

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

Firma

misterwater GmbH

Johann-Karg-Str. 44

**D-85540 Haar OT Salmdorf**

Auf der Voßhardt 25

D-49419 Wagenfeld, Germany

Fon: +49 5444 980 1322

Mobil: +49 151 2272 1294

Email: [info@dartsch-scientific.com](mailto:info@dartsch-scientific.com)

Web: [www.dartsch-scientific.com](http://www.dartsch-scientific.com)

20. Juni 2021

## TESTBERICHT

### **Förderliche Wirkeffekte des Wasserstoffwassers der misterwater GmbH Untersuchungen mit kultivierten Nierenzellen**

---

#### **1 Fragestellung der durchgeführten *in vitro*-Studie**

In der vorliegenden Studie sollte mit aktuellen zellbiologischen Testverfahren untersucht werden, ob das Wasserstoffwasser im direkten Vergleich zum gleichen Stillen Wasser ohne Behandlung (= Ausgangswasser) auf Zellebene förderliche Wirkeffekte besitzt. Auf Grund der beschriebenen positiven Wirkeffekte von Anwendern wurden in dieser Studie die Untersuchungen ausschließlich mit kultivierten Nierenzellen durchgeführt.

#### **2 Wasserstoffwasser**

Für die Untersuchungen wurden zwei verschiedene Geräte für den Zeitraum der Untersuchungen von der Firma misterwater GmbH zur Verfügung gestellt und mit Stille Wasser eines Markenherstellers lt. Bedienungsanleitung verwendet. Die Untersuchungen des resultierenden Wasserstoffwassers wurden unmittelbar im Anschluss durchgeführt, da der generierte Wasserstoff nur sehr kurzlebig ist. Durch Abdichten der Zellkulturschalen wurden auch Vorkehrungen getroffen, um den Wasserstoff möglichst lange auf die Zellkulturen einwirken zu lassen. Als Kontrolle diente Stilles Wasser ohne Behandlung mit dem Wasserstoff-Generator (= Ausgangswasser). Zur Vermeidung osmotisch bedingter Zellanpassungen wurde das Ausgangs- und Wasserstoffwasser bis zu einem maximalen Volumenanteil von 40 Vol% am Kulturmedium/Reaktionsgemisch in die Versuche eingesetzt.

#### **3 Verwendete Nierenzellen**

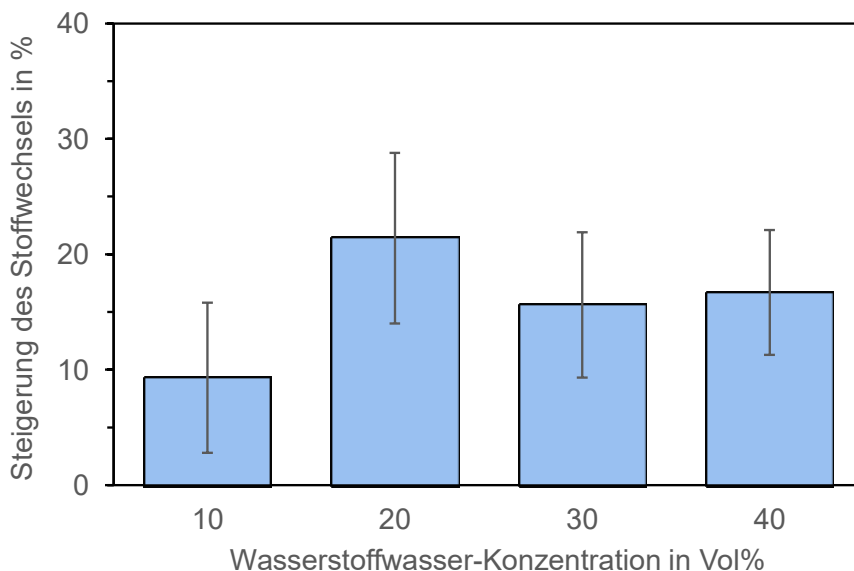
Für die Untersuchungen wurden sog. Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)-Zellen verwendet. Dies ist eine Nierenepithelzelllinie aus dem Säugetier, welche in der biomedizinischen Forschung für eine Vielzahl von zellbiologischen Studien herangezogen wird. Dies dokumentiert in der wissenschaftlichen Literatur die mehr als 100.000 Veröffentlichungen zu dieser Zelllinie. Die Zelllinie wurde kryokonserviert von Sigma-Aldrich/ECACC erworben und nach dem Auftauen routinemäßig in Dulbeccos Modifikation von Eagle's Medium (DMEM) mit 10 % Wachstumsgemisch und 0,5 % Gentamycin in einem Begasungs-Brut-

schränk bei 37 °C in einer Atmosphäre aus 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luft in 98%iger Luftfeuchtigkeit kultiviert. Erst nach mehreren Passagen wurden die Zellen für die Untersuchungen verwendet, die über einen Zeitraum von annähernd 6 Monaten durchgeführt wurden.

#### 4 Basaler Zellstoffwechsel

Für die Versuche wurden die Zellen aus Massenkulturen in einer Zelldichte von 50.000 Zellen/Vertiefung in 96-Loch Kulturplatten (200 µl Kulturmedium/Vertiefung) ausgesät und für 24 Stunden bis zur vollständigen Adhäsion der Zellen inkubiert. Danach wurde zu den Zellen ein Reaktionsgemisch bestehend aus Phosphatpuffer mit Calcium und Magnesium mit 5 mM Glucose als Energiequelle, den entsprechenden Testkonzentrationen des frisch hergestellten Wasserstoff- bzw. Ausgangswassers sowie ein Tetrazoliumfarbstoff gegeben. Die Spaltung des Farbstoffes ist der Aktivität des zellulären Energiestoffwechsels direkt proportional. Es wurde die optische Dichte am Elisareader (BioTek ELx808) zu verschiedenen Zeitpunkten bis maximal 120 min aufgezeichnet und die Veränderung der optischen Dichte mit Microsoft Excel ausgewertet. Es wurden insgesamt vier unabhängige Versuchsreihen (n = 4) durchgeführt. Die statistische Analyse wurde mit dem parameterfreien zweiseitigen Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest vorgenommen.

**Ergebnis:** Die Verwendung des frisch hergestellten Wasserstoffwassers bewirkte in den vier unabhängigen Versuchen eine statistisch signifikante Stimulierung ( $p \leq 0,05$ ) des Zellstoffwechsels der Nierenzellen im Vergleich zum Ausgangswasser ab einem Volumenanteil von 20 Vol% im Reaktionsgemisch. Die deutlichste Stimulierung wurde bei einem Volumenanteil von 20 Vol% erreicht; jedoch auch höhere Konzentrationen des Wasserstoffwassers zeigten eine Steigerung um 15 bis 17 %. Auch wenn diese Stimulation nur scheinbar gering erscheint, kann das regelmäßige Trinken des Wasserstoffwassers zu einer verbesserten Zellstoffwechselsituation in der Niere (Entgiften) und so in der Folge zu einem verbesserten Wohlbefinden führen.



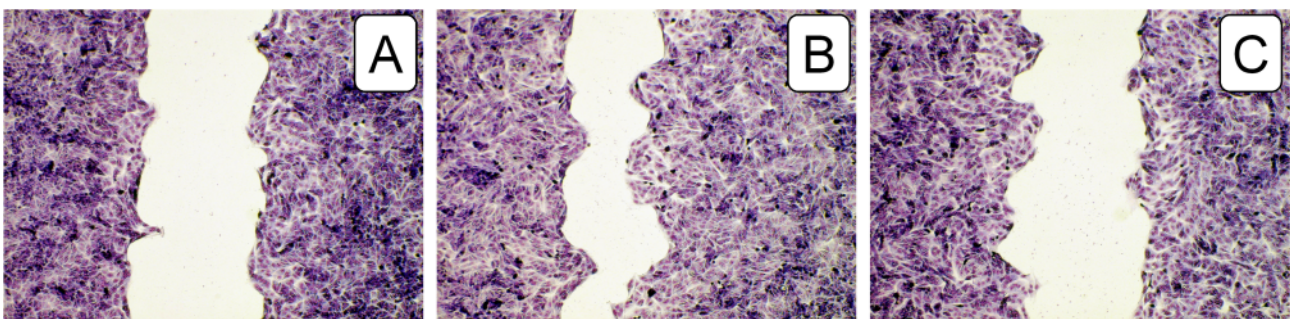
**Abb. 1:** Graphische Darstellung der prozentualen Stimulierung des Zellstoffwechsels der Nierenzellen durch das Wasserstoffwasser von milderwater im Vergleich zum Ausgangswasser (= Stilles Wasser) bei verschiedenen Volumenanteilen im Reaktionsgemisch. Angegeben ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus vier unabhängigen Versuchen.

## 5 Zellregeneration

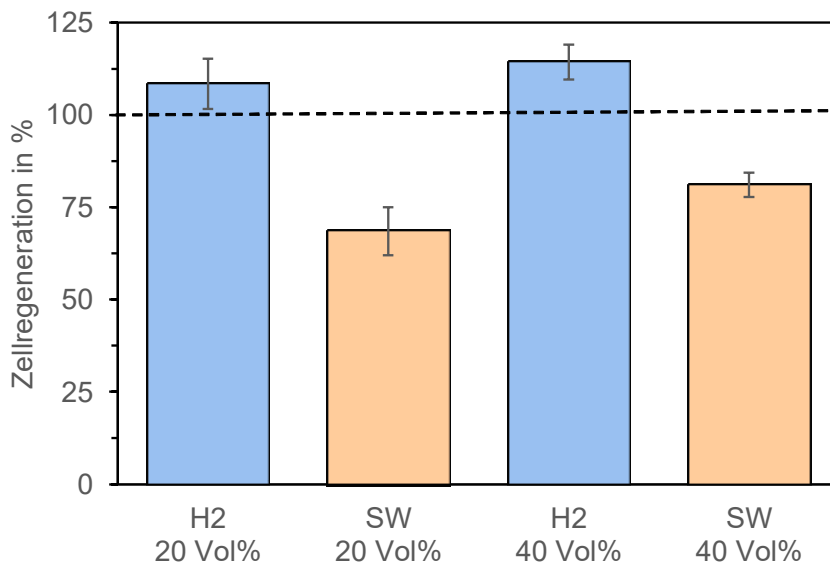
Die Nierenzellen wurden in einer Dichte von 100.000 Zellen/ml in die drei Kompartimente eines Silikonrahmens (3 well-culture inserts; ibidi, Gräfelting) ausgesät. Die einzelnen Kompartimente sind durch einen 500 µm dicken Silikonsteg voneinander getrennt. Der Silikonrahmens haftet fest auf dem Boden einer Kulturschale und bildet so einen zellfreien Raum, den die dicht (= konfluent) gewachsenen Zellen nach dem Entfernen des Rahmens durch Teilung und Wanderung besiedeln können.

Direkt nach dem Entfernen des Silikonrahmens wurde frisches Kulturmedium, welches 20 oder 40 Vol% Wasserstoffwasser bzw. Ausgangswasser enthielt, zugegeben. Zusätzlich wurden Kontrollzellen aus der gleichen Ausgangskultur nur in Kulturmedium ohne den Wasserzusatz als Referenz verwendet. Nach der weiteren Inkubation im Brutschrank für 12 Stunden wurden die Zellen gewaschen, mit Methanol fixiert, mit Giemsa-Methylenblau-Lösung gefärbt, luftgetrocknet und die Breite des noch verbliebenen zellfreien Bereiches am Mikroskop an mindestens 6 Stellen ausgemessen. Insgesamt wurden drei unabhängige Versuchsreihen (n = 3) durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte ebenfalls mit dem parameterfreien zweiseitigen Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest.

**Ergebnis:** Allein schon das mikroskopische Durchmusterung der fixierten und gefärbten Präparate zur Zellregeneration zeigte eine deutliche Förderung der Besiedlung des zellfreien Raumes durch die Exposition mit dem frisch hergestellten Wasserstoffwasser im Vergleich zum Ausgangswasser (Abb. 2). Bei einem 40%igen Volumenanteil des Wasserstoffwassers im Kulturmedium wurde sogar die Kontrolle ausschließlich mit Kulturmedium ohne Wasserzusatz übertroffen (Abb. 3). Im Gegensatz dazu führte das Ausgangswasser in allen Versuchen zu einer Verminderung der Zellregeneration, so dass im direkten Vergleich das Wasserstoffwasser stets um etwa 30 % besser abschnitt (Abb. 3). Diese Verbesserung der Zellregeneration durch das Wasserstoffwasser im Vergleich zum Ausgangswasser war in allen Versuchen statistisch hochsignifikant ( $p \leq 0,01$ ).



**Abb. 2:** Mikroskopische Darstellung der förderlichen Wirkung des Wasserstoffwassers von mitterwater auf die Zellregeneration kultivierter Nierenzellen innerhalb von 12 Stunden. (A) Unbehandelte Kontrolle. (B) Reduzierter zellfreier Raum und damit bessere Zellregeneration durch Verwendung von 40 Vol% Wasserstoffwasser im Kulturmedium. (C) Größerer zellfreier Raum und damit schlechtere Zellregeneration durch Verwendung von 40 Vol% Stille Wasser (= Ausgangswasser) im Kulturmedium. Fixierte und angefärbte Präparate im Olympus IX-50 Inversmikroskop mit 10x Planachromat und Olympus E-10 bei 4 Megapixeln Auflösung im Durchlicht-Hellfeld-Verfahren.



**Abb. 3:** Graphische Darstellung der Zellregeneration durch Besiedlung eines zellfreien Raumes für Wasserstoffwasser von misterwater (20 und 40 Vol%) im Vergleich zur gleichen Konzentration des Ausgangswassers (= Stilles Wasser). Die Kontrolle ohne Wasserzusatz wurde gleich 100 % gesetzt und durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet. Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. H2 = Wasserstoffwasser; SW = Stilles Wasser.

## 6 Schutzwirkung bei einem Überschuss exogener Radikale

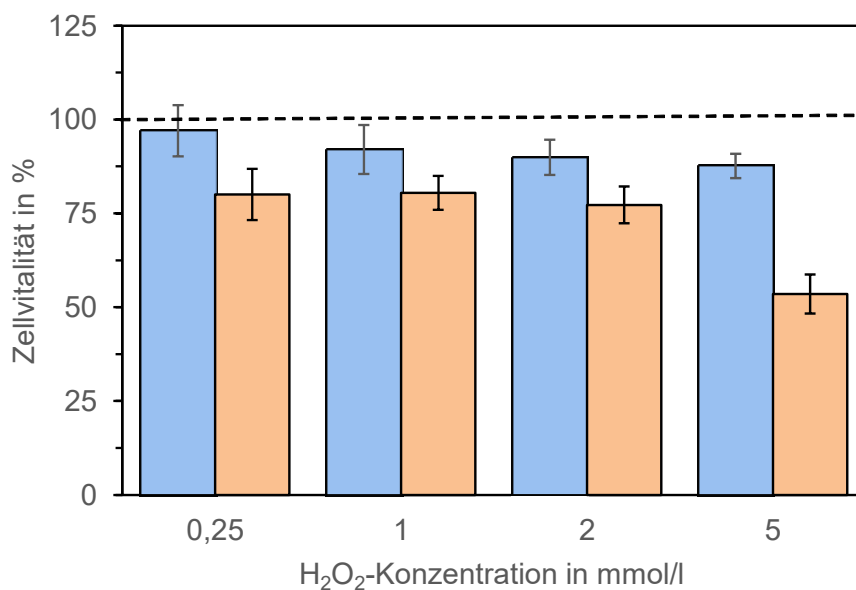
Für diese Untersuchungen wurde unser etabliertes Testsystem zum Wasserstoffperoxid-Induzierten Oxidativen Stress (HP-IOS) verwendet. Es wurden aus einer 3%igen Wasserstoffperoxid-Lösung (= 880 mmol/L) die jeweils 10fach konzentrierten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stammlösungen zu den späteren Testkonzentrationen durch weitere Verdünnung mit Phosphatpuffer hergestellt. Die Testkonzentrationen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Bioassay waren 0,25 - 0,5 - 1 - 2 und 5 mmol/L. Das Wasserstoffwasser bzw. Ausgangswasser wurde mit einem Volumenanteil von 20 Vol% verwendet.

Die Nierenzellen wurden in 24-Loch-Platten ausgesät (1 ml Kulturmedium pro Vertiefung) und bis zu einer Dichte von etwa 90 % Konfluenz kultiviert. Danach wurde das Kulturmedium abgesaugt und pro Vertiefung 700  $\mu$ l frisches Kulturmedium pipettiert und jeweils 200  $\mu$ l von frisch hergestelltem Wasserstoffwasser resp. Ausgangswasser zugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurden pro Vertiefung weitere 100  $\mu$ l der 10fach konzentrierten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stammlösungen zugegeben. Dieser Testansatz wurde für weitere 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Reaktionsgemisch abgesaugt, die Vertiefungen mit Phosphatpuffer gewaschen und frisches Kulturmedium mit XTT zugegeben.

XTT ist das Natriumsalz von 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphopheny]-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 wurde am Elisareader (BioTEK Elx 808) gemessen.

Es wurden insgesamt drei unabhängige Versuchsreihen mit Duplikaten durchgeführt. Die statistische Analyse wurde mit dem parameterfreien zweiseitigen Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest vorgenommen.

**Ergebnis:** Wie aus Abb. 4 hervorgeht, nahm die Zellvitalität mit steigender H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration ab. Dennoch war die Zellvitalität mit Wasserstoffwasser von misterwater immer besser als das Ausgangswasser; der Unterschied war statistisch signifikant ( $p \leq 0,05$ ) für 0,25 bis 2 mmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und hochsignifikant ( $p \leq 0,01$ ) für 5 mmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Trotz dieser ausgeprägten zellschützenden Eigenschaften bei einem Überschuss von exogenen Radikalen wurden auch mit dem Wasserstoffwasser nicht ganz die Werte einer unbehandelten Kontrolle erreicht; betrug aber bei der höchsten getesteten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration immer noch nahezu 90 % Zellvitalität (unbehandelte Kontrolle gleich 100 % gesetzt).



**Abb. 4:** Graphische Darstellung der Ergebnisse zur zellprotektiven Wirkung von Wasserstoffwasser (blaue Balken) im Vergleich zum Ausgangswasser (= Stilles Wasser; orange Balken) bei einem Überschuss exogener Radikale. Die stets bessere Schutzwirkung hat bei allen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen das Wasserstoffwasser. Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

## 7 Schlussfolgerungen

In den durchgeführten tierversuchsfreien Untersuchungen mit kultivierten Nierenzellen hat das frisch hergestellte Wasserstoffwasser der misterwater GmbH seine förderlichen Wirkeffekte im Vergleich zum Ausgangswasser (= Stilles Wasser) unter Beweis gestellt. Das Wasserstoffwasser konnte den Stoffwechsel, Regeneration und Radikalneutralisierung signifikant im direkten Vergleich zum Ausgangswasser verbessern. Daher kann das regelmäßige Trinken des Wasserstoffwassers bei der Niere nicht nur zu einer verbesserten Zellstoffwechselsituation (Entgiften), besseren Regeneration bei Zellschäden und größerem Zellschutz bei oxidativen Stress führen, sondern auch zu einem höheren Wohlbefinden.




Prof. Dr. Peter C. Dartsch  
Diplom-Biochemiker