist und die Proliferationsfähigkeit der bestrahlten Zellen ab einer gewissen Strahlenintensität abnimmt.

Somit könnte die LED-Blaulichtbestrahlung mit einer Wellenlänge von 420 nm eine Therapieoption bei der Behandlung von fibrotischen Erkrankungen wie hypertrophen Narben oder Keloiden darstellen.

## 5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- AUMÜLLER, G. 2007. *Duale Reihe - Anatomie, Georg Thieme Verlag KG.*
- BABILAS, P., KOHL, E., MAISCH, T., BACKER, H., GROSS, B., BRANZAN, A. L., BAUMLER, W., LANDTHALER, M., KARRER, S. & SZEIMIES, R. M. 2006. In vitro and in vivo comparison of two different light sources for topical photodynamic therapy. *Br J Dermatol*, 154, 712-8.
- BALZER, J., HEUER, K., DEMIR, E., HOFFMANN, M. A., BALDUS, S., FUCHS, P. C., AWAKOWICZ, P., SUSCHEK, C. V. & OPLANDER, C. 2015. Non-Thermal Dielectric Barrier Discharge (DBD) Effects on Proliferation and Differentiation of Human Fibroblasts Are Primary Mediated by Hydrogen Peroxide. *PLoS One*, 10, e0144968.
- BAUM, C. L. & ARPEY, C. J. 2005. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg*, 31, 674-86; discussion 686.
- BELLOC, F., DUMAIN, P., BOISSEAU, M. R., JALLOUSTRE, C., REIFFERS, J., BERNARD, P. & LACOMBE, F. 1994. A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry*, 17, 59-65.
- BIRCH, H. L., WILSON, A. M. & GOODSHIP, A. E. 1997. The effect of exercise-induced localised hyperthermia on tendon cell survival. *J Exp Biol*, 200, 1703-8.
- BLACK, H. S. 2002. Pro-oxidant and anti-oxidant mechanism(s) of BHT and beta-carotene in photocarcinogenesis. *Front Biosci*, 7, d1044-55.
- BRUNING, A. K. E., SCHIEFER, J. L., FUCHS, P. C., PETZSCH, P., KOHRER, K., SUSCHEK, C. V., STURMER, E. K. & OPLANDER, C. 2023. Low-Dose Blue Light (420 nm) Reduces Metabolic Activity and Inhibits Proliferation of Human Dermal Fibroblasts. *Life (Basel)*, 13.
- CALABUIG, A., MUGNANO, M., MICCIO, L., GRILLI, S. & FERRARO, P. 2016. Investigating fibroblast cells under "safe" and "injurious" blue-light exposure by holographic microscopy. *J Biophotonics*.
- CALLAGHAN, T. M. & WILHELM, K. P. 2008a. A review of ageing and an examination of clinical methods in the assessment of ageing skin. Part 2: Clinical perspectives and clinical methods in the evaluation of ageing skin. *Int J Cosmet Sci*, 30, 323-32.
- CALLAGHAN, T. M. & WILHELM, K. P. 2008b. A review of ageing and an examination of clinical methods in the assessment of ageing skin. Part I: Cellular and molecular perspectives of skin ageing. *Int J Cosmet Sci*, 30, 313-22.
- CROWLEY, L. C., MARFELL, B. J. & WATERHOUSE, N. J. 2016. Analyzing Cell Death by Nuclear Staining with Hoechst 33342. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016.
- DARBY, I. A., BISUCCI, T., PITTET, B., GARBIN, S., GABBIANI, G. & DESMOULIERE, A. 2002. Skin flap-induced regression of granulation tissue correlates with reduced growth factor and increased metalloproteinase expression. *J Pathol*, 197, 117-27.
- DESMOULIERE, A., CHAPONNIER, C. & GABBIANI, G. 2005. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen*, 13, 7-12.
- DOBRUCKI, J. & DARZYNKIEWICZ, Z. 2001. Chromatin condensation and sensitivity of DNA in situ to denaturation during cell cycle and apoptosis--a confocal microscopy study. *Micron*, 32, 645-52.
- EICHLER, M., LAVI, R., SHAINBERG, A. & LUBART, R. 2005. Flavins are source of visible-light-induced free radical formation in cells. *Lasers Surg Med*, 37, 314-9.
- GABBIANI, G. 2003. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol*, 200, 500-3.
- GODLEY, B. F., SHAMSI, F. A., LIANG, F. Q., JARRETT, S. G., DAVIES, S. & BOULTON, M. 2005. Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells. *J Biol Chem*, 280, 21061-6.

- GOLDBERG, D. J. & RUSSELL, B. A. 2006. Combination blue (415 nm) and red (633 nm) LED phototherapy in the treatment of mild to severe acne vulgaris. *J Cosmet Laser Ther*, 8, 71-5.
- GORGIDZE, L. A., OSHEMKOVA, S. A. & VOROBEV, I. A. 1998. Blue light inhibits mitosis in tissue culture cells. *Biosci Rep*, 18, 215-24.
- HALPER, J. 2021. Basic Components of Connective Tissues and Extracellular Matrix: Fibronectin, Fibrinogen, Laminin, Elastin, Fibrillins, Fibulins, Matrilins, Tenascins and Thrombospondins. *Adv Exp Med Biol*, 1348, 105-126.
- HARMAN, D. 2003. The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal*, 5, 557-61.
- HENDERSON, E., KEMPF, M., YIP, C., DAVENPORT, L., JONES, E., KONG, S., PEARSON, E., KEARNS, A. & CUTTLE, L. 2022. The lethal heat dose for 50% primary human fibroblast cell death is 48 degrees C. *Arch Dermatol Res*, 314, 809-814.
- HINZ, B. 2007. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol*, 127, 526-37.
- HOCKBERGER, P. E., SKIMINA, T. A., CENTONZE, V. E., LAVIN, C., CHU, S., DADRAS, S., REDDY, J. K. & WHITE, J. G. 1999. Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 6255-60.
- JINNIN, M. 2010. Mechanisms of skin fibrosis in systemic sclerosis. *J Dermatol*, 37, 11-25.
- JUSUF, S., ZHAN, Y., ZHANG, M., ALEXANDER, N. J., VIENS, A., MANSOUR, M. K. & CHENG, J. X. 2022. Blue Light Deactivation of Catalase Suppresses Candida Hyphae Development Through Lipogenesis Inhibition. *Photochem Photobiol*.
- KARU, T. 1999. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B*, 49, 1-17.
- KASIBHATLA, S., AMARANTE-MENDES, G. P., FINUCANE, D., BRUNNER, T., BOSSY-WETZEL, E. & GREEN, D. R. 2006. Staining of suspension cells with hoechst 33258 to detect apoptosis. *CSH Protoc*, 2006.
- KIELBASSA, C., ROZA, L. & EPE, B. 1997. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis*, 18, 811-6.
- KLEINPENNING, M. M., SMITS, T., FRUNT, M. H., VAN ERP, P. E., VAN DE KERKHOF, P. C. & GERRITSEN, R. M. 2010. Clinical and histological effects of blue light on normal skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 26, 16-21.
- KRASSOVKA, J. M., SUSCHEK, C. V., PROST, M., GROTHEER, V., SCHIEFER, J. L., DEMIR, E., FUCHS, P. C., WINDOLF, J., STURMER, E. K. & OPLANDER, C. 2020. 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*, 209, 111952.
- LEDER, M. D., BAGHERI, M., PLATTFAUT, I., FUCHS, P. C., BRUNING, A. K. E., SCHIEFER, J. L. & OPLANDER, C. 2022. Phototherapy of Pseudomonas aeruginosa-Infected Wounds: Preclinical Evaluation of Antimicrobial Blue Light (450-460 nm) Using In Vitro Assays and a Human Wound Skin Model. *Photobiomodul Photomed Laser Surg*, 40, 800-809.
- LEPOCK, J. R. 2005. How do cells respond to their thermal environment? *Int J Hyperthermia*, 21, 681-7.
- LEWIS, J. B., WATAHA, J. C., MESSER, R. L., CAUGHMAN, G. B., YAMAMOTO, T. & HSU, S. D. 2005. Blue light differentially alters cellular redox properties. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 72, 223-9.
- LIEBMANN, J., BORN, M. & KOLB-BACHOFEN, V. 2010. Blue-light irradiation regulates proliferation and differentiation in human skin cells. *J Invest Dermatol*, 130, 259-69.
- LIPOVSKY, A., NITZAN, Y. & LUBART, R. 2008. A possible mechanism for visible light-induced wound healing. *Lasers Surg Med*, 40, 509-14.
- MA, W., WLASCHEK, M., TANTCHEVA-POOR, I., SCHNEIDER, L. A., NADERI, L., RAZI-WOLF, Z., SCHULLER, J. & SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K. 2001. Chronological ageing and photoageing of the fibroblasts and the dermal connective tissue. *Clin Exp Dermatol*, 26, 592-9.

- MAHMOUD, B. H., HEXSEL, C. L., HAMZAVI, I. H. & LIM, H. W. 2008. Effects of visible light on the skin. *Photochem Photobiol*, 84, 450-62.
- MAMALIS, A., GARCHA, M. & JAGDEO, J. 2015. Light emitting diode-generated blue light modulates fibrosis characteristics: fibroblast proliferation, migration speed, and reactive oxygen species generation. *Lasers Surg Med*, 47, 210-5.
- MAREK, V., POTEY, A., REAUX-LE-GOAZIGO, A., REBOUSSIN, E., CHARBONNIER, A., VILLETTE, T., BAUDOUIN, C., ROSTENE, W., DENOYER, A. & MELIK PARSADANIANTZ, S. 2019. Blue light exposure in vitro causes toxicity to trigeminal neurons and glia through increased superoxide and hydrogen peroxide generation. *Free Radic Biol Med*, 131, 27-39.
- MIRONOVA, E. V., EVSTRATOVA, A. A. & ANTONOV, S. M. 2007. A fluorescence vital assay for the recognition and quantification of excitotoxic cell death by necrosis and apoptosis using confocal microscopy on neurons in culture. *J Neurosci Methods*, 163, 1-8.
- OMI, T., BJERRING, P., SATO, S., KAWANA, S., HANKINS, R. W. & HONDA, M. 2004. 420 nm intense continuous light therapy for acne. *J Cosmet Laser Ther*, 6, 156-62.
- OPLANDER, C., HIDDING, S., WERNERS, F. B., BORN, M., PALLUA, N. & SUSCHEK, C. V. 2011. Effects of blue light irradiation on human dermal fibroblasts. *J Photochem Photobiol B*, 103, 118-25.
- PIERAGGI, M. T., BOUISSOU, H., ANGELIER, C., UHART, D., MAGNOL, J. P. & KOKOLO, J. 1985. [The fibroblast]. *Ann Pathol*, 5, 65-76.
- PINTADO, B., DE LA FUENTE, J. & ROLDAN, E. R. 2000. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *J Reprod Fertil*, 118, 145-52.
- PURBHOO-MAKAN, M., HOURELD, N. N. & ENWEMEKA, C. S. 2022. The Effects of Blue Light on Human Fibroblasts and Diabetic Wound Healing. *Life (Basel)*, 12.
- ROSSI, F., MAGNI, G., TATINI, F., BANCHELLI, M., CHERCHI, F., ROSSI, M., COPPI, E., PUGLIESE, A. M., ROSSI DEGL'INNOCENTI, D., ALFIERI, D., PAVONE, F. S., PINI, R. & MATTEINI, P. 2021. Photobiomodulation of Human Fibroblasts and Keratinocytes with Blue Light: Implications in Wound Healing. *Biomedicines*, 9.
- SAMARAKOON, R., OVERSTREET, J. M. & HIGGINS, P. J. 2013. TGF-beta signaling in tissue fibrosis: redox controls, target genes and therapeutic opportunities. *Cell Signal*, 25, 264-8.
- SATO, K., TAGUCHI, H., MAEDA, T., MINAMI, H., ASADA, Y., WATANABE, Y. & YOSHIKAWA, K. 1995. The primary cytotoxicity in ultraviolet-a-irradiated riboflavin solution is derived from hydrogen peroxide. *J Invest Dermatol*, 105, 608-12.
- SHIN, D. & MINN, K. W. 2004. The effect of myofibroblast on contracture of hypertrophic scar. *Plast Reconstr Surg*, 113, 633-40.
- SHNITKIND, E., YAPING, E., GEEN, S., SHALITA, A. R. & LEE, W. L. 2006. Anti-inflammatory properties of narrow-band blue light. *J Drugs Dermatol*, 5, 605-10.
- SLINEY, D. H. 2016. What is light? The visible spectrum and beyond. *Eye (Lond)*, 30, 222-9.
- STEINBAUER, J. M., SCHREML, S., KOHL, E. A., KARRER, S., LANDTHALER, M. & SZEIMIES, R. M. 2010. Photodynamic therapy in dermatology. *J Dtsch Dermatol Ges*, 8, 454-64.
- TAFILINSKI, L., DEMIR, E., KAUCZOK, J., FUCHS, P. C., BORN, M., SUSCHEK, C. V. & OPLANDER, C. 2014. Blue light inhibits transforming growth factor-beta1-induced myofibroblast differentiation of human dermal fibroblasts. *Exp Dermatol*, 23, 240-6.
- TAOUFIK, K., MAVROGONATOU, E., ELIADES, T., PAPAGIANNOULIS, L., ELIADES, G. & KLETSAS, D. 2008. Effect of blue light on the proliferation of human gingival fibroblasts. *Dent Mater*, 24, 895-900.
- TIELEMANS, M., COMPERE, P., GEERTS, S. O., LAMY, M., LIMME, M., DE MOOR, R. J., DELME, K. I., BERTRAND, M. F., ROMPEN, E. & NAMMOUR, S. 2009. Comparison of microleakages of photo-cured composites using three different light sources: halogen lamp, LED and argon laser: an in vitro study. *Lasers Med Sci*, 24, 1-5.
- TOBIN, D. J. 2006. Biochemistry of human skin--our brain on the outside. *Chem Soc Rev*, 35, 52-67.

- WATAHA, J. C., LEWIS, J. B., LOCKWOOD, P. E., HSU, S., MESSER, R. L., RUEGGERBERG, F. A. & BOUILLAGUET, S. 2004. Blue light differentially modulates cell survival and growth. *J Dent Res*, 83, 104-8.
- WEINSTABLA, H.-L. S., MERK H F ET AL. 2011. Prospective Randomized Study on the Efficacy of Blue Light in the Treatment of Psoriasis Vulgaris. *Dermatology* 201, 223:251–259.
- YOSHIDA, A., YOSHINO, F., MAKITA, T., MAEHATA, Y., HIGASHI, K., MIYAMOTO, C., WADATAKAHASHI, S., TAKAHASHI, S. S., TAKAHASHI, O. & LEE, M. C. 2013. Reactive oxygen species production in mitochondria of human gingival fibroblast induced by blue light irradiation. *J Photochem Photobiol B*, 129, 1-5.
- ZHA, X., WU, G., ZHANG, H., YANG, Y., ZHANG, Y. & MA, L. 2019. PRDX6 regulates the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and blue light-induced APRE-19 cell apoptosis via down-regulating and interacting with RARA. *Anim Cells Syst (Seoul)*, 23, 241-245.