

MMD GmbH & Co KG

Einfluss von Klein`sche Felder Magnetstreifen auf Mitochondrienfunktionen

Voruntersuchung mit differenzierten THP-1 Zellen

INHALT

Differenzierte THP-1 Zellen	4
Fragestellung	4
Methodik	4
ZUSAMMENFASSUNG	4
Aktivität Mitochondrialer Dehydrogenasen (MTT-Test)	5
Mitochondriale ATP Generierung	8
Mitochondrienmasse	10
Mitochondriales Membranpotential.....	12

Abbildung 1: Einfluss der Klein`sche Felder Magnetstreifen auf die mitochondrialen Dehydrogenasen in THP-1 Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden. Dargestellt ist die Absolutwerte von 4 separaten Analysen und dem Mittelwert.....	5
Abbildung 2: Einfluss der Klein`sche Felder Magnetstreifen auf die mitochondrialen Dehydrogenasen in THP-1 Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und anschließender Stimulation mit H ₂ O ₂ für 24h. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 separaten Analysen.....	6
Abbildung 3: Einfluss der Klein`sche Felder Magnetstreifen auf die mitochondrialen Dehydrogenasen in PBMC nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und anschließender Stimulation mit Valinomycin für 24h. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 separaten Analysen.	6
Abbildung 4: Einfluss der Klein`sche Felder Magnetstreifen auf die mitochondrialen Dehydrogenasen in PBMC nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und anschließender Stimulation mit LPS für 24h. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 separaten Analysen.....	7
Abbildung 5: Einfluss der Klein`sche Felder Magnetstreifen auf die mitochondrialen ATP Generierung in PBMC nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und anschließender Stimulation mit H ₂ O ₂ für 24h. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 separaten Analysen.	8
Abbildung 6: Einfluss der Klein`sche Felder Magnetstreifen auf die mitochondrialen ATP Generierung in PBMC nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und anschließender Stimulation mit Valinomycin für 24h. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 separaten Analysen.....	9
Abbildung 7: Einfluss der Klein`sche Felder Magnetstreifen auf die mitochondrialen ATP Generierung in PBMC nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und anschließender Stimulation mit LPS für 24h. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 separaten Analysen.....	9
Abbildung 8: Einfluss der Klein`sche Felder Magnetstreifen auf die Mitochondrienmasse in PBMC nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und anschließender Stimulation mit H ₂ O ₂ für 24h. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 separaten Analysen.....	10
Abbildung 9: Einfluss der Klein`sche Felder Magnetstreifen auf die Mitochondrienmasse in PBMC nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und anschließender Stimulation mit Valinomycin für 24h. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 separaten Analysen.....	11
Abbildung 10: Einfluss der Klein`sche Felder Magnetstreifen auf die Mitochondrienmasse in PBMC nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und anschließender Stimulation mit LPS für 24h. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 separaten Analysen.....	11
Abbildung 11: Einfluss der Klein`sche Felder Magnetstreifen auf das mitochondriale Membranpotential in PBMC nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und anschließender Stimulation mit H ₂ O ₂ für 24h. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 separaten Analysen.....	12
Abbildung 12: Einfluss der Klein`sche Felder Magnetstreifen auf das mitochondriale Membranpotential in PBMC nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und anschließender Stimulation mit Valinomycin für 24h. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 separaten Analysen.	13
Abbildung 13: Einfluss der Klein`sche Felder Magnetstreifen auf das mitochondriale Membranpotential in PBMC nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen und anschließender Stimulation mit LPS für 24h. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 separaten Analysen.	13

DIFFERENZIERTE THP-1 ZELLEN

FRAGESTELLUNG

Die Verwendung von Klein`sche Felder Magnetstreifen in der therapeutischen Anwendung hat Verbesserungen des klinischen Krankheitsbildes gebracht. Der Mechanismus ist nicht gänzlich bekannt, eine direkte und/oder indirekte Wirkung auf die Mitochondrienfunktionen ist anzunehmen. Daher sollte in einer in-vitro Pilotstudie überprüft werden ob die Anwendung von Klein`sche Magnetstreifen zentrale Mitochondrienfunktionen beeinflusst.

METHODIK

Es wurden zunächst mit PMA-differenzierte THP-1-Zellen verwendet. Die vorbehandelten THP-1-Zellen wurden in zwei Aliquots geteilt. Jedes Aliquot wurde entweder in der Abwesenheit oder Anwesenheit von Klein`sche Felder Magnetstreifen bei 37°C unter 5% CO₂ inkubiert. Die Kultivierung in An- bzw. Abwesenheit der Klein`sche Felder Magnetstreifen erfolgte für 24 Stunden. Nach der Inkubationszeit wurden die THP-1-Zellen der entsprechenden Aliquots entweder mit H₂O₂, mit Valinomycin (verursacht Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials), oder mit Lipopolysaccharid von *Escherichia coli* (LPS) führt konzentrationsabhängig zur Mitochondrienschädigung) für weitere 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Analyse der Aktivitäten von mitochondrialen Dehydrogenasen, des mitochondrial generierten ATP, des mitochondrialen Membranpotentials und der Mitochondrienmasse. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt.

ZUSAMMENFASSUNG

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dass die Anwesenheit von Klein`sche Felder Magnetstreifen die Mitochondrien resistenter gegenüber Stressoren macht. Insbesondere die mitochondriale ATP Generierung wird durch die Anwesenheit der Klein`schen Felder Magnetstreifen prinzipiell gesteigert und bleibt auch nach Zugabe von Stressoren signifikant höher im Vergleich zu PMA differenzierten THP-1-Zellen in der Abwesenheit der Klein`schen Felder Magnetstreifen .

AKTIVITÄT MITOCHONDRIALER DEHYDROGENASEN (MTT-TEST)

Zunächst ist der Einfluss der Klein`sche Felder Magnetstreifen auf die Aktivität der mitochondrialen Enzyme nach 24 Stunden Kultivierung analysiert. Die Aktivität der mitochondrialen Enzyme nach dieser Inkubationsperiode ist in Abbildung 1 dargestellt. Die in Ab- bzw. Anwesenheit von Klein`sche Felder Magnetstreifen kultivierten THP-1 Zellen wurden entweder mit H_2O_2 , mit Valinomycin oder mit LPS für 24 Stunden stimuliert. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 2 bis 4 nachfolgend dargestellt.

INSGESAMT ZEIGT SICH, DASS DIE KULTIVIERUNG VON DIFFERENZIIERTEN THP-1 ZELLEN IN GEGENWART DER KLEIN`SCHE FELDER MAGNETSTREIFEN DIE MITOCHONDRIALEN ENZYME AKTIVIERT UND SCHÄDIGENDEN AGENZIEN SO ENTGEGEN GEWIRKT WIRD.

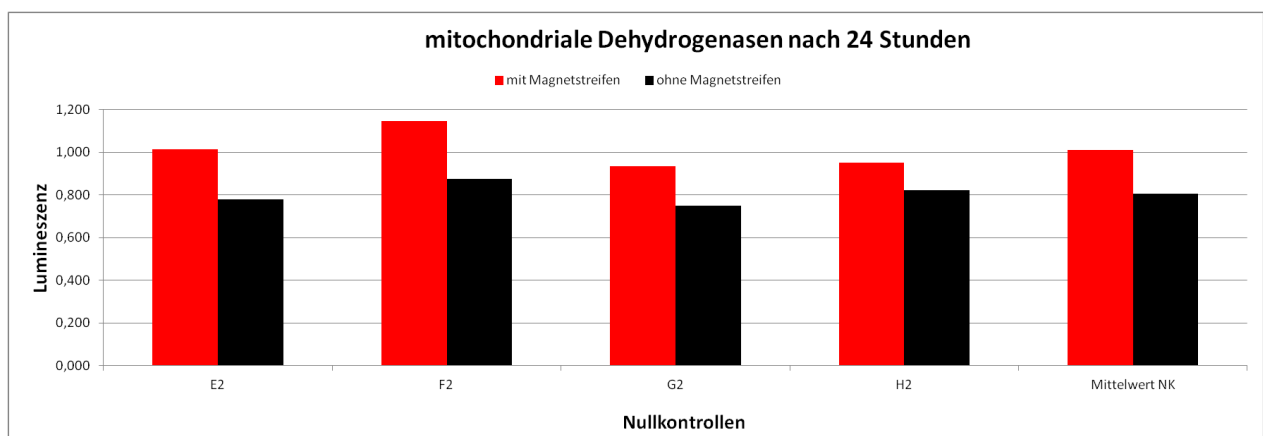


Abbildung 1: Einfluss der Klein`sche Felder Magnetstreifen auf die mitochondrialen Dehydrogenasen in THP-1 Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden. Dargestellt ist die Absolutwerte von 4 separaten Analysen und dem Mittelwert.

Nach 24 Stunden Kultivierung der Zellen mit den Klein`sche Felder Magnetstreifen erhöhten sich die Enzymaktivitäten mitochondrialer Enzyme um circa 20%.

NACH STIMULATION MIT H_2O_2

Die vorherige Kultivierung der THP-1 Zellen in Anwesenheit der Klein`sche Felder Magnetstreifen für 24 Stunden erhöht die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen um mindestens 20% nach Stimulation mit H_2O_2 im Vergleich zur Kultivierung in Abwesenheit der Klein`sche Felder Magnetstreifen.

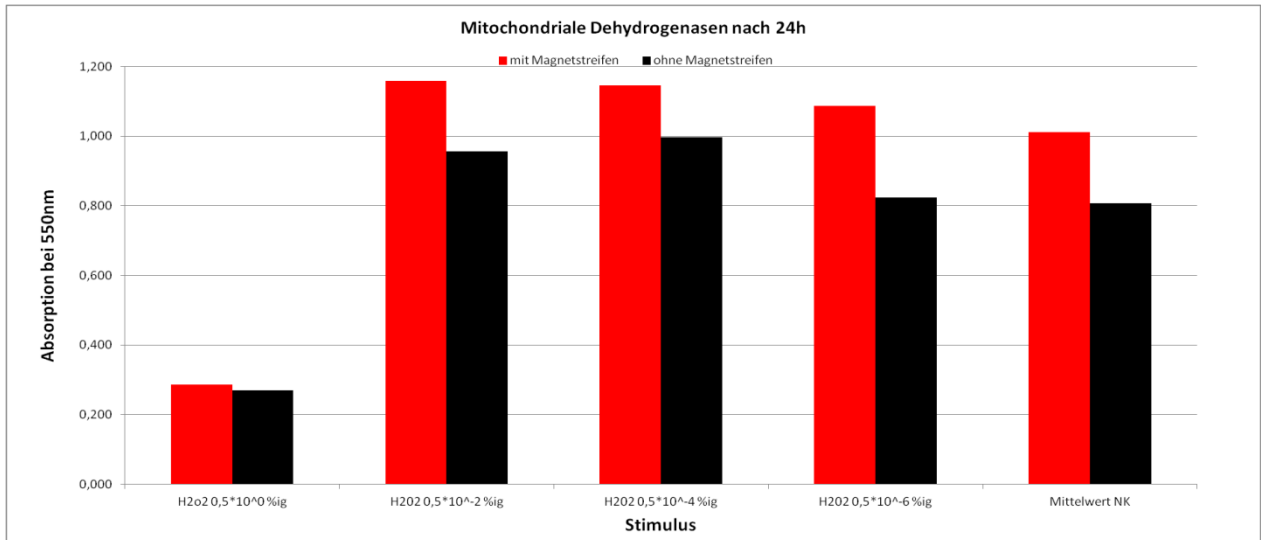


Abbildung 2: Einfluss der Klein'sche Felder Magnetstreifen auf die mitochondrialen Dehydrogenasen in THP-1 Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und anschließender Stimulation mit H2O2 für 24h. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 separaten Analysen.

NACH STIMULATION MIT VALINOMYCIN

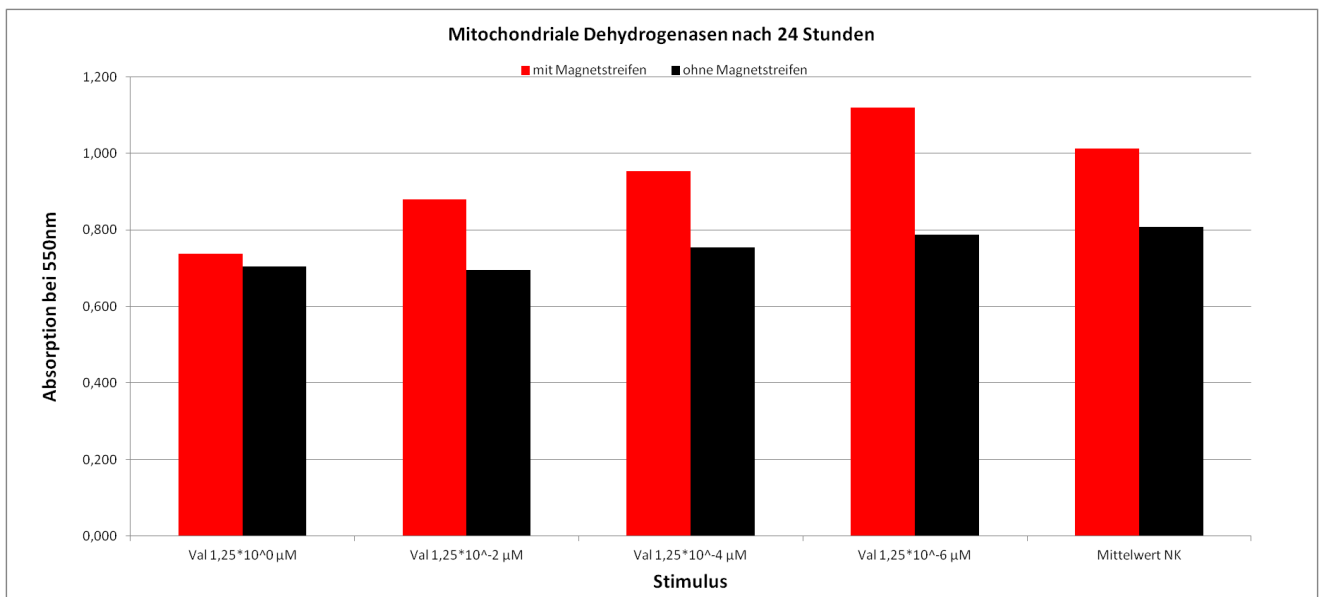


Abbildung 3: Einfluss der Klein'sche Felder Magnetstreifen auf die mitochondrialen Dehydrogenasen in PBMC nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und anschließender Stimulation mit Valinomycin für 24h. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 separaten Analysen.

Die vorherige Kultivierung der THP-1 Zellen in Anwesenheit der Klein'sche Felder Magnetstreifen für 24 Stunden erhöht die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen um mindestens 30% nach Stimulation mit Valinomycin im Vergleich zur Kultivierung in Abwesenheit der Klein'sche Felder Magnetstreifen.

NACH STIMULATION MIT LPS

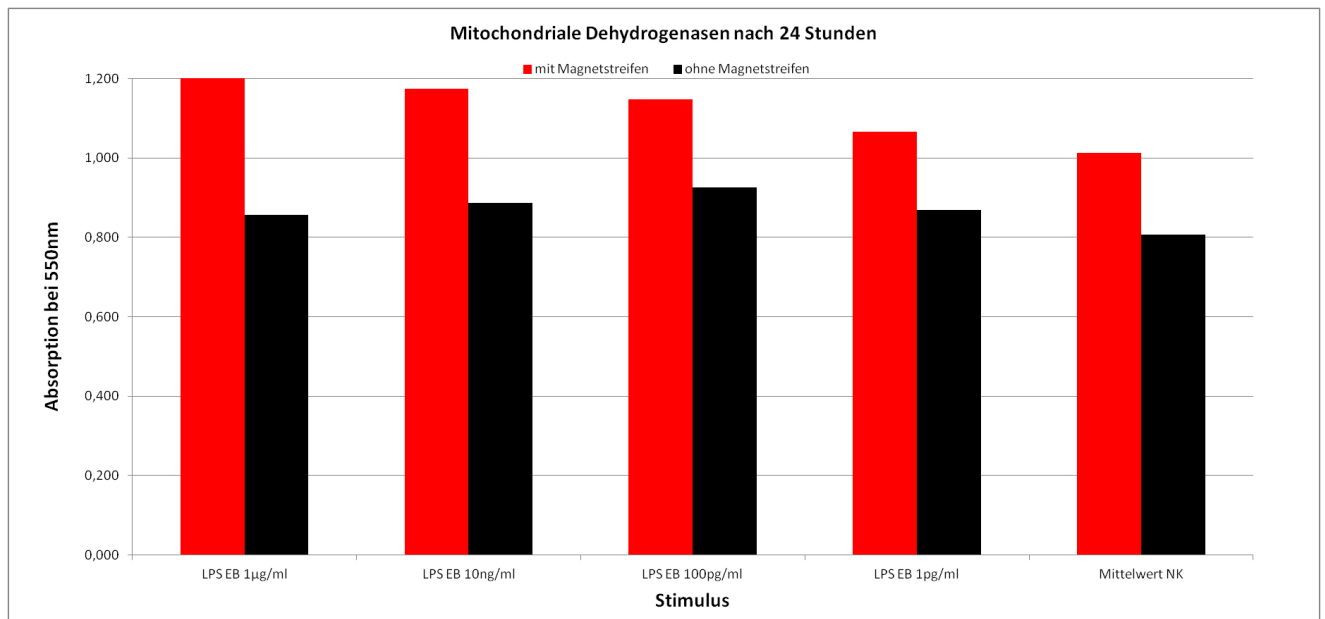


Abbildung 4: Einfluss der Klein`sche Felder Magnetstreifen auf die mitochondrialen Dehydrogenasen in PBMC nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und anschließender Stimulation mit LPS für 24h. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 separaten Analysen.

Die vorherige Kultivierung der THP-1 Zellen in Anwesenheit der Klein`sche Felder Magnetstreifen für 24 Stunden erhöht die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen um mindestens 30% nach Stimulation mit LPS im Vergleich zur Kultivierung in Abwesenheit der Klein`sche Felder Magnetstreifen.

MITOCHONDRIALE ATP GENERIERUNG

INSGESAMT ZEIGT SICH, DASS DIE KULTIVIERUNG VON THP-1 ZELLEN IN GEGENWART DER KLEIN`SCHE FELDER MAGNETSTREIFEN DIE MITOCHONDRIALE ATP GENERIERUNG SIGNIFIKANT STEIGERT.

NACH STIMULATION MIT H₂O₂

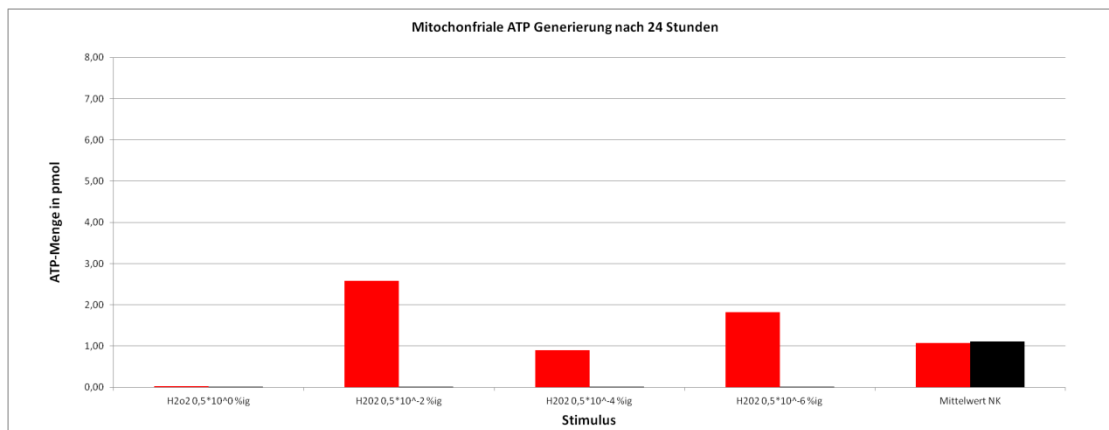


Abbildung 5: Einfluss der Klein`sche Felder Magnetstreifen auf die mitochondrialen ATP Generierung in PBMC nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und anschließender Stimulation mit H₂O₂ für 24h. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 separaten Analysen.

Die vorherige Kultivierung der THP-1 Zellen in Anwesenheit der Klein`sche Felder Magnetstreifen für 24 Stunden erhöht die generierte mitochondriale ATP Menge nach Stimulation mit H₂O₂ signifikant um mehr als 300% im Vergleich zur Kultivierung in Abwesenheit der Klein`sche Felder Magnetstreifen.

NACH STIMULATION MIT VALINOMYCIN

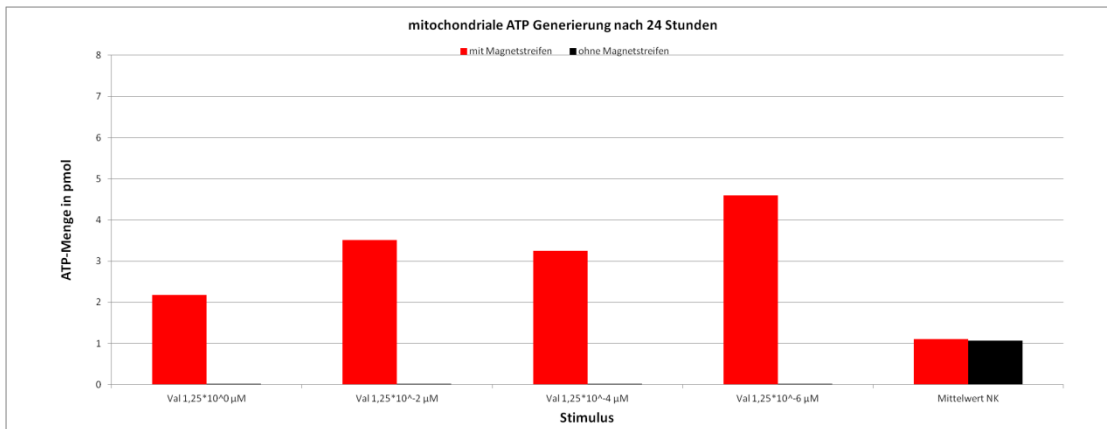


Abbildung 6: Einfluss der Klein`sche Felder Magnetstreifen auf die mitochondrialen ATP Generierung in PBMC nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und anschließender Stimulation mit Valinomycin für 24h. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 separaten Analysen.

Die vorherige Kultivierung der THP-1 Zellen in Anwesenheit der Klein`sche Felder Magnetstreifen für 24 Stunden erhöht die generierte mitochondriale ATP Menge nach Stimulation mit Valinomycin signifikant um mehr als 300% im Vergleich zur Kultivierung in Abwesenheit der Klein`sche Felder Magnetstreifen.

NACH STIMULATION MIT LPS

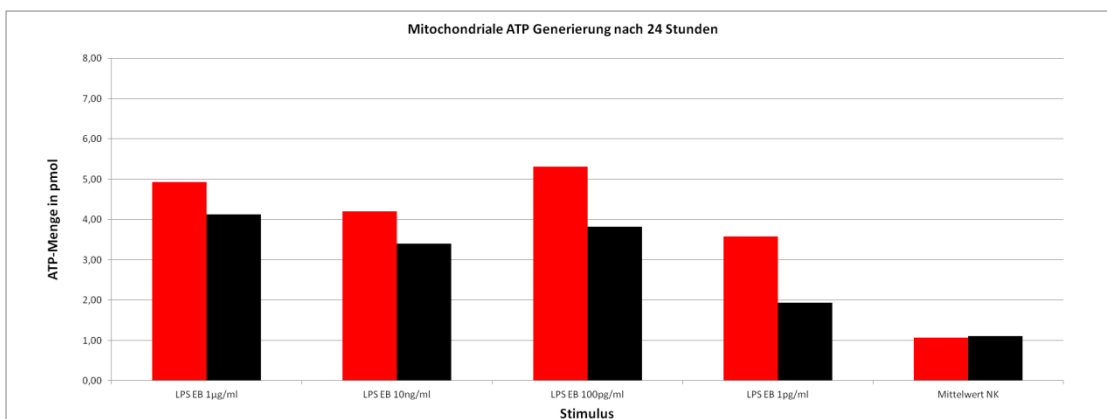


Abbildung 7: Einfluss der Klein`sche Felder Magnetstreifen auf die mitochondrialen ATP Generierung in PBMC nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und anschließender Stimulation mit LPS für 24h. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 separaten Analysen.

Interpretation: Tendenziell führt die Kultivierung der Zellen mit den Klein`sche Felder Magnetstreifen zu einer Höheren ATP Generierung in Gegenwart von Stimulans LPS.

Die vorherige Kultivierung der THP-1 Zellen in Anwesenheit der Klein`sche Felder Magnetstreifen für 24 Stunden erhöht die generierte mitochondriale ATP Menge nach Stimulation mit LPS signifikant im Vergleich zur Kultivierung in Abwesenheit der Klein`sche Felder Magnetstreifen.

MITOCHONDRIENMASSE

DIE KULTIVIERUNG DER ZELLEN IN GEGENWART DER KLEIN`SCHE FELDER MAGNETSTREIFEN HAT KEINEN NEGATIVEN EINFLUß AUF DIE MITOCHONDRIEN GEMESSEN ALS MITOCHONDRIALE MASSE.

NACH STIMULATION MIT H₂O₂

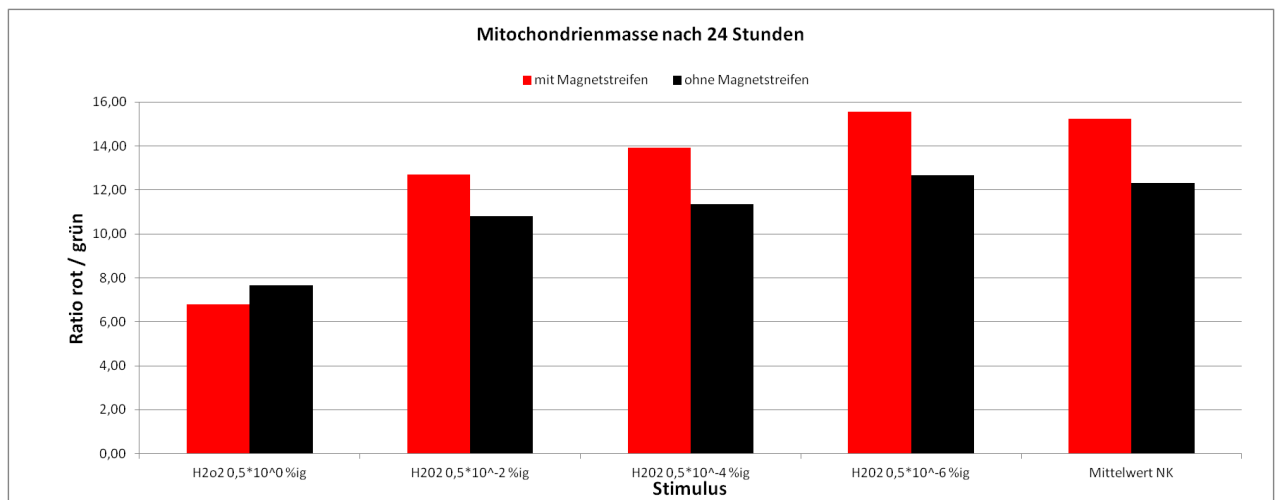


Abbildung 8: Einfluss der Klein`sche Felder Magnetstreifen auf die Mitochondrienmasse in PBMC nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und anschließender Stimulation mit H₂O₂ für 24h. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 separaten Analysen.

Wasserstoffperoxid führt konzentrationsabhängig zu einer Zerstörung der Mitochondrien und in Folge dessen zu verringerten Massen. Nach 1 Tag Kultivierung der Zellen mit den Klein`sche Felder Magnetstreifen sind höhere Mitochondrienmassen zu detektieren im Vergleich zu Zellen ohne Einfluß der Klein`sche Felder Magnetstreifen.

NACH STIMULATION MIT VALINOMYCIN

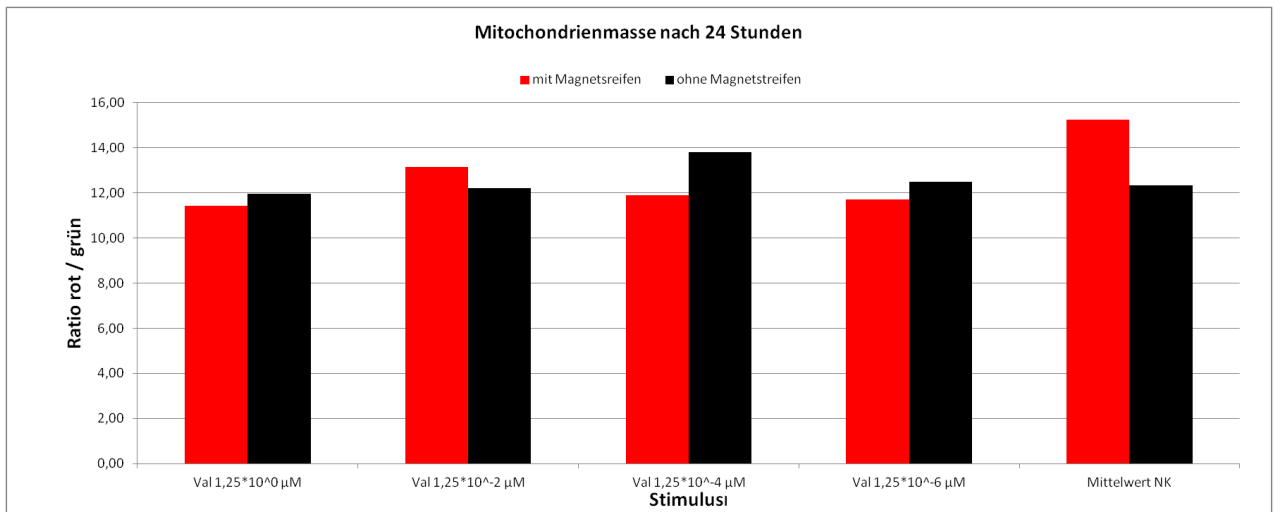


Abbildung 9: Einfluss der Klein`sche Felder Magnetstreifen auf die Mitochondrienmasse in PBMC nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und anschließender Stimulation mit Valinomycin für 24h. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 separaten Analysen.

In der Regel hat Valinomycin in den eingesetzten Konzentrationen und der gewählten Inkubationsdauer keinen negativen Einfluß auf die mitochondrialen Massen. Nach 1 Tag Kultivierung der Zellen mit den Klein`sche Felder Magnetstreifen sind die mitochondrialen Massen vergleichbar unabhängig von der Kultivierung in Anwesenheit von Klein`sche Felder Magnetstreifen.

NACH STIMULATION MIT LPS

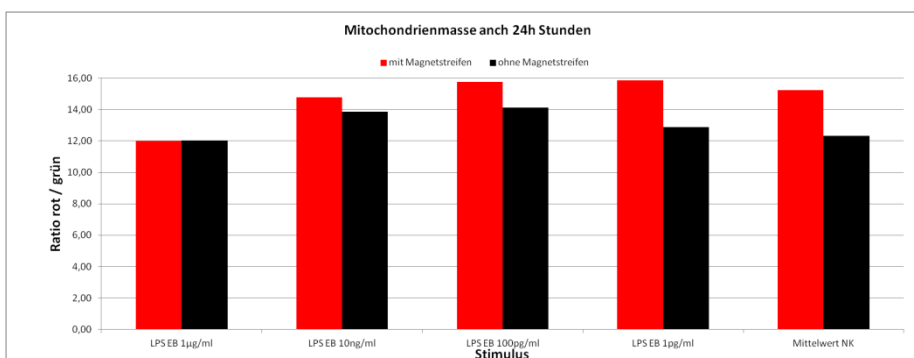


Abbildung 10: Einfluss der Klein`sche Felder Magnetstreifen auf die Mitochondrienmasse in PBMC nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und anschließender Stimulation mit LPS für 24h. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 separaten Analysen.

Nach 1 Tag Kultivierung der Zellen mit den Klein`sche Felder Magnetstreifen sind höhere Mitochondrienmassen zu detektieren im Vergleich zu Zellen ohne Einfluß der Klein`sche Felder Magnetstreifen.

MITOCHONDRIALES MEMBRANPOTENTIAL

DIE KULTIVIERUNG DER ZELLEN IN GEGENWART DER KLEIN`SCHE FELDER MAGNETSTREIFEN HAT KEINEN NEGATIVEN EINFLUß AUF DAS MITOCHONDRIALE MEMBRANPOTENTIAL. ES ZEIGT SICH SOGAR, DASS DAS MITOCHONDRIALE POTENTIAL AUCH IN GEGENWART VON VALINOMYCIN IM VERGLEICH ZU NICHT DEN KLEIN`SCHE FELDER MAGNETSTREIFEN AUSGESETZTEN ZELLEN LÄNGER STABIL BLEIBT.

NACH STIMULATION MIT H₂O₂

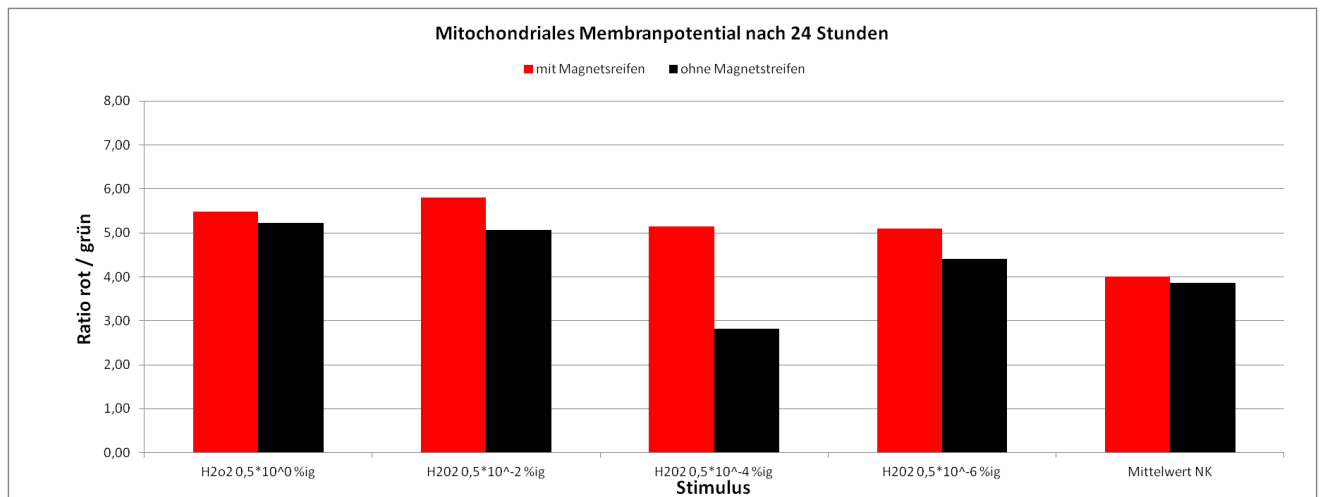


Abbildung 11: Einfluss der Klein`sche Felder Magnetstreifen auf das mitochondriale Membranpotential in PBMC nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und anschließender Stimulation mit H₂O₂ für 24h. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 separaten Analysen.

In der Regel hat Wasserstoffperoxid in den eingesetzten Konzentrationen und der gewählten Inkubationsdauer keinen negativen Einfluß auf das mitochondriale Membranpotential. Nach 1 Tag Kultivierung der Zellen mit den Klein`sche Felder Magnetstreifen bleibt das mitochondriale Membranpotential auf dem gleichen Niveau im Vergleich zu Zellen ohne Einfluß der Klein`sche Felder Magnetstreifen.

NACH STIMULATION MIT VALINOMYCIN

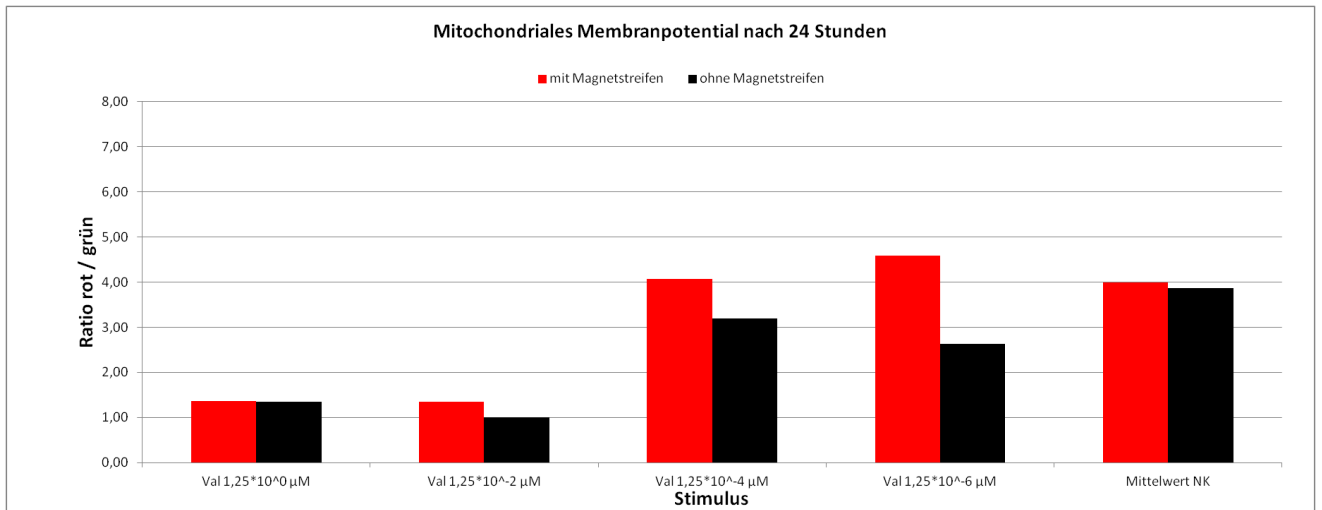


Abbildung 12: Einfluss der Klein`sche Felder Magnetstreifen auf das mitochondriale Membranpotential in PBMC nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und anschließender Stimulation mit Valinomycin für 24h. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 separaten Analysen.

In der Regel hat Valinomycin in den eingesetzten Konzentrationen und der gewählten Inkubationsdauer konzentrationsabhängig einen negativen Einfluß auf das mitochondriale Membranpotential. Nach 1 Tag Kultivierung der Zellen mit den Klein`sche Felder Magnetstreifen hält das mitochondriale Membranpotential höheren Valinomyckonzentrationen stand.

NACH STIMULATION MIT LPS

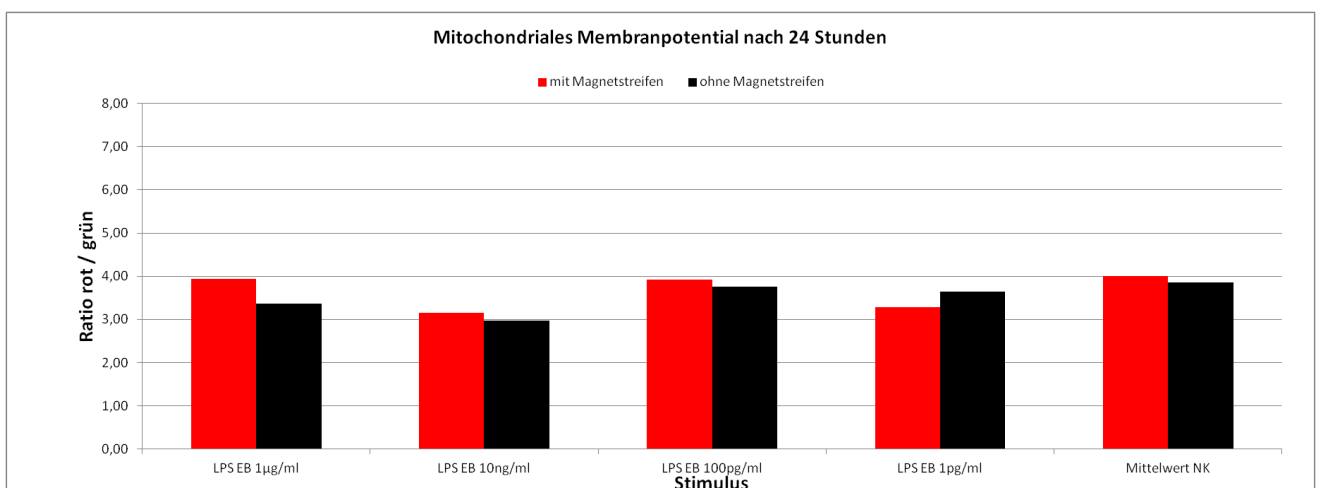


Abbildung 13: Einfluss der Klein`sche Felder Magnetstreifen auf das mitochondriale Membranpotential in PBMC nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen und anschließender Stimulation mit LPS für 24h. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 separaten Analysen.

In der Regel hat LPS in den eingesetzten Konzentrationen und der gewählten Inkubationsdauer keinen negativen Einfluß auf das mitochondriale Membranpotential. Nach 1 Tag Kultivierung der Zellen mit den Klein`sche Felder Magnetstreifen bleibt das mitochondriale Membranpotential auf dem höheren Niveau im Vergleich zu Zellen ohne Einfluß der Klein`sche Felder Magnetstreifen.