

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

Evodrop AG
c/o Fabio Hüther
Birkenstrasse 21

CH - 8306 Brüttsellen, Schweiz

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

30. Mai 2024

TESTBERICHT

Förderliche Wirkeffekte von „Apfelsäurewasser“ auf zellulärer Ebene

1 Hintergrund

Das Schweizer Unternehmen Evodrop hat für die Bekämpfung von Kalk und zur Verbesserung der Trinkwasserqualität eine Technologie entwickelt, welche die im Wasser enthaltenen chemischen Verbindungen auflöst, die sich normalerweise ablagern. Dies geschieht durch die Verwendung von einer Apfelsäuregranulat-Kartusche in den entsprechenden Filtersystemen. Apfelsäure ist geschmacklos, hat keine negativen Auswirkungen auf den Organismus und ist lt. FDA-Zertifizierung lebensmittelkonform.

In der vorliegenden Studie wurde mit zellbiologischen Methoden untersucht, ob Wasser nach dem Durchgang durch das Filtersystem mit der Apfelsäuregranulat-Kartusche zusätzlich förderliche Wirkeffekte besitzt, welche das Ausgangswasser nicht hat. Insbesondere oxidativer Stress kann die Integrität und Funktion der Darmwand massiv schädigen. Zudem können Entzündungsprozesse angetriggert und in Gang gehalten werden.

2 Untersuchte Wasserproben

Wir haben zwei verschiedene Wasserproben untersucht, die uns von der Firma Evodrop zugeschickt worden waren: (1) Normales örtliches Leitungswasser (= Ausgangswasser; abgekürzt LW) und (2) dieses Leitungswasser nach Durchlauf durch das Filtersystem mit der Apfelsäuregranulat-Kartusche (abgekürzt LWA). Diese Abkürzungen der Proben werden der Einfachheit halber in den nachfolgenden Ausführungen beibehalten.

3 Verwendete Zellkulturen

3.1 Darmepithelzellen

Da Wasser nach dem Trinken zunächst in den Magen-Darm-Trakt gelangt, haben wir kultivierte Darmepithelzellen vom Schwein (Zelllinie IPEC-J2) verwendet. Die Zellen wurden routinemäßig als adhärenente Massenkulturen in einem Kulturmedium (DMEM/Ham's F12 1:1 mit 10 % Wachstumsgemisch und Standardmengen an Gentamycin) in einem Bega-

sungsbrutschrank bei 5 % CO₂ und 95 % Luft, 37 °C und nahezu 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert und regelmäßig zweimal pro Woche subkultiviert. Es wurde diese Zelllinie ausgewählt, weil „die IPEC-J2-Zelllinie einzigartig ist, da sie aus dem Dünndarm stammt und weder transformiert noch tumorerzeugend Natur ist. Die IPEC-J2-Zellen ahmen die menschliche Physiologie besser nach als jede andere Zelllinie nichtmenschlichen Ursprungs“ [1,2]. So können die Zellen auch unter entsprechenden Kulturbedingungen eine epitheliale Darmwandbarriere mit hoher Integrität, d.h. einem hohen transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) aufgrund der „tight junctions“ als Zell-Zell-Verbindungen, ausbilden.

- 1 Vergauwen H (2015). The IPEC-J2 cell line. In: Verhoeckx K. et al. (eds) The Impact of Food Bioactives on Health. Springer, Cham, pp. 125-134.
- 2 Schierack P, Nordhoff M, Pollmann M, Weyrauch KD, Amasheh S, Lodemann U, Jores J, Tachu B, Kleta S, Blikslager A, Tedin K, Wieler LH (2006). Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochem Cell Biol* 125:293–305.

3.2 Entzündungsvermittelnde Zellen (funktionale Neutrophile)

Als entzündungsvermittelnde Zellen wurden Promyelozyten des Menschen (Zelllinie HL-60) verwendet. Diese Zellen wachsen nicht adhärent, sondern schwimmen im Kulturmedium. Die Zellen wurden daher routinemäßig als Suspensions-Massenkulturen in einem Kulturmedium (RPMI 1640 mit 10 % Wachstumsgemisch und Standardmengen an Gentamycin) in einem Begasungsbrutschrank unter den o.g. Bedingungen inkubiert und regelmäßig zweimal pro Woche subkultiviert.

Durch Zugabe von 1,5 % Dimethylsulfoxid zum Kulturmedium wurden die Zellen über einen Zeitraum von 5-6 Tagen in sog. „funktionale Neutrophile“ differenziert, welche nach Stimulation durch einen Phorbol ester in der Lage sind, im Verlauf eines oxidativen Burst Superoxidanion-Radikale zu bilden [3,4]. Die Hauptaufgabe dieser Zellen als Teil der angeborenen Immunabwehr besteht darin, mikrobielle Pathogene im Blut aufzuspüren und die durch die Radikalbildung abgetöteten Keime mittels Phagozytose zu entfernen [5]. Neutrophile werden aber auch durch spezifische Chemokine und Zytokine, welche durch Entzündungen im Gewebe gebildet werden, angelockt und wandern vom Blut in das Gewebe ein. Dort können sie reaktive Sauerstoffradikale bilden und einen entzündlichen Prozess in Gang halten [6,7]. In der Folge kann es zu weiteren unerwünschten Gewebezerstörungen und verzögerter Wundheilung kommen.

- 3 Tan AS, Berridge MV (2000). Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt WST-1 to produce a soluble formazan: a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents. *J Immunol Meth* 238: 59-68.
- 4 Dartsch PC (2006). TIiOS – a sensitive and cell-based test assay for the screening of biologically active substances for their antioxidant potential. *Innov Food Technol* 32: 72-75.
- 5 Nathan C (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6: 173-182.
- 6 Mortaz E, Alipoor SD, Adcock IM, Mumby S, Koenderman L (2018). Update on neutrophil function in severe inflammation. *Front Immunol* 9: 2171.
- 7 Selders GS, Fetz AE, Radic MZ, Bowlin GL (2017). An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regenerat Biomater* 4: 55-68.

4 Durchgeführte Untersuchungen und Ergebnisse

4.1 Regeneration der Darmepithelzellen

Für die Untersuchung der Zellregeneration wurden die Darmepithelzellen in einer Dichte von 100.000 Zellen/ml in die vier Kompartimente eines Silikonrahmens (4 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 definierten 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 entfernt. So wurde ein scharfer Zellrand zwischen den vier Kompartimenten des Rahmens erhalten.

Direkt nach dem Entfernen des Silikonrahmens wurden dem Kulturmedium der Zellkulturen die beiden verschiedenen Wasserproben so zugesetzt, dass eine Konzentration von 25 Vol% erreicht wurde. Nach der weiteren Inkubation im Brutschrank für 8 Stunden wurden die Zellen mit Phosphatpuffer gewaschen und danach fixiert und angefärbt. Die Fläche des noch verbliebenen zellfreien Bereiches wurde am Mikroskop an mindestens 4 Stellen pro Zellkultur dokumentiert und durch eine Software mit künstlicher Intelligenz (Iksa AI, KML Vision, Graz, Österreich) ausgewertet.

Ergebnis: Wie in Abb. 1 dargestellt, wurde die Regeneration der Darmepithelzellen durch das LWA im Vergleich zum Ausgangswasser deutlich stimuliert, d.h. die zellfreie Fläche war geringer. So betrug für das LW die verbliebene zellfreie Fläche $17,3 \pm 1,7$ % der Gesamtfläche (Mittelwert \pm Standardabweichung) und für das LWA nur $10,5 \pm 3,0$ % (Mittelwert \pm Standardabweichung). Diese Flächenreduktion war statistisch signifikant ($p \leq 0,05$).

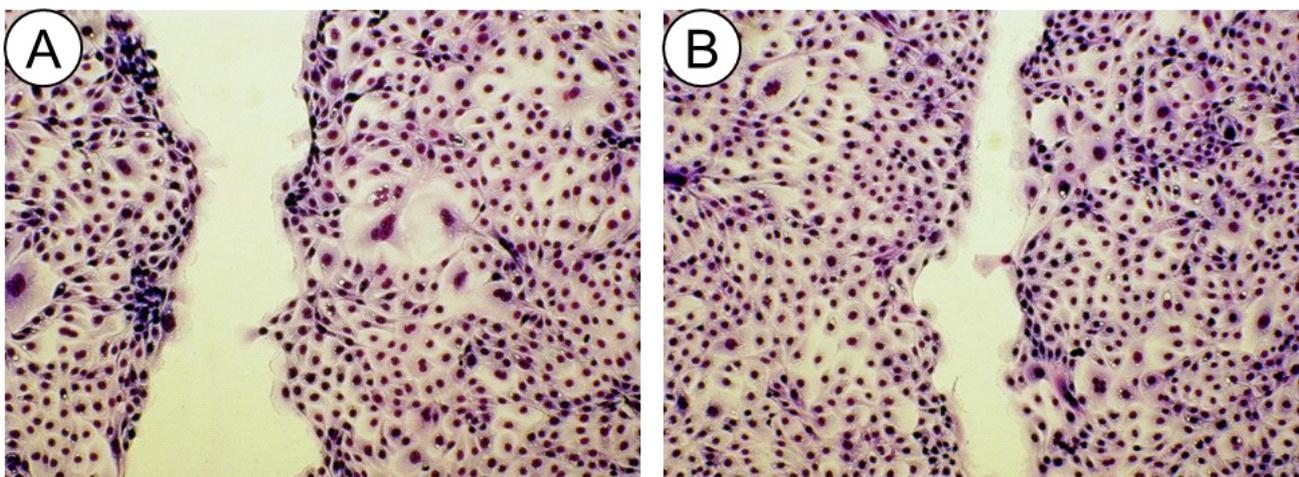


Abb. 1: Mikrofotografische Dokumentation der Regeneration von Darmepithelzellen nach 8 Stunden. (A) Unbehandelte Kontrollkultur mit 25 Vol% Leitungswasser. (B) Zellkultur, welche mit 25 Vol% des nach dem Durchgang durch das Filtersystem mit der Apfelsäuregranulat-Kartusche erhaltenen Wassers versetzt war. Der Unterschied in der besiedelten Fläche ist deutlich erkennbar.

4.2 Integrität der Darmwandbarriere

Die Darmepithelzellen wurden in einer Dichte von 200.000 Zellen/ml in das obere Kompartiment von sog. Transwells (Corning Transwells, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) ausgesät. Dies sind Einsätze, die unten durch eine Membran mit 0,4 µm großen Löchern verschlossen sind und in die Kulturschale eingehängt werden (Abb. 2). So entstehen in der Kulturschale zwei Kompartimente, welche durch die Membran und die darauf wachsenden Epithelzellen als Darmwandbarriere voneinander getrennt sind. Dabei entspricht das obere Kompartiment dem Darmlumen und das untere dem Blut.



Abb. 2: Transwell-Zellkultureinsatz der Firma Corning. Die weiße Fläche ist die mikroporöse Membran, welche nach dem Einhängen in eine Kulturschale später die beiden Kompartimente voneinander trennt. Auf diese Membran werden auch die Darmepithelzellen ausgesät, welche später eine Barriere bilden.

Die im oberen Kompartiment ausgesäten Zellen bilden durch die „tight junctions“ nach wenigen Tagen eine zelluläre Darmwandbarriere, welche nur noch selektiv Stoffe vom oberen ins untere Kompartiment durchlässt. Dies ist in vivo sehr wichtig, damit keine unerwünschten Stoffe aus dem Nahrungsbrei im Darm ins Blut gelangen können.

Die Zellen wurden 4 Tage lang mit Kulturmedium inkubiert, welches jeweils 25 Vol% LW bzw. LWA enthielt. Danach wurde über zwei Elektroden der transepitheliale elektrische Widerstand zwischen dem oberen und unteren Kompartiment (TEER) mit einem speziellen Voltmeter (Millicell ERS-2 Voltmeter, Millipore/Merck, Darmstadt; Deutschland) gemessen. Je höher der TEER, desto besser ist die Integrität der Darmwandbarriere.

Ergebnis: Die Zellschichten, welche mit LW inkubiert worden waren, zeigten einen TEER von $1.522 \pm 111 \Omega/\text{cm}^2$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) und die mit LWA inkubierten Zellen einen TEER von $4.183 \pm 495 \Omega/\text{cm}^2$ (Mittelwert \pm Standardabweichung), d.h. die Darmwandintegrität wurde durch das LWA um mehr als das 2,5-fache gesteigert. Diese Steigerung war statistisch hochsignifikant ($p \leq 0,01$).

4.3 Entzündungshemmende Wirkung mit funktionalen Neutrophilen

Für die Untersuchung der endogenen Radikalbildung wurden die Zellen nach ihrer 6-tägigen Differenzierung zu funktionalen Neutrophilen nach Zentrifugation und mehrmaligem Waschen in Phosphatpuffer durch Zugabe eines Phorbolesters in einem Reaktionsgemisch dazu angeregt, Superoxidanion-Radikale zu bilden. Die Radikale führten dabei zu

einer Spaltung eines ebenfalls dem Versuchsansatz zugesetzten Tetrazoliumfarbstoffes WST-1 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland). Dabei war die Menge der gebildeten Sauerstoffradikale direkt proportional zur Farbstoffspaltung, d. h. je mehr reaktive Radikale vorhanden waren, desto stärker war die Farbstoffspaltung und damit auch die Änderung der optischen Dichte (= Farbe). Wurden die von den Zellen gebildeten Radikale durch die Wasserprobe inaktiviert, so veränderte sich die optische Dichte weniger stark.

Von den beiden Testwässern betrug die Konzentration im Reaktionsgemisch 0 - 10 - 20 - 40 Vol%. Die Änderung der optischen Dichte wurde als Differenzmessung $\Delta OD = 450$ minus 690 nm zu definierten Zeitpunkten mit einem Elisareader (BioTEK Elx 808 mit Software Gen 5 Version 3.00) gemessen und mit Microsoft Excel ausgewertet.

Ergebnis: Sowohl das LW als auch das LWA bewirkten eine konzentrationsabhängige Reduktion der endogenen Radikalbildung im oxidativen Burst. Dennoch war die Reduktion der Radikalbildung, und damit auch die entzündungshemmende Wirkung, bei einer Konzentration von 40 Vol% beim LWA um $22 \pm 4,7$ % (Mittelwert \pm Standardabweichung) besser als beim LW. Bereits bei 10 Vol% reduzierte das LWA im Vergleich zum LW die Radikalbildung durch die Zellen um $15,2 \pm 6,6$ % (Mittelwert \pm Standardabweichung).

5 Schlussfolgerungen

Die von uns durchgeführten Untersuchungen mit Zellkulturen haben unter Beweis gestellt, dass auf zellulärer Ebene das Leitungswasser nach dem Durchgang durch das Filtersystem mit der Apfelsäuregranulat-Kartusche der Firma Evodrop AG eine erhebliche Qualitätsverbesserung erfahren hat. Dies zeigte sich bei Darmepithelzellen durch die signifikante Steigerung von Regeneration und Integrität der Darmwandbarriere und bei entzündungsvermittelnden Zellen durch die Reduktion der Radikalbildung. Somit kann das „Apfelsäurewasser“ zu einer verbesserten Darmgesundheit und in der Folge zu einem verbesserten Wohlbefinden beitragen.

Verantwortlich für die fachgerechte Versuchsdurchführung sowie den Testbericht.



Prof. Dr. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemiker