



Abschlussbericht

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

Adressat: Dipl. Ing. (TH) Dietmar Heimes  
RAYONEX Schwingungstechnik GmbH  
Sauerland-Pyramiden 1

Vereinigung zur Förderung der Schwingungsmedizin e. V.  
Hunold-Rump-Str. 13  
57368Lennestadt

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: 29. September 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 CO<sub>2</sub>-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  $5 \times 10^4$  Zellen/ml.

## **2.3 Versuchsaufbau**

Für die *Aktivitätsbestimmung* wurden die Zellen mit den Konzentrationen  $3 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$  Zellen/ml (entspricht 88, 148, 147 und 177 Zellen/mm<sup>2</sup>) in 96-Well-Platten für 31 Stunden vorkultiviert. Je Konzentration fand eine 8-fache Bestimmung, beim Thyreogym eine 16-fache Bestimmung der Konzentration  $5 \times 10^4$  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  $5 \times 10^4$  Zellen/ml (entspricht 104 Zellen/mm<sup>2</sup>) 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.

Die Behandlungszeit betrug mit dem Gerät PS10: 2 x 20 Minuten mit einer halben Stunde Pause zwischen den Behandlungen. Mit den Geräten PS1000 und Thyreogym wurde parallel je 27 Minuten behandelt. Danach wurden die Proben 2 Stunden im Brutschrank belassen, um den pH-Wert des Mediums und Temperatur zu regenerieren. Abbildung 1 zeigt den Versuchsaufbau der Rayonex-Gerätesysteme.



Abbildung 1: Versuchsaufbau der 3 Rayonex-Gerätesysteme zur Behandlung der Zellkulturen; links PS1000, mittig PS10, rechts hinten Thyreogym

## 2.4 Theorie zur Zellstoffwechselaktivität mit dem Resazurinessay

Der Resazurin-Reduktionstest ist ein geeignetes Mittel, um den Umsatz des Zellstoffwechsels zu ermitteln. Der blaue Farbstoff Resazurin ist nicht fluoreszierend. Nach der Aufnahme in die Zelle wird er durch metabolische Aktivität von Organismen in das rosafarbene Resorufin reduziert, dessen Fluoreszenz messbar ist. Der Umsatz findet hauptsächlich in den Mitochondrien, aber auch im Zytoplasma statt. Die gemessene Fluoreszenzintensität wird in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) angegeben. Der Umsatz des Farbstoffes ist proportional zur Zellaktivität und Zellzahl. Die Anregung findet bei 560 nm statt, die Emission kann bei 590 nm gemessen werden.

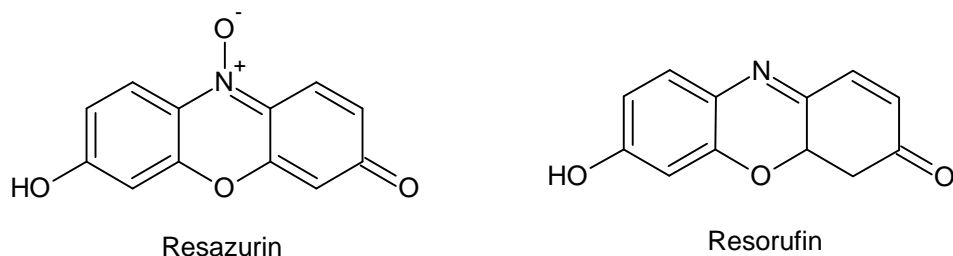


Abbildung 2: Resazurin und Resorufin

Ein hoher Umsatz des Farbstoffes weist dabei auf eine hohe Zellaktivität hin.

## 2.5 Theorie zur Analyse des Zellzyklus mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Der Zellzyklus ist ein sich wiederholender Ablauf von Ereignissen zwischen zwei Zellteilungen. Er kann bei humanen Zellen zwischen 20 und 24 Stunden dauern und ist in zwei entscheidende Phasen unterteilt:

- die Interphase (Phase zwischen zwei Zellteilungen) und
- die Mitose-Phase, welche 30 Minuten dauert und mit der Teilung der Zelle endet.

Die Interphase besteht wiederum aus der **G1-Phase**, der **S-Phase** und der **G2-Phase**. Die postmitotische Phase (G1-Phase) ist direkter Nachfolger der Mitose-Phase. Die Hauptaufgabe gliedert sich in Zellwachstum und Ergänzung noch fehlender Kompartimente (z. B. Zytoplasma, Zellorganellen). Neben DNA-Reparaturen, der Synthese von Replikationsenzymen und der mRNA, wird ebenfalls Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) produziert.

Die G0-Phase ist eine Ruhephase und befindet sich nicht mehr im Zellzyklus. In der S-Phase findet die Replikation der DNA statt. Am Ende dieses Vorgangs besteht jedes Chromosom aus zwei Chromatiden. In der prämitotischen Phase (G2-Phase) bereitet sich die Zelle auf die Teilung vor. Die in der G1-Phase produzierten Enzyme und Proteine werden in der G2-Phase geschnitten (prozessiert) bzw. modifiziert, so dass sie ihre volle Funktion ausüben können. Darüber hinaus lösen sich die Zell-Zell-Kontakte zu den Nachbarzellen und die Zellen schwellen durch Flüssigkeitsaufnahme an. Die M-Phase (Mitose) ist die eigentliche Zellteilung. Abbildung 3 zeigt den Ablauf eines Zellzyklus.

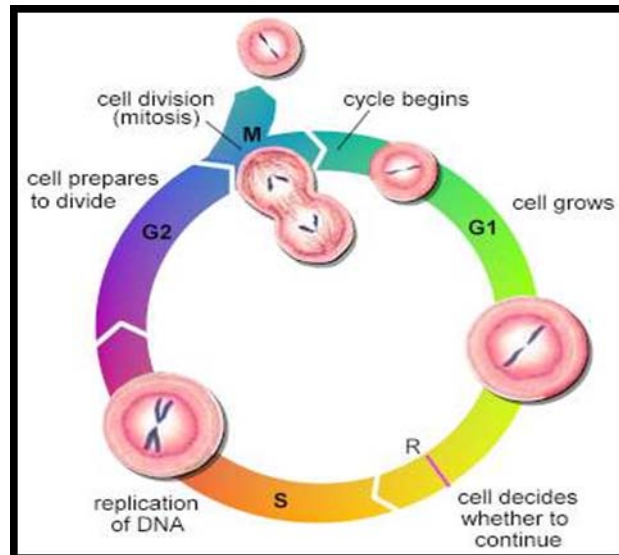


Abbildung 3: Zellzyklus<sup>1</sup>

<sup>1</sup> MURRAY, Andrew. *The cell cycle*. New York : Oxford University Press, 1993. S. 8.

### 3. Ergebnisse

Als Abkürzungen der Zelllinien wurde AG für Fibroblasten und HaCat für Keratinozyten genutzt. Innerhalb der statistischen Bewertung wurden Ausreißer nach GRUBBS eliminiert.

#### 3.1 Reaktionsverhalten humaner Fibroblasten

Es erfolgt eine Betrachtung der Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen, der Aktivitätsbestimmung und der Analyse des Zellzyklus der Fibroblasten.

##### 3.1.1 Zellmorphologie

Erfreulicherweise konnten keine Unterschiede im Aussehen zwischen behandelten Zellen und den Kontrollgruppen festgestellt werden. Die geschädigten Zellen zeigten –wie zu erwarten – eine geringe Zelldichte als die ungeschädigten Zellen.

##### 3.1.2 Aktivitätsbestimmung mit Resazurinessay

Im Resazurintest wird der Stoffumsatz des Farbstoffes Resazurin betrachtet. Da der Umsatz proportional zur Zellaktivität ist, stellt dieser Test einen Indikator für die Vitalität der Zellen dar. In Abbildung 4-6 sind die im Zellkulturüberstand gemessenen Werte grafisch dargestellt.

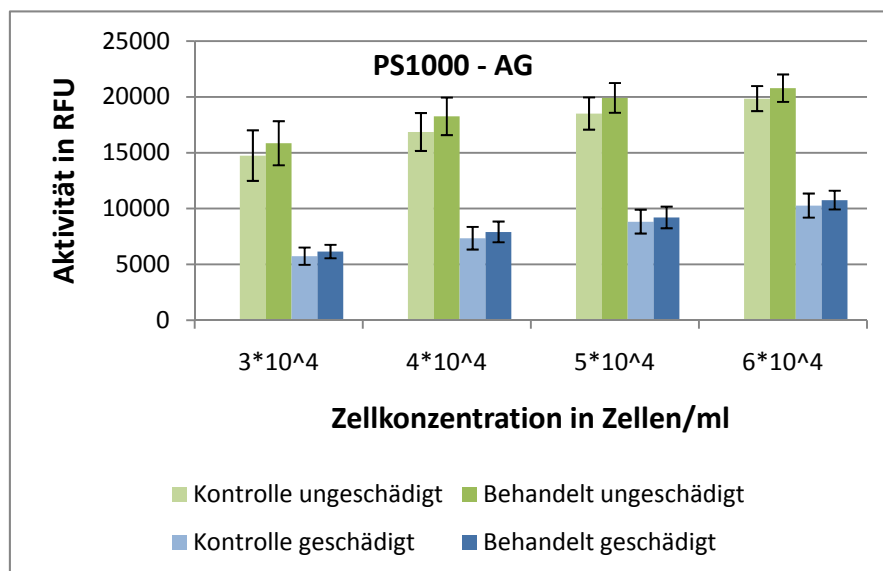


Abbildung 4: Fluoreszenzaktivität im Zellkulturüberstand von humanen Fibroblasten mit und ohne Behandlung mit PS1000

Es konnte eine Zunahme der Aktivität bei allen Konzentrationen, sowie bei geschädigten und Zellen ohne Vorschädigung beobachtet werden. Die absolute Zunahme der Aktivität über die Zellkonzentrationen ist durch die Ausgangszellzahl bedingt.

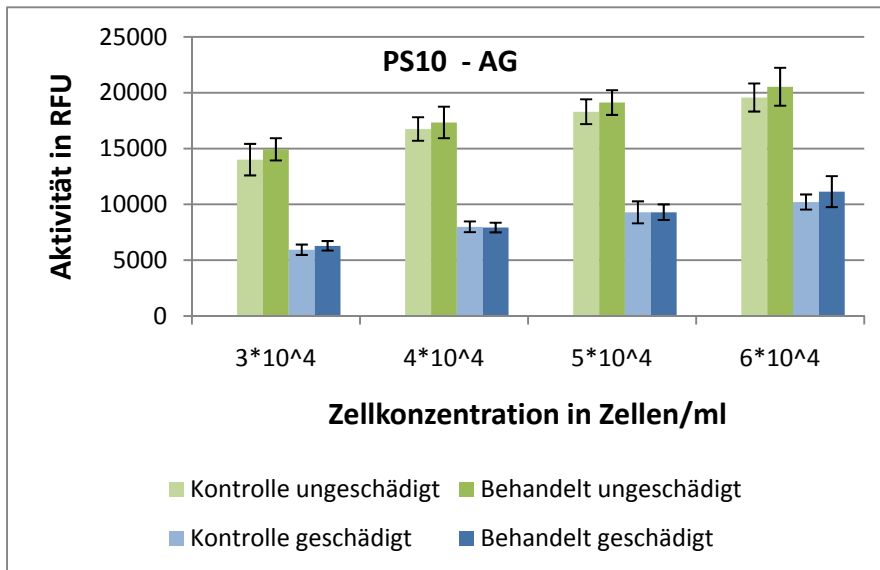


Abbildung 5: Fluoreszenzaktivität im Zellkulturüberstand von humanen Fibroblasten mit und ohne Behandlung mit PS10

Eine leichte Zunahme der Aktivität der ungeschädigten Fibroblasten nach Behandlung war zu verzeichnen. Die Unterschiede in den Ergebnissen der geschädigten Zellen ist unspezifisch, weist aber auf einen Trend zur Zunahme.

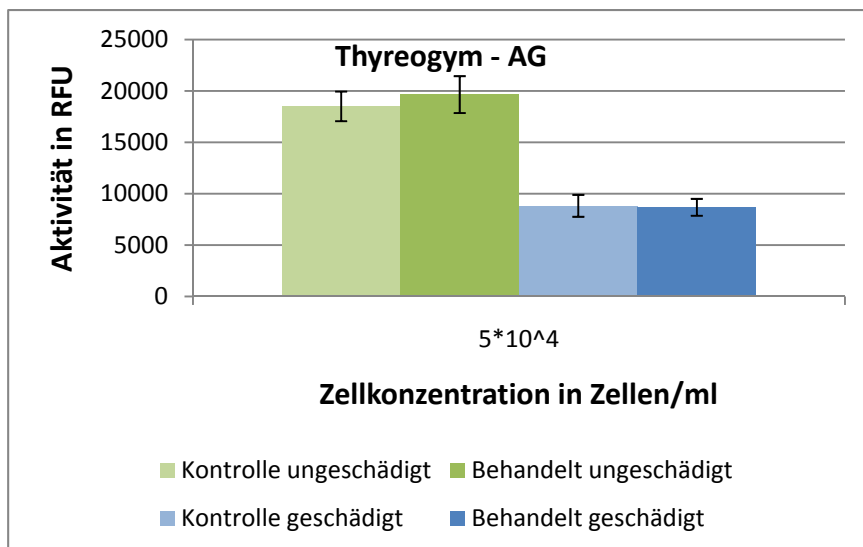


Abbildung 6: Fluoreszenzaktivität im Zellkulturüberstand von humanen Fibroblasten mit und ohne Behandlung mit dem Thyreogym.

Die ungeschädigten Zellen konnten mit dem Thyreogym leicht aktiviert werden. Die geschädigten Fibroblasten zeigen keine Unterschiede.

### 3.1.3 Analyse des Zellzyklus mit der Durchflusszytometrie

In den Abbildungen 7-9 werden die quantitativen Messdaten, d. h. die Anzahl der sich in entsprechender Phase befindlichen AGs, als Funktion ihrer Behandlung (Vorschädigung und Gerätetypen) dargestellt.

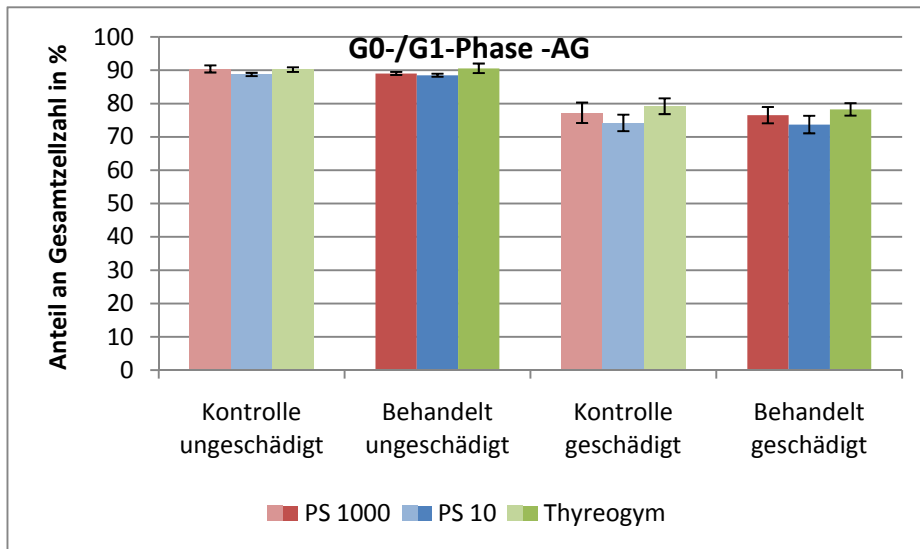


Abbildung 7: Prozentualer Anteil an Fibroblasten in der G0/G1-Phase

- G0/G1-Phase  
Für die G0/G1-Ruhephase zeigt sich, dass die drei getesteten Geräte nur einen geringen Einfluss auf den prozentualen Anteil an ungeschädigten sowie geschädigten Zellen haben.

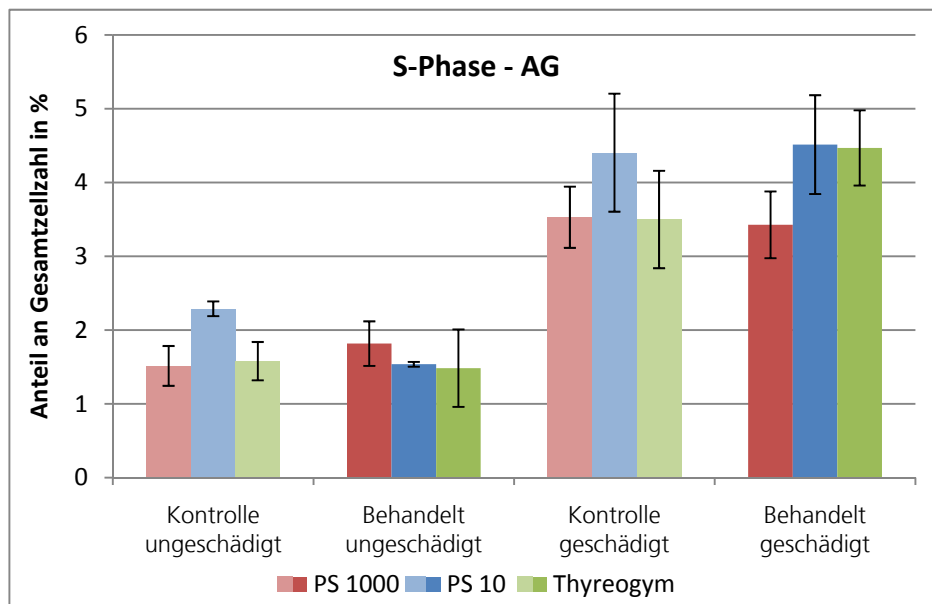


Abbildung 8: Prozentualer Anteil an Fibroblasten in der S-Phase

- S-Phase  
Für die S-Phase ergeben sich mit dem PS1000 keine signifikanten Unterschiede. Die Anwendung des Gerätes PS10 zeigt einen leichten Rückgang des prozentualen Anteils der ungeschädigten Proben, jedoch keine Veränderung der geschädigten Zellen. Beim Thyreogym zeigt sich eine leichte Erhöhung der Zellzahl in der Synthesephase der vorgeschädigten Zellen. Die ungeschädigten Zellen konnten vom Thyreogym nicht signifikant beeinflusst werden.



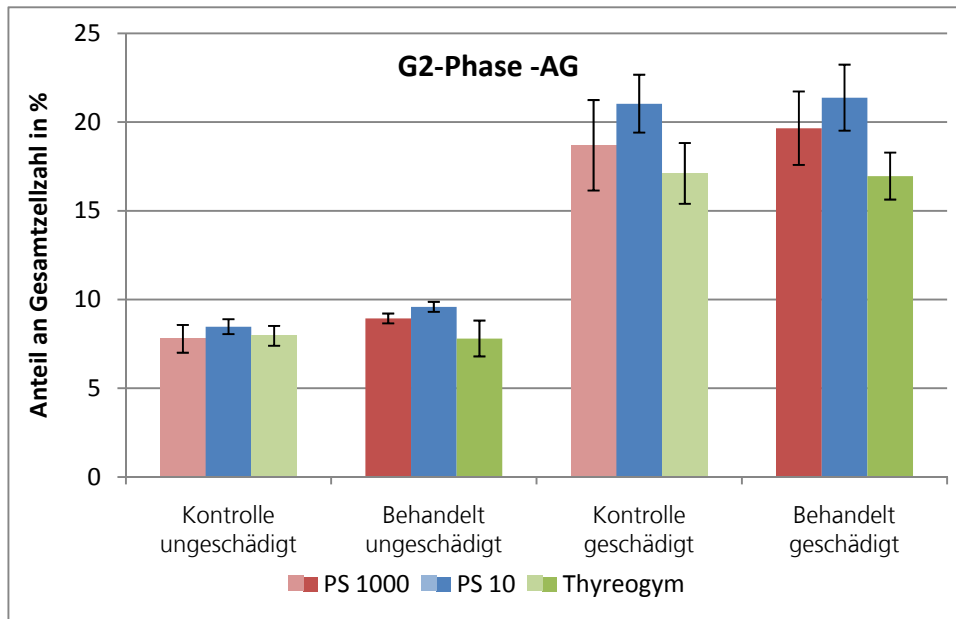


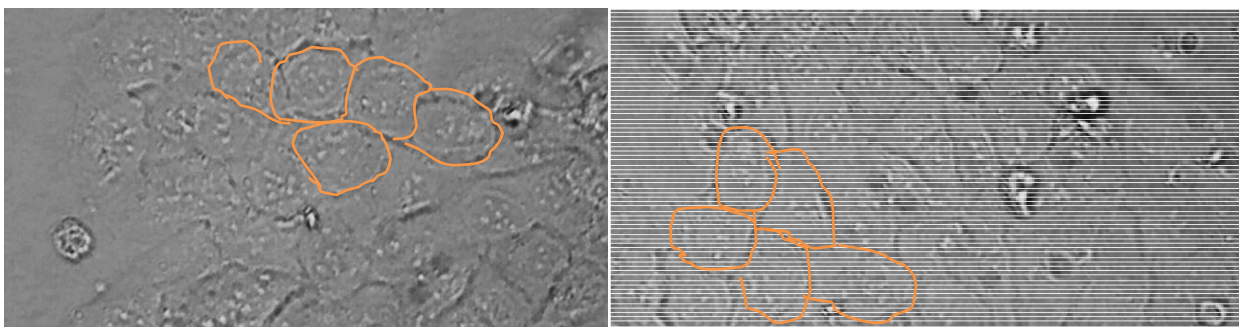
Abbildung 9: Prozentualer Anteil an Fibroblasten in der G2/M-Phase

- G2/M-Phase  
Für die G2/M-Phase wurde bei den Geräten PS1000 und dem Thyreogym keine signifikante Änderung festgestellt unabhängig, ob eine Vorschädigung vorlag oder nicht. Das PS10 zeigt eine leicht steigende Zellzahl der ungeschädigten Proben. Die geschädigten Proben konnten nicht signifikant beeinflusst werden.

## 3.2 Reaktionsverhalten humaner Keratinozyten

### 3.2.1 Zellmorphologie (Mikroskopie)

Analog den Fibroblasten zeigen auch die Keratinozyten zwischen den einzelnen Versuchsgruppen keine morphologischen Unterschiede im Zellaussehen. Lediglich in den vorgeschädigten Proben war die Zelldichte am Tag der Auswertung erwartungsgemäß gering.



Abbildungen 10 und 11: Mikroskopische Aufnahme der HaCat Zellen (links (10) vor der Behandlung, rechts (11) nach der Behandlung, 100 x fache Vergrößerung)

### 3.2.2 Aktivitätsbestimmung mit Resazurinessay

Nachfolgende Abbildung 12-14 zeigen die Zellviabilität für humane Keratinozyten.

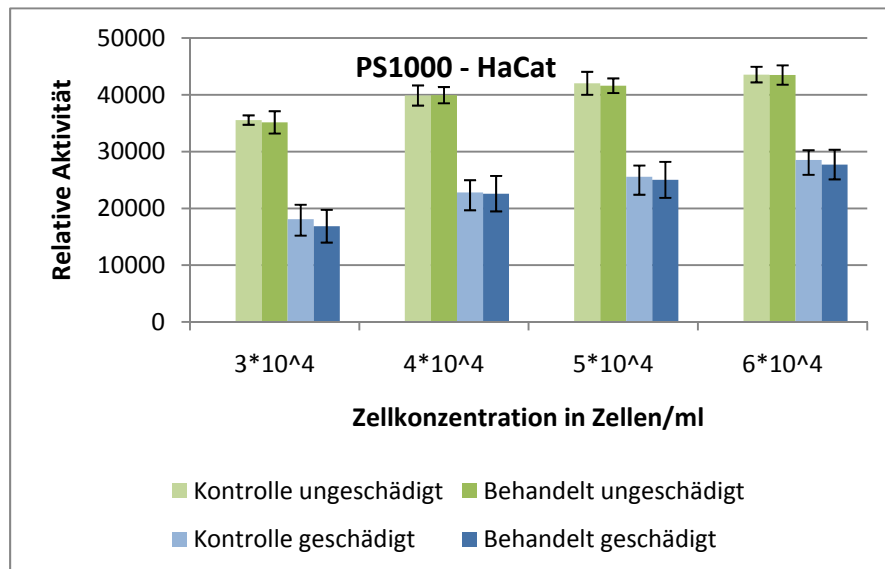


Abbildung 12: Fluoreszenz im Zellkulturüberstand (entspricht Aktivität) von humanen Keratinozyten mit und ohne Behandlung mit PS1000

Die Ergebnisse des PS1000 zeigen keine signifikanten Änderungen der Zellaktivität der Keratinozyten. Die geschädigten Zellen zeigen einen Trend zur leichten Abnahme der Aktivität.

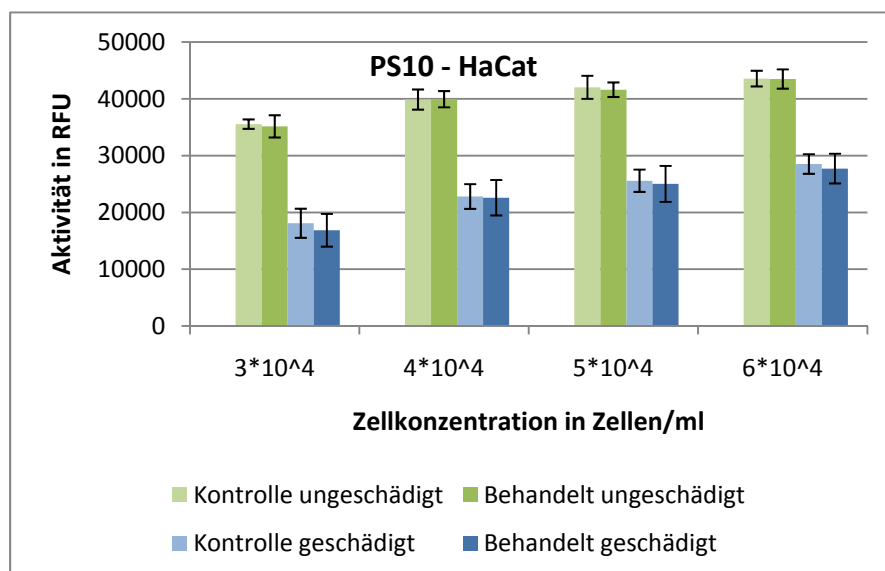


Abbildung 13: Fluoreszenz im Zellkulturüberstand (entspricht Aktivität) von humanen Keratinozyten mit und ohne Behandlung mit PS10

Die Behandlung der HaCat-Zellen mit dem Gerät PS10 bewirkte ebenfalls keine wesentliche Veränderung in der Zellaktivität.

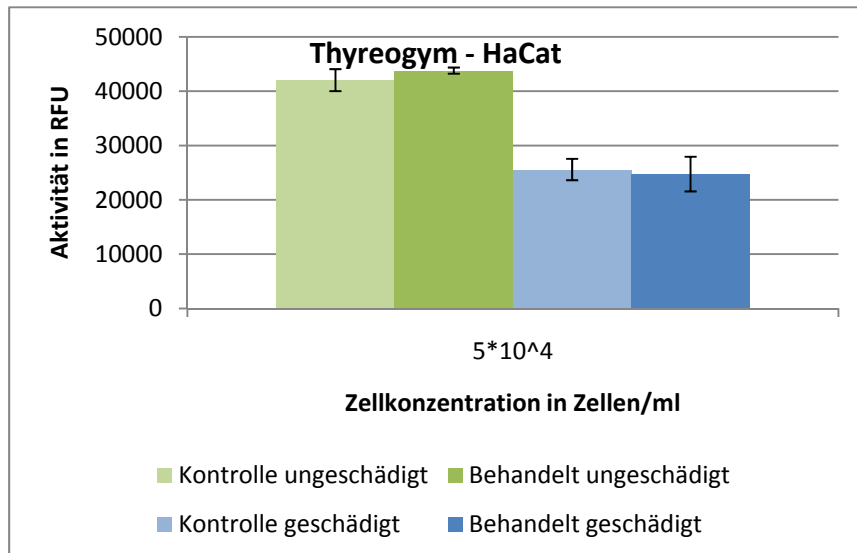


Abbildung 14: Fluoreszenz im Zellkulturüberstand (entspricht Aktivität) von humanen Keratinozyten mit und ohne Behandlung mit dem Thyreogym

Eine leichte Zunahme der Zellaktivität war nach der Behandlung mit dem Thyreogym zu verzeichnen.

### 3.2.3 Analyse des Zellzyklus mit der Durchflusszytometrie

Im Folgenden werden die quantitativen Messdaten, d.h. die Anzahl der sich in entsprechender Phase befindlichen humanen Keratinozyten, dargestellt.

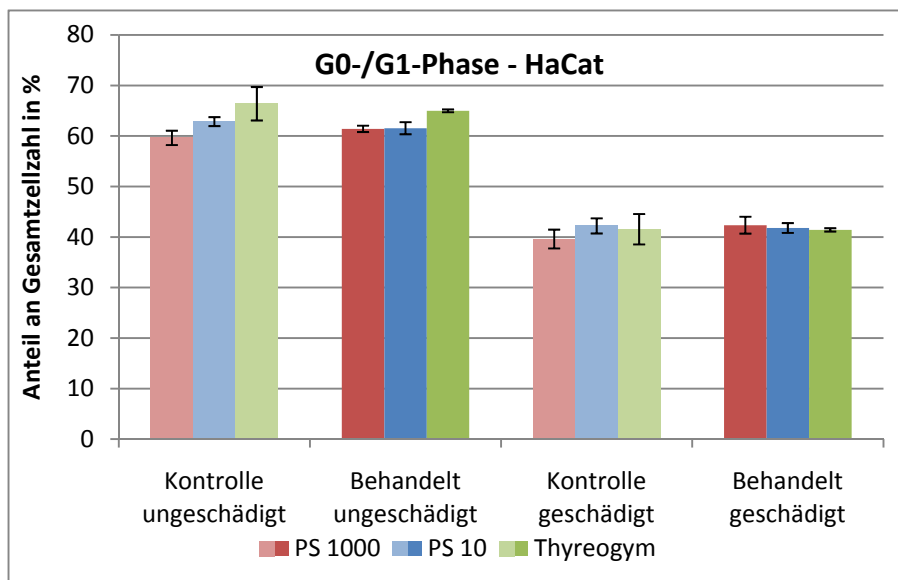


Abbildung 15: Prozentualer Anteil an Keratinozyten in der G0/G1-Phase

- G0-/G1-Phase  
Für die G0/G1-Phase zeigen sich keine signifikanten Veränderungen. Dies gilt für ungeschädigte sowie geschädigte Zellen. Die erhaltenen Resultate entsprechen im Wesentlichen den Kontrollwerten.

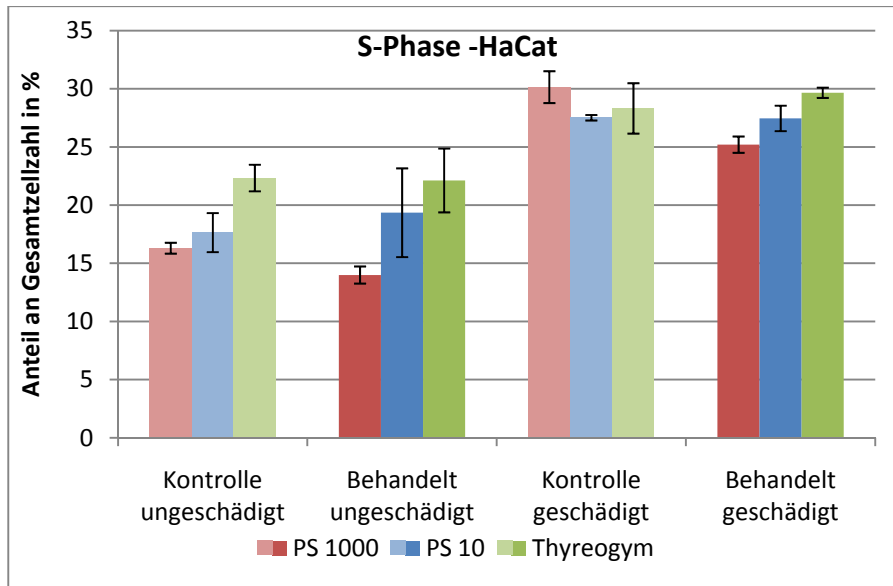


Abbildung 16: Prozentualer Anteil an Keratinozyten in der S-Phase

- S-Phase

Es zeigt sich eine Erhöhung der Zellzahl der ungeschädigten Zellen nach Behandlung mit dem PS10. Weiterhin lässt sich eine Abnahme der Zellzahl der geschädigten Zellen nach Behandlung mit dem Gerät PS1000 beobachten. Die restlichen Ergebnisse weisen keine signifikanten Veränderungen auf.

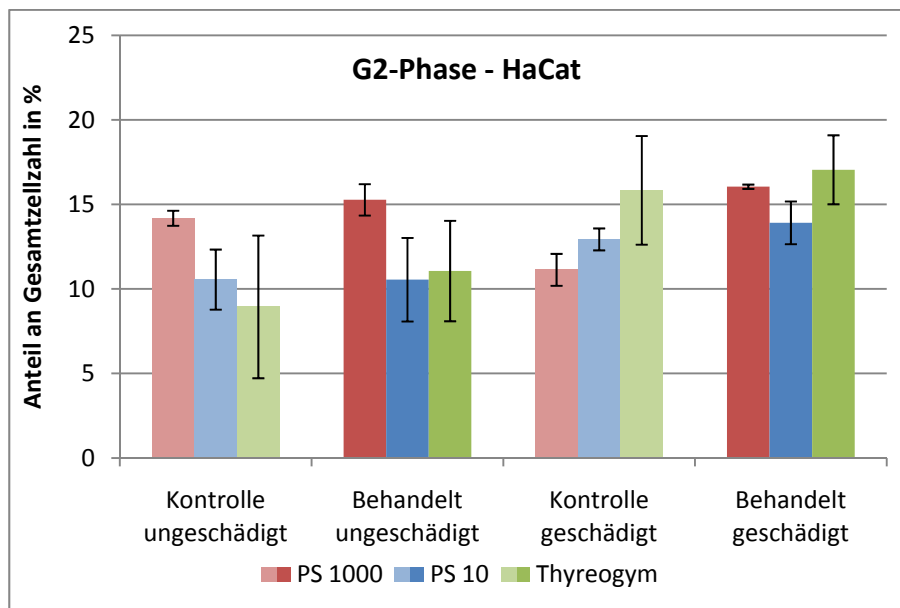


Abbildung 17: Prozentualer Anteil an Keratinozyten in der G2/M-Phase

- G2-/M-Phase

Es zeigt sich eine leichte Zunahme der G2/M-Phase bei der Behandlung mit dem Thyreogym bei ungeschädigten Zellen; ebenso bei den geschädigten mit PS1000 behandelten Zellen. Ein leichter Rückgang der G2/M-Phase ist bei ungeschädigten Zellen nach der Behandlung mit dem PS10 zu beobachten.

## 4. Diskussion

### 4.1 Auswahl/Eingrenzung Konzentrationsbereich

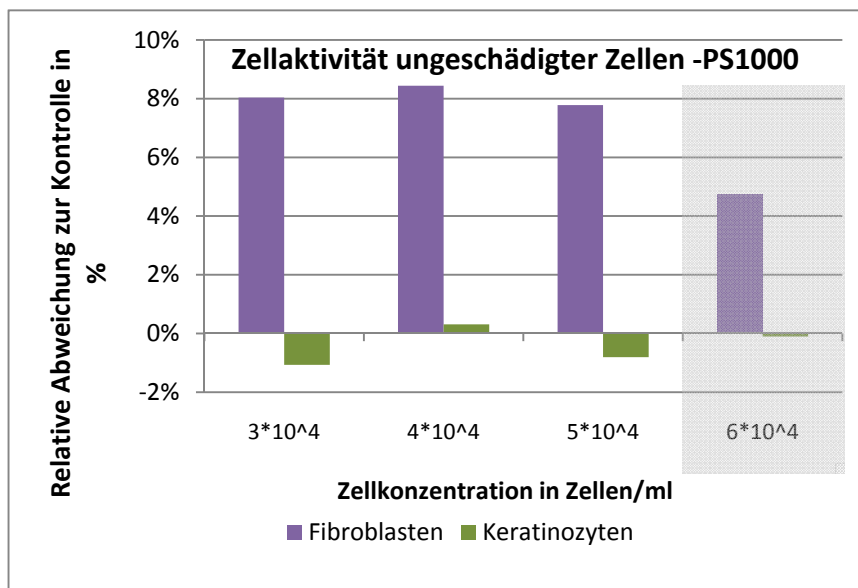


Abbildung 18: Zellaktivität als Funktion Zellkonzentration

Um eine optimale Zellreaktion hervorrufen zu können ist eine gewisse Mindestkonzentration an Zellen erforderlich. Darüber hinaus sollte die Dichte nicht so groß sein, dass sich Zellen gegenseitig im Wachstum und Reaktionsverhalten behindern.

Abbildung 18 gibt hierfür die Richtlinie. Es ist deutlich sichtbar, dass eine **sehr gute Aktivierung der FIBROBLASTEN** bis zu einer Konzentration von  $5 \cdot 10^4$  Zellen/ml möglich ist, wobei der größte Zuwachs bei kleineren Zellkonzentrationen erfolgt. Die KERATINOZYTEN zeigen hingegen eine leicht negative, nicht durchgängige Tendenz, d. h. für die Frequenzen der harmonisierenden Schwingungen gibt es noch Optimierungsbedarf, was die Aktivierung des Zellstoffwechsels der KERATINOZYTEN betrifft.

Als zweite Erkenntnis ist dem Versuch zu entnehmen, dass eine verhältnismäßig hohe Zellkonzentration (ab ca.  $6 \cdot 10^4$  Zellen/ml) für das gewählte Versuchsdesign ungünstig ist. Dies zeigt sich in einer fallenden Tendenz der Aktivität. Offenbar reicht der erforderliche Platzbedarf den Zellen benötigen nicht aus, um ihre volle Aktivität zu entfalten. Diese Erkenntnis wurde bei allen weiteren Untersuchungen berücksichtigt. Die eingesetzten Zellkonzentrationen waren stets  $\leq 5 \cdot 10^4$  Zellen/ml.

## 4.2 Vergleich der Rayonex-Gerätesysteme PS1000, PS10 und Thyreogym

### 4.2.1 Stoffwechselaktivität

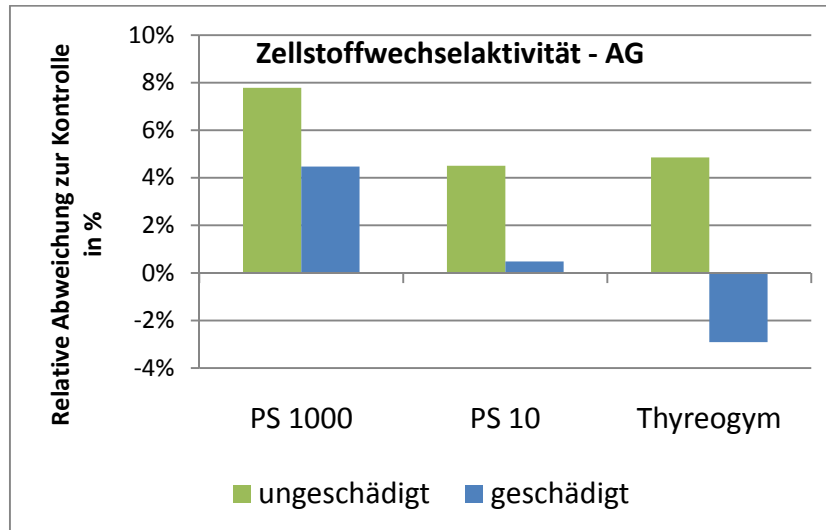


Abbildung 19: Relative Veränderung<sup>2</sup> der Zellstoffwechselaktivität der Fibroblasten mit und ohne Vorschädigung als Funktion der Behandlung mit den Gerätesystemen (Zellkonzentration  $5 \times 10^4$  Zellen/ml)

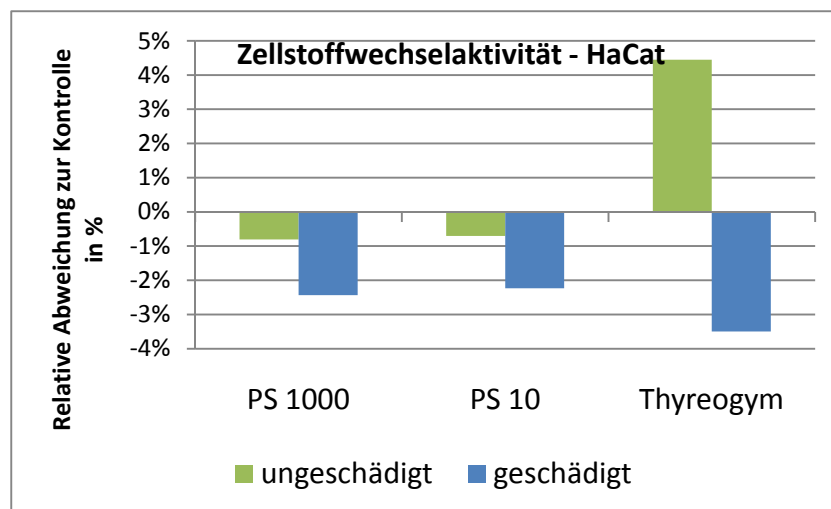


Abbildung 20: Relative Veränderung der Zellstoffwechselaktivität der Keratinozyten mit und ohne Vorschädigung als Funktion der Behandlung mit den Gerätesystemen (Zellkonzentration  $5 \times 10^4$  Zellen/ml)

### Thesen zur Diskussion der Stoffwechselaktivität:

1. **Alle Rayonex Gerätesysteme aktivieren** mit ihrer harmonisierenden Schwingung die Stoffwechselaktivität von **FIBROBLASTEN VON 4 % bis zu 8 %** (Abbildung 21). Sie wirken somit intensiv in den oberen Schichten der Haut, wobei sich die Fibroblasten (aus Bindegewebe) als geeigneter Indikator zur Messung der Anregung erwiesen haben.

<sup>2</sup> Die Berechnung der Abweichung ist prozentual bezogen auf die Werte der unbehandelten Kontrolle. Dies gilt für alle folgenden Darstellungen

Die etwas geringeren Werte des PS10 lassen sich darauf zurückführen, dass die Zellen einem größeren Stress durch das Versuchsdesign ausgesetzt waren<sup>3</sup>. Die längeren Behandlungszeiten (2 x 20 Minuten) wiegen den Stress durch das Verlassen des optimalen Lebensraumes nicht auf. Hier gilt es die Versuchsbedingungen zu optimieren. Umso höher sind die Ergebnisse mit dem PS 1000 Gerätesystem zu wichten, da hier mit wesentlich geringeren Behandlungszeiten (27 Minuten) im Prinzip der doppelte Effekt erzielt wurde.

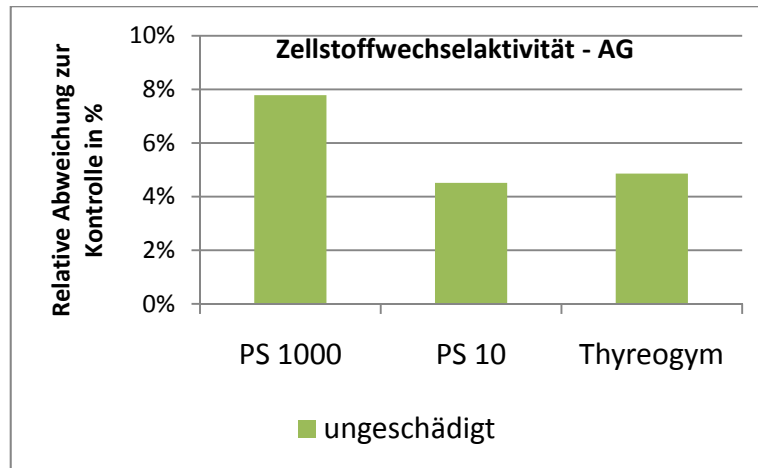


Abbildung 21: Relative Veränderung der Zellstoffwechselaktivität der Fibroblasten als Funktion der Behandlung mit den Rayonex-Gerätesystemen (Zellkonzentration  $5 \times 10^4$  Zellen/ml)

2. Signifikant messbar ist eine **erhöhte Stoffwechselaktivität der KERATINOZYTEN nur bei der Behandlung mit dem Thyreogym** (Abbildung 22). Keratinozyten sind Epithelzellen ähnlich denen in der Schilddrüse und ermöglichen einen korrelativen Schluss zur positiven Beeinflussung der Schilddrüsenfunktion. Die Zellstoffwechselaktivität nahm bis zu 4 % zu.

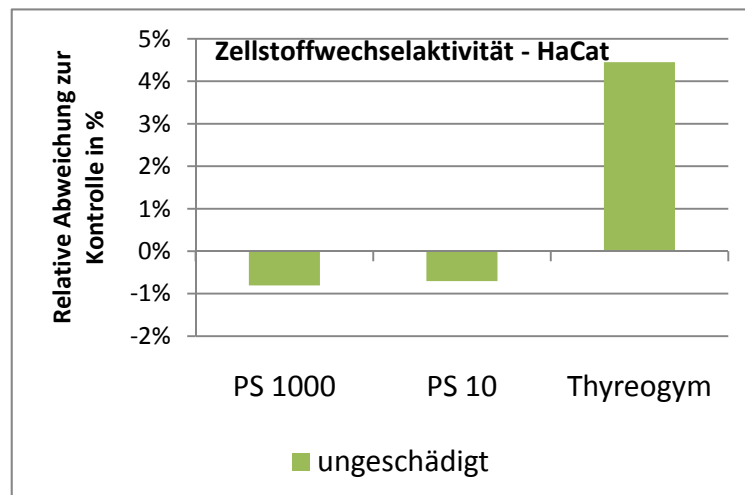


Abbildung 22: Relative Veränderung der Zellstoffwechselaktivität der Keratinozyten als Funktion der Behandlung mit den Rayonex-Gerätesystemen (Zellkonzentration  $5 \times 10^4$  Zellen/ml)

<sup>3</sup> zwei Mal 20 Minuten außerhalb der optimalen Bedingungen im Brutschrank

3. Das Erscheinungsbild bei vorgeschädigten FIBROBLASTEN UND KERATINOZYTEN ist differenziert (Abbildung 23). Nur das **PS1000** zeigt bei den AGs eine Übereinstimmung des positiven Effektes mit Stoffwechselsteigerungen bis zu 4 %.

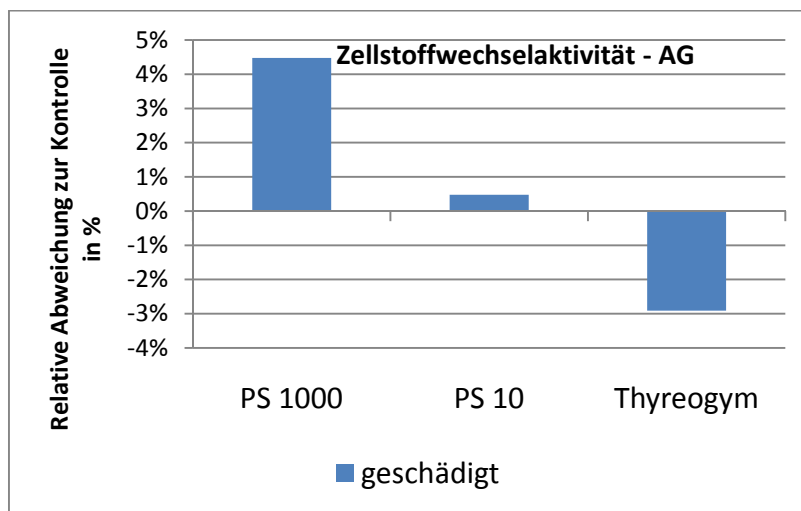
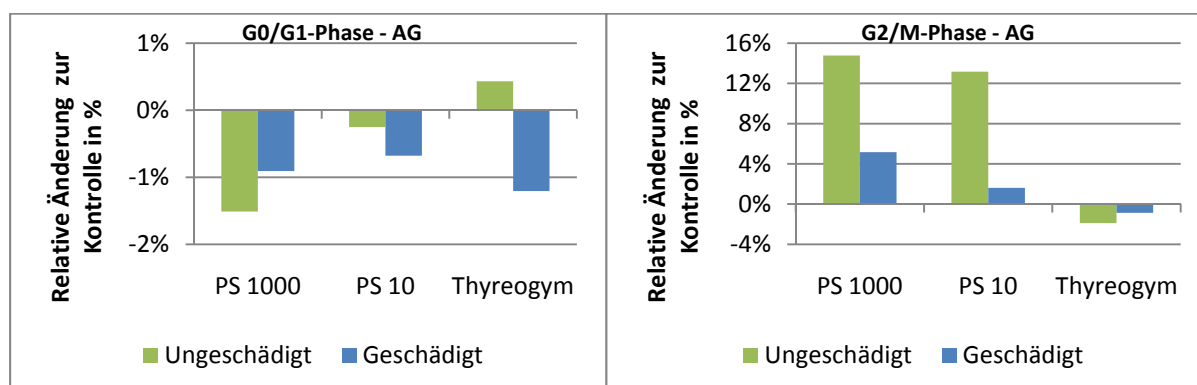


Abbildung 23: Relative Veränderung der Zellstoffwechselaktivität vorgeschädigter Fibroblasten als Funktion der Behandlung mit den Rayonex-Gerätesystemen (Zellkonzentration  $5 \times 10^4$  Zellen/ml)

Die Effekte des **PS10** Gerätesystems sind eher unspezifisch und auch das **Thyreogym** beeinflusst den Zellstoffwechsel nicht positiv (Abbildung 23).

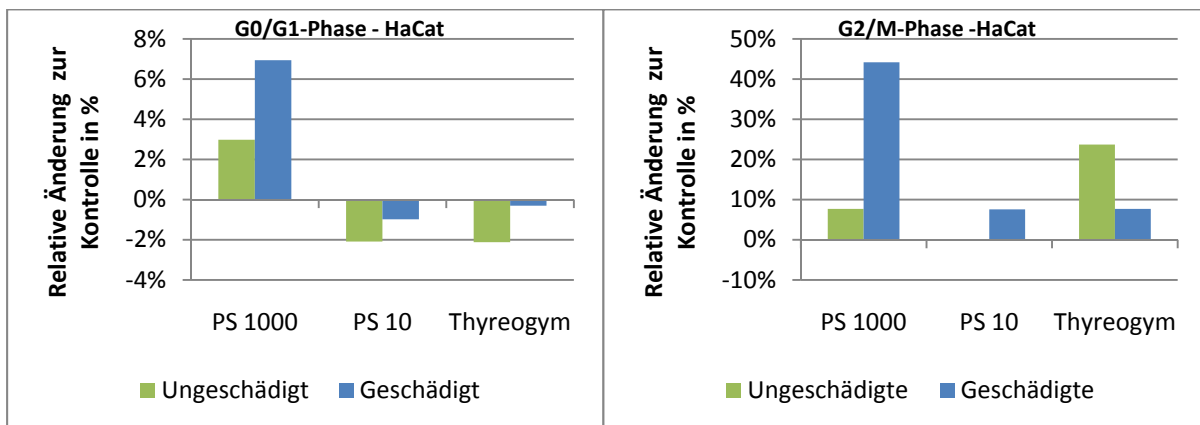
Gemessen wurde ebenfalls eine Abnahme der Zellstoffwechselaktivität für geschädigte KERATINOZYTEN. Es ist anzunehmen, dass die Frequenzen für eine Zellreparatur nicht unbedingt übereinstimmen mit denen der Aktivierung von gesunden Zellen. Hier weiß man ganz einfach noch zu wenig. Eine individuelle Einstellung der Frequenzen zur Anregung oder ein Frequenzverlauf könnte einen sogenannten „Mitzieheffekt“ bewirken und die Selbstheilung der Keratinozyten aktivieren. Da das Thyreogym eindeutig zeigt, dass KERATINOZYTEN prinzipiell positiv auf harmonisierende Schwingungen ansprechen, sollten in der gerätespezifischen Anpassung hinsichtlich Frequenzmodulation noch Reserven liegen.

#### 4.2.2 Zellzyklusphasen



Abbildungen 24 a/b: Zellzyklusphasen der ungeschädigten und geschädigten Fibroblasten; Zellkonzentration:  $5 \times 10^4$  Zellen/ml;





Abbildungen 25a/b: Zellzyklusphasen der ungeschädigten und geschädigten Keratinozyten; Zellkonzentration:  $5 \times 10^4$  Zellen/ml

### Thesen zur Diskussion der Zellteilungsaktivität:

4. **PS1000 und PS10** bewirken bei FIBROBLASTEN eine verhältnismäßig gleiche Verschiebung der Zellzahl von der G0/G1-Phase innerhalb des Zellzyklus hin zur G2/M-Phase, d. h. der Zellteilungsphase mit Werten zwischen 12 und 14 % (Abbildung 26/27).

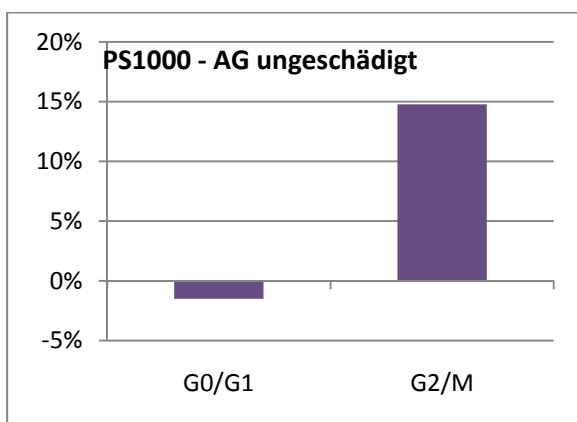


Abbildung 26: Zellzyklusphasen der Fibroblasten nach Behandlung mit dem PS1000; Zellkonzentration:  $5 \times 10^4$  Zellen/ml

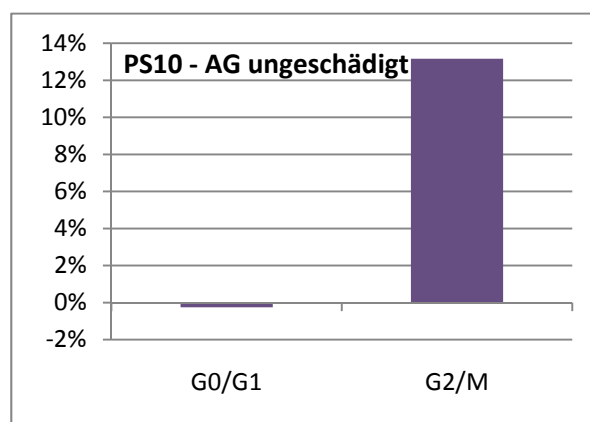


Abbildung 27: Zellzyklusphasen der Fibroblasten nach Behandlung mit dem PS10; Zellkonzentration:  $5 \times 10^4$  Zellen/ml

Die Effekte des **Thyreogym** (Abbildung 28) zeigen trotz 10.000 ausgezählter Zellen eher ein diffuses Erscheinungsbild, dessen Ursache noch zu klären ist. Obwohl die Zellstoffwechselaktivität (Abbildung 22) um 4 % gesteigert wurde, neigen die AGs bei der Analyse der Zellzyklusphasen eher zur Ergänzung noch fehlender Kompartimente (z. B. Zytoplasma, Zellorganellen). Neben DNA-Reparaturen, der Synthese von Replikationsenzymen und der mRNA, wird eher Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) produziert, wobei die Anzahl an Zellen in der G2-Phase zugunsten der G0/G1 abnimmt.

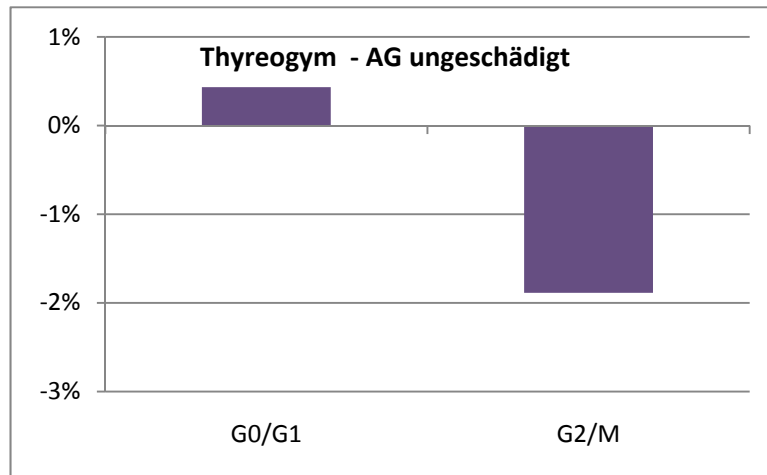


Abbildung 28: Zellzyklusphasen der Fibroblasten nach Behandlung mit dem Thyreogym; Zellkonzentration:  $5 \times 10^4$  Zellen/ml

5. Auf KERATINOZYTEN hingegen wirkt das Gerätesystem **Thyreogym** sehr gut (Abbildung 29). Der gesamte Zellzyklus wurde durch die harmonischen Schwingungen in Richtung aktive Zellteilung hin verschoben. Es erfolgte eine verhältnismäßig hohe Zunahme der Zellzahl in der G2/M-Phase - **Zellteilung mit bis zu 24 % mehr Zellen.**

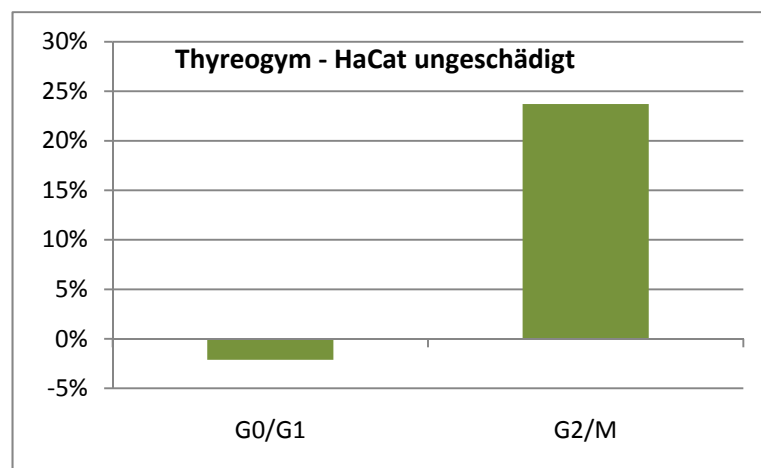


Abbildung 29: Zellzyklusphasen G0/G1 und G2/M der Keratinozyten nach Behandlung mit dem Thyreogym; Zellkonzentration:  $5 \times 10^4$  Zellen/ml

6. Für die Behandlung mit der Schwingungstherapie auf geschädigte FIBROBLASTEN zeigen sich ebenfalls leicht positive Tendenzen beim **PS1000 mit 5 % Steigerung und beim PS 10 mit 2% Steigerung in der G2-Phase** (Abbildung 30/31). Die Ergebnisse mit dem Thyreogym sind wie bei den ungeschädigten FIBROBLASTEN widersprüchlich.

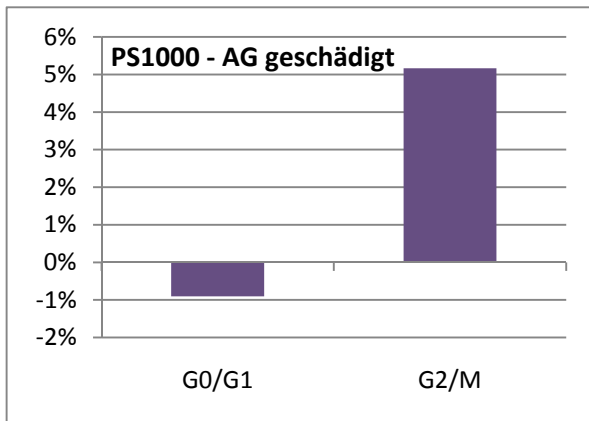


Abbildung 30: Zellzyklusphasen G0/G1 und G2/M der geschädigten Fibroblasten nach Behandlung mit dem PS1000;  $5 \times 10^4$  Zellen/ml

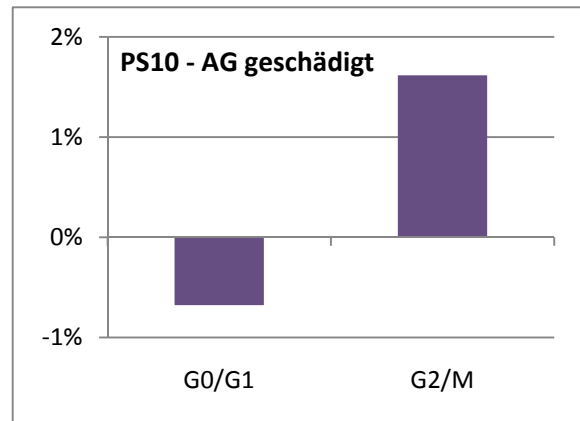


Abbildung 31: Zellzyklusphasen G0/G1 und G2/M der geschädigten Fibroblasten nach Behandlung mit dem PS10;  $5 \times 10^4$  Zellen/ml

7. Ausgesprochen interessant sind die Resultate zur Reparatur der KERATINOZYTEN: sowohl ungeschädigte als auch geschädigte Zellen zeigen signifikant hohe Aktivitäten in der Zellteilungsphase (Abbildung 32/33). Dies trifft insbesondere für das Thyreogym mit bis zu 22 % Steigerung an ungeschädigten Keratinozyten, als auch für das PS 1000 mit über 40 % Steigerung bei vorgeschädigten Keratinozyten zu (Abbildung 34).

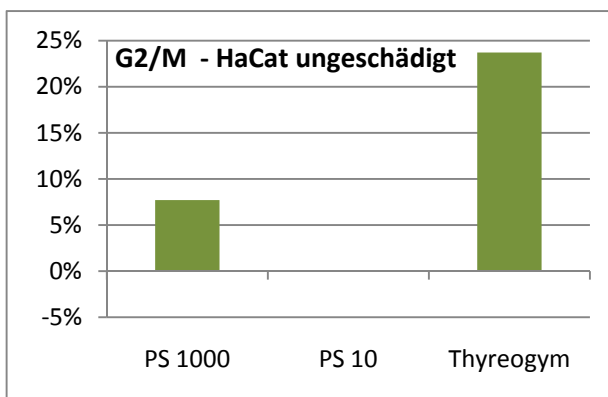


Abbildung 32: Zellzyklusphasen G2/M-Phase der ungeschädigten KERATINOZYTEN nach Behandlung mit den Rayonex-Gerätesystemen;  $5 \times 10^4$  Zellen/ml

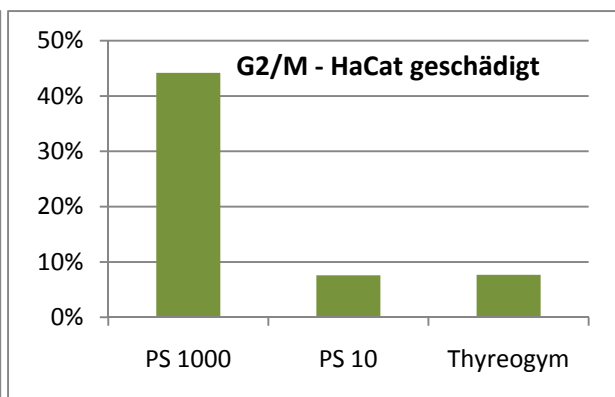


Abbildung 33: Zellzyklusphasen G2/M der geschädigten KERATINOZYTEN nach Behandlung mit den Rayonex-Gerätesystemen;  $5 \times 10^4$  Zellen/ml

Als sogenannte hornbildende Zellen sind KERATINOZYTEN in der Lage, eine regelrechte Hornschicht (Stratum corneum) zu bilden und damit als Barriere zu fungieren, die Fremdkörper und Keime abhält und vor Austrocknung schützt. Keratinozyten sind aktiv an der Immunantwort an Entzündungsprozessen und bei der Wundheilung beteiligt. Sie können eine Vielzahl von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und sogar Komplementfaktoren produzieren. Bei vielen chronisch entzündlichen Hauterkrankungen werden insbesondere TNF-alpha und IL-1, aber auch viele andere Interleukine und Chemokine freigesetzt. Eine Erhöhung des Zellstoffwechsels würde somit eine Reihe von ineinander greifende Verbesserungen nach sich ziehen.

## 5. Zusammenfassung/Ausblick

Das Ziel der Studie „Untersuchungen zur Wirkung von Gerätesystemen der RAYONEX Schwingungstechnik GmbH auf Zellkulturen“ waren systematische Untersuchungen bezüglich Revitalisierung und Reparatur nach Schädigung signifikanter Zelltypen in Kulturmedien unter statistischer Absicherung der Messdaten.

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.

Im Einzelnen konnte gezeigt werden, dass die Rayonex-Gerätesysteme bereits in dem gewählten *in vitro*-Zellkulturansatz aussagefähige Resultate liefern, die eindeutige Tendenzen zulassen.

- a. Alle Rayonex Gerätesysteme erhöhen mit ihrer harmonisierenden Schwingung die Stoffwechselaktivität von **FIBROBLASTEN** auf bis zu 8 %. Sie wirken somit intensiv in den oberen Schichten der Haut. PS1000 und PS10 bewirken bei FIBROBLASTEN verhältnismäßig gleiche Verschiebungen von der G0/G1-Phase hin zur G2/M-Phase, d. h. die Zellteilung wird aktiviert (ca. 10 %). Die Effekte des Thyreogym zeigen trotz 10.000 ausgezählten Zellen eher ein diffuses Erscheinungsbild mit noch zu klärender Ursache. Auch geschädigte FIBROBLASTEN können durch die Schwingungstherapie nicht wesentlich „geheilt“ werden.
- b. Im Gegensatz dazu ist mit dem Thyreogym eine erhöhte Stoffwechselaktivität der **KERATINOZYTEN** signifikant messbar. KERATINOZYTEN sind Epithelzellen ähnlich denen in der Schilddrüse und ermöglichen einen korrelativen Schluss zur positiven Beeinflussung der Schilddrüsenfunktion. Die Zellstoffwechselaktivität nahm bis zu 4 % zu. Der Zellzyklus wird ebenfalls aktiviert. Durch die harmonischen Schwingungen erfolgt eine intensive Zunahme der Zellzahl in der G2/M-Phase mit Werten bis zu 24 %.
- c. Ausgesprochen interessant sind die Resultate zur **Reparatur der KERATINOZYTEN**. Geschädigte Zellen zeigen signifikant hohe Aktivitäten in der Zellteilungsphase. Dies trifft insbesondere auf das Thyreogym mit bis zu 22 % Steigerung zu als auch für das PS 1000 mit sogar über 40 % Steigerung, währenddessen die Stoffwechselaktivitätsmessungen eher unspezifische Werte ergaben. Hier weiß man ganz einfach noch zu wenig. Eine individuelle Einstellung der Frequenzen zur Anregung oder ein Frequenzverlauf könnte einen sogenannten „Mitzieheffekt“ bewirken und die Selbstheilung der Keratinozyten aktivieren. Da die Ergebnisse des Thyreogym eindeutig zeigen, dass KERATINOZYTEN prinzipiell positiv auf harmonisierende Schwingungen ansprechen, sollten in der gerätespezifischen Anpassung hinsichtlich Frequenzmodulation noch Reserven liegen. Das Gleiche betrifft natürlich auch das Versuchsdesign.

Es hat sich gezeigt, dass sich die empfindliche Methode der Zellstoffwechselaktivität prinzipiell sehr gut eignet, um den Einfluss der harmonischen Schwingungen auf *in vitro*-Zellkulturen zu messen. Darüber hinaus geben die Untersuchungen des Zellzyklus signifikante Hinweise zur Wirkung der Gerätesysteme auf die Aktivierung der Zellteilung.

Es ist zu empfehlen, in einer weiteren Studie ein optimales Untersuchungskonzept zu erarbeiten. Insbesondere die Eignung der Frequenzen muss spezifisch auf die zu erzielenden Effekte abgestimmt werden.

Für die Anwendung der harmonischen Schwingungen hinsichtlich therapeutischer Applikationen sollten die Effekte noch wesentlich günstiger zu erwarten sein, da es bereits bei den basalen Zellen signifikant nachweisbare positive Veränderungen gibt.