



DARTSCH SCIENTIFIC

Dartsch Scientific GmbH · Oskar-von-Miller-Str. 10 · D-86956 Schongau

Firma
Provicell GmbH
Eisenstraße 1

D-57482 Wenden

Dartsch Scientific GmbH
Institut für zellbiologische Testsysteme
Oskar-von-Miller-Straße 10
D-86956 Schongau

Fon +49 (0) 8861 256-5250
Fax +49 (0) 8861 256-7162
E-Mail info@dartsch-scientific.com
Internet www.dartsch-scientific.com

8. November 2011

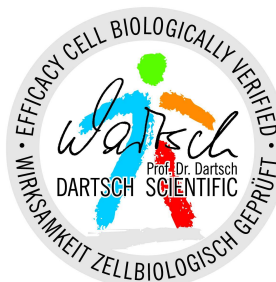
Magnetfeldinduzierte förderliche Wirkeffekte bei kultivierten Bindegewebszellen durch Anwendung des Thyreogymgerätes

1 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Nach mehreren Vorversuchen zur Etablierung des Versuchsdesigns wurden kultivierte und 70-80 % konfluente Bindegewebsfibroblasten der Zelllinie L-929 in 96-Loch-Kulturplatten für 30 min bei 37 °C einer magnetischen Flussdichte von 120-140 nT ausgesetzt. Dies wurde mit einer standardisierten Versuchsanordnung unter Verwendung eines Prototyps des Thyreogymgerätes erzielt. Zellen am Rand der gleichen Kulturplatte, welche nicht dem Magnetfeld ausgesetzt waren, dienten als entsprechende Kontrollen. Unmittelbar nach Magnetfeldeinwirkung wurde der zelluläre Energiestoffwechsel/Zellvitalität bestimmt.

In drei unabhängigen standardisierten Versuchen mit L-929-Zellen bewirkte das Magnetfeld eine statistisch signifikante Stimulation der exponierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen um 32 ± 8 % (Mittelwert \pm Standardabweichung; $p < 0,05$, Student's *t*-Test). Die direkte Steigerung des Energiestoffwechsels dieser Zellen ist sicherlich auf die Einwirkung des Magnetfeldes durch das Thyreogymgerät zurückzuführen, da die Kontrollzellen ohne Magnetfeld in der gleichen Kulturplatte keine Stimulation zeigten. Die Einwirkung eines Magnetfeldes stellt jedoch keinen zelltypspezifischen Stimulus dar, der ausschließlich für kultivierte Bindegewebszellen gilt. Daher muss von einer allgemeingültigen zellulären Wirkung ausgegangen werden. Untersuchungen mit Zellen der Schilddrüse sind nicht möglich, da es in den Zellbanken keine Zellen aus normalem Schilddrüsengewebe gibt. Zellen aus Tumorgewebe der Schilddrüse sind für diese Untersuchungen aus nahe liegenden Gründen nicht geeignet.

Schongau, den 8. November 2011



Prof. Dr. Peter C. Dartsch

Testbericht

2 Thyreogymgerät und magnetische Flussdichte auf Zellebene

Ein Prototyp des Thyreogymgerätes wurde von der Fa. RAYONEX Schwingungstechnik GmbH, D-57368 Lennestadt, für die Untersuchungen mit den kultivierten Zellen zur Verfügung gestellt. Exemplarisch für eine 96-Loch-Kulturplatte wurde die direkt auf Zellebene einwirkende magnetische Flussdichte bestimmt und mit einer Ständerkonstruktion für das Gerät standardisiert (Abb. 1). Es zeigte sich, dass nur in der Mitte der Kulturplatte in einem Bereich von 4 Vertiefungen eine maximale magnetische Flussdichte von 140 nT erzielt wird und am Rand der Platte weniger als 80 nT erreicht werden. Da in den Vorversuchen eine vergleichbare Wirkung zwischen 120 und 140 nT erzielt wurde, wurden nur diese Vertiefungen in der Kulturplatte für die Auswertung als „behandelte Zellen“ verwendet. Die Zellen in den Vertiefungen am äußersten Rand einer jeden getesteten Platte wurden als „unbehandelte Zellen“ (= Kontrollen) herangezogen.

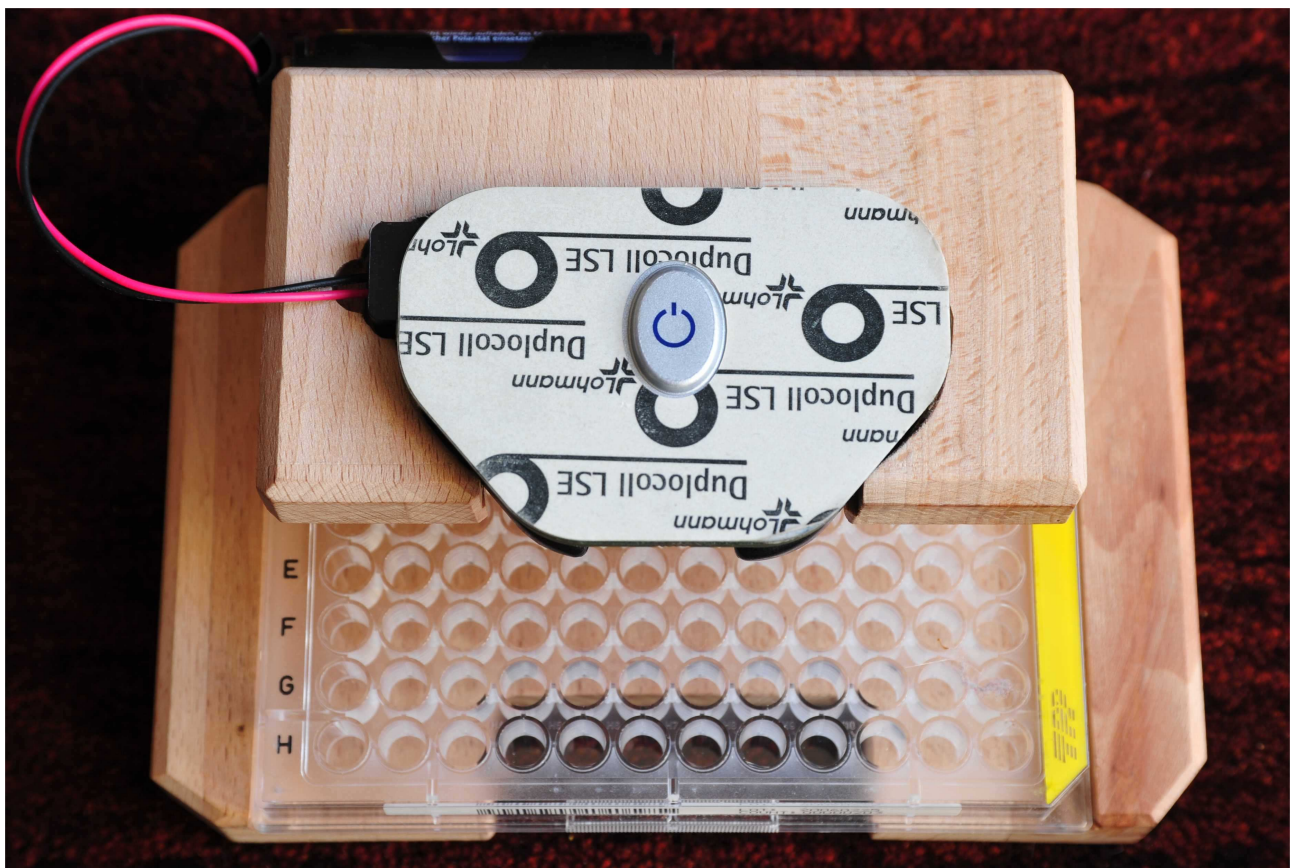


Abb. 1: Prototyp des verwendeten Thyreogymgerätes in der eigens von der RAYONEX GmbH gebauten Ständerkonstruktion zur Aufnahme einer 96-Loch-Kulturplatte. Nach der Abnahme des Deckels wurden die Zellen in den Vertiefungen der Kulturplatte für 30 min bei 37 °C im Brutschrank dem Magnetfeld ausgesetzt.

Testbericht

3 Versuchsdurchführung und Auswertung

In mehreren vororientierenden Tests mit Bindegewebsfibroblasten der Zelllinie L-929 (DSMZ), in denen unterschiedliche Kulturgefäße und Auswertungsparameter ausgetestet wurden, wurde das folgende endgültige Versuchsdesign für die standardisierte Untersuchung der Magnetfeldwirkungen auf die kultivierten Bindegewebsfibroblasten verwendet:

Die Zellen wurden in die Vertiefungen einer 96-Loch-Kulturplatte in einer Dichte von 20.000 Zellen/Vertiefungen in 200 µl Kulturmedium (RPMI 1640 mit 10 % fetalem Kälberserum und Penicillin/Streptomycin) ausgesät. Nach zweitägiger Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und Begasung mit 5 % CO₂ waren die Zellen in den Vertiefungen zu 70-80 % konfluent. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und durch 200 µl Phosphatpuffer mit Calcium und Magnesium (PBS+) ersetzt. Bei abgenommenem Deckel wurde die Kulturplatte in die Ständerkonstruktion des Thyreogymgerätes gesetzt und die Zellen im Brutschrank bei 37 °C für 30 min dem Magnetfeld ausgesetzt. Unmittelbar nach der Exposition wurden die Zellen durch 180 µl PBS+ mit 10 mM Glucose stimuliert. Der zelluläre Energiestoffwechsel mit seinen verschiedenen Redoxprozessen führt dabei zu einer Spaltung und damit auch einer Änderung der optischen Dichte des ebenfalls zum Ansatz zugegebenen wasserlöslichen Tetrazoliumfarbstoffes WST-1 (20 µl/Vertiefung; Roche Diagnostics, Mannheim). Je höher dabei die Stoffwechselaktivität der Zellen, desto stärker verändert sich die optische Dichte durch Spaltung des zugesetzten Farbstoffes. Die Änderung der optischen Dichte wurde im BioTek-Elisareader als Differenzmessung $\Delta OD = 450 - 690$ nm kontinuierlich für 120 min aufgezeichnet.

Durch lineare Regression der erhaltenen Kurvenzüge und Berechnung der mittleren Steigung (= mOD/min bei 20-60 min) wurden die Messdaten zwischen behandelten und unbehandelten Zellen zueinander in Beziehung gesetzt.

4 Versuchsergebnisse

Die Ergebnisse der einzelnen Versuche (V 712 bis V 714) sind in Tabelle 1 dargestellt. In allen Versuchen kam es durch das Magnetfeld zu einer deutlichen Stimulation des zellulären Energiestoffwechsels um maximal $40,3 \pm 5,9$ % und minimal $26 \pm 5,2$ %. Aus allen drei Versuchen ergibt sich eine mittlere und statistisch signifikante Stimulation der exponierten Zellen um 32 ± 8 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($p < 0,05$, Student's *t*-Test). Diese Steigerung des Energiestoffwechsels der Zellen ist sicherlich auf die Einwirkung des Magnetfeldes durch das Thyreogymgerät zurückzuführen, da die Kontrollzellen ohne Magnetfeld in der gleichen Kulturplatte keine Stimulation zeigten. Die Einwirkung eines Magnetfeldes stellt jedoch keinen zelltypspezifischen Stimulus dar, der ausschließlich für kultivierte Bindegewebszellen gilt. Daher muss von einer allgemeingültigen zellulären Wirkung ausgegangen werden.

Testbericht

Tab. 1: Darstellung der Messergebnisse der einzelnen Versuche zur Stimulation des Energiestoffwechsels kultivierter Bindegewebsfibroblasten durch das Magnetfeld.

Versuch 1 (V 712)

Probe	Einzelne Messwerte Steigung in mOD/min				Mittelwert	S.D.
120-140 nT	121	123	117	129	122,5	5,0
Kontrolle	97	95	98	99	97,3	1,7

Stimulation des zellulären Energiestoffwechsels in %

26

5,2

Versuch 2 (V 713)

Probe	Einzelne Messwerte Steigung in mOD/min				Mittelwert	S.D.
120-140 nT	119	114	118	126	119,3	5,0
Kontrolle	104	69	75	92	85	16,0

Stimulation des zellulären Energiestoffwechsels in %

40,3

5,9

Versuch 3 (V 714)

Probe	Einzelne Messwerte Steigung in mOD/min				Mittelwert	S.D.
120-140 nT	97	112	134	135	121,9	14,8
	124	142	113	118		
Kontrolle	85	100	97	90	94	5,6
	94	98				

Stimulation des zellulären Energiestoffwechsels in %

29,7

15,8