

Abschlussbericht

Studie: Ermittlung des Einflusses der Nanophotonentechnologie® auf in vitro Zellkulturen

Adressat: Walitschek Medizintechnik GmbH
Herrn Walitschek
Fuldablick 3
34355 Staufenberg

Bearbeiter: Dr. Christiane Wetzel, Dipl. Chem. Jessy Schönfelder
Fraunhofer-Institut für Elektronenstrahl- und Plasmatechnik
Medizinische Applikationen
Winterbergstraße 28
01277 Dresden

Datum: 22.04.2010

1. Zielstellung

Die Nanophotonentechnologie® wird zur Therapie problematischer Krankheitsbilder, in der Akupunktur, bei der Behandlung von Narben und Wunden sowie bei der Behandlung von Muskeln bzw. Triggerpunkten eingesetzt. Die applizierten Photonen sollen den Zellmetabolismus steigern, den Antioxidschutz erhöhen sowie die Bildung von DNA und RNA fördern.

Der Einfluss der Nanophotonentechnologie® auf die zellbiologischen Vorgänge wurde in Abhängigkeit der verwendeten Frequenzen und Behandlungszeiten durch in vitro-Tests mit definierten Zellkulturen (*humane Fibroblasten*) charakterisiert. Dazu wurde in dieser ersten abgeschlossenen Arbeitsstufe der Zellstoffwechsel ohne und mit einer definierten Vorschädigung der Zellen untersucht.

2. Durchführung:

2.1 Versuchsgruppen

Alle Untersuchungen wurden an in vitro-Kulturen von humanen Fibroblasten (Bi-hTERT) durchgeführt. In Tabelle 1 sind die 4 Versuchsgruppen aufgelistet:

Tabelle 1: Modellierung der Versuchsgruppen

Versuchsgruppe	Vorschädigung	Nanophotonen-Behandlung
Gruppe 1 K	ohne Vorschädigung	keine (Kontrolle)
Gruppe 2 NaPh	ohne Vorschädigung	3 Tage Nanophotonen-Behandlung (3x täglich ein 16-min-Zyklus)
Gruppe 3 H2O2	mit Vorschädigung (Wasserstoffperoxid H2O2)	keine
Gruppe 4 H2O2-NaPh	mit Vorschädigung (Wasserstoffperoxid H2O2)	3 Tage Nanophotonen-Behandlung (3x täglich ein 16-min-Zyklus)

Bei der Häufigkeit bzw. Dauer des Einsatzes der Geräteeinheit wurde sich an der therapeutischen Behandlung in der Praxis (tägliche Behandlung über 10 Tage) orientiert und diese an die Bedingungen der Zellkultur angepasst.

2.2 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau ist in den Abbildungen 1 und 2 zu sehen.

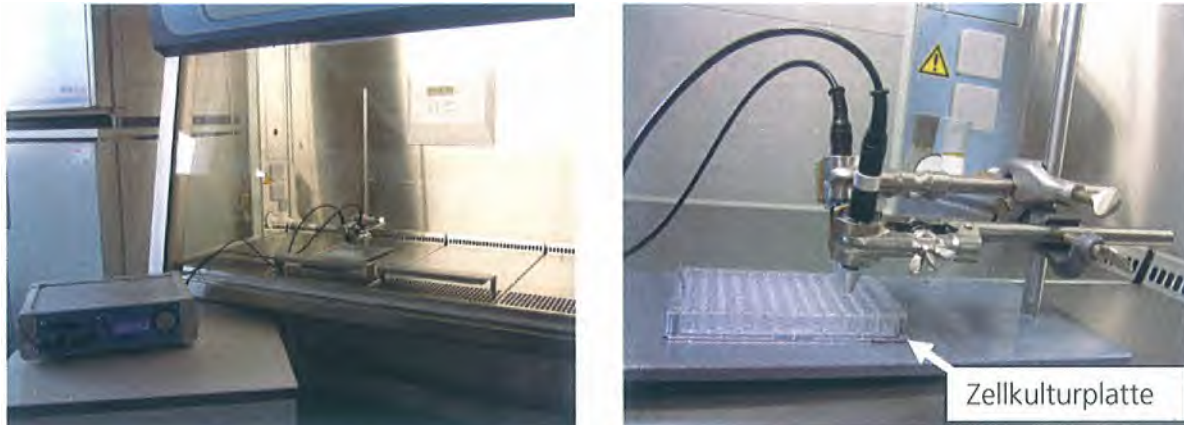


Abbildung 1/2: Versuchsaufbau, (Abb. 1 links: Gesamtaufbau, Abb.2 rechts: Detailsicht Schnittstelle Nanophotonentechnologie/Zellen)

2.3 Untersuchung des Zellstoffwechsels mit dem Resazurin-Test

Sehr gute Aussagekraft über den energetischen Zustand der Zelle läßt sich über den Resazurintest gewinnen. Bei diesem in vitro-Zelltest handelt es sich um eine neue, ausgewählte sensitive Methode, die eine Beeinträchtigung (Zellstress) oder Verbesserung der energetischen Lage der zu testenden Zellen zeigt. Es lassen sich statistisch hoch-aussagefähige Resultate relativ sicher gewinnen.

Beim Resazurin-Test (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA) erfolgt prinzipiell in Abhängigkeit von der Aktivität intrazellulärer Redoxsysteme in den Mitochondrien ein Farbumschlag von blau nach pink, dessen Intensität die metabolische Aktivität der Zelle anzeigt. Der Farbumschlag wurde mit einem Fluorometer (FluOstar Optima, BMG Labtech GmbH, Offenburg, Germany) detektiert.

Durchführung: In eine 96-Well-Platte (Greiner Cellstar) wurden ca. 7.000 Zellen in 100 µl Standard-Zellkulturmedium in die Wells pipettiert. Nach 24 h wurde mit der Nanophotonen-Behandlung begonnen. Es erfolgten 3 Nanophotonen-Behandlungen täglich mit einem Abstand von ca. 100 min. Im Anschluss an die täglichen Behandlungen wurde das Nährmedium gewechselt. Die Versuchsgruppen mit der Vorschädigung wurden vor der ersten Nanophotonen-Behandlung für 30 min. mit 0,02 pM H₂O₂ inkubiert.

Nach der 3-tägigen Behandlung erfolgte eine weitere Ruhephase von 24 h. Nach einem erneuten Mediumwechsel wurde in die Wells je 10 µl Resazurin (Sigma Aldrich) gegeben. Nach 4 h Inkubation wurde der Resazurinumsatz mit einem Fluorometer (FluOstar Optima, Labtech GmbH) erfasst. Zur Auswertung wurde der Mittelwert von 3 Wells abzüglich des Blanks herangezogen. Die Experimente wurden 5 mal wiederholt.

3. Ergebnisse:

Bei den Untersuchungen mit den ungeschädigten Zeilen ist tendenziell eine Erhöhung des Resazurinumsatzes nach Anwendung der Nanophotonentechnologie messbar. Bei den geschädigten Zellen wurde eine Tendenz in Richtung geringerer Resazurinumsatz nach Anwendung der Nanophotonentechnologie festgestellt.

Die Ergebnisse vom Resazurin-Test sind in Abbildung 2 grafisch dargestellt:

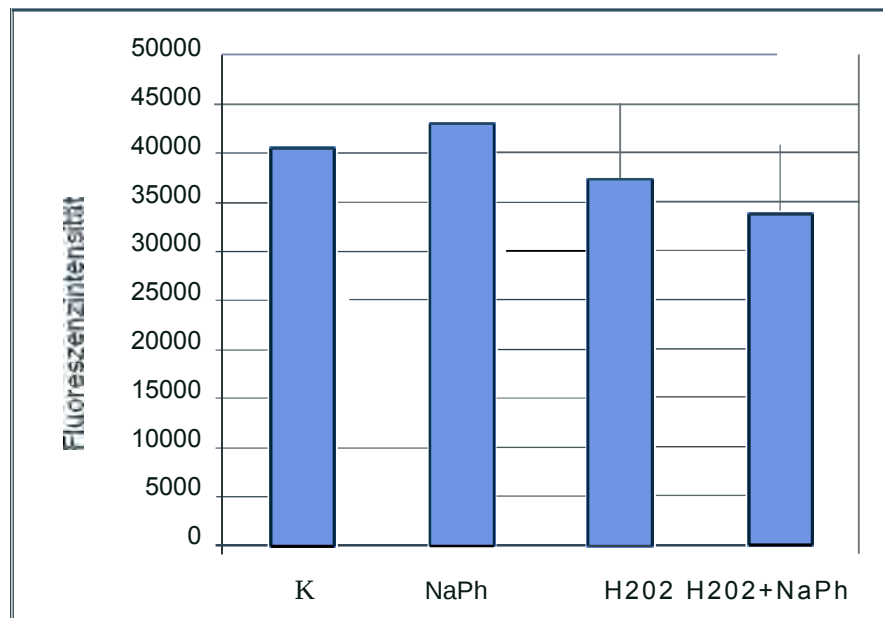


Abbildung 2: Ergebnisse des Resazurintests

In der Morphologie wurden keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt (Abbildung 3 bis 6).

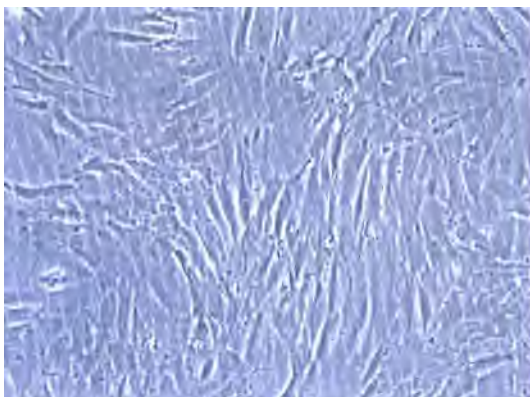


Abbildung 3: Kontrolle am Tag der Auswertung

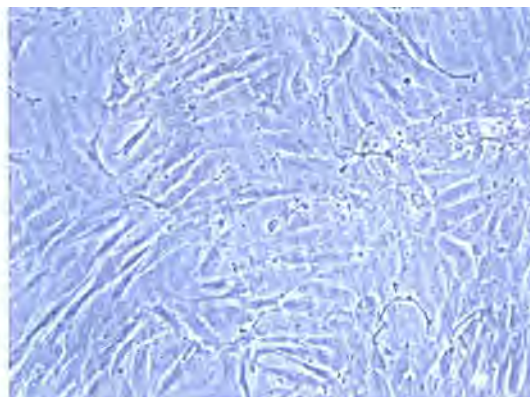


Abbildung 4: Zellen mit Nanophotonen behandelt am Tag der Auswertung

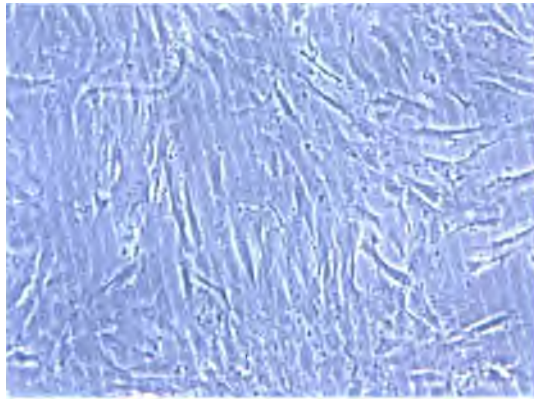


Abbildung 5: Zellen mit H_2O_2 behandelt am Tag der Auswertung

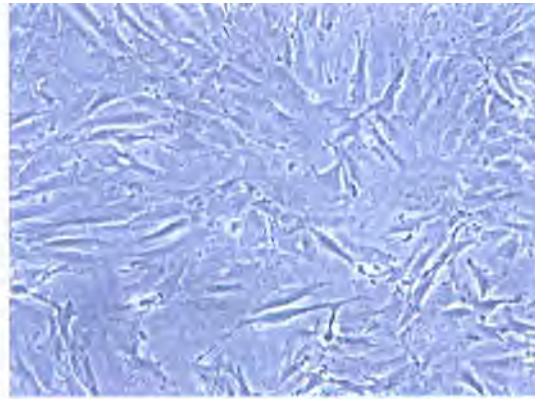


Abbildung 6: Zellen mit H_2O_2 und Nanophotonen behandelt am Tag der Auswertung

4. Diskussion

Alle Untersuchungen wurden mit in vitro-Kulturen von Fibroblasten aus dem Bindegewebe durchgeführt. Zur Bewertung der zellbiologischen Effekte durch die Nanophotonentherapie wurde der energetische Zustand der Zelle mit dem Resazurintest analysiert. Durch die Vorschädigung der Zellen z.B. mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wurden die Zellen oxydativem Stress ausgesetzt. Durch den Vergleich der Zellaktivität vor und nach der Nanophotonen-Behandlung ließ sich die Auswirkung der Therapie auf die geschädigten Zellen zeigen.

Resazurin ist ein Indikator-Farbstoff, der in der Zellkultur u.a. zum Nachweis von zytotoxischen Stoffen verwendet wird. Resazurin wird im Stoffwechsel der Zellen zum fluoreszierenden Resorufin reduziert. In diesen Versuchen wurde der Farbumschlag bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm detektiert. Je höher die gemessene Fluoreszenzintensität ist, desto höher sind die Zellzahl bzw. die Stoffwechselaktivität der Zellen.

Die Untersuchungen bei fixierter Dosis basieren auf umfangreichen Voruntersuchungen, in denen das Proben-Handling, insbesondere die Schnittstelle Nanophotonentherapie/Zelltests, gesichert wurde um reproduzierbare Messergebnisse zu erzielen.

5. Zusammenfassung/Ausblick

Durch die Behandlung der Zellkulturen humaner Fibroblasten mit der Nanophotonentechnologie sind leichte Unterschiede im Zellstoffwechsel gegenüber den Kontrollkulturen erkennbar. Die Nanophotonentechnologie® zeigt eine Tendenz zur Steigerung des Zellmetabolismus, die weiter untersucht werden sollte. Dies bietet einen guten Ansatzpunkt. In der Studie wurden systematische Untersuchungen bezüglich Revitalisierung bzw. Reparatur nach Schädigung signifikanter Zelltypen in Kulturmedien mit statistischer Absicherung der Messdaten realisiert. Ergänzend dazu könnte sich die **„Ermittlung des Dosis-Wirkungs-Verhältnisses beim Einsatz der Nanophotonentechnologie®“** anbieten, um eine komplexere Bewertung des Einflusses der Nanophotonentechnologie® auf in vitro-Zellkulturen zu ermöglichen.