Dartsch Scientific GmbH · Oskar-von-Miller-Str. 10 · D-86956 Schongau

Firma
Rayonex Biomedical GmbH
c/o Prof. Dietmar Heimes
Sauerland-Pyramiden 1

D-57368 Lennestadt

Oskar-von-Miller-Straße 10
D-86956 Schongau, Germany

Fon Diessen: +49 8807 2759-650
Fon Schongau: +49 8861 256-5250
Fax: +49 8861 256-7162
Email: info@dartsch-scientific.com
Web: www.dartsch-scientific.com

27. März 2014

– Testbericht und Fachinformation –

Mini-Rayonex

In vitro-Untersuchungen zur Stimulation der Wundheilung bei kultivierten Bindegewebsfibroblasten

Hintergrund & Fragestellung

Beim Wundheilungsprozess kann zwischen der Reinigungsphase (Exsudation und Resorption), der Granulationsphase (Proliferation und Festigung) und der Differenzierungsphase (Epithelialisierung und Narbenbildung) unterschieden werden. Speziell die Granulationsphase wird in dem hier verwendeten Testsystem simuliert. Diese Phase zeichnet sich durch das Auftreten von Zellwanderung und Zellproliferation zur Defektauffüllung aus. Vorherrschender Zelltyp sind hier Fibroblasten sowohl aus dem umgebenden als auch aus dem darunter liegenden intakten Gewebe.
Bei zahlreichen Anwendern weltweit hat der Mini-Rayonex seine Wertigkeit und Wirkung durch seine abgestrahlte positive Resonanz bisher unter Beweis stellen können. In dieser *in vitro*-Untersuchung sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Resonanz des Mini-Rayonex in der Lage ist, durch die bereits gezeigte Aktivierung des Zellstoffwechsels auch eine Förderung des Wundheilungsprozesses zu bewirken.

Versuchsdurchführung & Auswertung

Für die hier dargestellten *in vitro*-Untersuchungen zur Wundheilung wurden Bindegewebsfibroblasten der Maus verwendet. Diese werden auch für die Untersuchung der Biokompatibilität von Medizinprodukten nach EN ISO 10993-5 eingesetzt (Zelllinie L-929, ACC 173, Passage $P132_{intern}$). Die Zelllinie stammte vom Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38124 Braunschweig. Die Zellen wurden in einem CO2-Begasungsbrutschrank in einer Atmosphäre mit 100 % Luft-

feuchtigkeit bei 37 °C und 5 % CO_2 und 95 % Luft inkubiert. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 verwendet, das mit 5 % fötalem Rinderserum, 100 Units/ml Penicillin & 100 µg/ml Streptomycin supplementiert war. Alle Zellkulturreagenzien stammten von GE Healthcare Life Sciences, D-35091 Cölbe.

Die Bindegewebszellen wurden in einer Dichte von 50.000 Zellen/Vertiefung in 12-Loch-Platten ausgesät (2 ml Kulturmedium/Vertiefung) und für drei Tage bis zum Erreichen einer konfluenten Zellschicht im CO2-Brutschrank inkubiert. Dann wurde in einer Variation des Scratchtests mit einer Kunststoffspitze (Breite 1400 µm) der Zellrasen in jeder Vertiefung in Form eines kreuzförmigen Schnittes entfernt und so eine künstliche (= zellfreie) Wunde angelegt. Das Kulturmedium wurde abgesaugt, die Zellschicht einmal vorsichtig mit Phosphatpuffer mit Calcium und Magnesium gewaschen und danach 2 ml des frisch angesetzten pH-stabilen Expositionsmediums zugegeben. Dieses Medium bestand aus 1 Teil RPMI 1640, 1 Teil Phosphatpuffer mit Kalzium und Magnesium und 5 mM Glukose, 5 % fötalem Rinderserum, 100 Units/ml Penicillin & 100 µg/ml Streptomycin und 15 mM HEPES-Puffer.

Die Kulturplatten wurden wegen der relativ langen Inkubationszeit mit Klebeband abgedichtet, so dass keine Verdunstung des Mediums möglich war. Die Kulturplatten wurden dann in spezielle temperaturkonstante externe Inkubatoren überführt, welche zur Vermeidung einer ungewollten Beeinflussung durch die Resonanzen des Mini-Rayonex mehr als 3 m voneinander getrennt in zwei verschiedenen Räumen aufgestellt waren. Diese externen Inkubatoren lieferten über die gesamte Expositionszeit eine Temperaturkonstanz von 37,2 °C ± 0,2 °C. Im Inkubator mit den Kontrollzellen wurden die Kulturplatten einfach auf dem Boden des Inkubators übereinander aufgestellt. Bei den Zellen, die der Resonanz des Mini-Rayonex ausgesetzt wurden, wurden die Geräte zunächst für 30 Sekunden in lauwarmes fließendes Wasser gehalten, abgetrocknet und danach im Inkubator “West – Ost” und mit der Schrift nach oben und nach vorne ausgerichtet. Die Kulturplatten wurden sowohl unterhalb dem Mini-Rayonex als auch direkt auf dem Mini-Rayonex plaziert.

An den Wundrändern kommt es durch die Verletzung der intakten Zellschicht zu einer Stimulation von Zellteilung und Zellwanderung und so zu einer Besiedlung des zellfreien Raumes unter Schließung der Wunde. Nach drei Tagen wurden die Zellen fixiert und nach Romanowski-Giemsa gefärbt. Dabei wird das Zytoplasma blauviolett und der Zellkern der Zellen rotviolett gefärbt. Die Breite der noch verbliebenen Wunde wurde nun in jeder Vertiefung an zwei verschiedenen Stellen anhand von Mikrofotografien bestimmt.

Die Auswertung erfolgte zunächst in tabellarischer Form und zur Veranschaulichung auch graphisch in der Auftragung der Wundbreite. Dargestellt wurde jeweils der Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.). Als statistisch signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurde ein p-Wert ≤ 0,01 im Student’s *t*-Test angesehen.

dartschSCIENTIFIC
INSTITUT FÜR ZELLBIOLOGISCHE TESTSYSTEME

Ergebnisse und Schlussfolgerungen

Wie in Abbildung 1 dargestellt, wanderten und proliferierten die Bindegewebszellen während der dreitägigen Inkubation in den zellfreien Raum der künstlichen Wunde. In den unbehandelten Kontrollen wurde die Wunde etwa zur Hälfte geschlossen (von 1.400 µm auf ca. 700 µm; Abbildung 2). Die Resonanzen des Mini-Rayonex-Gerätes stimulierten den Wundheilungsprozess bei den Kulturen, die sowohl oberhalb als auch unterhalb des Gerätes für die Dauer der dreitägigen Inkubation plaziert waren. Infolgedessen war in diesen Fällen die Wundbreite mit 490 resp. 549 µm deutlich geringer als für die unbehandelte Kontrolle (Abbildung 2). Berechnet man die prozentuale Stimulation, so erhält man eine annähernd 20 %ige Stimulation durch die Einwirkung des Mini-Rayonex. Diese Stimulation war statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrolle ($p \leq 0{,}01$; Student's *t*-Test). Ein signifikanter Unterschied zwischen der Plazierung der Kulturplatten oberhalb und unterhalb des Gerätes konnte nicht festgestellt werden.

Zusammengefasst konnten in den hier durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen die schon von Anwendern beobachtenden stimulierenden Wirkeffekte des Mini-Rayonex bei der Wundheilung bestätigt werden. Bemerkenswert ist dabei das Ausmaß der Stimulation um etwa 20 %. Somit kann die Anwendung des Mini-Rayonex in bestimmten Lebenssituationen wie beispielweise zur Beschleunigung von Wundheilungsprozessen bestens empfohlen werden.

Versuchsleiter und verantwortlich für die Richtigkeit der dargestellten Testverfahren und Ergebnisse.

Schongau, 27. März 2014

CELL-BIOLOGICALLY TESTED PRODUCT
dartsch SCIENTIFIC
2014
PRODUKT ZELLBIOLOGISCH GEPRÜFT

Prof. Dr. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemiker

dartschSCIENTIFIC
INSTITUT FÜR ZELLBIOLOGISCHE TESTSYSTEME

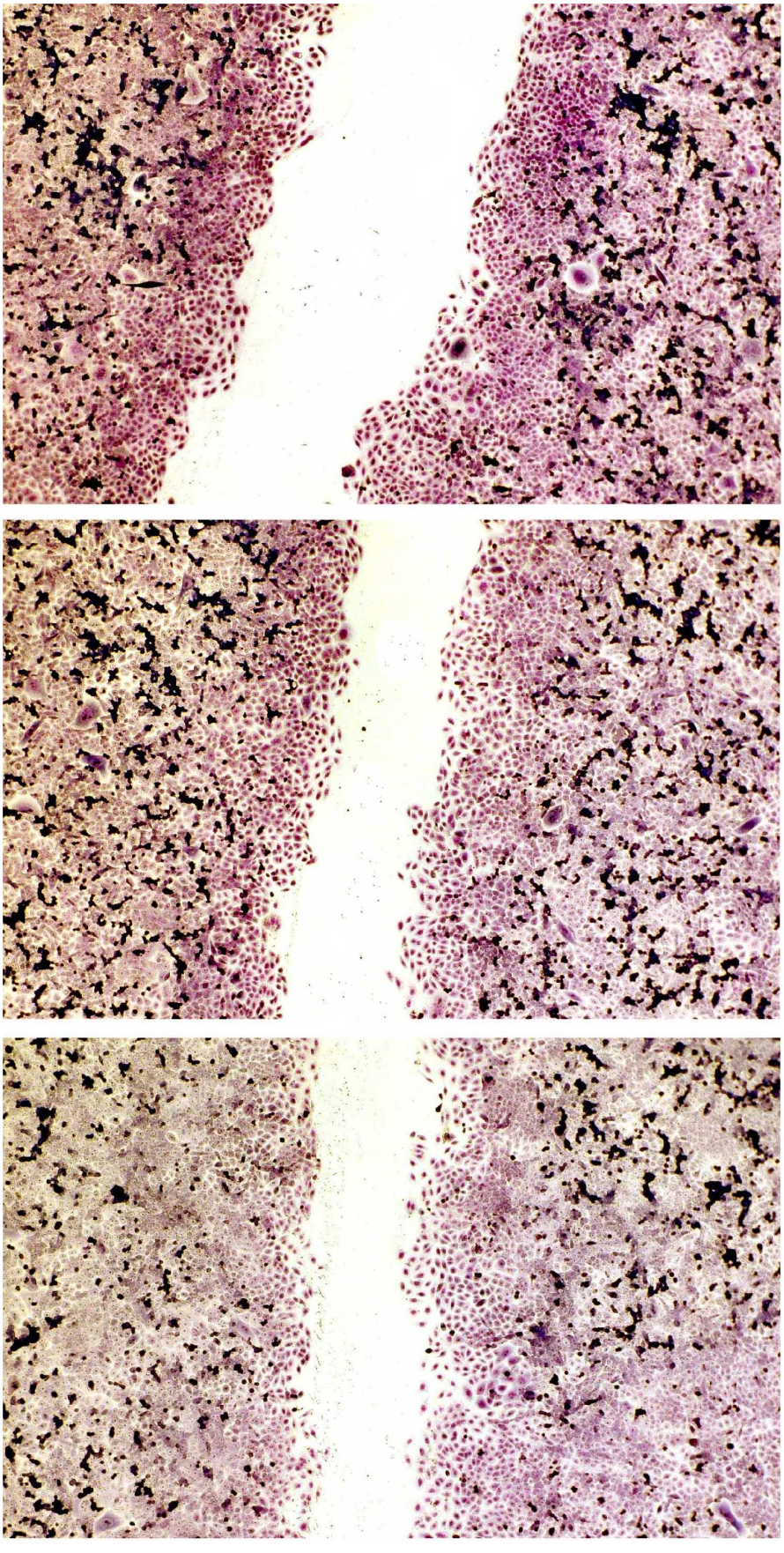

Abbildung 1: Mikrofotografien der gefärbten Zellkulturen im Hellfeld-Verfahren nach 3 Tagen. Die zellfreie Zone, in welche die Zellen einwandern und proliferieren konnten, ist in allen drei Aufnahmen gut erkennbar. Allerdings ist die Breite der Wunde in den unteren beiden Aufnahmen sichtbar geringer. Sehr schön erkennbar ist auch der aufgelockerte Wundrand, welcher wegen der vielen eingewanderten Zellen rötlicher erscheint als die viel dichter gepackten und zudem mit extrazellulärer Matrix überzogenen konfluenten Zellschichten am Rand.
Oberes Bild: Unbehandelte Kontrolle.
Mittleres Bild: Wundheilung oberhalb des Mini-Rayonex-Gerätes.
Unteres Bild: Wundheilung unterhalb des Mini-Rayonex-Gerätes.
Die Aufnahmen wurden nur beispielhaft herausgesucht und dienen der Veranschaulichung.

Dartsch Scientific GmbH
Oskar-von-Miller-Straße 10
D-86956 Schongau, Germany

Geschäftsführer:
Prof. Dr. rer. nat. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemiker

Amtsgericht München HRB 169719
Steuer-Nr. 119/124/10155
USt-IdNr. DE 222586342

dartschSCIENTIFIC
INSTITUT FÜR ZELLBIOLOGISCHE TESTSYSTEME

Probe	Wundbreite nach 3 Tagen (Einzelwerte in µm)				Mittelwert (n = 3)	S.E.M. (n = 3)
Unbehandelte Kontrolle	591	682	819	573	697	71
	591	727	764	682		
	545	672	736	986		
Oberhalb vom Mini-Rayonex	709	682	467	610	490	83
	473	564	362	228		
	482	364	364	571		
Unterhalb vom Mini-Rayonex	410	500	672	546	532	57
	400	510	474	624		
	476	541	506	729		

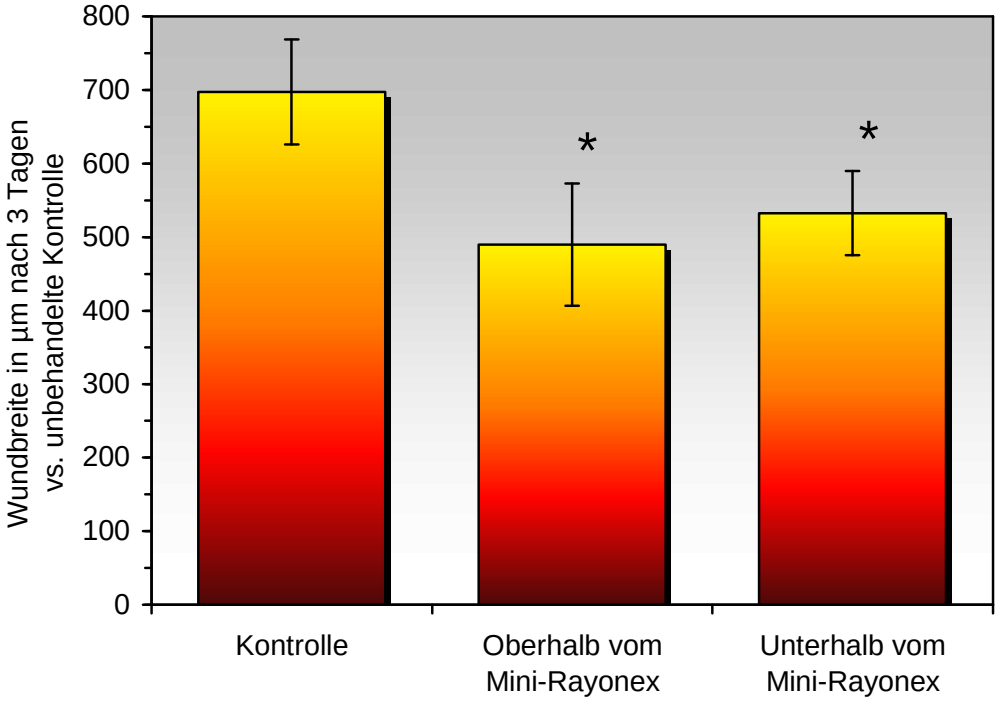

Abbildung 2: Darstellung der Messergebnisse zur Wundheilung in tabellarischer und graphischer Form. Die Daten zeigen die Ergebnisse nach 3 Tagen kontinuierlicher Inkubation der unbehandelten Kontrollen im Vergleich zu den Kulturplatten, die oberhalb und unterhalb des Mini-Rayonex-Gerätes aufgestellt waren. Angegeben ist der Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.). Eine statistisch signifikante Förderung des Wundheilungsheilungsprozesses (= geringere Wundbreite) wurde in der graphischen Darstellung mit einem Stern markiert ($p \leq 0{,}01$; Student's *t*-Test).