

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

Vital Energy GmbH
c/o Herrn Helmut Theuretzbacher
Mühlenhof 2

A-4800 Wankham, 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

27. April 2020

TESTBERICHT

Förderliche Wirkeffekte des VITAL PAD/BOTEC

Untersuchungen mit organspezifischen Zellkulturen

1 Fragestellung und angewandte VITAL PAD/BOTEC

Mit tierversuchsfreien und aktuellen zellbiologischen Methoden wurde untersucht, ob sich nach der Anwendung des VITAL PAD/BOTEC der Firma Vital Energy GmbH aus A-4800 Wankheim, Österreich, förderliche Wirkeffekte auf zellulärer Ebene nachweisen lassen.

2 Vorbemerkungen zu den Untersuchungen

Für die Untersuchungen kamen zwei verschieden große VITAL PAD/BOTEC mit einem Durchmesser von 32 mm und 80 mm zum Einsatz. Vorversuche mit Bindegewebsfibroblasten für einen Einwirkungszeitraum von nur wenigen Stunden zur Untersuchung des basalen Zellstoffwechsels erbrachten keinen Effekt des VITAL PAD/BOTEC. Erst nach längerer kontinuierlicher Einwirkungszeit von 6 Tagen konnten wir Unterschiede zwischen den unbehandelten Kontrollen und den behandelten Zellkulturen feststellen, so dass in den weiterführenden Untersuchungen nur die mehrtägige Langzeitexposition verwendet wurde.

3 Vitalität und Teilungsaktivität (Proliferation) von Bindegewebsfibroblasten

Die Untersuchungen wurden mit Bindegewebsfibroblasten der Zelllinie L-929 (ACC-2; Leibniz-Institut DSMZ, Braunschweig) durchgeführt und in der Passage 111 bis 112 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.

Die Zellen wurden als Massenkulturen mit geringer Zelldichte (100.000 Zellen/Flasche) in Kulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² ausgesät und diese auf das VITAL PAD/BOTEC mit dem Durchmesser von 32 mm gestellt und mit mehreren Lagen Aluminiumfolie zum Abschirmen umwickelt. Mit der Kontrollkultur ohne VITAL PAD/BOTEC wurde gleich verfahren. Auch diese wurde mit Aluminiumfolie abgeschirmt. Ohne Mediumwechsel wurden die Kulturen kontinuierlich für 6 Tage inkubiert und danach für 2 min bei

Raumtemperatur mit Methanol fixiert und mit Azur-Eosin-Methylenblau nach Giemsa für 30 min gefärbt. In einem zweiten unabhängigen Versuch wurde das 80 mm-VITAL PAD/BOTEC verwendet und nach der 6tägigen Inkubationszeit die erreichte Zellzahl nach Ablösen der Zellen durch Trypsin mit einem CASY Zellzählgerät in jeweils vier Proben bestimmt.

Ergebnis: Wie in den Makrofotos der Zellkulturen deutlich erkennbar, bildete sich nahezu exakt über dem VITAL PAD/BOTEC ein deutlich dichterere kreisförmiger Zellrasen aus im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 1). Gleichfalls unter dem Mikroskop war in dieser Zone die unterschiedliche Zelldichte gut erkennbar (Abb. 2). Die im zweiten unabhängigen Versuchsansatz bestimmte Zelldichte zeigte auch diesen Unterschied auf. In der Kontrollkultur waren insgesamt $3,56 \pm 0,38 \times 10^6$ Zellen enthalten, in der behandelten Kultur dagegen $4,88 \pm 0,41 \times 10^6$ Zellen (jeweils Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes). Dies entspricht einer Förderung der Zellvitalität/Zellproliferation um etwa 37 %.

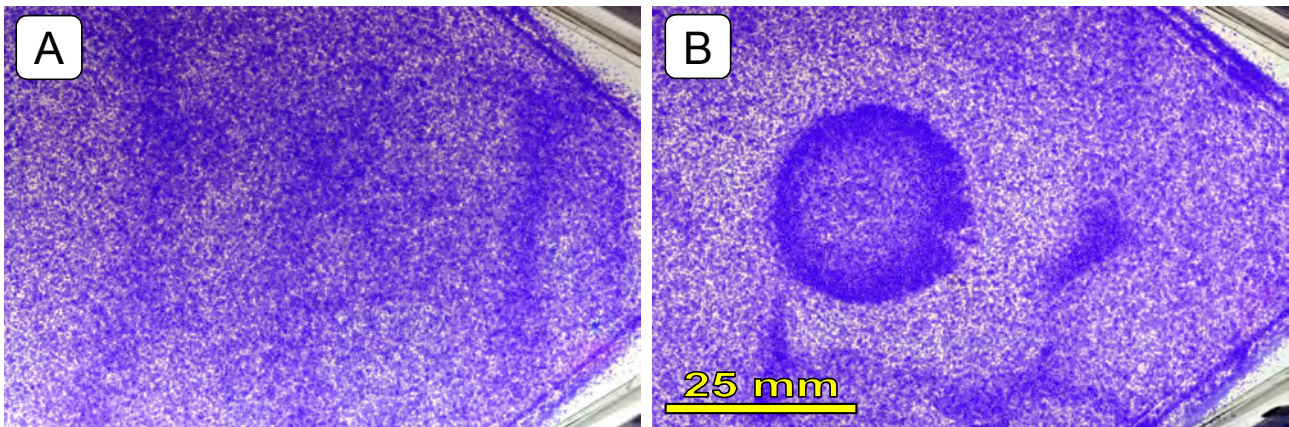


Abb. 1: (A) Unbehandelte Kontrolle mit nahezu homogener Zelldichteverteilung. (B) Kreisförmige Erhöhung der Zelldichte an der Stelle, wo sich das 32 mm-VITAL PAD/BOTEC für 6 Tage unter der Zellkultur befand. Makroaufnahme der angefärbten Zellkulturen.

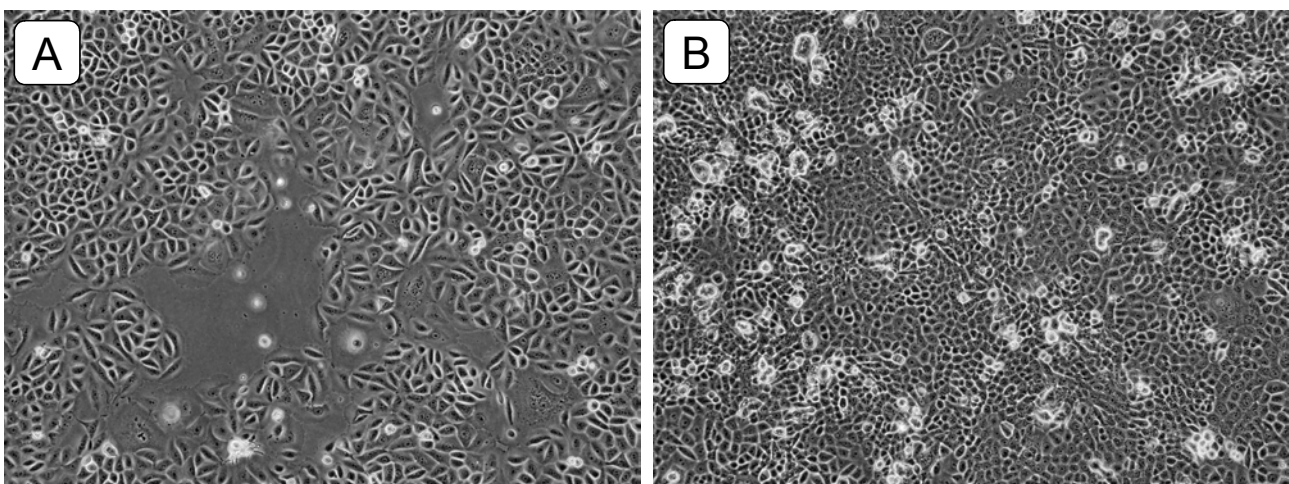


Abb. 2: (A) Unbehandelte Kontrolle mit unvollständiger Zellbesiedlung. (B) Dichter (= konfluent) Zellrasen an der Stelle über dem VITAL PAD/BOTEC nach 6tägiger Inkubation. Mikroaufnahme mit Olympus IX50-Inversmikroskop mit 10x-Planachromat im Phasenkontrast-Verfahren.

4 Basaler Stoffwechsel und Radikalbildung bei funktionalen Neutrophilen

4.1 Kurzbeschreibung der Zellkultur

Die Untersuchungen wurden mit Promyelozyten der Zelllinie HL-60 (ACC-3; ECACC 98070106; Leibniz-Institut DSMZ, Braunschweig) durchgeführt. 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.

Routinemäßig werden die nicht adhärenen Zellen in Suspensionskulturen kultiviert. Unter speziellen Bedingungen wie beispielsweise der Kultivierung in Kulturmedium mit 1,5 % Dimethylsulfoxid für 5 bis 7 Tage differenzieren die Zellen zu sog. funktionalen Neutrophilen. Dies sind Zellen, welche die Eigenschaften von phagozytierenden und entzündungsvermittelnden Zellen (neutrophile Granulozyten) im Blut besitzen. Nach dem Eindringen in ein geschädigtes Gewebeareal und die dortige Bildung von reaktiven Radikalen in einem sog. oxidativen Burst können sie unerwünschterweise weitere Zellschäden verursachen und so auch einen chronischen Entzündungsprozeß in Gang halten. Zusätzlich kann auch der Energiestoffwechsel dieser Zellen in Suspensions-Massenkulturen untersucht werden. Dies gibt Aufschluss über die Aktivität dieser Zellen.

4.2 Untersuchung des basalen Stoffwechsels

Die HL-60 Zellen in Massenkulturen wurden durch sechstägige Behandlung mit und ohne VITAL PAD/BOTEC 80 mm mit 1,5 % Dimethylsulfoxid zu funktionalen Neutrophilen differenziert. Danach wurde zu den Zellen ein Reaktionsgemisch bestehend aus Phosphatpuffer mit 5 mM Glucose als Energiequelle und der 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 $\Delta OD = 450 - 690$ 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 im direkten Vergleich ausgewertet.

Ergebnis: Die Stoffwechselaktivität der Zellen wurde durch das VITAL PAD/BOTEC um $24,7 \pm 14,9$ % (Mittelwert \pm Standardabweichung; zwei Parallelversuche mit jeweils doppelter Auswertung) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen reduziert. Diese Reduktion war statistisch signifikant ($p < 0,05$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test).

Die Reduktion als ein positives Ergebnis zu sehen, wird erst dann verständlich, wenn man es mit der endogenen Radikalbildung kombiniert. Eine Reduktion des Zellstoffwechsels dieser Zellen hat zur Folge, dass nach Einwanderung ins Gewebe dort auch weniger Radikale produziert werden, wodurch ein geringerer lokaler oxidativer Stress und damit in der Folge geringere Gewebeschäden resultieren. Tatsächlich konnte genau dieser Effekt in den Versuchen des nachfolgenden Abschnitts 4.3 gezeigt werden.

4.3 Untersuchung der endogenen Radikalbildung

Nach Stimulation bilden die zu funktionalen Neutrophilen differenzierten Zellen in einem oxidativen Burst Superoxidanion-Radikale. Ein solcher Burst stellt nach der Einwanderung dieser Zellen aus dem Blut ins betroffene Gewebe einen Teilaspekt des komplexen Entzündungsprozesses dar und kann durch die weitere Gewebeerstörung diesen Prozess dauerhaft in Gang halten.

Die funktionalen Neutrophilen wurden durch Zugabe eines Phorbolesters dazu angeregt, Superoxidanion-Radikale zu bilden. Die Radikale führen zu einer Spaltung des ebenfalls dem Versuchsansatz zugesetzten Tetrazoliumfarbstoffes WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim). Dabei ist die Menge der gebildeten Sauerstoffradikale direkt proportional zur Farbstoffspaltung, d. h. je mehr reaktive Radikale vorhanden sind, desto stärker ist die Farbstoffspaltung und damit auch die Änderung der optischen Dichte. Werden die von den Zellen gebildeten Radikale durch den Wirkstoff inaktiviert, so verändert sich die optische Dichte weniger stark. Die optische Dichte wurde als Differenzmessung $\Delta OD = 450 - 690$ nm aufgezeichnet und nach linearer Regression der erhaltenen Kurvenzüge in Form der Steigung (Zeitintervall 0-30 min) ausgewertet. Die Ergebnisse wurden im direkten Vergleich ausgewertet.

Ergebnis: Die mit dem VITAL PAD/BOTEC inkubierten Zellen zeigten eine reduzierte Bildung von reaktiven Superoxidanion-Radikalen um $38,2 \pm 4,9$ % (Mittelwert \pm Standardabweichung; zwei unabhängige Versuche mit jeweils doppelter Probenzahl). Diese Reduktion war statistisch hochsignifikant ($p < 0,01$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test).

5 Schlussfolgerungen

Die durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen mit organspezifischen Zellkulturen haben gezeigt, dass die Verwendung des VITAL PAD/BOTEC auf zellulärer Ebene zu förderlichen Wirkeffekten führt. Voraussetzung dafür ist nach unseren Untersuchungen eine mehrtägige kontinuierliche Anwendung. Durch das VITAL PAD/BOTEC werden Vitalität und Teilungsaktivität von Hautfibroblasten deutlich gesteigert. Des Weiteren konnte die endogene Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen, wie sie im Gewebe bei entzündlichen Prozessen verstärkt auftreten, durch die Verwendung des VITAL PAD/BOTEC erheblich reduziert werden.



Prof. Dr. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemiker