

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

24. Dezember 2019

TESTBERICHT

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

1 Hintergrund und Fragestellung

Entsprechend der Homepage der GEONADO GmbH, Österreich, gibt der durch biophysikalische Methoden dauerhaft positiv informierte „e.chi Energie Chip“ diese Schwingungen an den Organismus weiter und stärkt so das Immunsystem und den körpereigenen Schutz. Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um mit *in vitro*-Testsystemen unter Verwendung organspezifischer Zellkulturen die Wirkeffekte des Chips zu untersuchen. Die hier verwendeten Tests wurden bereits vielfach in internationalen wissenschaftlichen Journalen mit peer-review Verfahren (= vorab von Experten begutachtet) veröffentlicht und sind in der wissenschaftlichen Welt anerkannt.

2 Voruntersuchungen mit anonymisierten Chips

Zu Beginn der Untersuchungen wurden zwei anonymisierte Chips an uns geschickt, um die Wirkung in Voruntersuchungen einander gegenüber zu stellen. Einer der beiden Chips war dabei informiert worden und der andere trug keine Informationen. Alle Voruntersuchungen zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Chips. Es stellte sich nach Rückfrage bei GEONADO heraus, dass der informierte Chip im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und dem Chip ohne Informationen derjenige mit der erheblich besseren Wirkeffizienz war. Daher fiel auch die Entscheidung, den „e.chi Energie Chip“ im Detail weiter zu untersuchen.

Bereits in den Voruntersuchungen zeigte sich, dass die Kurzzeitexperimente mit einer Dauer von nur wenigen Stunden keine signifikanten Wirkungen des informierten Chips bewirkten. Erst nach mindestens 12 bis 24 Stunden kontinuierlicher Expositionszeit erhielten wir eindeutige Ergebnisse. Diese Tatsache wurde in den nachfolgend dargestellten Untersuchungen entsprechend berücksichtigt.

3 Untersuchungen mit Bindegewebsfibroblasten

Die erste Serie der hier dargestellten Untersuchungen wurde mit Bindegewebsfibroblasten der Zelllinie L-929 (ACC-2; Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) durchgeführt. Die Zellen wurden in den Passagen 80 bis 88 verwendet und routinemäßig in RPMI 1640 mit 10 % Wachstumsgemisch und 0,5 % Gentamycin in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre aus 5 % CO₂ und 95 % Luft kultiviert.

3.1 Basaler Energiestoffwechsel

Für die Versuche wurden die Zellen aus Massenkulturen in einer Zelldichte von 20.000 Zellen/Vertiefung in 96-Loch Kulturplatten (200 µl Kulturmedium/Vertiefung) ausgesät und für 24 Stunden bis zur vollständigen Adhäsion der Zellen sowie einem normalen Zellstoffwechsel inkubiert. Danach wurden die Zellkulturen für weitere 24 Stunden mit und ohne den Energiechip in direktem Kontakt zur Zellkulturplatte inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellkulturplatten in mehrere Lagen Aluminiumfolie gewickelt, um gegenseitige unerwünschte Beeinflussungen zu vermeiden. Das Kulturmedium wurde dann abgesaugt und durch ein Reaktionsgemisch aus Phosphatpuffer mit Calcium und Magnesium, 5 mM Glucose als Energiequelle und dem Tetrazoliumfarbstoff WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim) ersetzt. Dabei ist die Farbstoffspaltung der Aktivität des zellulären Energiestoffwechsels direkt proportional, d.h. je höher der Energiestoffwechsel, desto stärker wird der Farbstoff gespalten und umso stärker ist die Veränderung seiner Farbe. Zur Auswertung wurde die optische Dichte (= Farbe) des Reaktionsgemisches als Differenzmessung $\Delta OD = 450 - 690$ nm zu verschiedenen Zeitpunkten nach 80, 140 und 240 min am Elisareader (BioTek SLx808 mit Software Gen 5 Version 3.00) aufgezeichnet, mit Microsoft Excel im Vergleich zum Ausgangszeitpunkt $t = 0$ min ausgewertet und anschließend graphisch aufgetragen.

Wie in Abb. 1 dargestellt, bewirkte die 24stündige Exposition der Zellen mit dem "e.chi Energie Chip" eine signifikante Zunahme des Energiestoffwechsels um 12.6 ± 4.0 % (Mittelwert \pm Standardabweichung) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei 3 parallel durchgeführten Experimenten ($p < 0.05$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test).

3.2 Zellvitalität/Zellproliferation in "dünnen" Massenkulturen

Zellen wurden aus subkonfluenten Massenkulturen in einer Dichte von 200.000 Zellen/Flasche (Wachstumsfläche 75 cm²) ausgesät und für 24 Stunden inkubiert, um eine Zelladhäsion und einen normalen Zellstoffwechsel zu erreichen. Danach wurden die Zellkulturen für weitere 6 Tage mit und ohne den Energiechip in direktem Kontakt zum Kulturflaschenboden und in mehrere Lagen Aluminiumfolie verpackt, inkubiert. Das Kulturmedium wurde während der gesamten Inkubationszeit nicht ausgetauscht.

Nach 6 Tagen wurden zunächst zur Dokumentation Mikroaufnahmen der mit Zellen besetzten Wachstumsfläche aufgenommen, danach die Zellen durch Trypsin/EDTA-Behand-

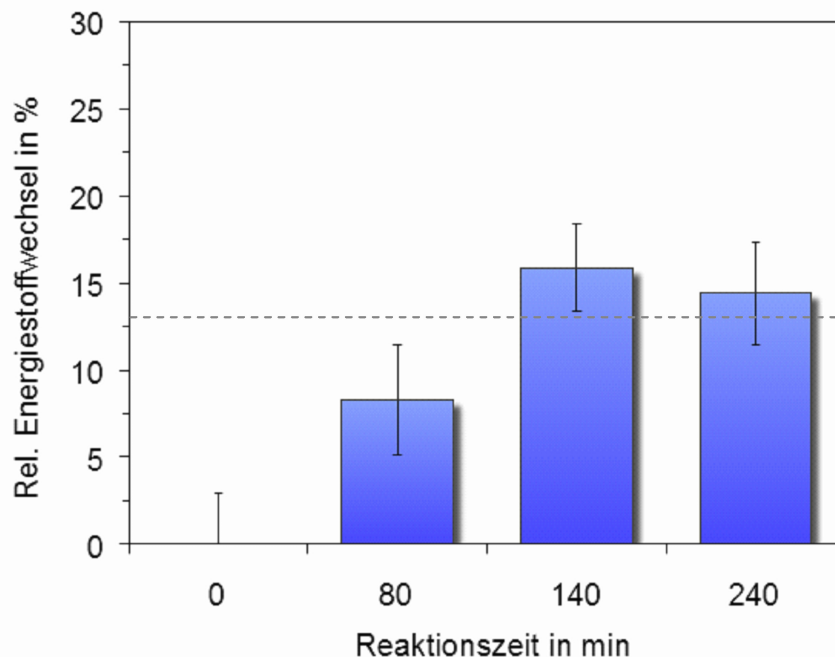


Abb. 1: Wirkung des “e.chi Energie Chip” auf den Energiestoffwechsel von kultivierten Bindegewebsfibroblasten nach einer 24stündigen Exposition der Zellen mit dem Chip nach den verschiedenen Reaktionszeiten bei der enzymatischen Messung. Die unbehandelte Kontrolle ist gleich “0” gesetzt. Die gestrichelte Linie zeigt die mittlere Stimulation um $12,6 \pm 4,0$ %. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 Parallelexperimenten.

lung abgelöst (30 Minuten bei 37 °C) und Zellzahl und Zellgrößenverteilung mit einem CASY Zellzähl- und Analysiergerät (OLS-OMNI Life Science, Bremen, Deutschland) bestimmt. Das Gerät quantifiziert Zellen und Partikel, welche durch eine 150 μm -Messkapillare mit einem angelegten elektrischen Feld durchgesaugt werden. Basierend auf der Größe und der daraus resultierenden Leitfähigkeitsänderung wird ein Signal generiert und aufgezeichnet.

Wie in Abb. 2 gezeigt, war die besiedelte Wachstumsfläche der Kulturflaschen viel größer bei den Zellen, die für 6 Tage mit dem Energiechip in Kontakt waren als bei den unbehandelten Zellen. Die unbehandelten Kontrollzellen wiesen zahlreiche zellfreie Räume auf, während die Chip-behandelten Zellen konfluent waren, d.h. die Zellen lagen dicht an dicht über die gesamte Kulturfläche. Die Zellzahlbestimmung bestätigte dieses Bild. Die Flaschen mit den unbehandelten Zellen wiesen eine Zahl von $8,3 \pm 1,5 \times 10^6$ Zellen/Flasche auf (Mittelwert \pm Standardabweichung), während die mit dem Chip-behandelten Zellzahlen bei $13,0 \pm 1,8 \times 10^6$ Zellen/Flasche lag (Mittelwert \pm Standardabweichung). Statistisch gesehen war somit die erreichte Zahl bei den Chip-behandelten Zellen signifikant um $56,6 \pm 15,6$ % höher ($p < 0,05$, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test). Der “e.chi Energie Chip” hatte keine Auswirkung auf die mittlere Zellgröße, bewirkte jedoch eine deutlich schärfere Gauß-Verteilung (Abb. 3).

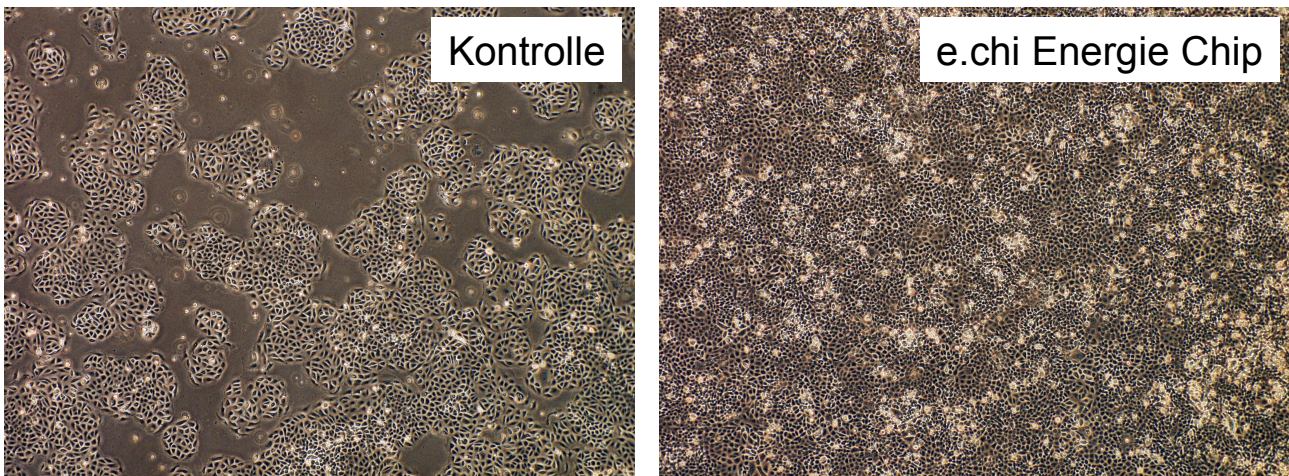


Abb. 2: Mikroaufnahmen, welche die unterschiedliche Oberflächenbesiedlung nach 6 Tagen zwischen der unbehandelten Kontrolle (links) und der Zellkultur mit dem Energiechip (rechts) zeigt. Olympus IX-50 Inversmikroskop mit Olympus Planachromat 10x und einer Olympus E-10 Digitalkamera bei einer Auflösung von 4 Megapixeln im Phasenkontrast.

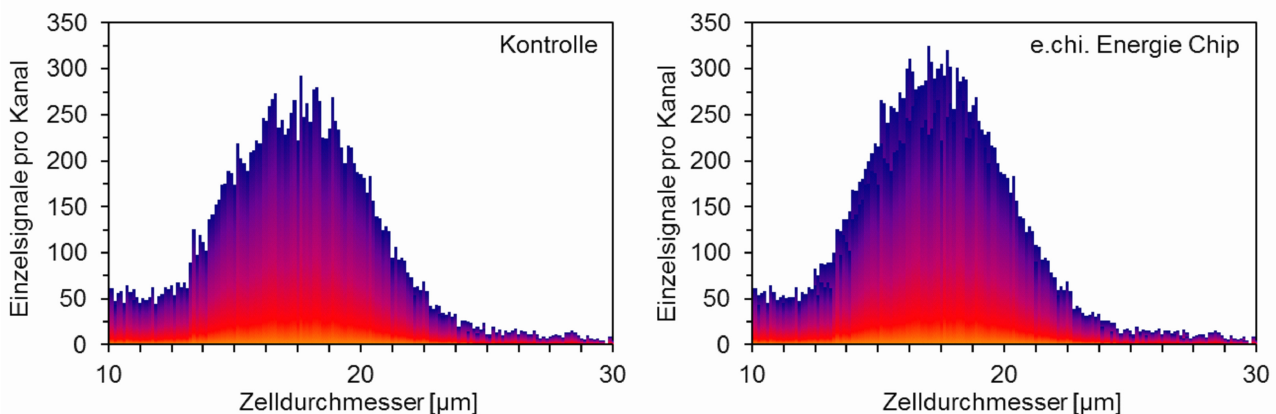


Abb. 3: Zellgrößenverteilung und Zellzahl der unbehandelten Kontrolle (links) und der Zellkultur mit dem Energiechip (rechts) nach 6 Tagen. Die Bestimmung erfolgte mit dem CASY Zellzähl- und Analysiergerät.

3.3. Zellregeneration/Wundheilung

Eine Verbesserung des Zellstoffwechsels von Bindegewebszellen ist in der Regel mit einer Förderung der Zellregeneration/Wundheilung gekoppelt. Dieser Prozess zeichnet sich u.a. 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.

Um zu untersuchen, ob der Energiechip ebenfalls die Zellregeneration/Wundheilung fördern kann, wurden die Zellen in einer Dichte von 50.000 Zellen/ml in die drei einzelnen Kompartimente von sog. Culture-Insert 3 Wells aus Silikon (ibidi, München) ausgesät. Die

Kompartimente der Inserts werden durch einen 500 µm dicken Silikonsteg voneinander getrennt und sind nach außen durch einen 700 µm dicken Silikonrahmen begrenzt. Durch den speziellen Adhäsionsbereich haftet ein Insert fest auf dem Boden einer Kulturschale und bildet so später einen definierten zellfreien Bereich.

Die in die Kompartimente ausgesäten Bindegewebsfibroblasten wurden für 24 Stunden bis zum Erreichen eines dichten Zellrasens mit und ohne “e.chi Energie Chip” kultiviert und danach die Silikonrähmchen entfernt. Die Zellen begannen in den zellfreien Raum einzuwandern und sich dort zu teilen. Nach weiteren 20 Stunden mit und ohne den Energiechip wurden die Zellen mit Methanol fixiert und mit Giemsa Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung (Merck, Darmstadt) gefärbt und der noch verbliebene zellfreie Raum ausgemessen.

Die unbehandelten Kulturen wiesen nach den 20 Stunden noch einen deutlich erkennbaren zellfreien Raum/künstliche Wunde auf, während dieser bei den mit dem Energiechip behandelten Kulturen nahezu geschlossen war (Abb. 4). Die Breite dieses verbliebenen zellfreien Raumes betrug $28,5 \pm 8,7 \mu\text{m}$ für die behandelten Kulturen und $80,0 \pm 7,7 \mu\text{m}$ für die unbehandelten Kulturen (Mittelwert \pm Standardabweichung bei 3 Parallelexperimenten). Dieser Unterschied für beide Testreihen war statistisch signifikant ($p < 0.05$, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test) und dokumentiert die Förderung der Zellregeneration durch die Verwendung des “e.chi Energie Chip”.

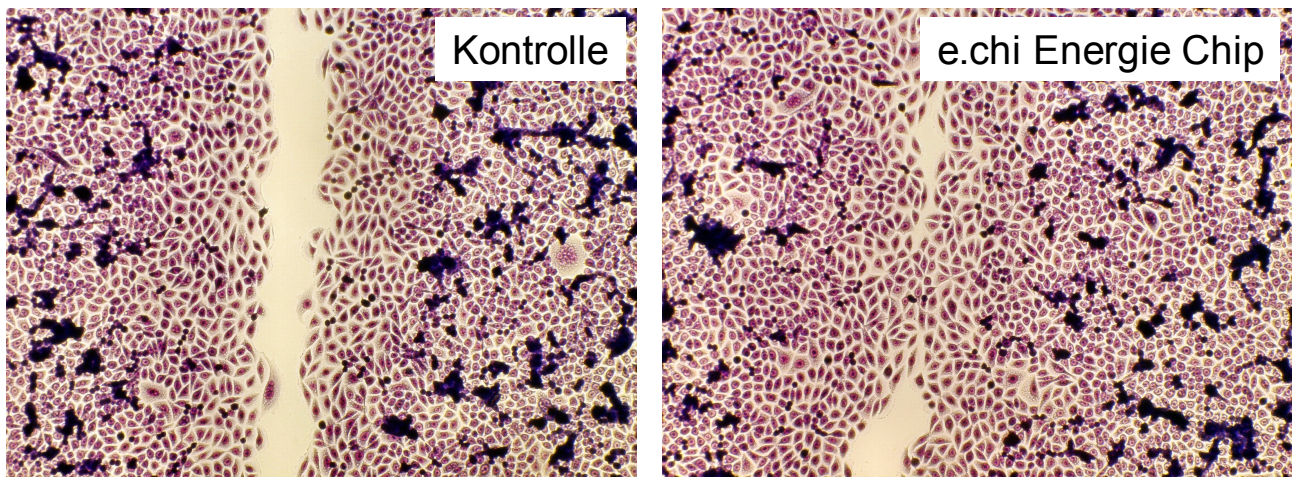


Abb. 4: Repräsentative Mikroaufnahmen der gefärbten Zellkulturen, welche die Regeneration und den Wundverschluss der unbehandelten Kontrolle (links) sowie die mit dem Energiechip behandelten Kultur (rechts) zeigen. Es ist gut erkennbar, dass beim Energiechip der zellfreie Raum nahezu geschlossen ist, während er bei der unbehandelten Kultur noch deutlich sichtbar ist. Olympus IX-50 Inversmikroskop mit Olympus Planachromat 10x und einer Olympus E-10 Digitalkamera mit 4 Megapixel Auflösung im Hellfeld.

4 Untersuchungen mit funktionalen Neutrophilen

Die zweite Untersuchungsserie wurde mit Promyelozyten des Menschen durchgeführt (Zelllinie HL-60; ACC-3; ECACC 98070106; Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig). Die Zellen wurden routinemäßig als Massenkulturen in Suspension in RPMI 1640-Kulturmedium mit 10 % Wachstumszusatz und 0,5 % Gentamycin kultiviert und in einem Inkubator bei 37 °C und einer feuchten Atmosphäre von 5 % CO₂ und 95 % Luft inkubiert. Durch 5 bis 7tägige Kultivierung mit 1,5 % Dimethylsulfoxid wurden die HL-60-Zellen zu funktionalen Neutrophilen differenziert, die dann die typischen Eigenschaften von Fresszellen (= Phagozyten) besitzen und durch einen oxidativen Burst mikrobielle Pathogene (= Krankheitserreger) abtöten. Eine Aktivierung der funktionellen Neutrophilen kann *in vivo* zu einer erhöhten Abwehr im Blut gegen eingedrungene Fremdkeime führen.

Die Massenkulturen der HL-60-Zellen wurden während der letzten zwei Tage der Differenzierung mit und ohne "e.chi Energie Chip" kultiviert. Nach mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten zur Gewinnung einer Suspension mit hoher Zelldichte wurde der Energiestoffwechsel durch die Spaltung des Tetrazolium-Farbstoffes aufgezeichnet wie bereits für den basalen Energiestoffwechsel der Bindegewebsfibroblasten beschrieben. Da die HL-60-Zellen jedoch deutlich stoffwechselaktiver sind als die adhärennten Fibroblasten, war die maximale Reaktionszeit nicht Stunden, sondern nur 30 Minuten.

Die Testergebnisse zeigten eine ausgeprägte Aktivierung der mit dem Chip behandelten Zellen um $38,0 \pm 4,8$ % (Mittelwert \pm Standardabweichung bei 4 Parallelexperimenten) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Diese Aktivierung war statistisch signifikant ($p < 0.05$, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test) und repräsentiert eine erhöhte Abwehr im Blut gegen eingedrungene Fremdkeime.

5 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Unter Verwendung verschiedener *in vitro*-Tests mit kultivierten organspezifischen Zellen wurden die Wirkeffekte des "e.chi Energie Chip" der Firma GEONADO GmbH, Österreich, untersucht. Die hier verwendeten Testverfahren sind bereits vielfach in der internationalen wissenschaftlichen Literatur dargestellt und akzeptiert worden. Kurzzeit-Experimente mit einer Reaktionszeit von nur wenigen Stunden ergaben keine entscheidenden Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Chip-behandelten Zellen. Erst nach mindestens 12 bis 24 Stunden konnten eindeutige Ergebnisse mit dem Chip-behandelten Zellen erzielt werden.

Im Detail hatte der "e.chi Energie Chip" in den hier durchgeführten Untersuchungen die nachfolgend erwähnten Eigenschaften:

- 1 24stündige Behandlung von Bindegewebsfibroblasten mit dem "e.chi Energie Chip" bewirkte eine Aktivierung des Energiestoffwechsels um $12,6 \pm 4,0$ % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

- 2 Dünn ausgesäte Massenkulturen der Bindegewebsfibroblasten hatten unter dem Einfluss des Energiechips nach 6 Tagen eine deutlich höhere Zellzahl als die unbehandelten Kontrollen. Die Zunahme betrug $56,6 \pm 15,6$ %.
- 3 Im Test zur Zellregeneration/Wundheilung mit Bindegewebsfibroblasten hatten die mit dem Chip behandelten Zellen nach 20 Stunden nur noch eine Wundrandbreite von $28,5 \pm 8,7$ μm ; diese war bei den Kontrollzellen noch $80,0 \pm 7,7$ μm breit.
- 4 Die Inkubation von funktionalen Neutrophilen für die letzten 48 Stunden des Differenzierungsprozesses mit dem "e.chi Energie Chip" bewirkte eine signifikante Aktivierung des Zellstoffwechsels um $38,0 \pm 4,8$ % im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Dieses Ergebnis dokumentiert die Verbesserung der primären Abwehr im Blut gegenüber eingedrungenen Fremdkeimen (= mikrobielle Pathogene).

Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass der "e.chi Energie Chip" wie ein Energie-Booster auf zellulärer Ebene wirkt und zur Reduzierung der körperlichen Regenerationszeit, zur Verbesserung der Zellvitalität sowie zum Erhalt des allgemeinen Wohlbefindens erheblich beitragen kann.



Prof. Dr. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemiker