

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

Firma
Symbioceuticals-Harmonizer GmbH
Gangsteig 2

A-5082 Grödig

Auf der Voßhardt 25
D-49419 Wagenfeld, Germany

Fon: +49 5444 980 1322
Fax: +49 5444 980 1332
Mobil: +49 151 2272 1294

Email: info@dartsch-scientific.com
Web: www.dartsch-scientific.com

10. Juli 2016

TESTBERICHT

Reaktionen kultivierter Bindegewebsfibroblasten und immunkompetenter Zellen auf die Exposition mit dem Symbioceuticals Harmonizer Comfort

1 Fragestellung der vorliegenden Untersuchung

In der vorliegenden experimentellen Studie sollte untersucht werden, ob die Anwendung eines Symbioceuticals Harmonizer Comfort der Firma Symbioceuticals-Harmonizer GmbH aus A-5082 Grödig, Österreich, zu nachweisbaren (förderlichen) Wirkeffekten bei kultivierten Zellen führt.

2 Experimentelles Design & Versuchsdurchführung

Grundlage für vergleichende Zelltests waren die Räumlichkeiten der Dartsch Scientific GmbH in D-86956 Schongau und D-49419 Wagenfeld, welche im Rahmen früherer Strahlen-/Standorts-Forschungsprojekte hinsichtlich ihrer nieder-/hochfrequenten Strahlungsart sowie möglicher geopathischer Störfelder überprüft worden waren und als geeignete und unbeeinflusste Standorte für die vorliegenden Untersuchungen anzusehen sind.

2.1 Wirkung auf die Zellvitalität von Bindegewebsfibroblasten

Es wurde ein standardisiertes Setup verwendet, welches bereits bei früheren Untersuchungen entwickelt worden war. Hierfür wurden Bindegewebsfibroblasten (Zelllinie L-929; Leibniz-Institut - Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) aus 80 bis 90 % konfluenten Massenkulturen in einer Dichte von 50.000 Zellen/Vertiefung in 8 zentrale Vertiefungen einer 96-Loch-Kulturplatte ausgesät (200 µl Kulturmedium/Vertiefung) und in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C und einer Begasung von 95 % Luft und 5 % CO₂ für 24 Stunden zum Absetzen und Ausbreiten der adhärent wachsenden Zellen inkubiert. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 mit 5 % fötalem Kälberserum und den üblichen Mengen an Penicillin/Streptomycin verwendet.

Danach wurden die Kulturplatten mit den Zellen für 24/48 Stunden (Vorversuch) bzw. 72 Stunden (Hauptversuche) mit dem Symbioceuticals Harmonizer Comfort inkubiert. Die Anordnung des Harmonizers war entweder senkrecht (Vorversuch) oder parallel zur Zellebene (Hauptversuche). Als Kontrolle dienten gleich angesetzte Kulturplatten ohne Harmonizer. Nach der entsprechenden Expositionszeit wurde das Kulturmedium über den Zellen abgesaugt und durch 110 µl frisches Kulturmedium und 10 µl XTT ersetzt und für 120 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. XTT ist das Natriumsalz von 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilid und hat eine gelbliche Farbe. Mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen spalten den Tetrazoliumring von XTT und es entstehen orange gefärbte und wasserlösliche Formazankristalle, deren optischen Dichte man bei einer definierten Wellenlänge messen kann [1, 2]. Nach der Inkubationszeit von 120 min wurde die optische Dichte als Differenzmessung $\Delta OD = 450 - 690$ nm in einem Elisa-reader (BioTek Slx808) nach einer 4 Sekunden-Schüttelperiode gemessen. Die erhaltenen Werte wurden aufgezeichnet und statistisch mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ausgewertet. Die Hauptversuche wurden in zwei unabhängigen Versuchsreihen mit jeweils fünf-facher paralleler Ausführung durchgeführt (n = 5).

- 1 Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, and Glasebrook AL (1991). An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Meth* 142: 257-265.
- 2 Brosin A, Wolf V, Mattheus A, and Heise H (1997). Use of XTT-assay to assess the cytotoxicity of different surfactants and metal salts in human keratinocytes (HaCaT). A feasible method for in vitro testing of skin irritants. *Acta Dermato-venereologica* 77:26-28.

2.2 Wirkung auf die Stoffwechselaktivität von Zellen der unspezifischen Abwehr

Humane promyelozytische Leukämiezellen (Zelllinie HL60; Leibniz-Institut - Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) wurden in Suspensionskulturen durch die Zugabe von 1,25 % Dimethylsulfoxid zu funktionalen Neutrophilen differenziert [3, 4]. Damit erhalten sie die Eigenschaften von Zellen, die im Organismus als polymorphonukleäre Leukozyten (PMN) im Blut die erste unspezifische Abwehr gegen Infektionen durch die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale und Phagozytose darstellen [5, 6]. Der Differenzierungsprozess dauert in vitro in der Regel 6 Tage und wurde speziell für diesen Versuchsansatz in 200 µl pro Vertiefung in 96-Loch-Kulturplatten durchgeführt. Davon wurden die letzten 3 Tage unter dem Einfluss des Symbioceuticals Harmonizer Comfort parallel zur Zellebene inkubiert. Als Kontrolle dienten gleich angesetzte Suspensionskulturen ohne Harmonizer. Danach wurden jeweils 20 µl XTT (siehe oben) pro Vertiefung zugegeben, für weitere 120 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert und die optische Dichte als Differenzmessung $\Delta OD = 450 - 690$ nm in einem Elisareader (BioTek Slx808) nach einer 4 Sekunden-Schüttelperiode gemessen. Die erhaltenen Werte wurden aufgezeichnet und statistisch mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ausgewertet. Die Versuche wurden in 3 unabhängigen Versuchsreihen mit jeweils 4 Parallelversuchen durchgeführt.

- 3 Breitman TR, Selonick SE, Collins SJ (1980). Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. Proc Natl Acad Sci USA 77: 2936-2940.
- 4 Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, Gallo RC (1978). Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. Proc Natl Acad Sci USA 75:2458-2462.
- 5 Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, Gallo RC (1979). Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide. J Exp Med 149:969-974.
- 6 Newberger P, Chovaniec M, Greenberger J, Cohen H (1979). Functional changes in human leukemic cell line HL-60. A model for myeloid differentiation. J Cell Biol 82:315-322.

2.3 Wirkung auf die Zellregeneration und Wundheilung

Da durch eine Aktivierung des Zellstoffwechsels und verbesserte Zellvitalität auch eine beschleunigte Zellteilungsrate (mitotische Aktivität) und/oder Zellwanderung die Folge sein kann, ist die Untersuchung der Zellregeneration resp. Wundheilung nach Verletzung mit und ohne Harmonizer Comfort sinnvoll.

Zu diesem Zweck wurden die Bindegewebsfibroblasten L-929 in einer Dichte von 500.000 Zellen in die Vertiefungen einer 12-Loch-Kulturplatte ausgesät. Vorher war in die Vertiefungen ein Zellkultureinsatz aus Silikon für eine definierte Lücke in der Zellschicht (Culture insert 2-Well; ibidi, München) eingesetzt worden. Dieser Einsatz wurde jedoch so verwendet, dass die Lücke nicht die üblichen 500 µm für einen 24stündigen Test, sondern eine Lücke von 8.400 µm für einen dreitägigen Test ergab.

Sobald die Zellschicht der ausgesäten Fibroblasten konfluent war, wurde der Zellkultureinsatz entfernt und so ein zellfreier Raum (Lücke) erhalten. Nach drei Tagen wurden die Zellen mit Methanol p.A. fixiert (2 min bei Raumtemperatur) und danach mit Coomassie-Lösung angefärbt. Die Größe des Wundrandes wurde an jeweils 4 Stellen ausgemessen und statistisch mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ausgewertet. Die Versuche wurden in dreifacher unabhängiger Ausführung durchgeführt (n = 3).

3 Versuchsergebnisse

Nachfolgend die Ergebnisse für die bis Juli 2016 durchgeführten Untersuchungen im Überblick.

- In den Vorversuchen stellte sich heraus, dass der Symbioceuticals Harmonizer Comfort eine Einwirkungszeit von mindestens 2 Tagen benötigte, um positive zelluläre Effekte zu erzielen. Diese „Einschwingzeit“ ist offenbar für eine Harmonisierung notwendig. Alle Vorversuche mit einer kürzeren Dauer zeigten keine Wirkung.
- In den Vorversuchen ergab sich ebenfalls, dass der Harmonizer nur dann eine Wirkung auf die Zellen erzielte, wenn er parallel zur Zellschicht angeordnet war.

- Die positive Wirkung des Symbioceuticals Harmonizer Comfort zeigte sich bei den Untersuchungen zur Vitalität der Bindegewebsfibroblasten mit einer statistisch signifikanten Steigerung um ca. 25 % im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,01$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; Tabelle 1).
- Die Untersuchungen mit funktionalen Neutrophilen zeigten ebenfalls eine deutliche Stoffwechselaktivierung dieser Zellen nach Harmonizer-Einwirkung gegenüber den Kontrollen. Diese Aktivierung lag bei ca. 21 % im Vergleich zu den Kontrollzellen und war statistisch signifikant ($p < 0,01$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; Tabelle 2).
- Als Folge der Vitalitätssteigerung bei Bindegewebsfibroblasten war auch die Zellregeneration bzw. Wundheilung durch Neubesiedlung eines zellfreien Areals deutlich und statistisch signifikant um über 26 % verbessert ($p < 0,05$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; Tabelle 3). Durch die Harmonizer-Wirkung kam es an einzelnen Stellen des Wundrandes zu einer lokalen Steigerung von Zellwanderung und Zellproliferation, wodurch der resultierende Wundrand im Vergleich zur Kontrolle deutlich zerrissener aussah (Abbildung 1) und so eine größere Standardabweichung bei den Harmonizer-behandelten Zellen resultierte.

Zusammengefasst zeigte der Symbioceuticals Harmonizer Comfort in den hier durchgeführten Untersuchungen positive und damit förderliche Wirkungen auf die Vitalität und Regeneration von Bindegewebszellen der Haut, wodurch Wundheilungsprozesse deutlich beschleunigt werden. Ebenfalls durch die Aktivierung von Zellen der unspezifischen Abwehr kann das körpereigene Potenzial zur Abwehr von Fremdkeimen verbessert werden.



Prof. Dr. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemiker & Geschäftsführer

Tabelle 1: Zusammenfassende tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Einzelversuche mit den Bindegewebsfibroblasten und die sich daraus ergebenden prozentualen positiven Abweichungen (= Steigerung der Zellvitalität) in den zwei unabhängigen Versuchsreihen mit jeweils fünf Einzelmessungen. Insgesamt ergibt sich durch die dreitägige Verwendung des Symbioceuticals Harmonizer Comfort im Vergleich zur Kontrolle eine statistisch signifikante Gesamtsteigerung aus allen Versuchen um $25,65 \pm 5,79 \%$ ($p < 0,01$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test). Alle zu den Versuchen angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Versuchsreihe 1

Einzelversuch	Optische Dichte [mOD] Kontrolle		Optische Dichte [mOD] mit Harmonizer		Abweichung in %	
	Mittelwert	± SD	Mittelwert	± SD	Mittelwert	± SD
Versuch 1	572	± 93	723	± 39	26,40	± 5,38
Versuch 2	442	± 15	548	± 40	23,98	± 7,26
Versuch 3	565	± 31	687	± 30	21,59	± 4,41
Versuch 4	569	± 61	687	± 24	20,74	± 3,45
Versuch 5	571	± 26	692	± 35	21,19	± 5,09

Versuchsreihe 2

Einzelversuch	Optische Dichte [mOD] Kontrolle		Optische Dichte [mOD] mit Harmonizer		Abweichung in %	
	Mittelwert	± SD	Mittelwert	± SD	Mittelwert	± SD
Versuch 1	558	± 53	739	± 24	32,44	± 3,25
Versuch 2	418	± 35	561	± 35	34,21	± 6,29
Versuch 3	517	± 49	692	± 24	33,85	± 3,47
Versuch 4	572	± 37	680	± 20	18,88	± 2,91
Versuch 5	551	± 52	679	± 31	23,23	± 4,51
Gesamt					25,65	± 5,79

Tabelle 2: Zusammenfassende tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Einzelversuche mit den funktionalen Neutrophilen und die sich daraus ergebenden prozentualen positiven Abweichungen (= Steigerung der Zellaktivität) in den drei unabhängigen Versuchsreihen mit jeweils vier Einzelmessungen. Insgesamt ergibt sich durch die dreitägige Verwendung des Symbioceuticals Harmonizer Comfort im Vergleich zur Kontrolle eine statistisch signifikante Gesamtsteigerung aus allen Versuchen um $21,42 \pm 4,75 \%$ ($p < 0,01$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test). Alle zu den Versuchen angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Versuchsreihe 1

Einzelversuch	Optische Dichte [mOD] Kontrolle			Optische Dichte [mOD] mit Harmonizer			Abweichung in %		
Versuch 1	572	\pm	93	723	\pm	39	26,40	\pm	5,38
Versuch 2	442	\pm	15	548	\pm	40	23,98	\pm	7,26
Versuch 3	589	\pm	61	751	\pm	24	27,50	\pm	3,16
Versuch 4	571	\pm	26	665	\pm	35	16,46	\pm	5,29

Versuchsreihe 2

Einzelversuch	Optische Dichte [mOD] Kontrolle			Optische Dichte [mOD] mit Harmonizer			Abweichung in %		
Versuch 1	584	\pm	78	719	\pm	24	23,12	\pm	3,34
Versuch 2	452	\pm	25	561	\pm	35	24,12	\pm	6,29
Versuch 3	591	\pm	35	692	\pm	24	17,09	\pm	3,47
Versuch 4	558	\pm	29	679	\pm	31	21,68	\pm	4,51

Versuchsreihe 3

Einzelversuch	Optische Dichte [mOD] Kontrolle			Optische Dichte [mOD] mit Harmonizer			Abweichung in %		
Versuch 1	465	\pm	75	541	\pm	48	16,34	\pm	8,87
Versuch 2	589	\pm	67	709	\pm	56	20,37	\pm	7,90
Versuch 3	573	\pm	43	648	\pm	30	13,09	\pm	4,68
Versuch 4	517	\pm	54	656	\pm	43	26,89	\pm	6,55

Gesamt **21,42** **\pm** **4,75**

Tabelle 3: Zusammenfassung der Messergebnisse aus beiden Versuchsreihen zur Wirkung des Symbioceuticals Harmonizer Comfort auf die Zellregeneration/Wundheilung. Insgesamt ergibt sich durch die dreitägige Verwendung des Symbioceuticals Harmonizer Comfort im Vergleich zur Kontrolle eine statistisch signifikante Steigerung der Wundheilung um $26,36 \pm 13,60 \%$ ($p < 0,05$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test). MW = Mittelwert und SD = Standardabweichung.

Mit Symbioceuticals Harmonizer Comfort

Versuchsreihe	Verbliebene Wundbreite nach drei Tagen in μm (Einzelmesswerte)				Von Zellen besiedelte Wundbreite in μm				MW	SD
1	6971	6613	6250	6532	1429	1787	2150	1868		
2	6290	6129	6210	6123	2110	2271	2190	2277	2094	\pm 285
3	6371	6129	6169	5890	2029	2271	2231	2510		

Ohne Symbioceuticals Harmonizer Comfort (= Kontrolle)

Versuchsreihe	Verbliebene Wundbreite nach drei Tagen in μm (Einzelmesswerte)				Von Zellen besiedelte Wundbreite in μm				MW	SD
1	6774	6935	6613	6694	1626	1465	1787	1706		
2	6694	6452	6774	6613	1706	1948	1626	1787	1657	\pm 154
3	6774	6694	6885	7016	1626	1706	1515	1384		

Prozentuale Zunahme der von Zellen besiedelten Wundbreite nach Behandlung mit dem Harmonizer **26,36 \pm 13,60**

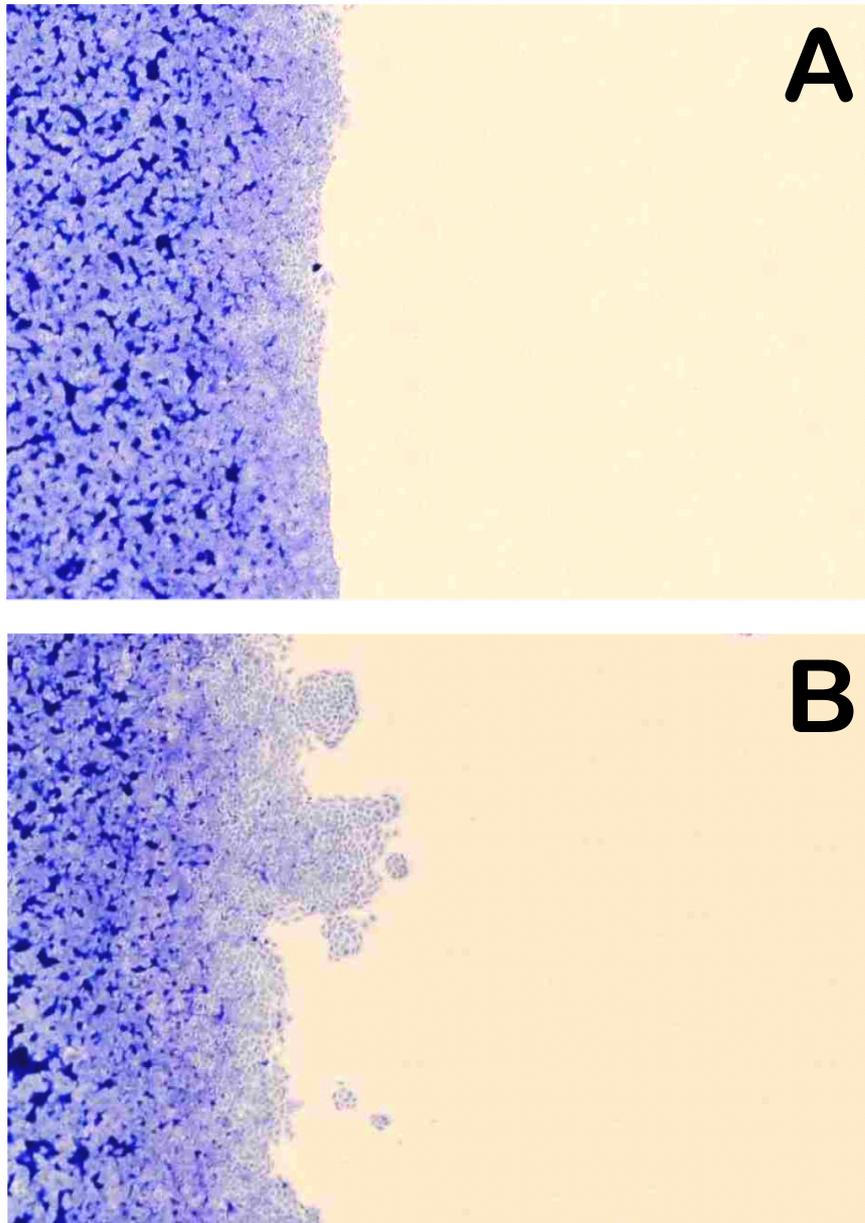


Abbildung 1: Mikrofotografien von der Kontrolle (A) und der mit dem Harmonizer behandelten Zellen (B) zur Verdeutlichung der Zellregeneration/Wundheilung. Die Zellen sind über einen dreitägigen Zeitraum von links nach rechts in den zentralen zellfreien Raum eingewandert und haben so die Breite der Wunde verringert. Bei den Harmonizer-behandelten Zellen kam es an einzelnen Stellen des Wundrandes zu einer lokalen Steigerung von Zellwanderung und Zellproliferation, wodurch der resultierende Wundrand im Vergleich zur Kontrolle deutlich weniger homogen und zerrissener aussieht. Das geht auch aus der größeren Standardabweichung bei den behandelten Zellen in Tabelle 3 hervor.