dartschSCIENTIFIC
INSTITUT FÜR ZELLBIOLOGISCHE TESTSYSTEME

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

Bormia
Klaus Jürgen Althoff (Nadeen)
Zwischen den Wegen 27

D - 88696 Owingen

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

18. März 2018

TESTBERICHT

Untersuchung der förderlichen Wirkeffekte von Bormiawasser mit kultivierten Zellen

1 Fragestellung

In der vorliegenden Studie sollte mit aktuellen zellbiologischen Methoden untersucht werden, ob das Wasser ***nach*** dem Durchlauf durch ein Einzelgerät der Firma Bormia in D-88696 Owingen im direkten Vergleich zu dem gleichen Wasser ***ohne*** Durchlauf förderliche Wirkeffekte besitzt.

2 Vorversuche

Es wurden mit zwei verschiedenen Wässern mit und ohne Durchlauf durch ein Bormia-Einzelgerät erste Voruntersuchungen mit kultivierten Zellen gemacht. In diesen Vorversuchen zeigte sich stets, dass das Wasser nach dem Durchlauf in Bezug auf die Testparameter Zellvitalität und Zellregeneration im direkten Vergleich deutliche förderliche Effekte zeigte. Im Einzelnen wurden die folgenden ganz unterschiedlichen Wässer ohne Filterung in den Vorversuchen untersucht:

- Leitungswasser (Grundwasser) in Wagenfeld
- Bodenseewasser gemixt mit lokalem Quellwasser durch die Leitung, d. h. druckgeschädigt

3 Verwendetes Bormia-Produkt & getestetes Wasser

Für die Verbesserung des Ausgangswassers wurde in den hier im Detail dargestellten Untersuchungen das Bormia Ananda 20 GS mit Gold/Silber-beschichteten Spiralen und mit Kristallwasserfall verwendet. Als Wasser für die hier dargestellten Tests wurde entweder Leitungswasser aus 83052 Bruckmühl oder 88696 Owingen, jeweils ohne Filterung, aber dennoch druckgeschädigt, verwendet.

4 Untersuchung der antioxidativen Wirkung im zellfreien Testsystem

In diesem zellfreien Testsystem wurde geprüft, ob das Bormiawasser im Vergleich zum Ausgangswasser in der Lage ist, freie Sauerstoffradikale besser zu inaktivieren und so einem oxidativen Stress vorzubeugen.

Für die Untersuchung wurden die verschiedenen Konzentrationen der beiden Wässer in Aqua dest. vorgelegt und dazu Kaliumsuperoxid in Aqua dest. (1 mg/ml) pipettiert. Die nicht durch die Wässer 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 Elisareader (BioTek SLx808) aufgezeichnet und nach linearer Regression der erhaltenen Kurvenzüge in Form der Steigung ausgewertet und für die beiden Wässer miteinander verglichen.

Wie in Abb. 1 dargestellt, bewirkte das Bormiawasser eine Verbesserung der antioxidativen Wirkung im Vergleich zum Ausgangswasser um bis zu 20 %. Dadurch werden mehr freie Sauerstoffradikale inaktiviert und somit wird die Wirkung der körpereigenen Mechanismen zur Neutralisierung solcher reaktiven Radikale positiv unterstützt. Als Folge kann so bei regelmäßiger Einnahme des Bormiawassers einem oxidativen Stress vorgebeugt werden.

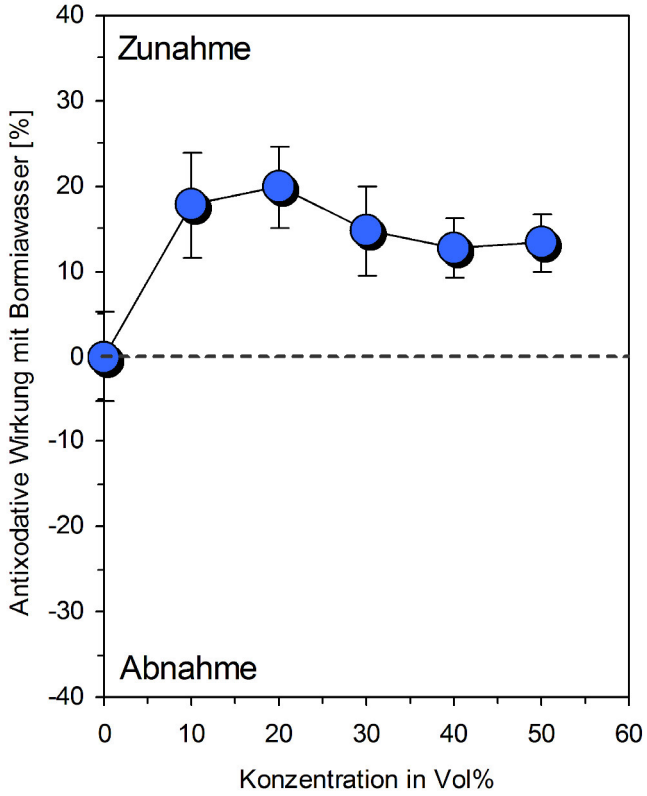

Abb. 1: Relative Verbesserung/Zunahme der antioxidativen Wirkung durch Bormiawasser im Vergleich zu unbehandeltem Ausgangswasser (hier gleich 0 gesetzt). Bei allen Konzentrationen des Bormiawassers ist die Zunahme statistisch signifikant ($p < 0{,}01$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test/U-Test). Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung von 3 Versuchen.

5 Zellkultur mit 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) 50 bis 52 verwendet. Die Zellen wurden routinemäßig in RPMI 1640 mit 10 % fötalem Kälberserum und 0,5 % Gentamycin kultiviert und in einem Brutschrank bei 37 °C und einer Atmosphäre aus 5 % CO_2 und 95 % Luft sowie nahezu 100%iger Luftfeuchtigkeit inkubiert.

5.1 Untersuchung der Zellvitalität

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 Anheftung der Zellen inkubiert.

Danch wurde das Medium gewechselt und die entsprechenden Wasserkonzentrationen zum frischen Kukturmedium gegeben. Nach eintägiger kontinuierlicher Exposition wurde das Kulturmedium abgesaugt und in jede Vertiefung 180 µl Kulturmedium sowie 20 µl XTT zum Nachweis der Zellvitalität zugegeben. Die optische Dichte jeder Vertiefung wurde nach 0 min und nach 120 min bei 37 °C als Differenzmessung bei $\Delta OD = 450 - 690$ nm am Elisareader (BioTEK Elx 808) gemessen und miteinander verglichen.

XTT ist das Natriumsalz von 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfopheny]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilid und hat eine gelbliche Farbe. Mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen spalten den Tetrazoliumring von XTT und es entstehen orange gefärbte, wasserlösliche Formazankristalle. Die Intensität der orangen Farbe der Reaktionslösung ist proportional zur Zellvitalität und wird photometrisch bestimmt.

Im Vergleich zum unbehandelten Ausgangswasser bewirkte das Bormiawasser eine deutliche und statistisch signifikante Zunahme der Zellvitalität ($p < 0{,}01$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test/U-Test) um bis zu 20 % (Abb. 2). Dies kann zu einer höheren körperlichen Leistungsfähigkeit und damit zu einem verbesserten Wohlbefinden führen.

5.2 Untersuchung der Zellregeneration

Eine Verbesserung der Zellvitalität ist in der Regel mit einer Förderung der Zellregeneration gekoppelt. Bei diesen Prozessen ist auf zellulärer Ebene die Proliferation (Teilung) und Migration (Wanderung) ein Schlüsselereignis. Um zu untersuchen, ob Bormiawasser ebenfalls die Zellregeneration 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.

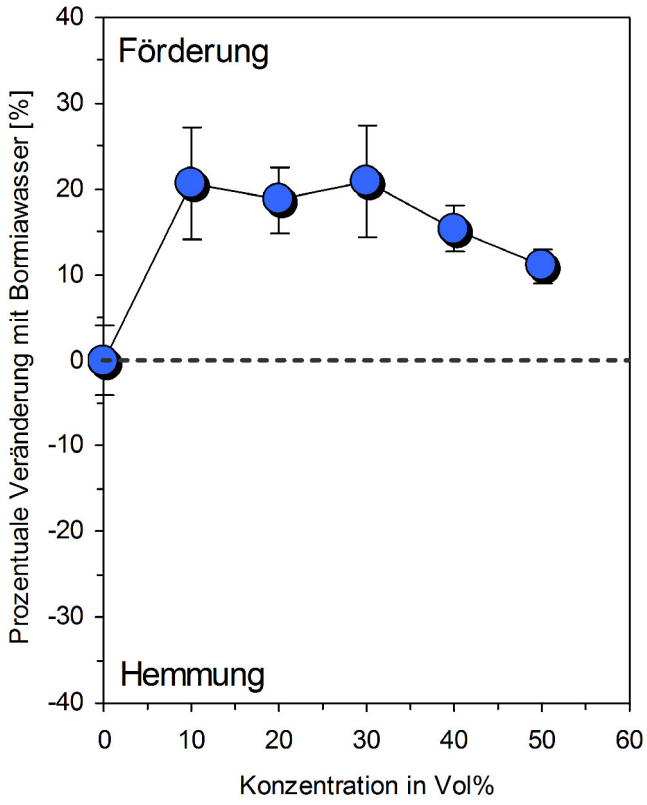

Abb. 2: Relative Förderung der Zellvitalität durch Bormiawasser im Vergleich zu unbehandeltem Ausgangswasser (hier gleich 0 gesetzt). Bei allen Konzentrationen des Bormiawassers ist die Zunahme statistisch signifikant ($p < 0{,}01$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test/U-Test). Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung von 3 Versuchen.

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.

Nach Erreichen der Konfluenz (Zellen liegen dicht an dicht) innerhalb von 48 Stunden nach der Zellaussaat wurden die Inserts mit einer Pinzette abgezogen, um scharf abgegrenzte zellfreie Bereiche zwischen den Kompartimenten erhalten. In diese zellfreien Bereiche konnten nun die Zellen einwandern und dort durch verstärkte Zellteilung den zellfreien Bereich wieder schließen (Abb. 3). Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit Methanol fixiert, nach Coomassie-Giemsa gefärbt, luftgetrocknet und die Breite des noch verbliebenen zellfreien Bereiches ausgemessen. Insgesamt wurden für jede Testkonzentration des Bormiawassers 18 Messungen in dreifachen unabhängigen Versuchsansätzen vorgenommen und die relative Zellregeneration im Vergleich zum unbehandelten Ausgangswasser berechnet.

Wie in Abb. 4 dargestellt, zeigte das Bormiawasser eine dosisabhängige Förderung der Zellregeneration, welche sich ab 30 Vol% statistisch signifikant ($p < 0{,}01$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test/U-Test) vom Ausgangswasser unterschied. Die maximale Förderung durch das Bormiawasser lag im Test bei 18 %. Das Ergebnis zeigt deutlich, dass das Bormia-

wasser auch die Zellregeneration fördert, so dass bei regelmäßiger Einnahme auch die regenerativen Prozesse auf zellulärer Ebene gefördert werden.

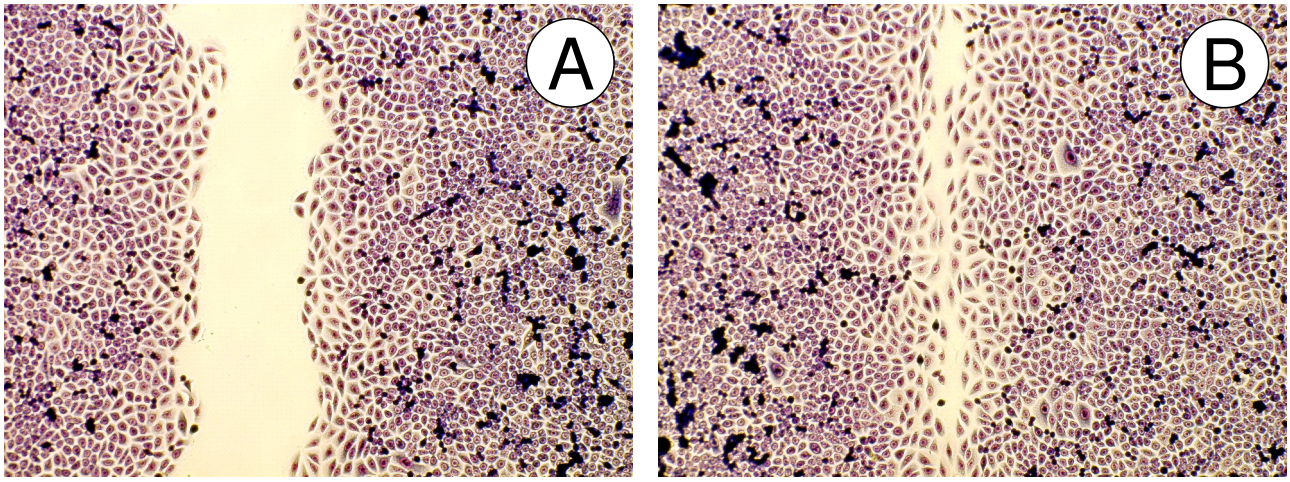

Abb. 3: Mikrofotos von kultivierten Bindegewebszellen zur Verdeutlichung der Zellregeneration. (A) Einwanderung der Zellen in den zellfreien Raum innerhalb von 2 Stunden nach Entfernen des Silikoninserts und (B) nach 24stündiger Inkubationszeit mit weitgehender Wiederbesiedlung des zellfreien Raumes.

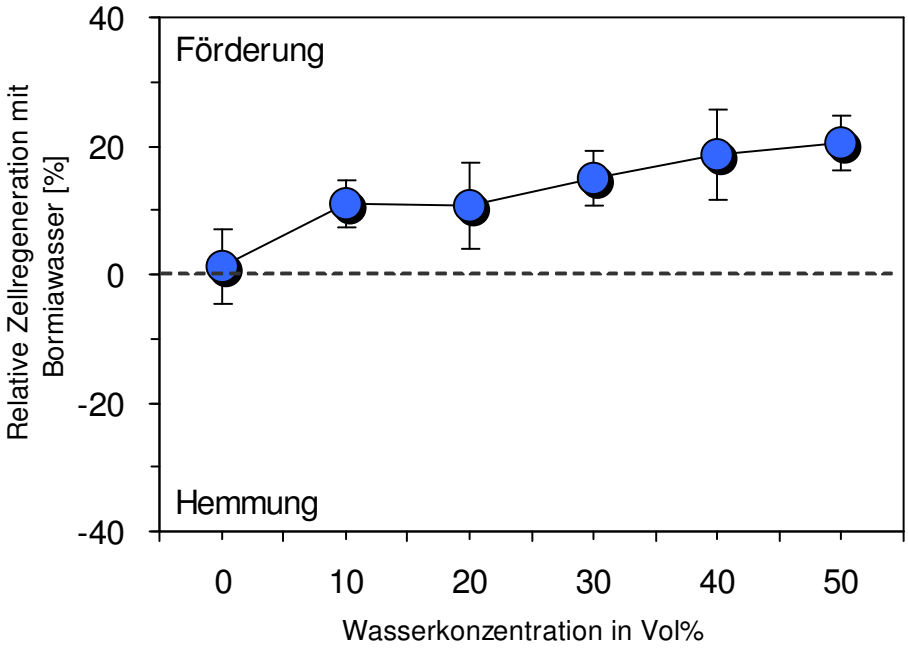

Abb. 4: Relative Förderung der Zellregeneration durch Bormiawasser im Vergleich zu unbehandeltem Ausgangswasser (hier gleich 0 gesetzt). Ab einer Konzentrationen des Bormiawassers von 30 Vol% ist die Zunahme statistisch signifikant ($p < 0{,}01$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test/U-Test). Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung von 3 Versuchen.

6 Zellkultur mit HL-60 Zellen

6.1 Beschreibung der Zellen und Routinekultivierung

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 mit 10 % fötalem Kälberserum und 0,5 % Gentamycin kultiviert und in einem Brutschrank bei 37 °C und einer Atmosphäre aus 5 % CO_2 und 95 % Luft sowie nahezu 100%iger Luftfeuchtigkeit inkubiert. Routinemäßig wurden die Zellen in Suspensionskulturen vermehrt und regelmäßig in frischem Kulturmedium subkultiviert.

Unter speziellen Bedingungen wie beispielsweise der Kultivierung in Medium mit 1,5 % Dimethylsulfoxid für 5 bis 7 Tage differenzieren die HL-60 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 vorgeschädigtes Gewebeareal und die dortige Bildung von reaktiven Superoxidanion-Radikalen können sie weitere Zellschäden verursachen und so ggf. einen chronischen Entzündungsprozeß in Gang halten. Bei adhärent wachsenden HL-60 Zellen kann auch der Energiestoffwechsel in Massenkulturen untersucht werden. Dadurch werden Rückschlüsse auf ihre Aktivierbarkeit unter dem Einfluß einer Testsubstanz erhalten und so ihr Potenzial bei der primären unspezifischen Abwehr von Fremdkeimen im Blut bewertet.

6.2 Potenzial zur Neutralisierung von endogen gebildeten Radikalen

Zunächst wurden die HL-60 Zellen in Massenkultur durch sechstägige Behandlung mit 1,5 % Dimethylsulfoxid zu funktionalen Neutrophilen differenziert. Nach Stimulation bilden diese Zellen in einem sog. oxidativen oder respiratorischen Burst Superoxidanion-Radikale. Ein solcher Burst stellt nach der Einwanderung dieser Zellen aus dem Blut ins betroffenene Gewebe einen Teilaspekt des komplexen Entzündungsprozesses dar und kann durch die weitere Gewebezerstörung diesen Prozess dauerhaft in Gang halten.

Die funktionalen Neutrophilen wurden durch Zugabe eines Phorbolesters (Phorbol-12-myristat-13-acetat; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) 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. Es wurde die

optische Dichte als Differenzmessung ΔOD = 450 – 690 nm kontinuierlich am Elisareader (BioTek SLx808) aufgezeichnet und nach linearer Regression der erhaltenen Kurvenzüge in Form der Steigung (Zeitintervall 10-30 min) ausgewertet. Die Ergebnisse wurden als Relativwerte im Vergleich zum Ausgangswasser ohne Durchlauf dargestellt und gegen die Konzentration aufgetragen.

Wie in Abb. 5 dargestellt, bewirkte der Durchlauf des Wassers durch den Bormia Ananda 20 GS mit Gold/Silber-beschichteten Spiralen und mit Kristallwasserfall im Vergleich zum unbehandelten Ausgangswasser eine ausgeprägte dosisabhängige Neutralisierung der endogen von den Zellen gebildeten Superoxidanion-Radikale. Bei allen Konzentrationen des Bormiawassers > 10 Vol % war die Neutralisierung im Vergleich zum Ausgangswasser statistisch signifikant ($p < 0{,}01$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test).

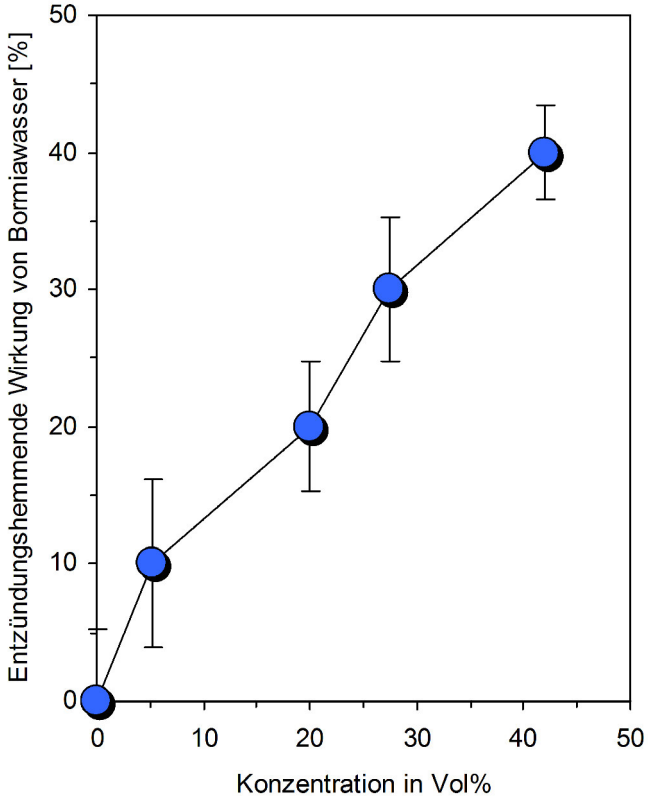

Abb. 5: Prozentuale Neutralisierung endogen gebildeter Superoxidanion-Radikale durch Bormiawasser im Vergleich zum Ausgangswasser ohne Durchlauf (hier gleich 0 gesetzt). Bei allen Konzentrationen des Bormiawassers > 10 Vol % ist die Zunahme statistisch signifikant ($p < 0{,}01$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test). Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung von 3 Versuchen.

6.3 Energiestoffwechsel von adhärent wachsenden HL-60 Zellen

HL-60 Zellen können nach ihrer Differenzierung auch adhärent wachsen und auf ihre Aktivierbarkeit ohne gleichzeitigen oxidativen Burst untersucht werden. Dadurch kann ihr Potenzial bei der primären unspezifischen Abwehr von Fremdkeimen im Blut bewertet werden. Für diese Versuchsreihe wurden adhärent wachsende HL-60 Zellen in einer Dichte von 20.000 Zellen/Vertiefung einer 96-Loch-Kulturplatte ausgesät und für 24 Stunden bis zum vollständigen Absetzen und Ausbreiten der umgesetzten Zellen inkubiert. Danach

wurde einem Reaktionsgemisch bestehend aus Phosphatpuffer mit Calcium und Magnesium und 5 mM Glucose, jeweils einem der beiden Testwässer (Bormiawasser und Ausgangswasser ohne Durchlauf als Referenz) sowie dem Tetrazoliumfarbstoff WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim) zugesetzt. 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) aufgezeichnet und nach linearer Regression der erhaltenen Kurvenzüge in Form der Steigung (Zeitintervall 10-180 min) ausgewertet. Die Ergebnisse wurden als Relativwerte im Vergleich zum Ausgangswasser ohne Durchlauf dargestellt und gegen die Konzentration aufgetragen.

Wie in Abb. 6 dargestellt, bewirkte der Durchlauf des Wassers durch den Bormia Ananda 20 GS mit Gold/Silber-beschichteten Spiralen und mit Kristallwasserfall im Vergleich zum unbehandelten Ausgangswasser eine deutliche Aktivierung des Energiestoffwechsels der adhärenten HL-60 Zellen. Bei allen Konzentrationen des Bormiawassers > 20 Vol % war die Aktivierung statistisch signifikant ($p < 0{,}01$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test).

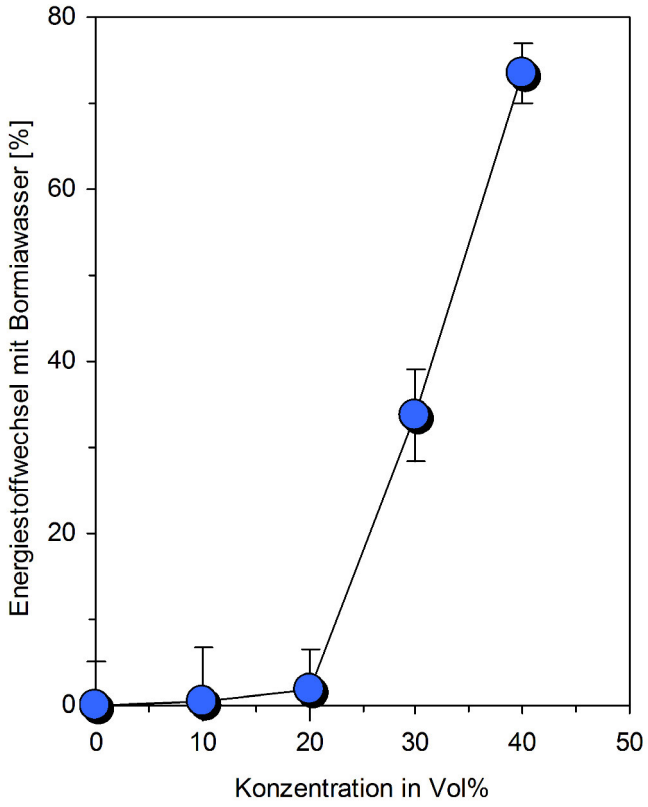

Abb. 6: Prozentuale Aktivierung des Energiestoffwechsels der adhärenten HL-60 Zellen innerhalb von 180 min nach Gabe von Bormiawasser im Vergleich zum Ausgangswasser ohne Durchlauf (hier gleich 0 gesetzt). Bei allen Konzentrationen des Bormiawassers > 20 Vol% ist die Aktivierung statistisch signifikant ($p < 0{,}01$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test). Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung von 3 Versuchen.

7 Zusammenfassung & Schlussfolgerungen

In den hier durchgeführten tierversuchsfreien Untersuchungen mit Zellkulturen des Bindegewebes hat das Bormiawasser im Vergleich zu unbehandeltem Ausgangswasser seine förderlichen Wirkeffekte deutlich unter Beweis gestellt. Neben seinen antioxidativen Eigenschaften zum Inaktivieren von überschüssigen reaktiven Sauerstoffradikalen und somit einer Reduktion von oxidativem Stress, zeigte das Bormiawasser auch eine Aktivierung der Zellen bis hin zu einer Förderung der zellregenerativen Prozesse.

Ebenfalls in den Untersuchungen mit kultivierten und differenzierten HL-60 Zellen hat das Bormiawasser im Vergleich zu unbehandeltem Ausgangswasser seine förderlichen Wirkeffekte deutlich unter Beweis gestellt. Neben der Neutralisierung von endogen gebildeten Superoxidanion-Radikalen bei den stimulierten Zellen, zeigte das Bormiawasser auch eine Aktivierung des Energiestoffwechsels der adhärenten Zellen für eine verbesserte primäre unspezifische Abwehr von Fremdkeimen im Blut.

Die regelmäßige Einnahme von Bormiawasser kann daher an Hand der Testergebnisse für die Verbesserung des Wohlbefindens bestens empfohlen werden.

CELL-BIOLOGICALLY TESTED PRODUCT • PRODUKT ZELLBIOLOGISCH GEPRÜFT •
dartsch SCIENTIFIC
2018

Prof. Dr. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemiker