

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

Karl Sachsenheimer
Pflanzen- und Bodenpflege
Begnizweg 15

97996 Niederstetten-Vorbachzimmern

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

21. September 2019

TESTBERICHT

Untersuchung der förderlichen Wirkeffekte von energetisiertem Wasser mit kultivierten Zellen

1 Fragestellung durchgeführten *in vitro*-Studie

In der vorliegenden Studie sollte mit aktuellen zellbiologischen Testverfahren untersucht werden, ob örtliches Leitungswasser nach der Energetisierung in der „High Energy Wasserflasche“ von Karl Sachsenheimer förderliche Wirkeffekte im Vergleich zum ursprünglichen Leitungswasser besitzt.

2 Herstellung des energetisierten Wassers

Aus Gründen des Versuchsablaufes wurde das Leitungswasser direkt in die Wasserflasche eingefüllt und dort für 60 min belassen. Danach wurden die beiden Wasserproben, nämlich das ursprüngliche Leitungswasser und das energetisierte Wasser, in unterschiedlichen Volumenverhältnissen dem Reaktionsgemisch bzw. Kulturmedium zugesetzt.

3 Untersuchung der antioxidativen Wirkung im zellfreien Testsystem

In diesem zellfreien Testsystem wurde geprüft, ob die beiden Wasserproben in der Lage sind, freie Sauerstoffradikale zu inaktivieren und so einem oxidativen Stress vorzubeugen. Für die Untersuchung wurden die verschiedenen Konzentrationen der Wasserproben in Aqua dest. vorgelegt und dazu Kaliumsuperoxid in Aqua dest. (1 mg/ml) pipettiert. Die nicht durch die Wasserproben inaktivierten und damit noch aggressiven und reaktionsfreudigen Superoxidanion-Radikale im Reaktionsgemisch führen dabei zu einer Spaltung und zu einer Änderung der optischen Dichte (= Farbe) des ebenfalls zum Ansatz zugegebenen wasserlöslichen Tetrazoliumfarbstoffes WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim). Die optische Dichte wurde als Differenzmessung $\Delta OD = 450 - 690$ nm kontinuierlich am Elisa-

reader (BioTek SLx808 mit Software Gen 5 Version 3.00) für das Zeitintervall 0-20 min aufgezeichnet und nach linearer Regression der erhaltenen Kurvenzüge mit Microsoft Excel in Form der Steigung ausgewertet und graphisch gegen die Konzentration aufgetragen.

Wie in Abb. 1 dargestellt, hatten die untersuchten Wasserproben völlig unterschiedliche antioxidative Wirkungen. Während das ursprüngliche und unbehandelte Leitungswasser überhaupt keine antioxidative Wirkung in den Tests zeigte, hatte die Zugabe des energetisierten Wassers eine konzentrationsabhängige antioxidative Wirkung zur Folge. Ab einer Konzentration von 40 Vol% im Test war die antioxidative Wirkung statistisch signifikant gegenüber der Kontrolle ($p < 0,05$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test).

Aus den Untersuchungen kann geschlossen werden, dass nach dem Trinken des energetisierten Wassers einem oxidativen Stress vorgebeugt werden kann.

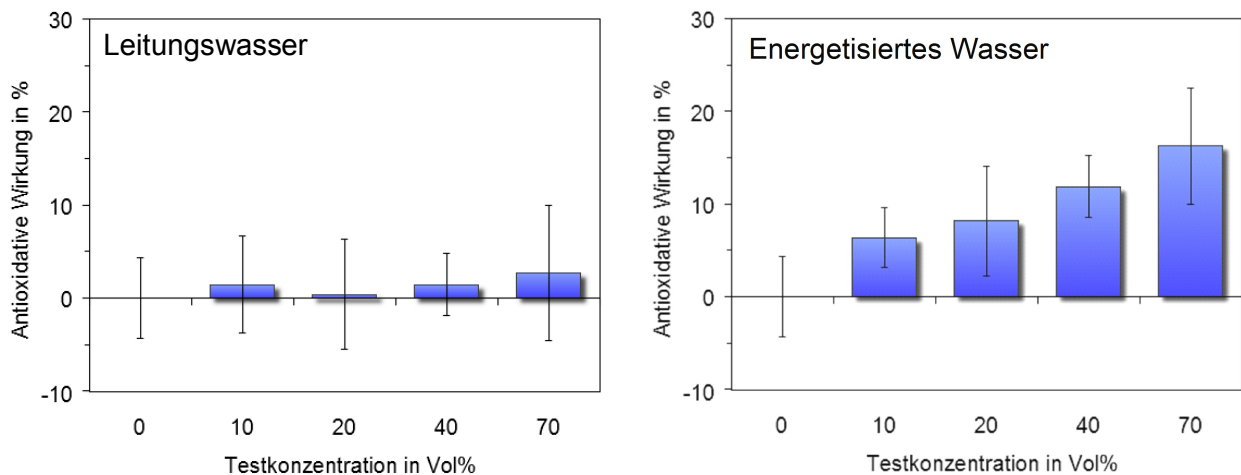


Abb. 1: Antioxidative Wirkung der beiden untersuchten Wasserproben. Die Kontrolle ohne Testwasser wurde jeweils gleich 0 gesetzt. Während das ursprüngliche Leitungswasser keine antioxidative Wirkung besitzt, zeigt das energetisierte Wasser eine konzentrationsabhängige antioxidative Wirkung. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von zwei unabhängigen Versuchen an verschiedenen Versuchstagen.

4 Basaler Energiestoffwechsel von Bindegewebszellen

Die Untersuchungen wurden mit Bindegewebsfibroblasten der Zelllinie L-929 (ACC-2; Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) durchgeführt und in den Subkultivierungsstufen (Passagen) 78 bis 79 verwendet. Die Zellen wurden routinemäßig in RPMI 1640 mit 10 % Wachstumsgemisch und 0,5 % Gentamycin kultiviert und in einem Brutschrank bei 37 °C und einer Atmosphäre aus 5 % CO₂ und 95 % Luft sowie nahezu 100%iger Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Für die Versuche wurden die Zellen aus Massenkulturen in einer Zelldichte von 20.000 Zellen/Vertiefung in 96-Loch Kulturplatten (200 μ l Kulturmedium/Vertiefung) ausgesät und für 24 Stunden bis zur vollständigen Adhäsion der Zellen inkubiert. Danach wurde zu den

Zellen ein Reaktionsgemisch bestehend aus PBS+ mit 5 mM Glucose als Energiequelle, den entsprechenden Testkonzentrationen der beiden Wasserproben sowie dem Tetrazoliumfarbstoff WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim) gegeben. Dabei ist die Farbstoffspaltung der Aktivität des zellulären Energiestoffwechsels direkt proportional. Es wurde die optische Dichte als Differenzmessung $\Delta OD = 450 - 690 \text{ nm}$ kontinuierlich am Elisareader (BioTek SLx808 mit Software Gen 5 Version 3.00) aufgezeichnet und nach linearer Regression der erhaltenen Kurvenzüge in Form der Steigung (Zeitintervall 0-180 min) mit Microsoft Excel ausgewertet. Die Ergebnisse wurden als Relativwerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ohne Testwasser dargestellt und graphisch gegen die Konzentration aufgetragen.

Während das Leitungswasser keine Stimulation des basalen Energiestoffwechsels bewirkte, zeigte das energetisierte Wasser bereits ab der niedrigsten Testkonzentration von 10 Vol% eine statistisch signifikante Stimulierung gegenüber der Kontrolle ($p < 0,05$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; Abb. 2). Diese Stimulation nahm bei höheren Testkonzentrationen nicht mehr weiter zu.

Diese stimulierende Wirkung kann nach dem Trinken des energetisierten Wassers zu einer höheren körperlichen Leistungsfähigkeit und damit zu einem gesteigerten Wohlbefinden führen.

Anmerkung: Im Gegensatz zum zellfreien Test in Abschnitt 3, bei der als höchste Testkonzentration 70 Vol% möglich waren, wurden die Zelltests auf maximal 40 bis 50 Vol% der Wasserproben beschränkt. Der Grund hierfür liegt in der sich ggf. verändernden Osmolarität und der damit einhergehenden Zellvolumenregulation der Zellen.

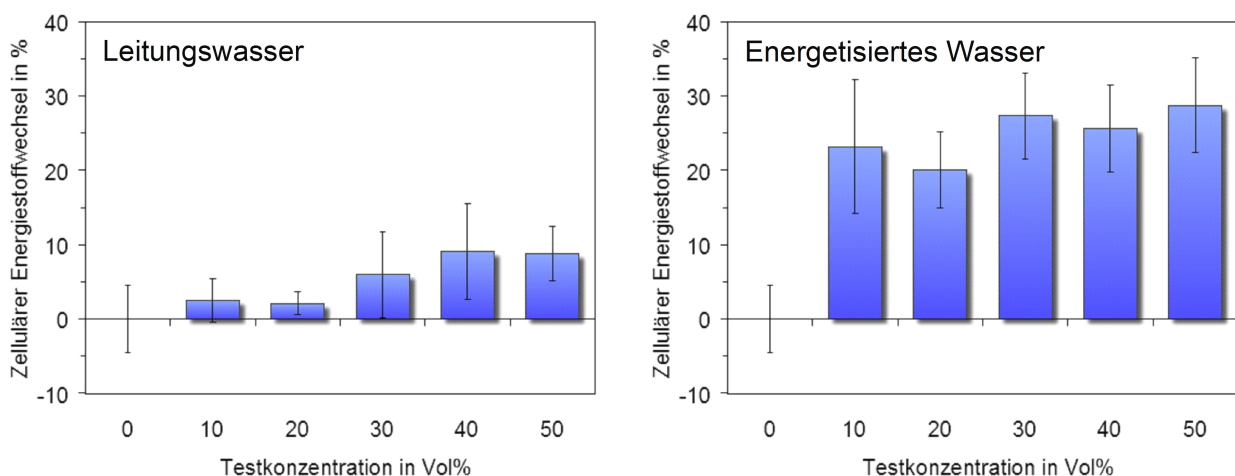


Abb. 2: Wirkung der beiden Wasserproben auf den basalen Energiestoffwechsel kultivierter Bindegewebsfibroblasten. Gut erkennbar ist die Verminderung für das unbehandelte Leitungswasser und die Stimulation durch das energetisierte Wasser. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen.

5 Zellregeneration mit Bindegewebszellen

Eine Stimulation des Energiestoffwechsels von Bindegewebszellen ist in der Regel mit einer Förderung der Zellregeneration gekoppelt. Im hier verwendeten Testsystem wird speziell die Granulationsphase eines Wundheilungsprozesses simuliert. Diese zeichnet sich durch das Auftreten von Zellwanderung und Zellproliferation aus.

Für die Untersuchung 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 Silikonsteg begrenzt. Durch den speziellen Adhäsionsbereich haftet ein Insert fest auf dem Boden einer Kulturschale und bildet so einen definierten zellfreien Bereich (künstliche Wunde), welchen die Zellen besiedeln können.

Nach Erreichen der Konfluenz innerhalb von 48 Stunden nach der Zellaussaat wurden die Silikon-Inserts mit einer Pinzette abgezogen, um scharf abgegrenzte zellfreie Bereiche zwischen den Kompartimenten zu erhalten. In diese zellfreien Bereiche konnten nun die Zellen einwandern und dort durch verstärkte Zellteilung den zellfreien Bereich wieder schließen (Abb. 3). Nach 20 Stunden wurden die Zellen mit Methanol fixiert, nach Coomassie-Giemsa gefärbt, luftgetrocknet und die Breite des noch verbliebenen zellfreien Bereiches ausgemessen. Basierend auf den Ergebnissen des Energiestoffwechsels wurde in diesem Versuchsansatz die Testkonzentration bei 40 Vol% konstant gelassen. Insgesamt wurden 4 Messungen in zwei unabhängigen Versuchen vorgenommen und die Zellregeneration im Vergleich zum Leitungswasser berechnet und graphisch dargestellt.

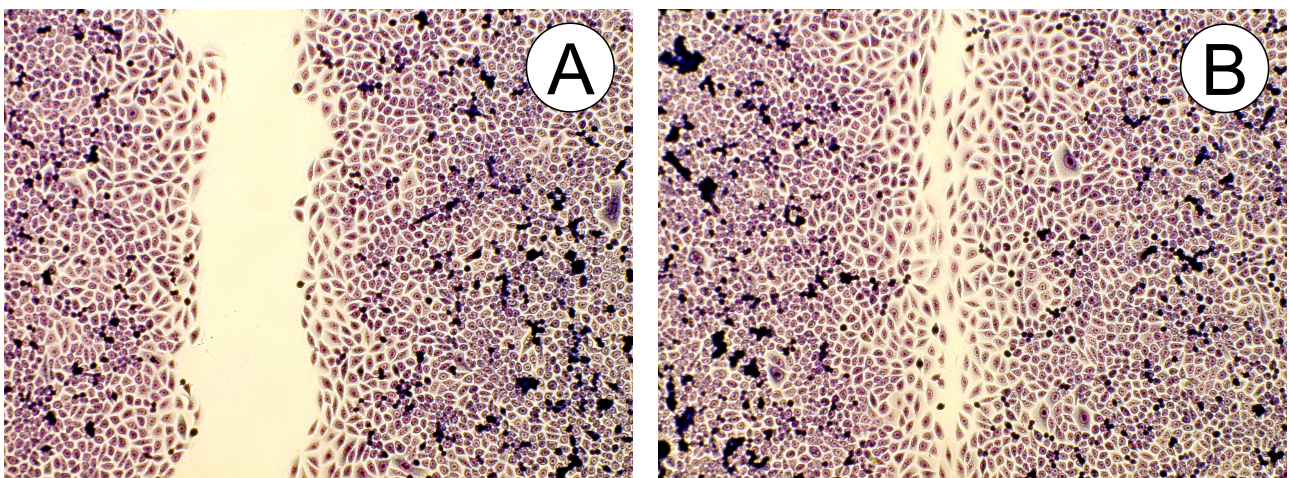


Abb. 3: Mikrofotos von kultivierten Bindegewebszellen zur Verdeutlichung der Zellregeneration. (A) Einwanderung der Zellen in den zellfreien Raum innerhalb von 2 Stunden nach Entfernen des Silikoninserts und (B) nach 24stündiger Inkubationszeit mit weitgehender Wiederbesiedlung des zellfreien Raumes.

Wie in Abb. 4 dargestellt, hatte das unbehandelte Leitungswasser keine Wirkung auf die Zellregeneration. Das energetisierte Wasser dagegen stimulierte diesen Prozess in einer konzentrationsabhängigen Weise und war ab einer Testkonzentration von 20 Vol% auch signifikant unterschiedlich von der Kontrolle ($p < 0,05$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test).

Diese aktivierende Wirkung kann nach dem Trinken des energetisierten Wassers zu einer verbesserten Zellregeneration (Wundheilung) führen.

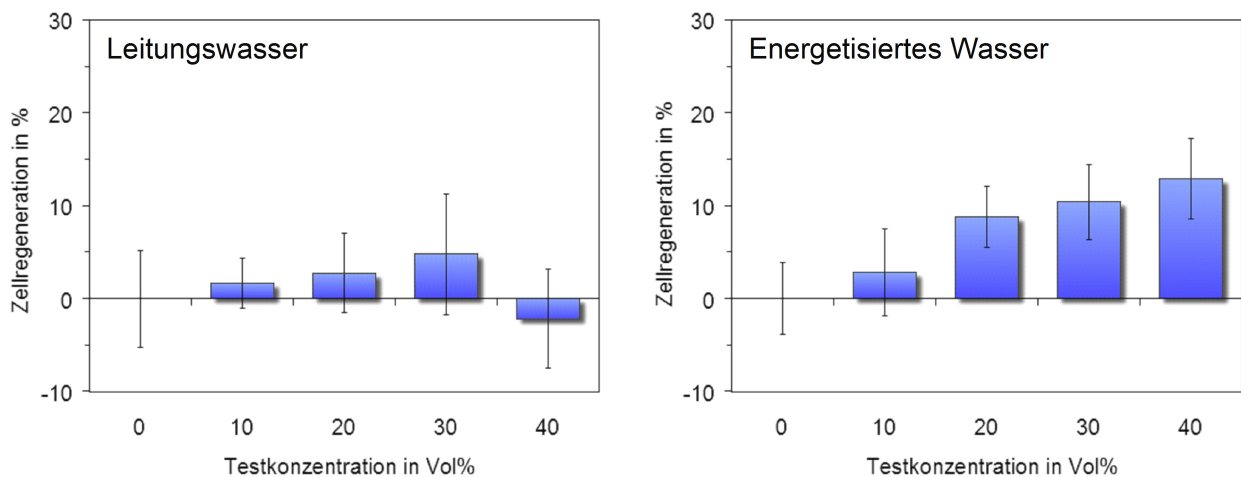


Abb. 4: Wirkung der beiden Wasserproben auf die Zellregeneration kultivierter Bindegewebsfibroblasten. Es ist gut erkennbar, dass das unbehandelte Leitungswasser keine Wirkung hat, jedoch das energetisierte Wasser eine konzentrationsabhängige Stimulation bewirkt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von zwei unabhängigen Versuchen.

6 Zusammenfassung & Schlussfolgerungen

In den hier durchgeführten tierversuchsfreien Untersuchungen mit Zellkulturen hat das energetisierte Wasser im Vergleich zum unbehandelten Leitungswasser seine förderlichen Wirkeffekte unter Beweis gestellt. Neben seinen antioxidativen Eigenschaften zeigte das energetisierte Wasser auch eine Stimulation des Energiestoffwechsels sowie der Regeneration von Bindegewebsfibroblasten.

Das Trinken von Wasser, welches durch die „High Energy Wasserflasche“ von Karl Sachsenheimer energetisiert wurde, kann daher an Hand der vorliegenden Testergebnisse bestens empfohlen werden.




Prof. Dr. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemiker