

Dartsch Scientific GmbH · Auf der Voßhardt 25 · D-49419 Wagenfeld

GEONADO GmbH

Amseltalweg 26

A-6336 Langkampfen, Österreich

Auf der Voßhardt 25
D-49419 Wagenfeld, Germany

Fon: +49 5444 980 1322

Mobil: +49 151 2272 1294

Email: info@dartsch-scientific.com

Web: www.dartsch-scientific.com

1. Juli 2020

TESTBERICHT

Untersuchungen zu den Wirkeffekten des „e.chi ImmunFreund“ unter Verwendung organspezifischer Zellkulturen

1 Hintergrund und Fragestellung

Neutrophile sind bei den meisten Säugetieren die am häufigsten vorkommende Art von Granulozyten, also einem bestimmten Typ von weißen Blutkörperchen. Sie spielen eine doppelte Rolle als Phagozyten und als proinflammatorische Zellen [1]. Indem sie im zirkulierenden Blut schwimmen, bilden sie die erste Linie der zellulären Abwehr gegen eindringende mikrobielle Krankheitserreger als wesentlichen Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Zusätzlich wandern bei Entzündungen die Neutrophilen aus dem Blut ins Gewebe ein [2,3].

Neutrophile greifen mikrobielle Krankheitserreger an, indem sie einen sogenannten oxidativen Burst produzieren, d.h. reaktive Sauerstoffradikale zum Abtöten der Krankheitserreger bilden [4].

Vor diesem Hintergrund untersuchten wir die Wirkung eines neuartigen Immunchips namens „e.chi ImmunFreund“ auf die Wachstumseigenschaften und den oxidativen Burst kultivierter Promyelozyten des Menschen, die in entsprechenden Kulturen mit und ohne Immunchip-Exposition zu funktionalen Neutrophilen differenziert wurden.

1. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80:617-653.
2. Ward PA (1999). The acute inflammatory response and its regulation. *Arch Surg* 134:666-669.
3. Nathan C (2002). Points of control in inflammation. *Nature* 420:846-852.
4. Lambeth JD. 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Rev Immunol* 4:181-189.

2 Beschreibung des Immunchips

Laut Informationen des Herstellers, wird der „e.chi ImmunFreund“ grundsätzlich von Frequenzspektren beeinflusst, die von speziellen Frequenzgeneratoren erzeugt werden. Mit der sogenannten Vitalfeldtechnologie werden über spezielle Antennen elektromagnetische Felder (bis 120 GHz), Mikrostromfrequenzen (bis 1 GHz) und unterschiedliche Magnetfelder erzeugt. Der Chip wird auf diesen Antennen platziert und für einen bestimmten Zeitraum den spezifischen Frequenzen ausgesetzt. Aufgrund seiner Speichereigenschaften kann der Chip diese Informationen aufzeichnen und über mehrere Monate hinweg freigeben. Im Fall des Immunchips wurden die gespeicherten Frequenzen spezifischer Immunzellen verwendet und der Chip wurde diesem Muster ausgesetzt, um das gewünschte Ergebnis zu erzielen. Dieser patentierte Informationsspeicher wird nach jahrelanger Entwicklungsarbeit nach einem speziellen Verfahren hergestellt. Ein genau definierter Anteil hochwertiger Speichermedien wird in eine besonders hautfreundliche Silikonbasis gegossen. Dies ermöglicht es, die Wirkung dieser Frequenzspektren so lange wie möglich zu erhalten. Die Erfahrung mit den tatsächlichen Daten zeigt, dass der Chip mindestens 6 Monate lang voll wirksam bleibt und anschließend ausgetauscht werden sollte.

3 Experimentelles Design (Kurzfassung)

Die Untersuchungen wurden mit Promyelozyten vom Menschen (Zelllinie HL-60; DSMZ, Braunschweig) durchgeführt. Die Zellen wurden als Suspensionskulturen in einer Nährlösung in einem Brutschrank bei 37 °C und einer speziellen Atmosphäre bei nahezu 100%iger Luftfeuchtigkeit kultiviert. Durch Zugabe von 1,5 % Dimethylsulfoxid für 6 Tage wurden sie mit und ohne Einwirkung des Immunchips zu funktionalen Neutrophilen differenziert. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation und mehrmaliges Waschen aufbereitet und zu einem Reaktionsgemisch gegeben, welches nach Zugabe einer speziellen chemischen Substanz einen oxidativen Burst bei den Zellen auslöst [5,6]. Die Reaktion der Zellen wurde durch Farbveränderung des Reaktionsgemisches gemessen.

Zusätzlich wurden mit einem Zellanalyse-System die erreichten Zellzahlen und die Zellgrößenverteilung als Maß für die Homogenität der Zellpopulation bestimmt. Es wurden insgesamt 5 unabhängige Experimente über einen Versuchszeitraum von 4 Wochen durchgeführt.

5. Tan AS, Berridge MV. 2000. Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt WST-1 to produce a soluble formazan: a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents. *J Immunol Meth* 238:59-68.
6. Dartsch PC. 2006. TIOS – a sensitive and cell-based test assay for the screening of biologically active substances for their antioxidant potential. *Innov Food Technol* 32:72-75.

4 Ergebnisse

Bei allen durchgeführten Experimenten wurden die nach der Differenzierung erreichten Zellzahlen durch den Immunchip im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen um $17,2 \pm 3,8$ % erhöht (Mittelwert \pm Standardabweichung). Dieser Anstieg war statistisch signifikant ($p \leq 0,05$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test). Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Immunchip eine beschleunigte mitotische Teilungsaktivität dieser Zellen bewirkt.

Zusätzlich wurde in allen Experimenten auch der maximale Zelldurchmesser von $9,5 \pm 0,2$ um auf $10,4 \pm 0,3$ um ((Mittelwert \pm Standardabweichung) erhöht. Dies entspricht einer relativen Zunahme von $9,5 \pm 0,2$ % und ist auch statistisch signifikant ($p \leq 0,05$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test). Die Zellgrößenverteilung und Verschiebung des maximalen Zelldurchmessers ist in Abbildung 1 für ein einzelnes Experiment dargestellt.

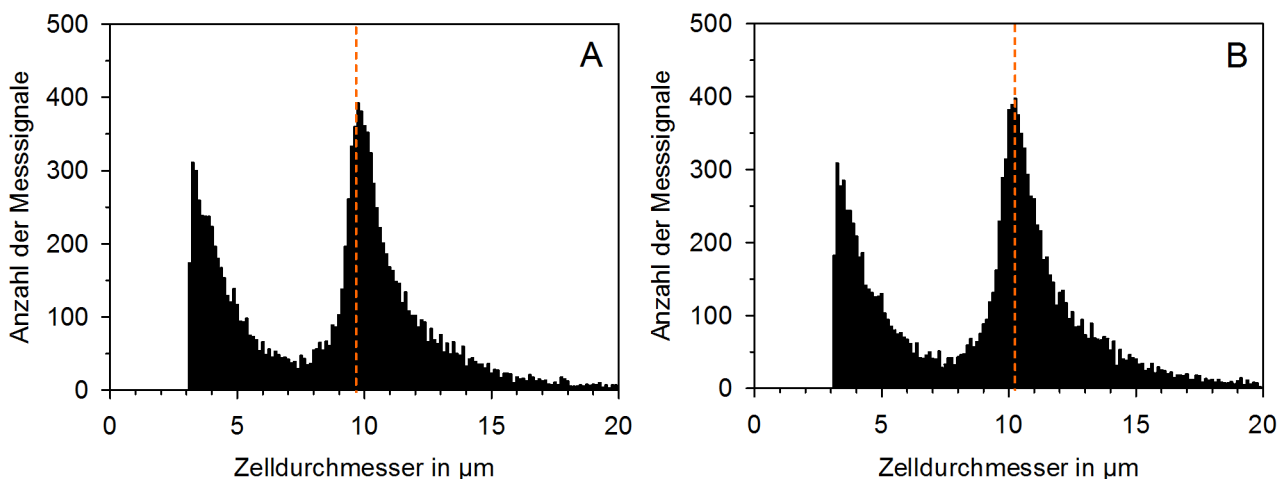


Abb. 1: Beispiel für die Zellgrößenverteilung der differenzierten Zellen ohne Immunchip (A) und mit Immunchip (B) während der 6tägigen Differenzierung zu funktionalen Neutrophilen. Die gestrichelte Linie markiert jeweils den maximalen Zelldurchmesser für diesen Versuch. Die Zellpopulation weist in beiden Fällen eine sehr homogene Größenverteilung auf. Der linke Peak repräsentiert kleine Partikel (z.B. Zelltrümmer, abgestorbene Zellen) und geht nicht in die Messung ein.

Wie in Abbildung 2A dargestellt, führte die Verwendung des Immunchips in allen 5 unabhängigen Experimenten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen zu einem erhöhten Zellstoffwechsel der funktionalen Neutrophilen. Insgesamt betrug der Anstieg des basalen Zellstoffwechsels $23,0 \pm 5,5$ % (Mittelwert \pm Standardabweichung), was statistisch signifikant war ($p \leq 0,05$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test). In Übereinstimmung mit dem erhöhten Zellstoffwechsel, der durch die Exposition mit dem Immunchip verursacht wurde, verlief die erhöhte Produktion von Superoxidanion-Radikalen der exponierten Zellen um $21,3 \pm 6,2$ % (Mittelwert \pm Standardabweichung; $p \leq 0,05$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; Abbildung 2B), Diese lag in der gleichen Größenordnung wie der Anstieg des Zellstoffwechsels.

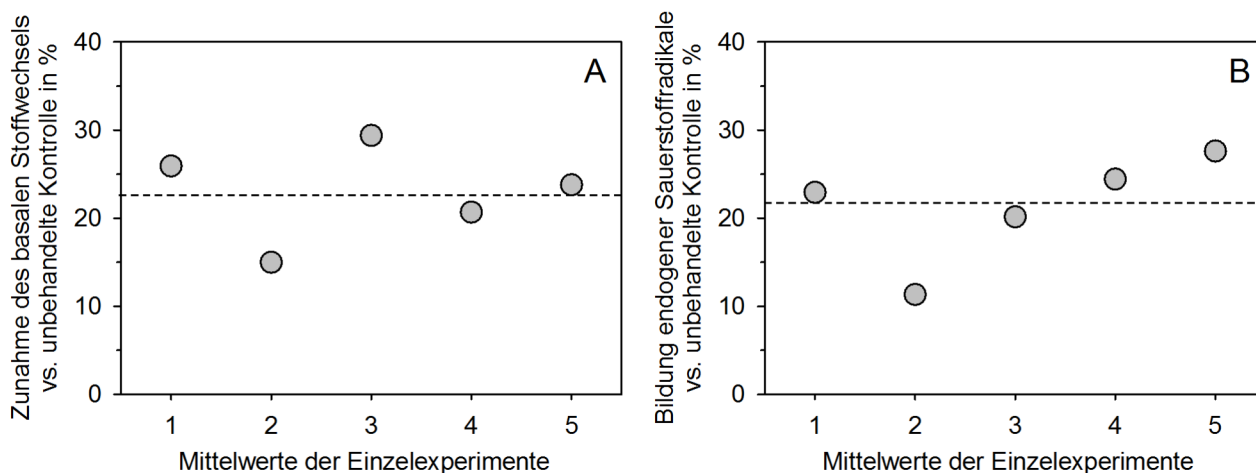


Abb. 2: (A) Erhöhter Zellstoffwechsel von funktionalen Neutrophilen nach 6tägiger Exposition mit dem Immunchip während des Differenzierungsprozesses. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte jedes unabhängigen Experiments (n = 5). Die gestrichelte Linie gibt die mittlere Zunahme für alle Experimente an. (B) Verstärkte Produktion von Superoxidanion-Radikalen durch funktionale Neutrophile nach 6tägiger Exposition mit dem Immunchip während des Differenzierungsprozesses. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte jedes unabhängigen Experiments (n = 5). Die gestrichelte Linie gibt die mittlere Zunahme für alle Experimente an. In beiden Diagrammen sind die unbehandelten Kontrollen als 0 % gesetzt.

5 Schlussfolgerungen

Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass der “e.chi ImmunFreund” bei mehrtägiger kontinuierlicher Anwendung in der Lage ist, bei Zellen, welche zu funktionalen Neutrophilen (= phagozytierende Zellen der angeborenen Immunabwehr) differenziert werden, sowohl die mitotische Teilungsaktivität als auch die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen zum Abtöten mikrobieller Krankheitserreger zu stimulieren. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Verwendung des “e.chi ImmunFreund” eine verbesserte Abwehr gegen mikrobielle Krankheitserreger auch im Gesamtorganismus bewirken kann.




Prof. Dr. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemiker