

24. prosince 2019

ZPRÁVA O PROVEDENÍ TESTOVÁNÍ

Testování účinků energetického čipu „e.chi“ s využitím orgánově specifických buněčných kultur

1 Kontext a zadání

Podle informací na domovské stránce rakouské společnosti GEONADO GmbH přenáší energetický čip e.chi, na který je pomocí biofyzikálních metod trvale nahrána informace, tyto vibrace na organismus, a posiluje tím imunitní systém a endogenní ochranu těla. Tato studie byla provedena za účelem zkoumání účinků čipu pomocí testovacích systémů *in vitro* s využitím orgánově specifických buněčných kultur. Zde použité testy byly již mnohokrát publikovány v recenzovaných (= předem experty posouzených) mezinárodních vědeckých časopisech a jsou ve vědeckém světě uznávány.

2 Předběžné testy s anonymizovanými čipy

Na začátku testování nám byly zaslány dva anonymizované čipy, abychom mohli v předběžném zkoumání porovnat účinky. Na jeden z čipů byly přitom nahrány informace, druhý žádné informace nenesl. Všechny předběžné testy ukázaly signifikantní rozdíl mezi těmito dvěma čipy. Po dotazu na společnost GEONADO bylo zjištěno, že čip s nahranými informacemi byl v porovnání s kontrolním vzorkem bez působení čipu a čipem bez nahraných informací tím, který měl výrazně lepší účinnost. Proto bylo rozhodnuto energetický čip e.chi prozkoumat podrobněji.

Již při předběžném testování se ukázalo, že krátkodobé experimenty trvající pouze několik hodin neukázaly žádný významný účinek čipu s nahranou informací. Teprve po minimálně 12 až 24 hodinách nepřetržité expozice jsme získali jednoznačné výsledky. Tento fakt byl zohledněn při dalším testování.

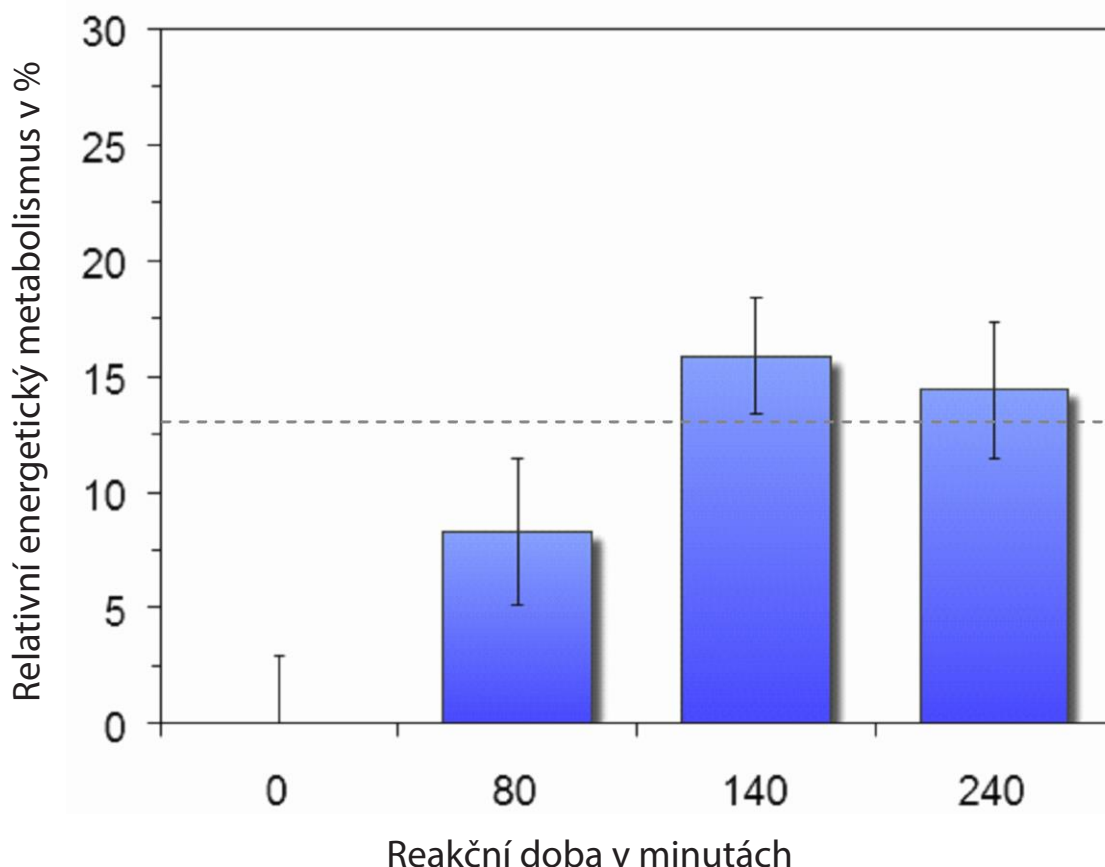
3 Testování s využitím fibroblastů pojivové tkáně

První série zde prezentovaného testování byla provedena s fibroblasty pojivové tkáně buněčné linie L-929 (ACC-1; Leibniz-Institut DSMZ – Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur, Braunschweig). Buňky byly použity v pasážích 80 až 88 a rutinně kultivovány v RPMI 1640 s 10 % růstového faktoru a 0,5 % gentamycinu v CO₂ inkubátoru při teplotě 37 °C ve vlhké atmosféře složené z 5 % CO₂ a 95 % vzduchu.

3.1 Bazální energetický metabolismus

Pro testování byly buňky z velkoobjemových kultur vysévány v hustotě 20.000 buněk na jednu jamku do 96jamkových kultivačních destiček (200 μ l kultivačního média na jamku) a inkubovány po dobu 24 hodin až do úplné adheze buněk a dosažení fáze normálního průběhu buněčného metabolismu. Poté byly buněčné kultury inkubovány po dalších 24 hodin v přímém kontaktu kultivační destičky s energetickým čipem a bez čipu. Kromě toho byly kultivační destičky s buňkami zabaleny do několika vrstev hliníkové fólie, aby se předešlo nežádoucímu vzájemnému ovlivňování. Poté bylo kultivační médium odsáto a nahrazeno reakční směsí fosfátového pufru s vápníkem a hořčíkem, 5 mM glukózy jako zdroje energie a tetrazoliovým barvivem WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim). Přitom je štěpení barviva přímo úměrné aktivitě energetického metabolismu buněk, tj. čím vyšší je energetický metabolismus, tím více se barvivo štěpí a tím silnější je změna jeho barvy. Pro vyhodnocení byla optická hustota (= barva) reakční směsi zaznamenávána jako měření rozdílu $\Delta OD = 450 - 690$ nm v různých časech po 80, 140 a 240 minutách ELISA readerem (BioTek SLx808 se softwarem Gen 5 verze 3.00), vyhodnocována pomocí programu MicrosoftExcel ve srovnání s počátečním časem $t = 0$ min a poté graficky znázorněna.

Jak ukazuje obr. 1, vedla 24hodinová expozice buněk energetickému čipu e.chi k významnému zvýšení energetického metabolismu o 12.6 ± 4.0 % (střední hodnota \pm směrodatná odchylka) v porovnání s kontrolním vzorkem neovlivněným čipem při 3 paralelně provedených testech ($p < 0.05$; Wilcoxon-Mann-Whitneyův test).



Obr. 1: Vliv energetického čipu e.chi na energetický metabolismus kultivovaných fibroblastů pojivové tkáně po 24hodinové expozici buněk s čipem podle různých reakčních dob při

enzymatickém měření. Kontrolní vzorek neovlivněný čipem je nastaven na hodnotu „0“. Přerušovaná čára ukazuje průměrnou stimulaci o $12,6 \pm 4,0$ %. Uvedena je střední hodnota \pm směrodatná odchylka 3 paralelně prováděných experimentů.

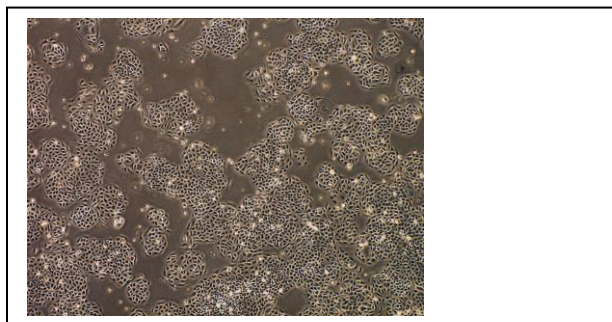
3.2 Buněčná vitalita/buněčná proliferace v „tenkých“ velkoobjemových kulturách

Buňky byly vysety ze subkonfluentních velkoobjemových kultur v hustotě 200.000 buněk na jednu láhev (růstová plocha 75 cm²) a inkubovány po 24 hodin, aby se dosáhlo adheze buněk a normálního buněčného metabolismu. Poté byly buněčné kultury inkubovány po dalších 6 dní v přímém kontaktu dna láhve s energetickým čipem nebo bez něj a zabalené do několika vrstev hliníkové fólie. Kultivační médium nebylo po celou dobu inkubace vyměněno.

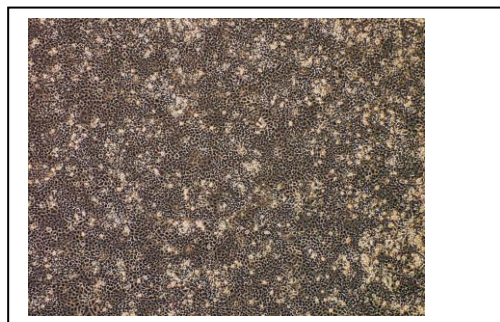
Po šesti dnech byly za účelem dokumentace nejprve pořízeny mikrosnímky růstové plochy kolonizované buňkami, poté byly buňky odděleny trypsinem/EDTA (30 minut při 37 °C) a byl zjištěn počet buněk a rozložení podle velikosti pomocí přístroje pro počítání a analýzu buněk (OLS-OMNI Life Science, Brémy, Německo). Toto zařízení kvantifikuje buňky a částice, které jsou nasávány přes 150 μ m měřicí kapiláru s aplikovaným elektrickým polem. Na základě velikosti a výsledné změny vodivosti je generován a zaznamenáván signál.

Jak ukazuje obr. 2, byla kolonizovaná růstová plocha kultivačních lahví mnohem větší v případě buněk, které byly po 6 dní v kontaktu s energetickým čipem, než u buněk neovlivněných čipem. Kontrolní vzorky bez působení čipu vykazovaly četné prostory bez buněk, zatímco buňky, které byly v kontaktu s čipem, byly konfluentní, tj. buňky se nacházely těsně u sebe po celé kultivační ploše. Zjištěný počet buněk tento obraz potvrdil. Láhve s buňkami neovlivněnými čipem vykazovaly počet buněk $8,3 \pm 1,5 \times 10^6$ buněk na jednu láhev (střední hodnota \pm směrodatná odchylka), zatímco počet buněk v kontaktu s čipem činil $13,0 \pm 1,8 \times 10^6$ buněk na jednu láhev (střední hodnota \pm směrodatná odchylka). Statisticky byl tedy počet buněk u vzorků ovlivněných čipem významně vyšší o $56,6 \pm 15,6$ % ($p < 0.05$, Wilcoxon-Mann-Whitneyův test). Energetický čip e.chi neměl vliv na průměrnou velikost buněk, ale způsobil výrazně ostřejší Gaussovo rozložení (obr. 3).

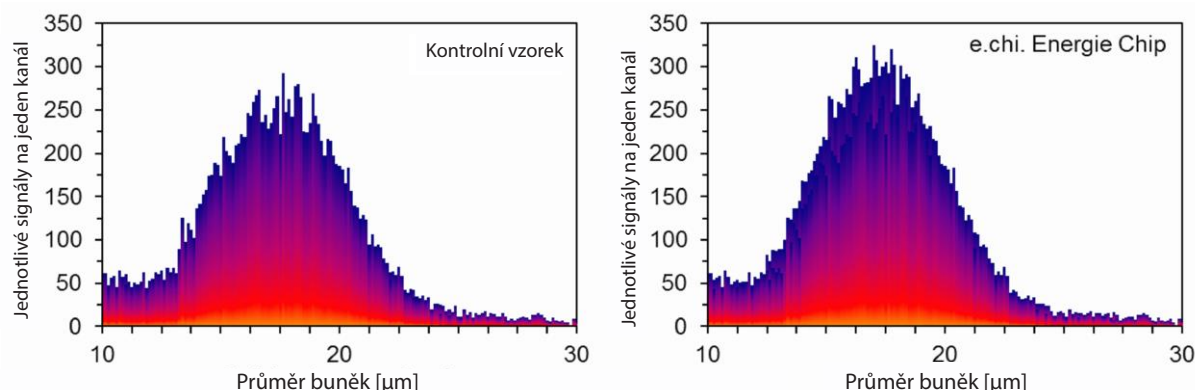
Kontrolní vzorek



Energetický čip e-chi



Obr. 2: Mikrosnímky ukazující rozdíl mezi kolonizací povrchu po 6 dnech mezi kontrolním vzorkem nevystaveným působení čipu (vlevo) a buněčnou kulturou s energetickým čipem (vpravo). Inverzní mikroskop Olympus IX-50 s planachromatickým objektivem Olympus Planachromat 10x a digitálním fotoaparátem Olympus E-10 s rozlišením 4 megapixely ve fázovém kontrastu.



Obr. 3: Rozložení velikosti buněk a počet buněk u kontrolního vzorku bez čipu (vlevo) a buněčné kultury s energetickým čipem (vpravo) po šesti dnech. Stanovení bylo provedeno pomocí přístroje CASY pro počítání a analýzu buněk.

3.3 Buněčná regenerace / hojení ran

Zlepšení metabolismu buněk pojivové tkáně je zpravidla spojeno s podporou regenerace buněk/hojení ran. Tento proces se vyznačuje mimo jiné tím, že dochází k migraci a proliferaci buněk, které vyplňují defekty. Převládajícím typem buněk jsou zde fibroblasty z okolní tkáně a intaktní tkáně pod defektem.

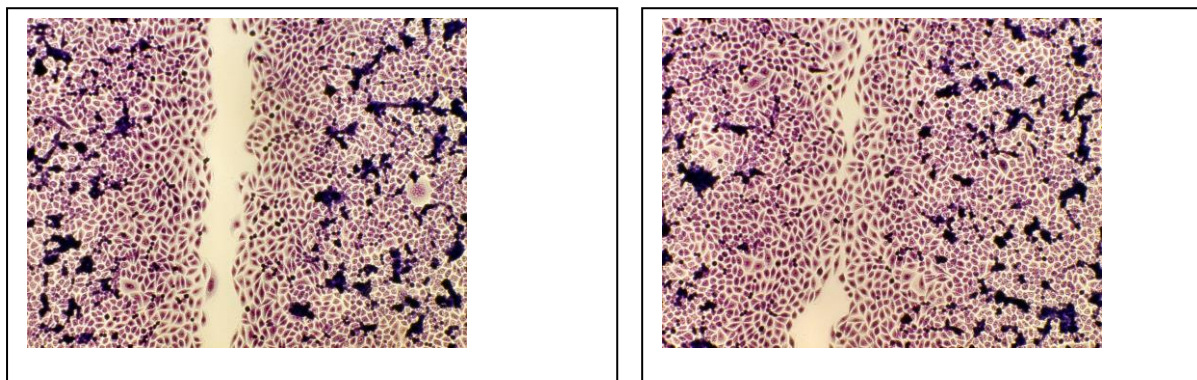
Aby bylo možno zjistit, zda energetický čip může podpořit rovněž regeneraci buněk/hojení ran, byly buňky vysety v hustotě 50.000 buněk/ml do tří oddílů tzv. kultivačních insertů se třemi jamkami ze silikonu (ibidi, Mnichov). Oddíly insertů byly navzájem odděleny 500 µm silným silikonovým proužkem a na vnější straně jsou ohraničeny 700 µm silným silikonovým rámečkem. Díky speciální adhezní části je insert přichycen na dně kultivační misky a později tak vytvoří jasně ohraničenou oblast bez buněk.

Fibroblasty pojivové tkáně vyšeté do jednotlivých oddílů byly kultivovány s energetickým čipem e.chi a bez něj po 24 hodin, dokud nevznikl silný buněčný porost, a potom byly silikonové rámečky odstraněny. Buňky se začaly šířit do volného prostoru a zde se dělily. Po uplynutí dalších 20 hodin s energetickým čipem a bez něj byly buňky fixovány metanolem a obarveny roztokem Giemsovy azur-eosin-metylenové modří (Merck, Darmstadt) a byl změřen zbývající prostor bez buněk.

Kultury bez působení čipu vykazovaly po 20 hodinách ještě zřetelně rozeznatelný prostor bez buněk/umělou ránu, zatímco u kultur vystavených působení čipu byl tento prostor téměř uzavřený (obr. 4). Šířka zbylého prostoru bez buněk činila $28,5 \pm 8,7 \mu\text{m}$ pro kultury s čipem a $80,0 \pm 7,7 \mu\text{m}$ pro kultury bez čipu (střední hodnota \pm směrodatná odchylka při 3 paralelně prováděných experimentech). Tento rozdíl byl pro obě testovací řady statisticky významný ($p < 0.05$, Wilcoxon-Mann-Whitneyův test) a dokumentuje podporu regenerace buněk použitím energetického čipu e.chi.

Kontrolní vzorek

Energetický čip e.chi



Obr. 4: Reprezentativní mikrosnímky obarvených buněčných kultur ukazující regeneraci a uzavření rány u kontrolního vzorku bez působení energetického čipu (vlevo) a kultury s energetickým čipem (vpravo). Je dobře rozpoznatelné, že prostor bez buněk je u energetického čipu téměř uzavřený, zatímco u kultury bez působení energetického čipu je stále zřetelně viditelný. Inverzní mikroskop Olympus IX-50 s planachromatickým objektivem Olympus Planachromat 10x a digitálním fotoaparátem Olympus E-10 s rozlišením 4 megapixely v jasném poli.

4 Testování s využitím funkčních neutrofilů

Druhá série testování byla provedena s lidskými promyelocyty (buněčná linie HL-60; ACC-3; ECACC 98070106; Leibniz-Institut DSMZ – Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur, Braunschweig). Buňky byly rutinně kultivovány jako velkoobjemové kultury v suspenzi v kultivačním médiu RPMI 1640 s 10 % růstového faktoru a 0,5 % gentamycinu a inkubovány v inkubátoru při 37 °C a ve vlhké atmosféře skládající se z 5 % CO₂ a 95 % vzduchu. Kultivací po 5 až 7 dní s 1,5 % dimethylsulfoxidu se buňky HL-60 diferencovaly na funkční neutrofil, které pak mají typické vlastnosti fagocytů (= buňky pohlcující pevné částice z okolního prostředí) a mohou pomocí oxidačního vzplanutí ničit mikrobiální patogeny (= původce chorob). Aktivace funkčních neutrofilů může vést *in vivo* ke zvýšené obranyschopnosti krve proti vniknutí cizorodých zárodků.

Velkoobjemové kultury buněk HL-60 byly během posledních dvou dnů diferenciaci kultivovány s energetickým čipem e.chi a bez něj. Po několika krocích promytí a centrifugace pro získání suspenze s vysokou hustotou buněk byl zaznamenán energetický metabolismus štěpením tetrazoliového barviva, jak již bylo popsáno pro bazální energetický metabolismus fibroblastů pojivové tkáně. Jelikož jsou však buňky HL-60 výrazně metabolicky aktivnější než adherentní fibroblasty, nečinila maximální reakční doba několik hodin, ale pouze 30 minut.

Výsledky testu ukázaly výraznou aktivaci buněk vystavených působení čipu o 38,0 ± 4,8 % (střední hodnota ± směrodatná odchylka ve 4 paralelně prováděných experimentech) v porovnání s kontrolními buňkami, které nebyly ovlivněny čipem. Tato aktivace byla statisticky významná ($p < 0.05$, Wilcoxon-Mann-Whitneyův test) a dokumentuje zvýšenou obrannou reakci v krvi proti proniknutí cizorodých zárodků.

5 Shrnutí a závěry

Pomocí různých testů *in vitro* s kultivovanými orgánově specifickými buňkami byly zkoumány účinky energetického čipu e.chi rakouské společnosti GEONADO GmbH. Použité testovací metody byly již mnohokrát popsány a akceptovány v mezinárodní vědecké literatuře. Krátkodobé experimenty s reakční dobou pouhých několika hodin neodhalily žádné významné rozdíly mezi kontrolními vzorky a buňkami vystavenými působení čipu. Teprve po uplynutí minimálně 12 až 24 hodin bylo u buněk ovlivněných čipem dosaženo jednoznačných výsledků. Konkrétně měl energetický čip e.chi při provedených testech níže uvedené vlastnosti:

- 1 24hodinové vystavení fibroblastů pojivové tkáně působení energetického čipu e.chi způsobilo aktivaci energetického metabolismu o $12,6 \pm 4,0$ % v porovnání s kontrolním vzorkem, který nebyl ovlivněn čipem.
- 2 Velkoobjemové kultury fibroblastů pojivové tkáně vyšetě v tenké vrstvě měly pod vlivem energetického čipu po 6 dnech zřetelně vyšší počet buněk než kontrolní vzorky neovlivněné čipem. Rozdíl činil $56,6 \pm 15,6$ %.
- 3 V testu buněčné regenerace / hojení ran s fibroblasty pojivové tkáně měly buňky vystavené působení energetického čipu po 20 hodinách šířku rány pouze $28,5 \pm 8,7$ μm ; u kontrolního vzorku to bylo ještě $80,0 \pm 7,7$ μm .
- 4 Při inkubaci funkčních neutrofilů v posledních 48 hodinách procesu diferenciaci s energetickým čipem e.chi došlo k významné aktivaci růstu buněk od $38,0 \pm 4,8$ % v porovnání s kontrolními buňkami neovlivněnými čipem. Tento výsledek dokumentuje zlepšení primární obranyschopnosti krve proti vniknutí cizorodých zárodků (= mikrobiálních patogenů).

Souhrnně tyto výsledky ukazují, že energetický čip e.chi působí jako energetický stimulator na buněčné úrovni a může výrazně přispět ke zkrácení regenerační doby těla, zlepšení vitality buněk a udržení celkové pohody.



Prof. dr. Peter C. Dartsch
diplomovaný biochemik