

Wirkung von Kernspinnresonanz auf die Zellwachstumsrate, Apoptose, und Lebensdauer von menschlichen Chondrozyten und Osteoblasten in vitro.

Temiz Artmann, A.*; Linder, P.*; Kayser, P.*; Digel, I.*; Artmann,G.M.*; Lücker,P.**

einzureichen bei:

Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology
[Methoden und Ergebnisse aus der experimentellen und klinischen Pharmakologie]

Kontaktadresse:
Prof. Dr. med. Peter Lücker
Verladeplatz 4
D-67269 Grünstadt

* Labor für medizinische Biologie und Molekularbiologie
Technische Universität Aachen, Abteilung Juelich, NRW
Ginsterweg 1
D-52428

** Prof. Dr. Lücker Consulting GmbH
Verladeplatz 4
D-67269 Grünstadt

22.03.2005

1. Zusammenfassung

Diese Studie zeigt Resultate in Bezug auf die Zellteilung, Zellapoptose und Lebensdauer von menschlichen Knorpelzellen und menschlichen Knochenzellen in *in vitro* Kulturen vor und nach einer Behandlung mit speziellen Kernspinnresonanzsequenzen. Ein, frei auf dem Markt zu beziehendes Kernspinnresonanzgerät (MBST[®]-KernspinnresonanzTherapie) wurde für die Behandlung benutzt. Die Studie erstreckte sich über einen Gesamtzeitraum von 19 Tagen, wobei über 9 Tage eine Einwirkung der Kernspinnresonanz stattfand. Die Studie wurde nach der kontrollierten, zweifach-blind Methode, mit frei käuflichen menschlichen Zellkulturen durchgeführt. Die Auswahl der zu behandelnden Proben und der Kontrollproben erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Die Studie ergab folgende Resultate: Die Behandlung mit Kernspinnresonanz verursachte weder eine Apoptose noch eine Verkürzung der Lebensdauer der Zellen. Andererseits ergaben die Ergebnisse einer Zellzählung, dass die Behandlung eine hohe Tendenz zeigte, die Zellteilungsrate zu erhöhen.

2. Einführung

Die Einwirkung von Magnetfeldern auf Zellen ist bereits früher untersucht worden. Die Resultate dieser Studien sind veröffentlicht worden. Da sich aber die technischen und physikalischen Gegebenheiten von Magnetfeldanwendungen (Amplituden, Frequenzen, Anwendungszeiten, etc.) von Fall zu Fall stark unterscheiden, bezieht sich die Gültigkeit der observierten Resultate immer nur auf die experimentellen Bedingungen einer jeweiligen Studie¹⁻⁷. Über die Einwirkung von Kernspinnresonanz auf Zellen ist wenig bekannt. Kernspinnresonanz wurde für die Medizin interessant und ist inzwischen populär, da sie ausgezeichnete Querschnittsbilder des menschlichen Körpers liefern kann. Die Kernspinnresonanz wurde zu einem erfolgreichen Werkzeug für die Klärung analytischer Fragen der modernen Medizin⁸. Die Fragestellung, ob man die Kernspinnresonanz für die Stimulierung menschlicher Zellen benutzen kann, wurde bisher noch nicht auf dem wissenschaftlichen Niveau in Erwägung gezogen, wie es die Fragestellung eigentlich verdient. Wenn Zellen innerhalb eines starken magnetischen Feldes positioniert werden, und ein magnetisches Hochfrequenzsignal erzeugt wird, wird Kernspinnresonanz erzeugt. Somit wird Energie in dem Körper abgelegt, in dem die Resonanz auftritt. Wenn dies geschieht, kann man erwarten, dass der Zellstoffwechsel beeinflusst wird, und dass sowohl das Gewebewachstum als auch die Eiweißproduktion stimuliert werden könnten¹². Diese möglichen Einwirkungen der Kernspinnresonanz auf Zellen werden jedoch kaum von der Wissenschaft anerkannt.

Heilungen im menschlichen Knochen- und Knorpelgewebe sind in mehreren klinischen Studien beobachtet worden. Tausende von Patienten sind in kommerziell zugänglichen Kernspinnresonanz-Stimulatoren (MBST[®]-KernspinnResonanzTherapie) behandelt worden. Auf der Grundlage dieser positiven Resultate haben wir eine *in vitro* Studie mit dem Zweck geplant, die klinischen Resultate im zellulären Bereich zu beurteilen. Diese Studie zeigte, dass die Behandlung mit Kernspinnresonanz den natürlichen Zelltod (Apoptose) nicht in Gang setzte und dass die Lebensdauer der Zellen nicht beeinträchtigt wurde. Andererseits hat die Studie gezeigt, dass die Zählung der Zellen andeutet, dass die Behandlung mit der Kernspinnresonanz das Zellwachstum anzuregen scheint. Diese Ergebnisse ermuntern zu weiteren *in vitro* Studien bezüglich der Wechselwirkungen zwischen der Kernspinnresonanz und den Zellen. Solche Studien könnten möglicherweise zeigen, dass die

Behandlung mit Kernspinnresonanz eine vollwertige wissenschaftlich fundierte Methode zur Regeneration von Gewebe im menschlichen Körper sein könnte.

3. Materialien und Methoden

Zellkulturen:

Für die *in vitro* Untersuchungen der zwischen der Kernspinnresonanz und den Zellen mittels der MBST[®]-Kernspinnresonanztherapie wurden menschliche Knorpelzellen und menschliche Knochenzellen benutzt (Knorpelzellen Kit-c [C-10710], Knochenzellen Kit-c [C-10720], beide der Firma Promocell, Heidelberg, Deutschland). Die Zellen wurden in einem Standard-Kulturmedium und Übertragungsbehälter, wie sie vom Lieferanten der Zellkulturen empfohlen wurden, gezüchtet.

Versuchsaufbau:

Die Studie war kontrolliert und zweifach-blind. Die Probanden wurden den einzelnen Gruppen nach dem Zufallsprinzip zugeordnet. Alle Untersuchungen wurden mit demselben Kernspinnresonanzgerät durchgeführt. Das Gerät wurde mittels spezieller Chipkarten gesteuert. Auf diesen Chipkarten wurden die notwendigen Programme für die Behandlung der Knorpelzellen, respektive der Knochenzellen mit der Kernspinnresonanz gespeichert (MedTec Medizintechnik GmbH, D35578 Wetzlar, Deutschland). Die Chipkarten für die Placebobehandlungen waren äußerlich identisch mit den programmierten Chipkarten. Sie aktivierten lediglich kein für eine Kernspinnresonanz notwendiges Hochfrequenzfeld. Die Zellversuche erfolgten unter fünf unterschiedlichen Bedingungen (experimentelle Gruppen):

- Gruppe 1: Kontrollgruppe keine statisches Feld, kein Hochfrequenzfeld
- Gruppe 2: statisches Magnetfeld, Hochfrequenzfeld für 30 Minuten pro Tag
- Gruppe 3: statisches Feld, kein Hochfrequenzfeld (Placebo)
- Gruppe 4: statisches Magnetfeld, Hochfrequenzfeld für 60 Minuten pro Tag
- Gruppe 5: statisches Feld, kein Hochfrequenzfeld (Placebo)

Die Behandlung wurde an fünf aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. Danach gab es eine Pause von zwei Tagen, wonach die Behandlung an vier aufeinanderfolgenden Tagen weitergeführt wurde. Nach Abschluss der Gesamtbehandlung wurden die Zellkulturen noch weitere acht Tage ohne Magnetfeldeinwirkung weiter kultiviert. Der Versuch wurde am 19. Tag abgeschlossen. Bei allen Proben wurde das Kulturmedium täglich erneuert. Am 5. und am 12. Tage wurden die Kulturen mit Faktor vier geteilt.

Lebensdauer und Apoptose:

Die Lebensdauer der Zellen wurde mittels der Trypan Blau Färbung (VWR, Stockholm, Schweden) überprüft. Die Apoptoserate wurde anhand des MitoCapture Kit (Meck Biosciences Ltd., Beeston, Nottingham, UK) ermittelt. Für die Ermittlung von positiven Apoptosen und für die Überprüfung des Zelltodes in dem Lebensdauerexperiment wurden die Kulturen mit 0,3 mM H₂O₂^{14,15} [0,3 millimolar Wasserstoffperoxid] behandelt.

Zellwachstumsrate:

Die Zellen wurden täglich gezählt. Drei nach dem Zufallsprinzip ausgewählte gleich große Sektionen der Kulturplatten wurden mit einer, an einem Mikroskop angebrachten, CCD-Kamera aufgenommen. Es wurde ein Programm entwickelt, mit dem die Zellzählung

halbautomatisch durchgeführt werden konnte (Cell & Tissue Technology, Aachen, Germany).

4. Ergebnisse

Das Ziel der Studie war es zu untersuchen ob die MBST®-Kernspinnresonanz-Therapie irgendwelche Einwirkungen auf die Apoptose, die Lebensdauer, und die Zellwachstumsrate von menschlichen Knorpel- und Knochenzellen (Chondrozyten und Osteoblasten) *in vitro* hat.

Apoptose und Lebensdauer:

mit Ausnahme der positiven Kontrollen, die zusammen mit H₂O₂ bebrütet wurden, zeigte keine der Gruppen irgendwelche Zeichen von Apoptose und keinerlei Verkürzung der Zellebensdauer.

Abbildung 1 zeigt als Beispiel Bilder, die für die Apoptoseüberprüfung (Abbildung 1A) respektive für die Lebensdauer tests (Abbildung 1B) aufgenommen wurden.

Zellwachstumsrate:

Tabelle 1 zeigt die Wachstumsraten für beide Zelltypen. Die Resultate für Tag 1, respektive Tag 15 (Ende der Behandlungsmethode) sind angegeben. Die Zahl der Knorpelzellen (Chondrozyten) im Vergleich zu der Placebogruppe war um 271% erhöht. Die Zahl der Knochenzellen (Osteoblasten) war im Vergleich zu der entsprechenden Placebogruppe um 290% erhöht. Die Resultate zeigten eindeutig positive Tendenzen in Bezug auf die Zellwachstumsrate nach der Behandlung mit der Kernspinnresonanz. Diese Tendenzen waren jedoch nicht signifikant. Dies ist jedoch hauptsächlich der niedrigen Zahl an Beobachtungen während dieser allerersten Studie (Abbildungen 2A und 2B) zuzuschreiben. Die eindeutige positive Tendenz der Zellwachstumsrate nach der Behandlung mit der Kernspinnresonanz (Verum) wie sie in der Tabelle 1 aufgeführt sind, zeigten sich in dem sehr großen prozentualen Unterschied für beide Zelltypen im Vergleich zu den jeweiligen Placebogruppen.

5. Diskussion und Schlussfolgerungen

Wir haben in bei 13000 Patienten beobachtet, dass durch die Behandlung mit Kernspinnresonanz (MBST®-KernspinnresonanzTherapie) eine Vielzahl von degenerativen und rheumatischen Gelenkerkrankungen die mit mehreren WOMAC Indikationen gepaart sind, geheilt werden konnten. Diese Resultate führen zu der Annahme, dass Kernspinnresonanz einen Einfluss auf die Vermehrungsraten von Knochen- und Knorpelzellen haben könnte.

Wir verwendeten kommerziell verfügbare primäre menschliche Zellkulturen. Die Studie zeigte eine starke Tendenz in Bezug auf die Zellwachstumsrate, die eindeutig auf die Behandlung mit Kernspinnresonanz zurückzuführen ist (Tabelle 1). Es wurde festgestellt, dass die Behandlung mit Kernspinnresonanz *in vitro* weder Apoptose verursachte noch die Lebensdauer der Zellen beeinflusste. Dies ist eine vor allem in Bezug auf die Anwendung der Kernspinnresonanz auf Patienten, da die Resultate andeuten, dass es höchst unwahrscheinlich ist, dass unter den gewählten Anwendungskriterien die Anwendung der Kernspinnresonanz auf Patienten mit negativen Effekten gepaart sein wird. Dies unterstützt

die weit verbreitete Meinung, dass die kurzzeitige (Sekunden bis Minuten) Anwendung der Kernspinresonanz während klinischer Bilddarstellungen sehr wahrscheinlich keine negativen Einwirkungen auf die Patienten hat¹⁷. Die Untersuchung worüber hier berichtet wird, wurde als erster Schritt entworfen. Sie soll der Anfang sein in einer weiterfassenden Studie über die biologischen Mechanismen der Heilungsprozesse in Knochen- und Knorpelgewebe durch die Anwendung der Kernspinresonanz. Diese Studie wurde nicht entworfen um tiefgehende statistische Analysen zu überstehen. Um statistische Signifikanz nachzuweisen, wäre eine höhere Zahl an Beobachtungen notwendig gewesen. Dies jedoch hätte den Rahmen und den Anwendungsbereich unserer Studie gesprengt. Die Resultate deuten jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit als Schlussfolgerung an, dass eine Behandlung mit Kernspinresonanz basierend auf der MBST®-KernspinresonanzTherapie eine sichtbar bessere Zellwachstumsrate in Primärkulturen von menschlichen Knorpel- bzw. Knochenzellen verursacht hat. Gleichzeitig wurde aber klar, dass die Behandlung mit der Kernspinresonanz keine Apoptose in Gang gesetzt hat und keinerlei negative Einwirkungen auf die Lebensdauer der Zellen hatte.

Obwohl es eine Tatsache ist, dass in anderen Studien¹⁸⁻²² magnetische Felder benutzt worden sind, um Zellwachstum zu stimulieren und obwohl diese Studien erfolgreich waren, können den entsprechenden Resultate jedoch nicht einfach auf die Stimulation durch die Kernspinresonanz übertragen werden. Die physikalischen Eigenschaften der angewandten Magnetfelder (Amplitude, Frequenz, zeitlicher Ablauf der Anwendung, etc.) spielen eine kritische Rolle in Bezug auf die Stimulation der Zellen. Somit ist festzustellen, dass wir noch einen langen Weg vor uns haben, bis wir die zwischen Zellen und der Kernspinresonanz verstehen werden.

Legenden

Tabelle 1:

Zellzählungen für die Knorpelzellen und die Knochenzellen vor (Tag 1) und am Ende (Tag 15) der Behandlung. Die Behandlung erfolgte mittels der MBST®-KernspinresonanzTherapie-Felder (Verum: 30 min statisches Magnetfeld, plus Hochfrequenzfeld auf Kernspinresonanzfrequenz, Placebo: 30 Minuten statisches Magnetfeld, kein Hochfrequenzfeld). Nach 15 Tagen war die Tendenz zu einer Erhöhung der Zellwachstumsraten nach Behandlung unter Kernspinresonanzbedingungen sichtbar: +271% für die Knorpelzellen und +290% für die Knochenzellen.

Abbildung 1:

Beispiele der Aufnahmen die während Apoptose-Tests (Abbildung 1A) und während der Zellebensdauer tests (Abbildung 1 B) bei Knorpelzellen am 19. Tag des Experimentes gemacht wurden. Bei Zellen, die mit der Kernspinresonanz behandelt wurden, konnte keine Apoptose und keine Verringerung der Zellebensdauer festgestellt werden.

Abbildung 2

A) Zellvermehrung bei Knorpelzellen.

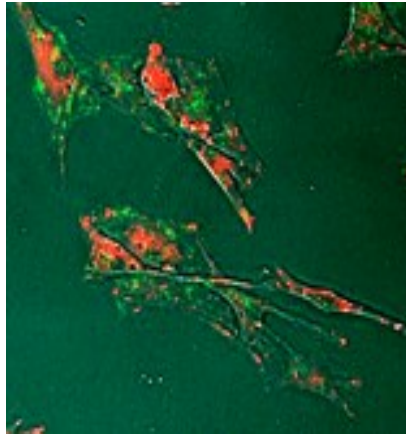
B) Zellvermehrung bei Knochenzellen.

Da die Kulturen zweimal um ein Vierfaches reduziert wurden, konnten drei aufeinanderfolgende Wachstumskurven für jede Gruppe ermittelt werden. Die Fehlerlinie rechts zeigt die durchschnittliche zweifache Standardabweichung inklusive aller Daten der Zellzahlenermittlung für jedes einzelne Datenblatt. Legende: Kontrolle: kein statisches Magnetfeld, kein Hochfrequenzfeld, 30 Min+: statisches Magnetfeld plus Hochfrequenzfeld

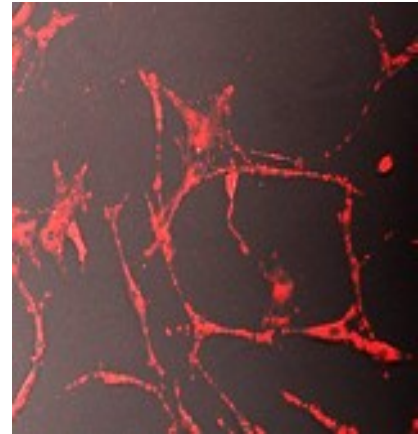
(MBST[®]-KernspinresonanzTherapie) für 30 Minuten pro Tag, 30 Min-: statisches Magnetfeld, kein Hochfrequenzfeld, 1Stunde+: statisches Magnetfeld plus Hochfrequenzfeld (MBST[®] - KernspinresonanzTherapie) für 1 Stunde pro Tag, 1Stunde-: statisches Magnetfeld, kein Hochfrequenzfeld.

	Anzahl der Chondrocyten (Knorpelzellen)	SD	Anzahl der Osteoblasten (Knochenzellen)	SD	Relative Anzahl der Chondrocyten (Knorpelzellen) in %	Relative Anzahl der Osteoblasten (Knochenzellen) in %
Tag 1						
Verum	59		14		100 %	100 %
Placebo	69		17		100 %	100 %
Unterschied	10		3			
Day 15						
Verum	824		109		1397 %	779 %
Placebo	777		83		1126 %	488 %
Unterschied	47		26			
Prozentualer Unterschied (%)					+ 271 %	+ 290 %

A)
Apoptose-Test

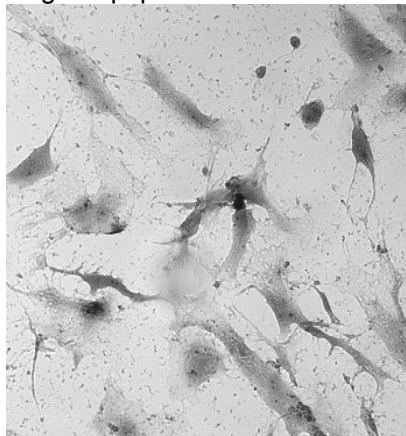


Apoptose in den Zellen durch die Einwirkung von H_2O_2 . Die grünen Punkte in den Zellflächen zeigen Apoptose.

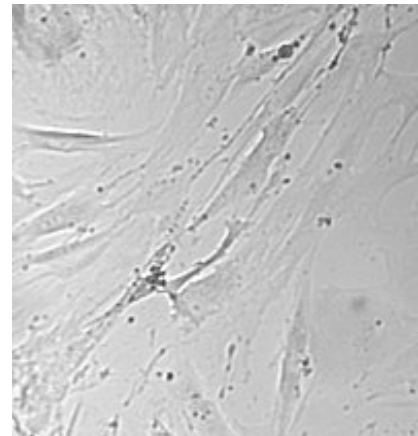


Chondrozyten nach Behandlung mit der Kernspinresonanz, Tag 19. Es gibt keine Anzeichen für Apoptose.

B)
Zellebensdauer-
Test



Zelltod durch Einwirke von H_2O_2 . Die toten Zellen zeigen die blaue Färbung des Typanfarbstoffes.



Chondrozyten nach Behandlung mit der Kernspinresonanz, Tag 19. Es gibt keine toten Zellen.

Chondrozyten (Knorpelzellen)

[Zellzählung]

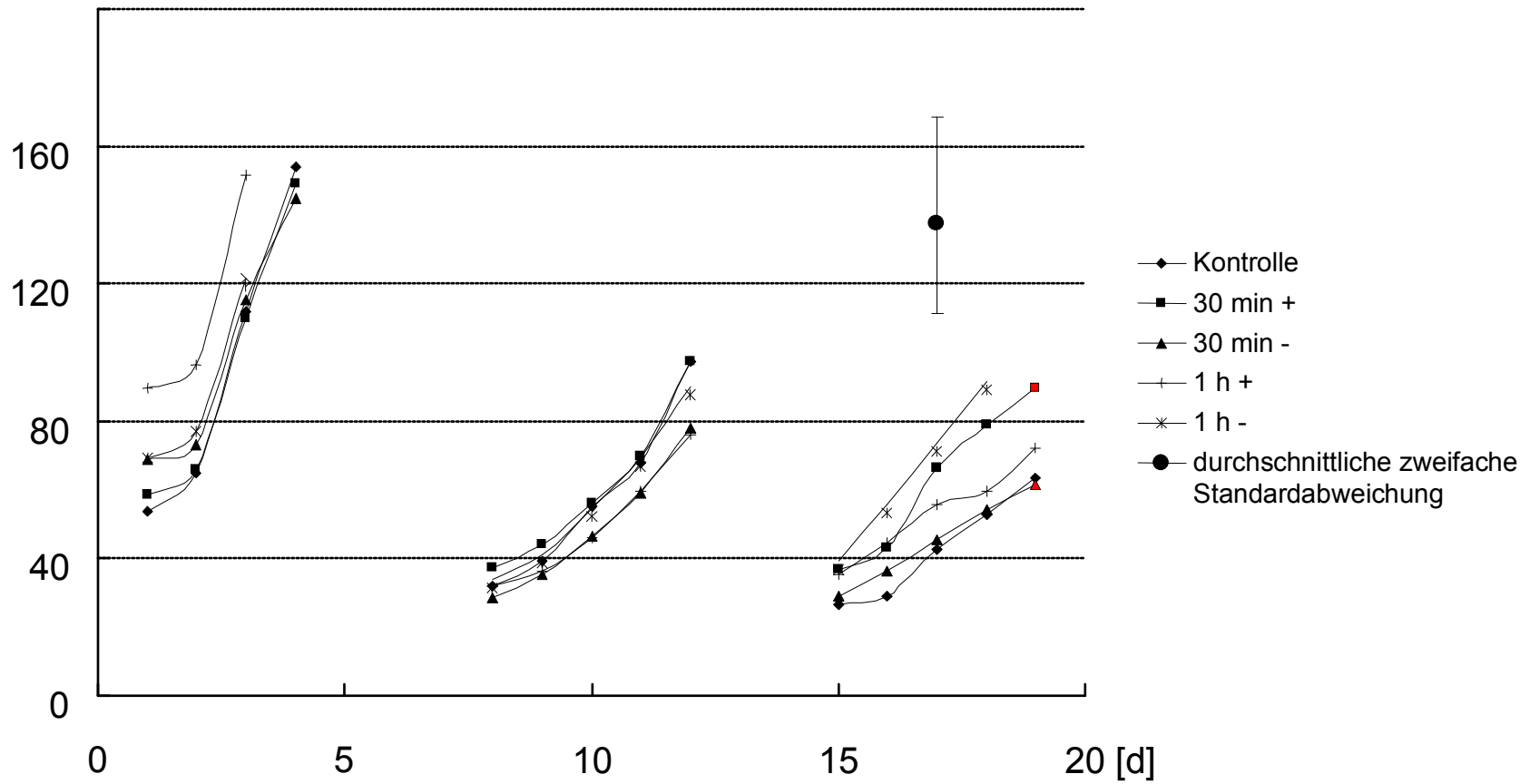


Abbildung 2 A

Osteoblasten

[Zellzählung]

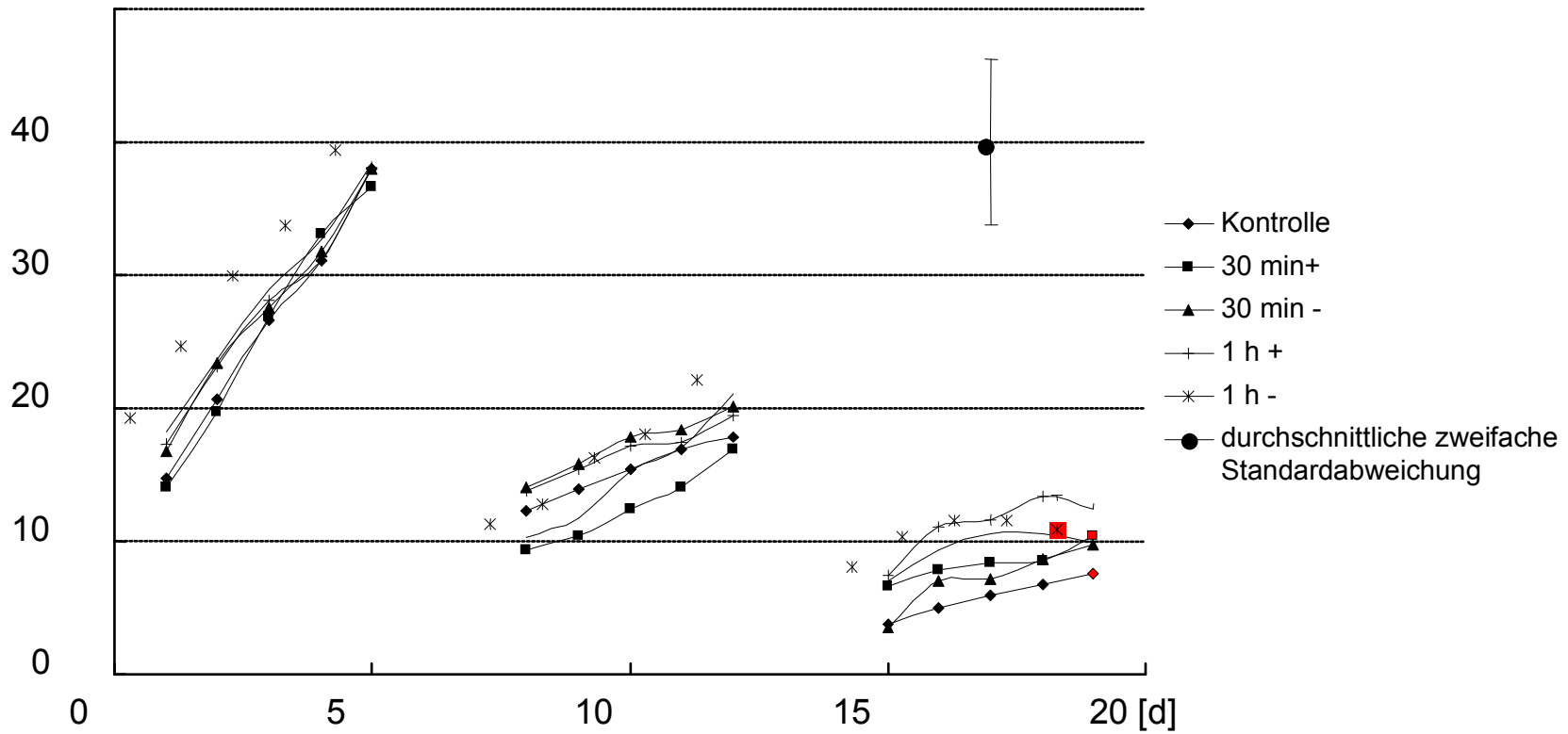


Abbildung 2 B

Literaturliste

- (1) Chang WH, Chen LT, Sun JS, Lin FH. Effect of pulse-burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. *Bioelectromagnetics*. 2004;25:457-465.
- (2) Curtze S, Dembo M, Miron M, Jones DB. Dynamic changes in traction forces with DC electric field in osteoblast-like cells. *J Cell Sci*. 2004;117:2721-2729.
- (3) Diniz P, Soejima K, Ito G. Nitric oxide mediates the effects of pulsed electromagnetic field stimulation on the osteoblast proliferation and differentiation. *Nitric Oxide*. 2002;7:18-23.
- (4) Qiu LH, Tang XN, Zhong M, Wang ZY. [Effect of static magnetic field on proliferation and cell cycle of osteoblast cell.]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*. 2004;13:469-470.
- (5) Reinbold KA, Pollack SR. Serum plays a critical role in modulating $[Ca^{2+}]_c$ of primary culture bone cells exposed to weak ion-resonance magnetic fields. *Bioelectromagnetics*. 1997;18:203-214.
- (6) Yamaguchi DT, Huang J, Ma D, Wang PK. Inhibition of gap junction intercellular communication by extremely low-frequency electromagnetic fields in osteoblast-like models is dependent on cell differentiation. *J Cell Physiol*. 2002;190:180-188.
- (7) Yuge L, Okubo A, Miyashita T et al. Physical stress by magnetic force accelerates differentiation of human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;311:32-38.
- (8) Patel AB, de Graaf RA, Mason GF et al. Glutamatergic neurotransmission and neuronal glucose oxidation are coupled during intense neuronal activation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004;24:972-985.
- (9) Bodamyali T, Bhatt B, Hughes FJ et al. Pulsed electromagnetic fields simultaneously induce osteogenesis and upregulate transcription of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in rat osteoblasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;250:458-461.
- (10) Beebe SJ, Blackmore PF, White J, Joshi RP, Schoenbach KH. Nanosecond pulsed electric fields modulate cell function through intracellular signal transduction mechanisms. *Physiol Meas*. 2004;25:1077-1093.
- (11) Yuge L, Okubo A, Miyashita T et al. Physical stress by magnetic force accelerates differentiation of human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;311:32-38.
- (12) Bivas I, Danelon C. Fields and forces acting on a planar membrane with a conducting channel. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*. 2004;69:041901.
- (13) Tennant JR. Evaluation of the Trypan Blue Technique For Determination of Cell Viability. *Transplantation*. 1964;12:685-694.

- (14) Asada S, Fukuda K, Nishisaka F, Matsukawa M, Hamanisi C. Hydrogen peroxide induces apoptosis of chondrocytes; involvement of calcium ion and extracellular signal-regulated protein kinase. *Inflamm Res*. 2001;50:19-23.
- (15) Kikuyama A, Fukuda K, Mori S et al. Hydrogen peroxide induces apoptosis of osteocytes: involvement of calcium ion and caspase activity. *Calcif Tissue Int*. 2002;71:243-248.
- (16) Bellamy N. WOMAC: a 20-year experiential review of a patient-centered self-reported health status questionnaire. *J Rheumatol*. 2002;29:2473-2476.
- (17) De Wilde JP, Rivers AW, Price DL. A review of the current use of magnetic resonance imaging in pregnancy and safety implications for the fetus. *Prog Biophys Mol Biol*. 2005;87:335-353.
- (18) Beebe SJ, Blackmore PF, White J, Joshi RP, Schoenbach KH. Nanosecond pulsed electric fields modulate cell function through intracellular signal transduction mechanisms. *Physiol Meas*. 2004;25:1077-1093.
- (19) Bodamyali T, Bhatt B, Hughes FJ et al. Pulsed electromagnetic fields simultaneously induce osteogenesis and upregulate transcription of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in rat osteoblasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;250:458-461.
- (20) Chang WH, Chen LT, Sun JS, Lin FH. Effect of pulse-burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. *Bioelectromagnetics*. 2004;25:457-465.
- (21) Yamaguchi DT, Huang J, Ma D, Wang PK. Inhibition of gap junction intercellular communication by extremely low-frequency electromagnetic fields in osteoblast-like models is dependent on cell differentiation. *J Cell Physiol*. 2002;190:180-188.
- (22) Yuge L, Okubo A, Miyashita T et al. Physical stress by magnetic force accelerates differentiation of human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;311:32-38.