

Abschlussbericht

**Untersuchungen zur Wirkung
harmonisierender
Schwingungen mittels
Rayonex-Gerätetechnik auf
Zellkulturen**

Adressat: Herr Heimes
RAYONEX Schwingungstechnik GmbH
Sauerland-Pyramiden 1
57368 Lennestadt

Bearbeiter: Dr.-Ing. habil. Christiane Wetzel, BSc Susanne Klamke, BSc Johanna Melke
Fraunhofer-Institut für Elektronenstrahl- und Plasmatechnik
Medizinische Applikationen
Winterbergstraße 28
01277 Dresden

Datum: 12. August 2011

1. Zielstellung

Das Ziel der Studie „Untersuchungen zur Wirkung von Gerätesystemen der RAYONEX Schwingungstechnik GmbH auf Zellkulturen“ war, systematische Untersuchungen bezüglich Revitalisierung und Reparatur nach Schädigung signifikanter Zelltypen in Kulturmedien unter statistischer Absicherung der Messdaten zu realisieren. Die Untersuchungen stellen eine Pilotstudie auf dem weiten Feld der Erkundung von Effekten durch harmonische Schwingungen auf molekularbiologischer Ebene dar und könnten bisher beobachtete medizinische Erfolge untermauern.

Es wurden Untersuchungen bezüglich der Vitalisierung gesunder Zellen und vorgeschädigter Zellen vorgenommen. Dazu wurde der Einfluss der Behandlung mit den Geräten **PS1000**, **PS10** und dem **Thyreogym** auf *in vitro*-Zellkulturen untersucht. Um den Einfluss der Gerätesysteme auf verschiedene Gewebearten zu ermitteln, wurden zwei Zelllinien **humane Fibroblasten** aus dem *Bindegewebe* und **humane Keratinozyten** aus dem *Epithelgewebe* verwendet.

Die Beurteilung molekularbiologischer Zellveränderungen infolge der Behandlung erfolgte durch die Untersuchungen des Zellstoffwechsels sowie der Aktivierung des Zellzyklus.

2. Durchführung

2.1 Testzyklen

Alle Untersuchungen wurden an *in vitro*-Kulturen von humanen Keratinozyten (HaCat) und humanen Fibroblasten (AG01522) durchgeführt. Diese *in vitro*-Kulturen wurden einmal ohne und einmal mit zusätzlicher Zellschädigung durch Cycloheximid einer Behandlung mit den Rayonex-Geräten unterzogen.

Eine Matrix der Testzyklen wurde im Angebot unterbreitet und als Untersuchungsgrundlage akzeptiert. Tabelle 1 zeigt zusammenfassend einen Überblick über das Testregime und die Analysemethoden.

Tabelle 1: Realisiertes Testregime

| Versuchsgruppe | Zellen | Vorschädigung | Behandlung | Behandlungszahl und Testart |
|------------------------|-----------------|---|--------------------------------|-----------------------------|
| Kontrolle ungeschädigt | • Keratinozyten | ohne Vorschädigung | keine | - T1, T2 |
| | • Fibroblasten | | | |
| Behandelt ungeschädigt | • Keratinozyten | ohne Vorschädigung | PS 10, PS1000, Thyreogym | 6 Behandlungen T1, T2 |
| | • Fibroblasten | | | |
| Kontrolle geschädigt | • Keratinozyten | mit Vorschädigung (14 h 12,5 µM Cycloheximid) | keine | - T1, T2 |
| | • Fibroblasten | | | |
| Behandelt geschädigt | • Keratinozyten | mit Vorschädigung (14 h 12,5 µM Cycloheximid) | PS 10, PS1000, Thyreogym | 6 Behandlungen T1, T2 |
| | • Fibroblasten | | | |

Zellbiologisches Testverfahren (T1):

Aktivitätsbestimmung mit Resazurinessay

- Ergebnisse s. Abschnitt 3.2.1 sowie 3.3.1

Zellbiologisches Testverfahren (T2):

Analyse des Zellzyklus mit der Durchflusszytometrie (FACS)

- Ergebnisse s. Abschnitt 3.2.2 sowie 3.3.2

2.2 Einschränkungen/Hinweise

- a) Die avisierte Anzahl von 10 Behandlungen an 10 Tagen konnte mit den ausgewählten Zellkulturen nicht umgesetzt werden. Da die *in vitro*-Kulturen für die Zeit der Behandlungsdauer aus dem Brutschrank mit optimaler Temperatur und CO₂-Atmosphäre entfernt werden mussten, war die Regenerationszeit kürzer als erforderlich. Dies würde die Überlebenschancen der Zellen erheblich schmälern. Aus diesem Grund wurde der Versuchsansatz auf 6 Behandlungen reduziert.
- b) Zur Behandlungen der AG-Zelllinie wurden die Wellplatten in Petrischalen gestellt (siehe 2.3). Für die Behandlung der HaCat-Zellen wurde hingegen eine sterile Glasplatte direkt auf die Wells gelegt um Verluste durch Verdunstung zu minimieren.
- c) Die Behandlung mit den Geräten PS1000 und PS10 wurde zur besseren Aussagefähigkeit der Ergebnisse mit 4 Zellkonzentrationen durchgeführt. Das geometrische Abmaß des Thyreogym begrenzt die Anwendungsmöglichkeit auf nur eine Zellkonzentration. Gewählt wurde eine Konzentration von 5×10^4 Zellen/ml.

2.3 Versuchsaufbau

Für die *Aktivitätsbestimmung* wurden die Zellen mit den Konzentrationen 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 Zellen/ml (entspricht 88, 148, 147 und 177 Zellen/mm²) in 96-Well-Platten für 31 Stunden vorkultiviert. Je Konzentration fand eine 8-fache Bestimmung, beim Thyreogym eine 16-fache Bestimmung der Konzentration 5×10^4 Zellen/ml, statt. Die statistische Sicherheit betrug $n = 4$.

Für die Untersuchung des *Zellzyklus* wurden die Zellen in 6-Well-Platten mit einer Konzentration von 5×10^4 Zellen/ml (entspricht 104 Zellen/mm²) ausgesät und ebenfalls 31 Stunden vorkultiviert. Es fand eine Doppelbestimmung statt. Die Behandlung mit dem Thyreogym erfolgte unter gleichen Bedingungen in Zellkulturschalen. Wegen des erhöhten Aufwandes wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt. Das Medium der Zellen wurde 2mal erneuert. Die erste Behandlung erfolgte nach 2 Stunden. Nach Waschen der Zellen mit PBS-Lösung erfolgte das Ausfällen der DNA mit -20°C kaltem Ethanol. Die Analyse des Zellzyklus erfolgte durch Anfärben der DNA mit Propidiumiodid am Durchflusszytometer (FACS Scan, BD Bioscience Germany). Bestimmt wurde in jeweils 10.000 Zellen pro Versuch der DNA-Gehalt, woraus sich die Zellzyklusphasen ableiten lassen.

Die Vorschädigung erfolgte bei allen Versuchen mit 12,5 µM Cycloheximid (in Medium). Bei den Untersuchungen mit Vorschädigung wurde ebenfalls nach 16 Stunden das Medium gewechselt. Zur Behandlung wurden die Well-Platten ohne Deckel in Petrischalen (17 cm) überführt. Die Stoffdetektoren wurden auf und unter die Petrischalen gelegt.

Die Behandlung mit harmonisierten Schwingungen der Rayonex-Gerätesysteme erfolgte gemäß den vorgegebenen Geräteparametern.