

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

PRO ENERGETIC

Wittmann GmbH & Co. KG

c/o Herrn Walter Wittmann

Werkstraße 10

A - 8580 Köflach, 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

11. April 2023

Informiertes Wasser „Life Energy Inside“ Förderliche Wirkeffekte bei organspezifischen Zellkulturen

1 Fragestellung der durchgeführten *in vitro*-Studie

In der vorliegenden Studie sollte mit aktuellen zellbiologischen Testverfahren – also komplett tierversuchsfrei – untersucht werden, ob das Wasser mit besonderer Photonenqualität „Life Energy Inside“ der Firma PRO ENERGETIC Wittmann GmbH & Co. KG im direkten Vergleich zum gleichen Leitungswasser aus dem Edelstal in Burgenland/Österreich ohne Behandlung (= Ausgangswasser) auf Zellebene förderliche Wirkeffekte besitzt. Die ersten Voruntersuchungen wurden mit anonymisierten Wasserproben durchgeführt, um eine ungewollte Beeinflussung durch den Untersuchenden auszuschließen. Erst nachdem durch die Testergebnisse die informierte Wasserprobe eindeutig identifiziert wurde, wurden die Folgeuntersuchungen ohne weitere Anonymisierung durchgeführt.

2 Untersuchungen mit kultivierten Bindegewebsfibroblasten

Die Untersuchungen wurden mit Bindegewebsfibroblasten der Zelllinie L-929 (ACC-2; Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) durchgeführt. Die Zellen wurden routinemäßig in RPMI 1640-Kulturmedium 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 für die nachfolgend dargestellten Untersuchungen wurden aus 80-90 % konfluenten Massenkulturen verwendet.

2.1 Basaler Zellstoffwechsel

Für die Versuche wurden die Zellen aus Massenkulturen in einer Zelldichte von 50.000 Zellen/Vertiefung in 96-Loch Kulturplatten (200 µl Kulturmedium/Vertiefung) ausgesät und für 24 Stunden bis zur vollständigen Adhäsion der Zellen inkubiert. Danach wurde zu den Zellen ein Reaktionsgemisch bestehend aus Phosphatpuffer mit Calcium und Magnesium mit 10 mM Glucose als Energiequelle, den entsprechenden Testkonzentrationen des informierten Wassers resp. unbehandelten Ausgangswassers sowie ein Tetrazoliumfarbstoff

gegeben. Die Farbstoffspaltung ist der Aktivität des zellulären Energiestoffwechsels direkt proportional. Es wurde die optische Dichte als Differenzmessung $\Delta OD = 450 - 690 \text{ nm}$ am Elisareader (BioTek ELx808 mit Software Gen 5 Version 3.00) zum Zeitpunkt $t = 0$ sowie verschiedenen definierten Zeitpunkten bis zu 180 min nach Wasserzugabe aufgezeichnet und die Veränderung der optischen Dichte mit Microsoft Excel 2016 ausgewertet. Die statistische Analyse wurde mit dem parameterfreien zweiseitigen Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest vorgenommen. Es wurden vier unabhängige Versuche durchgeführt.

Ergebnis: Wie in Abb. 1 dargestellt, bewirkte die Verwendung des informierten Wassers in vier unabhängigen Versuchen eine dosisabhängige und durchgehend statistisch signifikante ($p \leq 0,01$) Stimulierung des Stoffwechsels der Bindegewebsfibroblasten im Vergleich zum Ausgangswasser. Die maximale Steigerung betrug bei 40 Vol% Wasseranteil im Reaktionsgemisch nach 3-stündiger Einwirkungszeit mehr als 50 %. Die Werte des Ausgangswassers wichen bei allen Testkonzentrationen nicht entscheidend von der Kontrolle ohne Wasseranteil ab. Das regelmäßige Trinken des informierten Wassers kann so zu einer höheren körperlichen Leistungsfähigkeit und einem verbesserten Wohlbefinden führen.

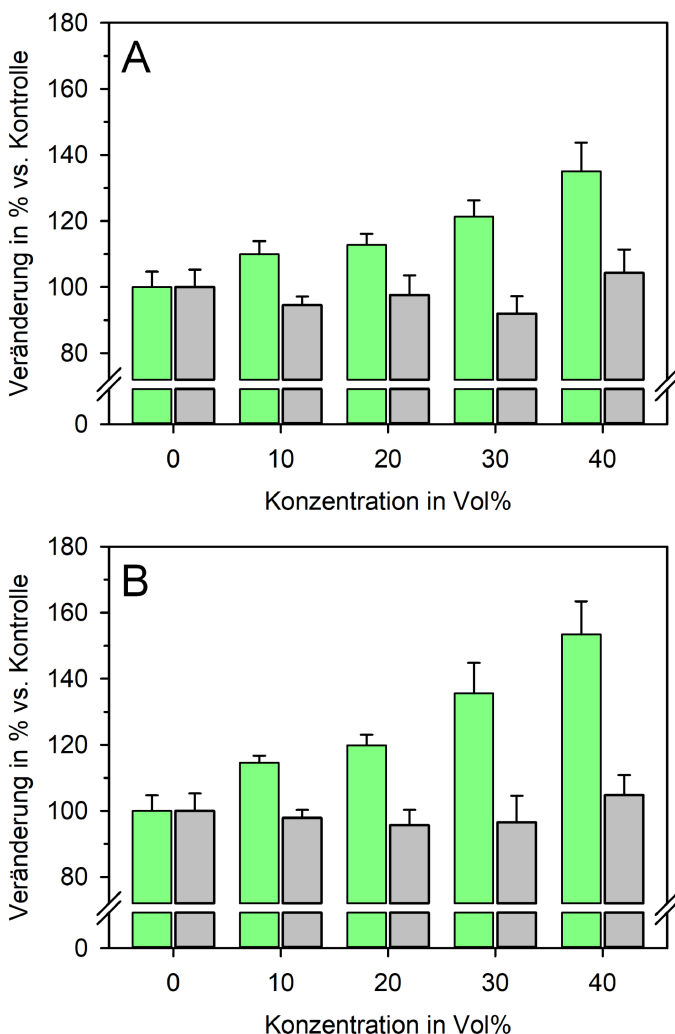


Abb. 1: Basaler Stoffwechsel von kultivierten Bindegewebsfibroblasten in Abhängigkeit von dem Volumenanteil des Wassers im Reaktionsgemisch im Vergleich zur Kontrolle ohne Wasserzusatz 90 min (A) und 180 min (B) nach Reaktionsbeginn. Die Kontrolle ohne Wasserzusatz (mit 0 gekennzeichnet) wurde gleich 100 % gesetzt. Die Werte für das informierte Wasser werden durch grüne Säulen dargestellt und die Werte für das Ausgangswasser in grauen Säulen. Beachte die signifikante und dosisabhängige Steigerung des Zellstoffwechsels durch das informierte Wasser. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen aus vier unabhängigen Versuchen.

2.2 Zellregeneration

Die Bindegewebsfibroblasten wurden in einer Dichte von 100.000 Zellen/ml in die drei Kompartimente eines Silikonrahmens (3 well-culture inserts; ibidi, Gräfelfing) ausgesät. Die einzelnen Kompartimente sind durch einen 500 µm dicken Silikonsteg voneinander getrennt. Wegen des speziellen Adhäsionsbereiches des Silikonrahmens haftet dieser fest auf dem Boden einer Kulturschale und bildet so einen zellfreien Raum, den die Zellen nach dem Entfernen des Rahmens durch Teilung und Wanderung neu besiedeln können. Nach Erreichen der Konfluenz (= Zellen liegen dicht an dicht) innerhalb von 48 Stunden nach der Zellaussaat wurden die Silikonrahmen mit einer Pinzette vorsichtig entfernt. So wurde ein scharfer Zellrand zwischen den vier Kompartimenten des Rahmens erhalten.

Direkt nach dem Entfernen des Silikonrahmens wurden die Zellkulturen mit verschiedenen Konzentrationen der beiden Testwässer im Kulturmedium für weitere 22 Stunden inkubiert. Höhere Wasserkonzentrationen führen über den 24-stündigen Inkubationszeitraum zu Volumenveränderungen der Zellen aufgrund der veränderten Osmolarität des Mediums und verfälschen das Versuchsergebnis. Danach wurden die Zellen mit Phosphatpuffer gewaschen, mit Methanol p.a. fixiert, mit Giemsa-Methylenblau-Lösung (Merck, Darmstadt) in Phosphatpuffer, pH 6,5, gefärbt und luftgetrocknet.

Der prozentuale Anteil des nach Ablauf der Inkubationszeit noch vorhandenen zellfreien Raumes sowie die Wanderungsstrecke der Zellen wurde an Hand von Mikrofotos an mindestens 8 Stellen pro Präparat durch die Verwendung der Ikosa-Software mit künstlicher Intelligenz (AI) bestimmt (KML Vision, Graz, Österreich) bestimmt. Insgesamt wurden drei unabhängige Versuchsreihen durchgeführt. Die statistische Analyse wurde mit dem parameterfreien zweiseitigen Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest vorgenommen.

Ergebnis: Bereits das mikroskopische Durchmustern der fixierten und gefärbten Präparate zur Zellregeneration zeigte eine statistisch signifikante Förderung der Besiedlung des zellfreien Raumes durch die Verwendung des informierten Wassers im Vergleich zum unbehandelten Ausgangswasser bei Wasserkonzentrationen ≥ 20 Vol% im Kulturmedium ($p \leq 0,05$; Abb. 2). Bezogen auf die Fläche betrug die Steigerung der Besiedlung/Regeneration durch das informierte Wasser gegenüber dem Ausgangswasser $14,4 \pm 1$ % bei 20 Vol% im Kulturmedium und $17,7 \pm 3,6$ % bei 40 Vol% (jeweils Mittelwert $\pm$ Standardabweichung). Vergleicht man die Messwerte zur Wanderungsstrecke der Zellen (eindimensionale Auswertung) und nicht die der besiedelten Fläche (zweidimensionale Auswertung), dann ergibt sich für 20 Vol% eine Steigerung um $20,3 \pm 4,7$ % und für 40 Vol% eine Steigerung um $46,5 \pm 7,9$ % (jeweils Mittelwert $\pm$ Standardabweichung).

Unabhängig von der Auswertungsmethodik wird durch das informierte Wasser der Zellregenerationsprozess bei den Bindegewebszellen im Versuch deutlich gesteigert. Übertragen auf eine Situation in einem Gesamtorganismus deutet dies darauf hin, dass das regelmäßige Trinken des informierten Wassers Erholungsphasen nach physischen Belastungen/Überbelastungen verkürzen kann.

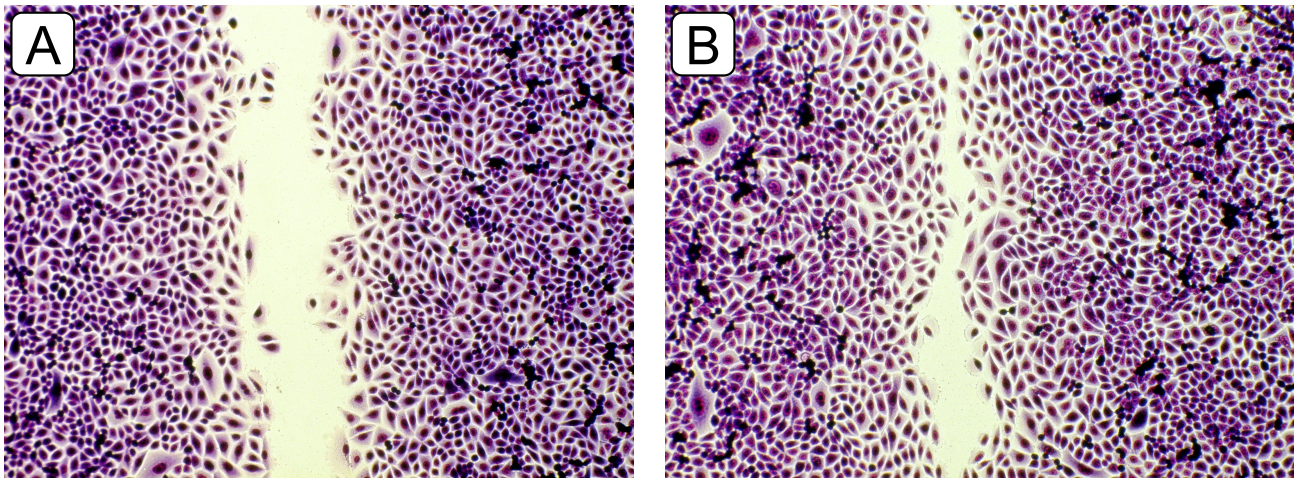


Abb. 2: Mikroskopische Darstellung der förderlichen Wirkung von 20 Vol% des informierten Wassers auf die Zellregeneration kultivierter Bindegewebsfibroblasten innerhalb von 24 Stunden (B) im Vergleich zum unbehandelten Ausgangswasser (A). Der deutlich geringere zellfreie Raum und damit die verbesserte Besiedlung durch die Zellen ist beim informierten Wasser deutlich erkennbar. Fixierte und angefärbte Präparate im Olympus IX-50 Inversmikroskop mit 10x Planachromat und Olympus E-10 Digitalkamera bei 4 Megapixeln Auflösung im Durchlicht-Hellfeld-Verfahren.

3 Endogene Radikalbildung bei funktionalen Neutrophilen

Neutrophile Granulozyten sind primär für die angeborene Abwehr von Fremdkörpern im Blut zuständig, welche sie nach dem Erkennen umschließen und durch die Bildung von Superoxidanion-Radikalen in einem sog. oxidativen Burst abtöten und danach „auffressen“. Deswegen heißen sie auch Fresszellen oder Phagozyten. Angelockt durch chemische Stoffe (Chemokine, Zytokine), welche bei entzündlichen Prozessen auftreten, können diese Zellen aus dem Blut ins entzündete Gewebe einwandern und dort unerwünschterweise ebenfalls Superoxidanion-Radikale bilden. Diese führen in dem ohnehin bereits entzündeten Gebiet zu weiteren Gewebeerstörungen (Nekrosen) und so zu einem weiteren Fortschreiten des entzündlichen Prozesses mit Störungen der Wundheilung. Es wurde mit einem *in vitro*-Modell untersucht, ob das informierte Wasser im Vergleich zum Ausgangswasser besser in der Lage ist, die Superoxidanion-Radikale zu neutralisieren, welche von den aktivierten entzündungsvermittelnden Zellen endogen im Gewebe gebildet werden.

Die hier dargestellten Untersuchungen wurden mit Promyelozyten der Zelllinie HL-60 (ACC-3; ECACC 98070106; Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) durchgeführt. Die Zellen wurden routinemäßig in RPMI 1640-Kulturmedium 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 wurden die nicht adhären-ten Zellen in Suspensions-Massenkulturen vermehrt und regelmäßig zweimal pro Woche subkultiviert. Die Zellen wurden durch sechstägige Behandlung mit 1,5 % Dimethylsulfoxid zu entzündungsvermittelnden Zellen (= funktionale Neutrophile) differenziert.

Durch Zugabe eines Phorbolesters (Phorbol-12-myristat-13-acetat, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurden die Zellen dazu angeregt, Superoxidanion-Radikale zu bilden. Die Radikale führen zu einer Spaltung eines ebenfalls dem Versuchsansatz zugesetzten Tetrazoliumfarbstoffes. Dabei ist die Menge der gebildeten und freigesetzten 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 ein Testwasser inaktiviert, so verändert sich die optische Dichte weniger stark. Es wurde die optische Dichte mit verschiedenen Konzentrationen der Wässer zu definierten Zeitpunkten am Elisareader (BioTek ELx808 mit Software Gen 5 Version 3.00) aufgezeichnet und mit Microsoft Excel 2016 ausgewertet. Die statistische Analyse wurde mit dem parameterfreien zweiseitigen Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest bei vier unabhängigen Versuchen vorgenommen.

Ergebnis: Wie in Abb. 3 dargestellt, bewirkte in den durchgeführten Versuchen das informierte Wasser im Vergleich zum Ausgangswasser eine dosisabhängige und durchgehende statistisch signifikante Verminderung der Aktivität der endogenen Superoxidanion-Radikale im Reaktionsgemisch bei allen getesteten Konzentrationen im Reaktionsgemisch ($p \leq 0,01$). Durch den Versuchsaufbau kann jedoch nicht festgelegt werden, ob die Bildung der Radikale durch die Zellen oder die Inaktivierung der freigesetzten Radikale der entscheidende Ansatzpunkt ist. Unabhängig von dem Wirkmechanismus wird jedoch durch das informierte Wasser die unerwünschte Aktivität der Radikale im Gewebe reduziert, so dass im Falle eines entzündlichen Prozesses geringere lokale Gewebeschäden resultieren dürften. Gleichzeitig ist die Aktivitätsverminderung so moderat, dass die angeborene Abwehr des Blutes gegenüber Fremdkörpern nicht entscheidend beeinflusst werden sollte.

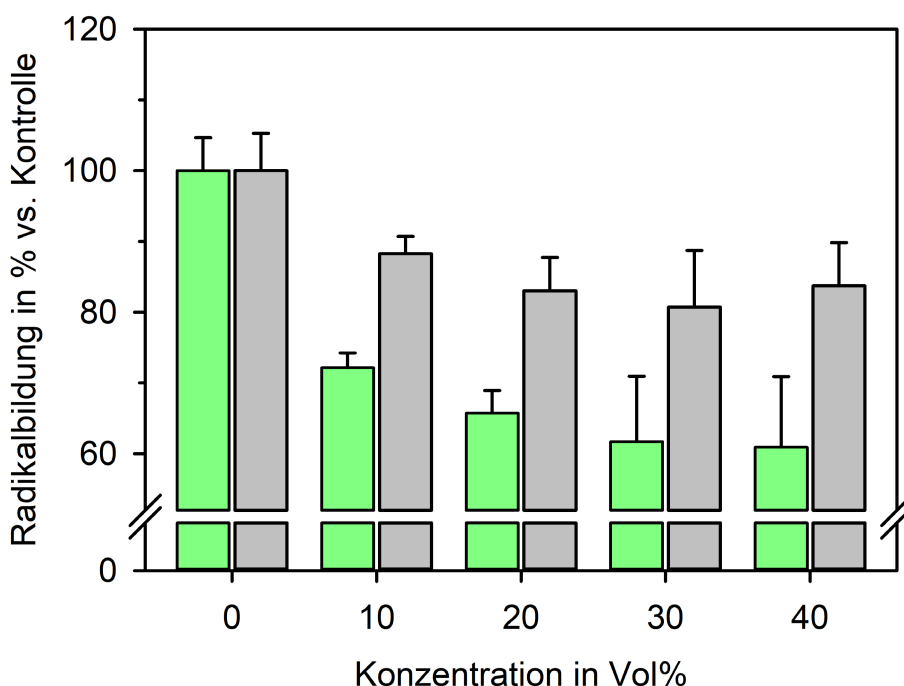


Abb. 3: Wirkung des informierten Wassers im Vergleich zum unbehandelten Ausgangswasser auf die Aktivität der endogen gebildeten Superoxidanion-Radikale im Reaktionsgemisch. Die Werte für das informierte Wasser werden durch grüne Säulen dargestellt und die Werte für das Ausgangswasser in grauen Säulen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert $\pm$ Standardabweichung aus vier unabhängigen Versuchen.

4 Schlussfolgerungen

In den hier durchgeführten tierversuchsfreien Untersuchungen mit kultivierten organspezifischen Zellen hat das informierte Wasser „Life Energy Inside“ der Fa. PRO ENERGETIC Wittmann GmbH & Co. KG seine förderlichen Eigenschaften auf Zellebene zeigen können. In den durchgeführten Untersuchungen war es in der Lage, endogen gebildete Radikale zur Vermeidung von oxidativem Stress im Gewebe zu reduzieren sowie den Stoffwechsel und die Regeneration von Bindegewebsfibroblasten zu stimulieren. Die Verwendung des informierten Wassers kann daher zur Steigerung der gesamten Vitalität und Verkürzung von Erholungsphasen nach physischer Belastung/Überbelastung und damit auch zur Verbesserung des allgemeinen Wohlbefindens empfohlen werden.



Prof. Dr. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemiker