

DARTSCH SCIENTIFIC GMBH

Istituto di Sistemi di Test Biologici Cellulari

qui certifica che il prodotto chiamato

Mini-Rayonex

Prodotto e distribuito da

Rayonex Bomedical GmbH a 57368 Lennestadt

Germania

è stato testato per i suoi effetti benefici usando sistemi di test *in vitro*

con cellule di coltura organo tipiche.

Risultati dei test sperimentali

Le indagini con fibroplasti di tessuto connettivo e promielociti che sono stati differenziati a macrofagi hanno mostrato che il metabolismo cellulare è stato stimolato del 45% dopo il trattamento con il dispositivo Mini-Rayonex per sole 24 ore quando paragonato a controlli non trattati. Inoltre, il simulato processo di guarigione di una ferita è stato stimolato approssimativamente del 20% dimostrando che l'uso del dispositivo è benefico per il processo di cura delle ferite.

In sintesi, l'applicazione del dispositivo Mini-Rayonex può essere raccomandato in specifiche situazioni di vita quali il carico fisico, disordini mentali, processi di guarigione e altro

Schongau, 27 Marzo 2014

Prof. Dr.rer.nat. Peter C. Darsch

Diploma di Biochimico

MINI-RAYONEX

Indagini *in-vitro* sull'attivazione del metabolismo cellulare in colture cellulari organotipiche

Inquadramento

Secondo Rayonex Biomedical GmbH a D-57368 Lennestadt, Germania, "il punto di risonanza maggiormente rilevato si colloca sul valore base di frequenza 12.5. Nella biorisonanza secondo Paul Schmidt questo valore base di frequenza è sinonimo di "energia". Infatti è proprio ciò che necessita l'organismo per far fronte ad ogni tipo di disturbo ... Il Mini-Rayonex è dotato al suo interno di un sistema di antenna a dipolo sintonizzato sul valore base di frequenza 12.5, con una risonanza positiva universale, che in base alla biorisonanza secondo Paul Schmidt è rilevabile in un raggio d'azione di 2/3 m attorno al Mini-Rayonex.

Consigli per l'impiego: i caratteri stampati sul Mini-Rayonex dovrebbero essere rivolti sempre verso l'alto, o lontano dal corpo (in direzione opposta al corpo. In una cartella per la scuola, ad esempio, i caratteri dovrebbero essere rivolti verso l'alto, dovrebbero cioè trovarsi in posizione orizzontale all'interno della cartella). Collocando il Mini-Rayonex in posizione fissa, (ad es. in hotel nel corso di un viaggio), il Mini-Rayonex avrà un'intensità maggiore se viene (puntato verso ovest-est) allineato in direzione est-ovest, secondo la marcatura presente sul dispositivo. Per ottenere la massima efficacia di Mini-Rayonex consigliamo di sciacquarlo con acqua corrente fredda – di rubinetto-per 20 secondi una o due volte alla settimana (lavarlo ogni due giorni per circa 20 secondi sotto l'acqua corrente).

Domanda in merito alle presenti ricerche *in vitro*

Numerosi utenti di tutto il mondo hanno finora percepito la risonanza positiva dei dispositivi Mini-Rayonex. La presente indagine *in vitro* è stata effettuata per verificare se anche diverse colture cellulari organo tipiche siano in grado di rispondere alla risonanza positiva dei dispositivi. L'effetto dovrebbe essere determinato con metodi sperimentali oggettivi e generalmente accettati nel mondo scientifico.

Assetto dell'esperimento

Per le indagini qui presentate sono state usate due diverse linee cellulari: (1) Fibroblasti di tessuto connettivo di topo, che sono solitamente usati per verificare la biocompatibilità di dispositivi medici secondo la EN ISO 10993-5 (linea cellulare L-929,

ACC 173, passaggio P128), e (2) cellule aderenti in crescita differenziate dai macrofagi che sono responsabili della prima difesa non specifica nel tessuto del corpo (linea cellulare HL-60, ACC 3, passaggio 3). Entrambe le linee cellulari sono state acquistate dal Leibniz-Institut DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38124 Braunschweig. Le cellule sono state coltivate come colture di massa in un'incubatrice CO2 Binder a 37° con un'atmosfera umida avente 5% di CO2 e 95% di aria. Il brodo (terreno) di coltura era RPMI 1640 supplementato con 5% di siero fetale bovino, 100 Unità/ml di penicillina & 100 mg/ml di streptomina. Tutti i reagenti delle colture cellulari provenivano da GE Healthcare Life Sciences, D-35091 Colbe.

Per gli esperimenti, le colture sono state prese tra l'80 e il 90% da colture di massa confluenti e sono state seminate in pozzetti quintupli in fila per ogni densità cellulare (piastre a 96 pozzetti, 200 microlitri di terreno di coltura/per pozzetto). La densità delle cellule variava nei singoli esperimenti da 5.000 a 20.000 cellule/per pozzetto). Le cellule seminate sono state incubate per 48 ore nell'incubatrice per permettere il fissaggio, la diffusione e la normalizzazione del metabolismo. Poi, il terreno di coltura è stato aspirato e sostituito da un terreno di esposizione a pH stabile (180 microlitri/per pozzetto) consistente in una parte di RPMI 1640, una parte di soluzione salina tamponata con fosfato, contenente calcio e magnesio, 5mM di glucosio, 5% di siero fetale bovino, 100 Unità/ml di penicillina & 100 microgrammi/ml di streptomina, e 15mM di tampone HEPES.

Le piastre multi pozzetto sono state trasferite in incubatrici esterne specificamente progettate a temperatura stabile di $37.2 \pm 0.2^\circ\text{C}$. Le incubatrici sono state posizionate in stanze diverse ad una distanza minima di 4 metri per evitare l'influenza della biorisonanza del Mini-Rayonex su controlli non trattati. I pozzetti di controllo sono stati sistemati direttamente sul fondo dell'incubatrice esterna, mentre i pozzetti esposti alla biorisonanza del Mini-Rayonex sono stati sistemati sotto e sopra il dispositivo nell'altra incubatrice esterna (Figura 1). Prima dell'uso i dispositivi Mini-Rayonex sono stati sciacquati con acqua corrente di rubinetto e allineati nell'incubatrice in direzione ovest-est con la scritta rivolta verso il lato superiore e quello frontale.

Dopo due ore (esperimenti triplicati) e 24 ore (esperimenti quadruplicati) di continua esposizione alla risonanza dei dispositivi Mini-Rayonex, le piastre a pozzetti multipli sono state tolte dalle incubatrici esterne, sono stati aggiunti 20 microlitri di XTT per pozzetto e le piastre a pozzetti multipli sono state poi incubate per un'altra ora negli stessi posti di prima all'interno dell'incubatrice. Successivamente, la densità ottica di ogni pozzetto è stata esaminata con una misurazione di differenza (?) a 450-690 nm usando un lettore elisa a doppia lunghezza d'onda (BioTek Elx808). XTT è il sale di sodio di 2,3-bis [2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilide e ha un colore giallognolo. Le deidrogenasi mitocondriali di cellule vitali scindono l'anello di tetrazolio XTT formando cristalli di formazano arancioni che sono solubili in soluzioni acquose.

L'intensità della risultante soluzione arancione è direttamente correlata alla vitalità cellulare e all'attività metabolica. I risultati sono espressi come valori di misurazione e di percentuale assoluti in paragone ai controlli non trattati.

Risultati e conclusioni

Come mostrato nella Tavola 1 e 2 in dettaglio, per un tempo di applicazione del dispositivo Mini-Rayonex di sole 2 ore, la risonanza del dispositivo ha provocato un notevole effetto stimolante sul metabolismo cellulare di entrambi i tipi di cellule. La differenza tra le cellule sotto e sopra il dispositivo Mini-Rayonex sono state statisticamente non rilevanti (*t*-test dello studente). La percentuale di stimolazione in paragone ai controlli non trattati è stata del 32 -38%. Ciò significa che l'applicazione del dispositivo ha aumentato l'attività metabolica delle cellule di approssimativamente un terzo. Questo effetto stimolante del Mini-Rayonex potrebbe essere ulteriormente aumentato fino ad un valore percentuale del 45% dopo un tempo di applicazione di 24 ore (Tavola 2 e 4). Ancora, non è stata osservata una differenza significativa tra le cellule sotto e sopra il dispositivo Mini-Rayonex ((*t*-test dello studente).

Riassumendo, i presenti risultati *in-vitro* con due diversi tipi di cellule hanno confermato l'effetto positivo dei dispositivi Mini-Rayonex come già descritto da numerosi utenti ovunque nel mondo. Il grado di stimolazione del metabolismo cellulare fino al 45% è alquanto impressionante e si ottiene dopo solo un giorno di continua applicazione. Quindi, l'uso del dispositivo può essere raccomandato in specifiche situazioni di vita quali il carico fisico, disordini mentali, processi di guarigione e altro.

Ricercatore e responsabile della correttezza dei presenti esperimenti e risultati.

Schongau-19 Marzo 2014 – Prof.Dartsch biochimico

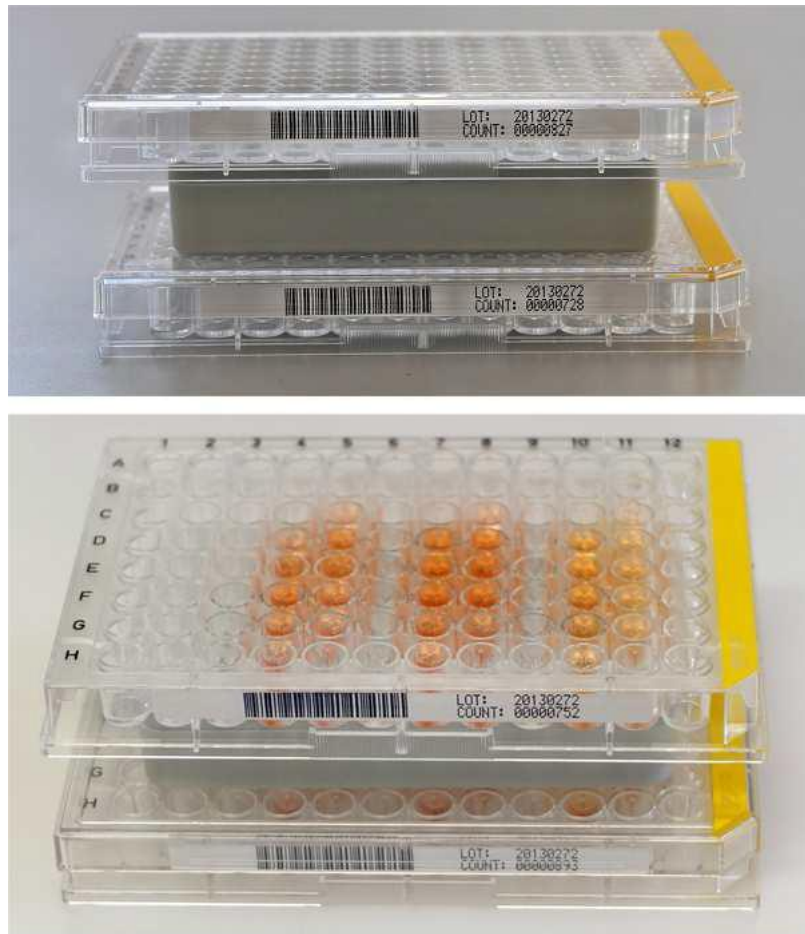


FIGURA 1: Allineamento di piastre a 96 pozzetti sotto e sopra un dispositivo Mini-Rayonex con la sua dicitura rivolta verso l'alto e la parte frontale. Le piastre multiple sono state poste esattamente in questa maniera nell'incubatrice esterna a $37.2\pm 0.2^{\circ}\text{C}$. La parte inferiore della figura mostra i pozzetti con cellule seminate ed esposte che hanno scisso il colorante tetrazolio grazie alla loro vitalità e attività di deidrogenasi mitocondriale (pozzetti di colore arancione)

TABELLA 1: Presentazione dei valori di misurazioni singole di tutti gli esperimenti ottenuti con fibroplasti di tessuto connettivo (linea cellulare L-929) dopo un tempo di esposizione di due ore al dispositivo Mini-Rayonex. Il riepilogo degli esperimenti presenta la stimolazione media \pm S.E.M. La differenza tra le cellule sotto e sopra il dispositivo Mini-Rayonex è statisticamente non rilevante (*t*-test dello studente).

S.E.M. = (Standard Error of the Mean) = Errore Standard della Media

Esperimento # 1 – L – 929 esposto per 2 ore

Campione	Valori di misurazione singole della densità ottica					Valore Medio	\pm	S.E.M.	Stimolazione in % vs controllo	\pm	S.E.M. in %
	142	124	173	121	109						
Controllo non trattato	142	124	173	121	109	134	\pm	11	0	\pm	8,3
Piastra di coltura posta sopra Mini-Rayonex	184	161	181	190	175	178	\pm	5	33,2	\pm	2,8
Piastra di coltura posta sotto il Mini- Rayonex	195	228	168	135	187	183	\pm	15	36,5	\pm	8,4

Esperimento # 2 – L – 929 esposto per 2 ore

Campione	Valori di misurazione singole della densità ottica					Valore Medio	\pm	S.E.M.	Stimolazione in % vs controllo	\pm	S.E.M. in %
	110	123	119	118	107						
Controllo non trattato	110	123	119	118	107	115	\pm	3	0	\pm	2,6
Piastra di coltura posta sopra Mini-Rayonex	206	180	153	128	119	157	\pm	16	36,2	\pm	10,3
Piastra di coltura posta sotto il Mini- Rayonex	136	163	159	182	174	163	\pm	8	41,1	\pm	48

Esperimento # 3 – L – 929 esposto per 2 ore

Campione	Valori di misurazione singole della densità ottica					Valore Medio	±	S.E.M.	Stimolazione in % vs controllo	±	S.E.M. in %
	167	128	179	164	143						
Controllo non trattato	167	128	179	164	143	156	±	9	0	±	5,8
Piastra di coltura posta sopra Mini-Rayonex	208	198	209	187	206	202	±	4	29,1	±	2,0
Piastra di coltura posta sotto il Mini- Rayonex	188	201	254	158	174	195	±	16	24,8	±	8,4

Riepilogo/Sintesi

Campione	stimolazione media in % V1 - V3	±	S.E.M. in %
Piastra di coltura posta sotto il Mini- Rayonex	34,1	±	4,8

TABELLA 2: Presentazione dei valori di misurazioni singole di tutti gli esperimenti ottenuti con 60 HL cellule differenziate dai macrofagi dopo un tempo di esposizione di due ore al dispositivo Mini-Rayonex. Il riepilogo degli esperimenti presenta la stimolazione media \pm S.E.M. La differenza tra le cellule sotto e sopra il dispositivo Mini-Rayonex è statisticamente non rilevante (*t*-test dello studente).

S.E.M. = (Standard Error of the Mean) = Errore Standard della Media

Esperimento # 1 – HL – 60 aderenti esposto per 2 ore

Campione	Valori di misurazione singole della densità ottica					Valore Medio	±	S.E.M.	Stimolazione in % vs controllo	±	S.E.M. in %
	96	123	178	145	131						
Controllo non trattato	96	123	178	145	131	135	±	13	0	±	10,0
Piastra di coltura posta sopra Mini-Rayonex	246	198	148	187	152	186	±	18	38,3	±	9,6
Piastra di coltura posta sotto il Mini- Rayonex	166	206	211	165	175	185	±	10	37,1	±	5,4

Esperimento # 2 HL – 60 aderenti esposto per 2 ore

Campione	Valori di misurazione singole della densità ottica					Valore Medio	±	S.E.M.	Stimolazione in % vs controllo	±	S.E.M. in %
	110	123	119	118	107						
Controllo non trattato	110	123	119	118	107	115	±	3	0	±	2,6
Piastra di coltura posta sopra Mini-Rayonex	180	166	205	132	145	166	±	13	43,5	±	7,8
Piastra di coltura posta sotto il Mini- Rayonex	176	144	161	200	177	172	±	9	48,7	±	5,4

Esperimento # 3 – HL – 60 aderenti esposto per 2 ore

Campione	Valori di misurazione singole della densità ottica					Valore Medio	±	S.E.M.	Stimolazione in % vs controllo	±	S.E.M. in %
	136	147	159	133	154						
Controllo non trattato	136	147	159	133	154	146	±	5	0	±	3,4
Piastra di coltura posta sopra Mini-Rayonex	181	177	189	203	206	191	±	6	31,1	±	3,0
Piastra di coltura posta sotto il Mini- Rayonex	166	213	223	169	175	189	±	12	29,8	±	6,3

Riepilogo/Sintesi

Campione	stimolazione media in % V1 - V3	±	S.E.M. in %
Piastra di coltura posta sotto il Mini- Rayonex	38,5	±	5,5

TABELLA 3: Presentazione dei valori di misurazioni singole di tutti gli esperimenti ottenuti con fibroplasti di tessuto connettivo (linea cellulare L-929) dopo un tempo di esposizione di 24 ore al dispositivo Mini-Rayonex. Il riepilogo degli esperimenti presenta la stimolazione media \pm S.E.M. La differenza tra le cellule sotto e sopra il dispositivo Mini-Rayonex è statisticamente non rilevante (*t*-test dello studente).

S.E.M. = (Standard Error of the Mean) = Errore Standard della Media

Esperimento # 1 – L – 929 esposto per 24 ore

Campione	Valori di misurazione singole della densità ottica					Valore Medio	\pm	S.E.M.	Stimolazione in % vs controllo	\pm	S.E.M. in %
Controllo non trattato	92	155	173	98	112	126	\pm	16	0	\pm	12,8
Piastra di coltura posta sopra Mini-Rayonex	219	136	153	192	132	166	\pm	17	32,1	\pm	10,2
Piastra di coltura posta sotto il Mini- Rayonex	143	219	275	182	144	193	\pm	25	52,9	\pm	12,9

Esperimento # 2 - L – 929 esposto per 24 ore

Campione	Valori di misurazione singole della densità ottica					Valore Medio	\pm	S.E.M.	Stimolazione in % vs controllo	\pm	S.E.M. in %
Controllo non trattato	89	90	120	139	98	107	\pm	10	0	\pm	9,1
Piastra di coltura posta sopra Mini-Rayonex	137	171	203	184	127	164	\pm	14	53,4	\pm	8,7
Piastra di coltura posta sotto il Mini- Rayonex	208	198	125	130	98	152	\pm	22	41,6	\pm	14,3

Esperimento # 3 – L – 929 esposto per 24 ore

Campione	Valori di misurazione singole della densità ottica					Valore Medio	\pm	S.E.M.	Stimolazione in % vs controllo	\pm	S.E.M. in %
Controllo non trattato	160	133	148	161	165	153	\pm	6	0	\pm	3,8
Piastra di coltura posta sopra Mini-Rayonex	202	197	198	189	241	205	\pm	9	33,9	\pm	4,5
Piastra di coltura posta sotto il Mini- Rayonex	211	248	203	171	314	229	\pm	24	49,5	\pm	10,7

Esperimento # 4 – L – 929 esposto per 24 ore

Campione	Valori di misurazione singole della densità ottica					Valore Medio	±	S.E.M.	Stimolazione in % vs controllo	±	S.E.M. in %
	244	177	235	322	244						
Controllo non trattato	244	177	235	322	244	244	±	23	0	±	9,4
Piastra di coltura posta sopra Mini-Rayonex	324	338	298	294	303	311	±	8	27,4	±	2,7
Piastra di coltura posta sotto il Mini- Rayonex	316	246	336	369	435	340	±	31	39,3	±	9,1

Riepilogo/Sintesi

Campione	stimolazione media in % V1 - V4	±	S.E.M. in %
Piastra di coltura posta sotto il Mini- Rayonex	45,8	±	3,2

TABELLA 4: Presentazione dei valori di misurazioni singole di tutti gli esperimenti ottenuti con 60 HL cellule differenziate dai macrofagi dopo un tempo di esposizione di 24 ore al dispositivo Mini-Rayonex. Il riepilogo degli esperimenti presenta la stimolazione media \pm S.E.M. La differenza tra le cellule sotto e sopra il dispositivo Mini-Rayonex è statisticamente non rilevante (*t*-test dello studente).

S.E.M. = (Standard Error of the Mean) = Errore Standard della Media

Esperimento # 1 – HL – 60 aderenti esposto per 24 ore

Campione	Valori di misurazione singole della densità ottica					Valore Medio	±	S.E.M.	Stimolazione in % vs controllo	±	S.E.M. in %
	89	90	120	139	98						
Controllo non trattato	89	90	120	139	98	107	±	10	0	±	9,1
Piastra di coltura posta sopra Mini-Rayonex	114	182	155	135	198	157	±	15	46,3	±	9,7
Piastra di coltura posta sotto il Mini- Rayonex	178	168	159	162	150	163	±	5	52,4	±	2,9

Esperimento # 2 - HL – 60 aderenti esposto per 24 ore

Campione	Valori di misurazione singole della densità ottica					Valore Medio	±	S.E.M.	Stimolazione in % vs controllo	±	S.E.M. in %
	184	133	149	136	129						
Controllo non trattato	184	133	149	136	129	146	±	10	0	±	6,9
Piastra di coltura posta sopra Mini-Rayonex	203	256	207	220	229	223	±	9	52,5	±	4,2
Piastra di coltura posta sotto il Mini- Rayonex	196	248	212	165	208	206	±	13	40,8	±	6,5

Esperimento # 3 – HL – 60 aderenti esposto per 24 ore

Campione	Valori di misurazione singole della densità ottica					Valore Medio	±	S.E.M.	Stimolazione in % vs controllo	±	S.E.M. in %
	124	103	136	137	158						
Controllo non trattato	124	103	136	137	158	132	±	9	0	±	6,8
Piastra di coltura posta sopra Mini-Rayonex	177	214	207	180	128	181	±	15	37,7	±	8,4
Piastra di coltura posta sotto il Mini- Rayonex	170	156	168	189	178	172	±	5	30,9	±	3,2

Esperimento # 4 – HL – 60 aderenti esposto per 24 ore

Campione	Valori di misurazione singole della densità ottica					Valore Medio	±	S.E.M.	Stimolazione in % vs controllo	±	S.E.M. in %
	194	178	265	258	339						
Controllo non trattato	194	178	265	258	339	253	±	30	0	±	11,8
Piastra di coltura posta sopra Mini-Rayonex	255	475	356	447	253	357	±	46	37,7	±	13,0
Piastra di coltura posta sotto il Mini- Rayonex	330	377	280	345	406	348	±	21	37,6	±	6,2

Riepilogo/Sintesi

Campione	stimolazione media in % V1 - V4	±	S.E.M. in %
Piastra di coltura posta sotto il Mini- Rayonex	40,4	±	4,5