

Dartsch Scientific GmbH · Oskar-von-Miller-Str. 10 · D-86956 Schongau

Firma

Rayonex Biomedical GmbH
c/o Prof. Dietmar Heimes
Sauerland-Pyramiden 1

D-57368 Lennestadt

Oskar-von-Miller-Straße 10
D-86956 Schongau, Germany

Fon Diessen: +49 8807 2759-650
Fon Schongau: +49 8861 256-5250
Fax: +49 8861 256-7162
Email: info@dartsch-scientific.com
Web: www.dartsch-scientific.com

16. März 2014

– **Testbericht und Fachinformation** –

Mini-Rayonex

***In vitro*-Untersuchungen zur Aktivierung des Zellstoffwechsels bei organspezifischen Zellkulturen**

Hintergrund

Lt. Hersteller und Vertreiber des Mini-Rayonex-Gerätes, die Rayonex Biomedical GmbH aus D-57368 Lennestadt, liegt die am häufigsten gefundene Resonanzstelle bei körperlichen Belastungen und Problemen auf dem Frequenzgrundwert 12.5. Innerhalb der Bioresonanz nach Paul Schmidt steht dieser Frequenzgrundwert für „Energie“, und dies ist genau das, was der Organismus zu diesem Zeitpunkt benötigt. Der Mini-Rayonex besitzt im Inneren ein auf dem Frequenzgrundwert 12.5 abgestimmtes Dipolantennensystem mit einer universell positiven Resonanz, die gemäß der Bioresonanz nach Paul Schmidt in einem Wirkradius von 2 bis 3 m um den Mini-Rayonex herum ermittelt werden kann.

Tipps zur Anwendung: Die auf dem Mini-Rayonex aufgedruckte Schrift sollte immer nach oben bzw. vom Körper weg zeigen. Positioniert man den Mini-Rayonex stationär, hat er eine größere Intensität, wenn er gemäß der am Gerät befindlichen Kennzeichnung nach „West – Ost“ ausgerichtet wird. Die beste Wirkung zeigt sich immer dann, wenn der Mini-Rayonex für ca. 20 Sekunden unter fließendes Wasser gehalten wird.

Fragestellung der vorliegenden *in vitro*-Untersuchungen

Bei zahlreichen Anwendern weltweit hat der Mini-Rayonex seine Wertigkeit und Wirkung bisher unter Beweis stellen können. In dieser *in vitro*-Untersuchung sollte an zwei verschiedenen organspezifischen Zellkulturen untersucht werden, ob diese vom Gerät abgestrahlte positive Resonanz ebenfalls *in vitro* zu positiven Wirkeffekten führt, welche mit objektiven und etablierten Messverfahren quantifiziert werden können.

Experimentelles Vorgehen

Für die hier dargestellten *in vitro*-Untersuchungen wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet: (1) Bindegewebsfibroblasten der Maus, welche auch für die Untersuchung der Biokompatibilität von Medizinprodukten nach EN ISO 10993-5 üblicherweise verwendet werden (Zelllinie L-929, ACC 173, Passage P128_{intern}) und (2) zu Monozyten, also Zellen der unspezifischen primären Immunabwehr, spontan differenzierte und adhärent wachsende Promyelozyten der Zelllinie HL-60 (ACC 3, Passage P3_{intern}). Beide Zelllinie stammten vom Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38124 Braunschweig.

Die Zellen wurden in einem Begasungsbrutschrank in einer Atmosphäre mit 100 % Luftfeuchtigkeit bei 37 °C und 5 % CO₂ und 95 % Luft inkubiert. Als Kulturmedium wurde für beide Zelllinien RPMI 1640 verwendet, das mit 5 % fötalem Rinderserum, 100 Units/ml Penicillin & 100 µg/ml Streptomycin supplementiert war. Alle Zellkulturreagenzien stammten von GE Healthcare Life Sciences, D-35091 Cölbe.

Für die Untersuchungen wurden die Zellen wurden in drei (2 h Exposition) bzw. vier (24 h Exposition) unabhängigen Versuchen aus ca. 80 bis 90 % konfluenten Massenkulturen in jeweils fünffachem Parallelansatz in 96 Loch-Kulturplatten in Reihen ausgesät (200 µl Kulturmedium/Vertiefung). Die Zelldichte variierte in den einzelnen Versuchen von 5.000 bis 20.00 Zellen/Vertiefung. Die ausgesäten Zellen wurden für 48 h zum Absetzen, Ausbreiten und Normalisierung ihres Stoffwechsels im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und 180 µl/Vertiefung des frisch angesetzten pH-stabilen Expositionsmediums zugegeben. Dieses Medium bestand aus 1 Teil RPMI 1640, 1 Teil Phosphatpuffer mit Kalzium und Magnesium und 5 mM Glukose, 5 % fötalem Rinderserum, 100 Units/ml Penicillin & 100 µg/ml Streptomycin und 15 mM HEPES-Puffer.

Die Kulturplatten wurden in spezielle temperaturkonstante externe Inkubatoren überführt, welche zur Vermeidung einer ungewollten Beeinflussung mehr als 3 m voneinander getrennt in zwei verschiedenen Räumen aufgestellt waren. Diese externen Inkubatoren lieferten über die gesamte Expositionszeit eine Temperaturkonstanz von 37,2 °C ± 0,2 °C. Im Inkubator mit den Kontrollzellen wurden die Kulturplatten einfach auf den Boden des Inkubators übereinander aufgestellt. Bei den Zellen, die der Resonanz des Mini-Rayonex ausgesetzt wurden, wurden die Geräte zunächst für 30 Sekunden in lauwarmes fließendes Wasser gehalten, abgetrocknet und danach im Inkubator "West – Ost" und mit der Schrift nach oben und nach vorne ausgerichtet. Die Kulturplatten wurden sowohl unter dem Mini-Rayonex als auch auf dem Mini-Rayonex plaziert (Abbildung 1).

Nach 2 h und 24 h kontinuierlicher Exposition wurden die Kulturplatten kurzzeitig aus den Inkubatoren entnommen, in jede Vertiefung 20 µl XTT zum quantitativen Nachweis der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen pipettiert und die Kulturplatten für eine weitere Stunde wieder in die Inkubatoren zurück gestellt. Danach wurde die optische Dichte jeder Vertiefung als Differenzmessung bei 450 – 690 nm am Elisareader (BioTEK Elx 808) ge-

messen und mit den entsprechenden Kontrollen verglichen. XTT ist das Natriumsalz von 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilid und hat eine leicht gelbliche Farbe. Die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen spaltet den Tetrazoliumring von XTT und es entstehen orange gefärbte und wasserlösliche Formazankristalle. Die Intensität der orangen Farbe der Reaktionslösung ist direkt proportional zur Enzymaktivität. Die Ergebnisse wurden als Absolut- und Relativwerte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen berechnet und nachfolgend tabellarisch dargestellt.

Ergebnisse und Schlussfolgerungen

Wie in den Tabellen 1 und 2 im Detail dargestellt, hatten die Resonanzen aus dem Mini-Rayonex nach nur zwei Stunden Einwirkungszeit eine deutlich stimulierende Wirkung auf den Zellstoffwechsel beider organspezifischer Zelltypen. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied in der stimulierenden Wirkung zwischen den Zellen auf der Ober- und Unterseite des Mini-Rayonex (Student's *t*-Test). Die prozentuale Stimulation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle lag in einem Bereich zwischen 32 % und 38 %. Durch die 24stündige Einwirkung des Mini-Rayonex-Gerätes auf die Zellen konnte die prozentuale Stimulation auf bis zu 45 % gesteigert werden (Tabelle 3 und 4). Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelltypen oder der Unter- und Oberseite des Mini-Rayonex wurde auch hier nicht beobachtet.

Zusammengefasst konnten in den hier durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen die schon von Anwendern beobachtenden stimulierenden Wirkeffekte des Mini-Rayonex bestätigt werden. Bemerkenswert ist dabei das Ausmaß der Zellstoffwechselstimulation um 30 % bis 45 %, welches offenbar unabhängig von der Anwendungsdauer zu sein scheint, aber mindestens mehrere Stunden betragen sollte. Somit kann die Anwendung des Mini-Rayonex in bestimmten Lebenssituationen (z.B. körperliche oder seelische Belastung, Heilungsprozesse etc.) bestens empfohlen werden.

Versuchsleiter und verantwortlich für die Richtigkeit der dargestellten Testverfahren und Ergebnisse.

Schongau, 16. März 2014




Prof. Dr. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemiker



Abbildung 1: Anordnung der 96-Loch-Kulturplatten unter und über dem Mini-Rayonex-Gerät, dessen Schrift nach oben und vorne gerichtet ist. Diese Anordnung wurden dann in die externen Inkubatoren zur Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur von 37 °C gestellt. Im unteren Bild wurden zur Verdeutlichung und Dokumentation von Zellaussaat und Farbstoffspaltung durch die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen die Kulturplatten nach der enzymatischen Reaktion nochmals unter bzw. auf den Mini-Rayonex plziert.

Tabelle 1: Präsentation der einzelnen Messergebnisse aller drei unabhängigen Versuche mit Bindegewebszellen (Zelllinie L-929) nach 2stündiger Exposition mit dem Mini-Rayonex-Gerät. Ganz unten wurde die Zusammenfassung aller drei Versuche mit der mittleren Stimulation der Zellen \pm S.E.M. dargestellt. Der Unterschied in der Stimulation oberhalb und unterhalb des Mini-Rayonex ist statistisch nicht signifikant (Student's *t*-Test). S.E.M. = Standardfehler des Mittelwertes.

Versuch 1 - L-929 für 2 h

Probe	Einzelwerte für die gemessene optische Dichte					Mittelwert	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. Kontrolle	\pm	S.E.M. in %
Unbehandelte Kontrolle	142	124	173	121	109	134	\pm	11	0	\pm	8,3
Multiplatte oberhalb des Mini Rayonex	184	161	181	190	175	178	\pm	5	33,2	\pm	2,8
Multiplatte unterhalb des Mini Rayonex	195	228	168	135	187	183	\pm	15	36,5	\pm	8,4

Versuch 2 - L-929 für 2 h

Probe	Einzelwerte für die gemessene optische Dichte					Mittelwert	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. Kontrolle	\pm	S.E.M. in %
Unbehandelte Kontrolle	110	123	119	118	107	115	\pm	3	0	\pm	2,6
Multiplatte oberhalb des Mini Rayonex	206	180	153	128	119	157	\pm	16	36,2	\pm	10,3
Multiplatte unterhalb des Mini Rayonex	136	163	159	182	174	163	\pm	8	41,1	\pm	4,8

Versuch 3 - L-929 für 2 h

Probe	Einzelwerte für die gemessene optische Dichte					Mittelwert	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. Kontrolle	\pm	S.E.M. in %
Unbehandelte Kontrolle	167	128	179	164	143	156	\pm	9	0	\pm	5,8
Multiplatte oberhalb des Mini Rayonex	208	198	209	187	206	202	\pm	4	29,1	\pm	2,0
Multiplatte unterhalb des Mini Rayonex	188	201	254	158	174	195	\pm	16	24,8	\pm	8,4

Zusammenfassung

Probe	Mittlere Stimulation in % für V1-V3	\pm	S.E.M. V1-V3
Multiplatte oberhalb des Mini Rayonex	32,8	\pm	2,1
Multiplatte unterhalb des Mini Rayonex	34,1	\pm	4,8

Tabelle 2: Präsentation der einzelnen Messergebnisse aller drei unabhängigen Versuche mit adhärent wachsenden und zu Monozyten differenzierten HL-60-Zellen nach 2stündiger Exposition mit dem Mini-Rayonex-Gerät. Ganz unten wurde die Zusammenfassung aller drei Versuche mit der mittleren Stimulation der Zellen \pm S.E.M. dargestellt. Der Unterschied in der Stimulation oberhalb und unterhalb des Mini-Rayonex ist statistisch nicht signifikant (Student's *t*-Test). S.E.M. = Standardfehler des Mittelwertes.

Versuch 1 - HL-60 adh. für 2 h

Probe	Einzelwerte für die gemessene optische Dichte					Mittelwert	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. Kontrolle	\pm	S.E.M. in %
Unbehandelte Kontrolle	96	123	178	145	131	135	\pm	13	0	\pm	10,0
Multiplatte oberhalb des Mini Rayonex	246	198	148	187	152	186	\pm	18	38,3	\pm	9,6
Multiplatte unterhalb des Mini Rayonex	166	206	211	165	175	185	\pm	10	37,1	\pm	5,4

Versuch 2 - HL-60 adh. für 2 h

Probe	Einzelwerte für die gemessene optische Dichte					Mittelwert	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. Kontrolle	\pm	S.E.M. in %
Unbehandelte Kontrolle	110	123	119	118	107	115	\pm	3	0	\pm	2,6
Multiplatte oberhalb des Mini Rayonex	180	166	205	132	145	166	\pm	13	43,5	\pm	7,8
Multiplatte unterhalb des Mini Rayonex	176	144	161	200	177	172	\pm	9	48,7	\pm	5,4

Versuch 3 - HL-60 adh. für 2 h

Probe	Einzelwerte für die gemessene optische Dichte					Mittelwert	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. Kontrolle	\pm	S.E.M. in %
Unbehandelte Kontrolle	136	147	159	133	154	146	\pm	5	0	\pm	3,4
Multiplatte oberhalb des Mini Rayonex	181	177	189	203	206	191	\pm	6	31,1	\pm	3,0
Multiplatte unterhalb des Mini Rayonex	166	213	223	169	175	189	\pm	12	29,8	\pm	6,3

Zusammenfassung

Probe	Mittlere Stimulation in % für V1-V3	\pm	S.E.M. V1-V3
Multiplatte oberhalb des Mini Rayonex	37,7	\pm	3,6
Multiplatte unterhalb des Mini Rayonex	38,5	\pm	5,5

Tabelle 3: Präsentation der einzelnen Messergebnisse aller vier unabhängigen Versuche mit Bindegewebszellen (Zelllinie L-929) nach 24stündiger Exposition mit dem Mini-Rayonex-Gerät. Ganz unten wurde die Zusammenfassung aller vier Versuche mit der mittleren Stimulation der Zellen \pm S.E.M. dargestellt. Der Unterschied in der Stimulation oberhalb und unterhalb des Mini-Rayonex ist statistisch nicht signifikant (Student's *t*-Test). S.E.M. = Standardfehler des Mittelwertes.

Versuch 1 - L-929 für 24 h

Probe	Einzelwerte für die gemessene optische Dichte					Mittelwert	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. Kontrolle	\pm	S.E.M. in %
Unbehandelte Kontrolle	92	155	173	98	112	126	\pm	16	0	\pm	12,8
Multiplatte oberhalb des Mini Rayonex	219	136	153	192	132	166	\pm	17	32,1	\pm	10,2
Multiplatte unterhalb des Mini Rayonex	143	219	275	182	144	193	\pm	25	52,9	\pm	12,9

Versuch 2 - L-929 für 24 h

Probe	Einzelwerte für die gemessene optische Dichte					Mittelwert	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. Kontrolle	\pm	S.E.M. in %
Unbehandelte Kontrolle	89	90	120	139	98	107	\pm	10	0	\pm	9,1
Multiplatte oberhalb des Mini Rayonex	137	171	203	184	127	164	\pm	14	53,4	\pm	8,7
Multiplatte unterhalb des Mini Rayonex	208	198	125	130	98	152	\pm	22	41,6	\pm	14,3

Versuch 3 - L-929 für 24 h

Probe	Einzelwerte für die gemessene optische Dichte					Mittelwert	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. Kontrolle	\pm	S.E.M. in %
Unbehandelte Kontrolle	160	133	148	161	165	153	\pm	6	0	\pm	3,8
Multiplatte oberhalb des Mini Rayonex	202	197	198	189	241	205	\pm	9	33,9	\pm	4,5
Multiplatte unterhalb des Mini Rayonex	211	248	203	171	314	229	\pm	24	49,5	\pm	10,7

Versuch 4 - L-929 für 24 h

Probe	Einzelwerte für die gemessene optische Dichte					Mittelwert	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. Kontrolle	\pm	S.E.M. in %
Unbehandelte Kontrolle	244	177	235	322	244	244	\pm	23	0	\pm	9,4
Multiplatte oberhalb des Mini Rayonex	324	338	298	294	303	311	\pm	8	27,4	\pm	2,7
Multiplatte unterhalb des Mini Rayonex	316	246	336	369	435	340	\pm	31	39,3	\pm	9,1

Zusammenfassung

Probe	Mittlere Stimulation in % für V1-V4	\pm	S.E.M. V1-V4
Multiplatte oberhalb des Mini Rayonex	36,7	\pm	5,7
Multiplatte unterhalb des Mini Rayonex	45,8	\pm	3,2

Tabelle 4: Präsentation der einzelnen Messergebnisse aller vier unabhängigen Versuche mit adhärent wachsenden und zu Monozyten differenzierten HL-60-Zellen nach 24stündiger Exposition mit dem Mini-Rayonex-Gerät. Ganz unten wurde die Zusammenfassung aller vier Versuche mit der mittleren Stimulation der Zellen \pm S.E.M. dargestellt. Der Unterschied in der Stimulation oberhalb und unterhalb des Mini-Rayonex ist statistisch nicht signifikant (Student's *t*-Test). S.E.M. = Standardfehler des Mittelwertes.

Versuch 1 - HL-60 adh. für 24 h

Probe	Einzelwerte für die gemessene optische Dichte					Mittelwert	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. Kontrolle	\pm	S.E.M. in %
Unbehandelte Kontrolle	89	90	120	139	98	107	\pm	10	0	\pm	9,1
Multiplatte oberhalb des Mini Rayonex	114	182	155	135	198	157	\pm	15	46,3	\pm	9,7
Multiplatte unterhalb des Mini Rayonex	178	168	159	162	150	163	\pm	5	52,4	\pm	2,9

Versuch 2 - HL-60 adh. für 24 h

Probe	Einzelwerte für die gemessene optische Dichte					Mittelwert	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. Kontrolle	\pm	S.E.M. in %
Unbehandelte Kontrolle	184	133	149	136	129	146	\pm	10	0	\pm	6,9
Multiplatte oberhalb des Mini Rayonex	203	256	207	220	229	223	\pm	9	52,5	\pm	4,2
Multiplatte unterhalb des Mini Rayonex	196	248	212	165	208	206	\pm	13	40,8	\pm	6,5

Versuch 3 - HL-60 adh. für 24 h

Probe	Einzelwerte für die gemessene optische Dichte					Mittelwert	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. Kontrolle	\pm	S.E.M. in %
Unbehandelte Kontrolle	124	103	136	137	158	132	\pm	9	0	\pm	6,8
Multiplatte oberhalb des Mini Rayonex	177	214	207	180	128	181	\pm	15	37,7	\pm	8,4
Multiplatte unterhalb des Mini Rayonex	170	156	168	189	178	172	\pm	5	30,9	\pm	3,2

Versuch 4 - HL-60 adh. für 24 h

Probe	Einzelwerte für die gemessene optische Dichte					Mittelwert	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. Kontrolle	\pm	S.E.M. in %
Unbehandelte Kontrolle	194	178	265	287	339	253	\pm	30	0	\pm	11,8
Multiplatte oberhalb des Mini Rayonex	255	475	356	447	253	357	\pm	46	41,4	\pm	13,0
Multiplatte unterhalb des Mini Rayonex	330	377	280	345	406	348	\pm	21	37,6	\pm	6,2

Zusammenfassung

Probe	Mittlere Stimulation in % für V1-V4	\pm	S.E.M. V1-V4
Multiplatte oberhalb des Mini Rayonex	44,5	\pm	3,2
Multiplatte unterhalb des Mini Rayonex	40,4	\pm	4,5

Dartsch Scientific GmbH · Oskar-von-Miller-Str. 10 · D-86956 Schongau

Rayonex Biomedical GmbH
c/o Prof. Dietmar Heimes
Sauerland-Pyramiden 1

D-57368 Lennestadt

Oskar-von-Miller-Straße 10
D-86956 Schongau, Germany

Fon Diessen: +49 8807 2759-650
Fon Schongau: +49 8861 256-5250
Fax: +49 8861 256-7162
Email: info@dartsch-scientific.com
Web: www.dartsch-scientific.com

March 19, 2014

– Test report and professional information –

Mini-Rayonex

In vitro-investigations on the activation of cell metabolism in organ-specific cell cultures

Background

According to Rayonex Biomedical GmbH from D-57368 Lennestadt, Germany, „the most frequently detected resonance spot lies on the fundamental frequency value space 12.5. Within bio-resonance according to Paul Schmidt, this frequency value stands for energy. This is exactly what the organism needs to face disturbances of any kind ... Inside, the Mini-Rayonex is equipped with a dipole antenna system tuned to the fundamental frequency value 12.5, with a universal positive resonance. Using bio-resonance according to Paul Schmidt, you can detect it in an effective radius of 2 - 3 m around the Mini-Rayonex.

Tips for use: The writing on the Mini-Rayonex should always point upward or away from the body ... A Mini-Rayonex in stationary position is more effective if it is aligned in east-west direction in accord with the markings on the device. It works best if you rinse it with running cold water (tap water) for 20 seconds once or twice a week.“

Question behind the present *in vitro*-investigations

Numerous users all over the world have felt the positive resonance of Mini-Rayonex devices up to now. The present *in vitro*-investigation was performed to examine whether different organ-specific cell cultures are also able to respond to the positive resonance of the devices. The effect should be determined with objective and generally accepted experimental methods in the scientific world.

Experimental setup

Two different cell lines were taken for the investigations presented here: (1) Mouse connective tissue fibroblasts, which are usually taken for the examination of biocompatibility of medical devices according to EN ISO 10993-5 (cell line L-929, ACC 173, passage P128), and (2) adherent growing cells which have been differentiated to macrophages which are responsible for the first unspecific defense in the tissue of the body (cell line HL-60, ACC 3, passage P3). Both cell lines were purchased from Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38124 Braunschweig.

Cells were cultivated as mass cultures in a Binder CO₂ incubator at 37 °C with a moist atmosphere of 5 % CO₂ and 95 % air. Culture medium was RPMI 1640 supplemented with 5 % fetal bovine serum, 100 Units/ml of penicillin & 100 µg/ml of streptomycin. All cell culture reagents were from GE Healthcare Life Sciences, D-35091 Cölbe.

For the experiments, cells were taken from 80 to 90 % confluent mass cultures and were seeded in quintuplicate wells in a row for each cell density (96-well plates, 200 µl culture medium/well). The cell density varied in the single experiments from 5,000 to 20,000 cells/well. The seeded cells were incubated for 48 hours in the incubator to allow attachment, spreading and normalisation of metabolism. Then, culture medium was aspirated and replaced by a pH-stable exposure medium (180 µl/well) consisting of one part of RPMI 1640, one part of phosphate-buffered saline with calcium and magnesium, 5 mM glucose, 5 % fetal bovine serum, 100 Units/ml of penicillin & 100 µg/ml of streptomycin, and 15 mM HEPES buffer.

The multiwell plates were transferred to specially designed external incubators allowing temperature stability at 37.2 ± 0.2 °C. The incubators were placed in different rooms with a minimum distance of 4 m to avoid influence of bio-resonance of the Mini-Rayonex to untreated controls. The control wells were placed directly on the bottom of the external incubator, whereas the wells which were exposed to the resonance of the Mini-Rayonex were placed below and above the device in the other external incubator (Figure 1). Prior to use, the Mini-Rayonex devices were rinsed with running tap water and aligned in the incubator in the direction west – east with the lettering pointing to the upper and front side.

After 2 hours (triplicate experiments) and 24 hours (quadruplicate experiments) of continuous exposure to the resonance of the Mini-Rayonex devices, the multiwell plates were taken from the external incubators, 20 µl of XTT was added per well and the multiwell plates were incubated for another hour at the same places as before within the incubators. Thereafter, the optical density of each well was examined by a difference measurement at 450 – 690 nm using a double-wavelength elisa reader (BioTEK Elx 808). XTT is the sodium salt of 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfopheny]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilide and has a yellowish colour. Mitochondrial dehydrogenases of viable cells cleave the tetrazolium ring of XTT yielding orange formazan crystals which are soluble in aqueous solutions. The intensity of the resulting orange solution is directly correlated with cell vitality and me-

tabolic activity. The results are expressed as absolute measurement values and percentage values in comparison to untreated controls.

Results and conclusions

As shown in Table 1 and 2 in detail for an application time of the Mini-Rayonex device of only 2 hours, the resonance of the device caused a remarkable stimulating effect on the cell metabolism of both cell types. The difference between the cells below and above the Mini-Rayonex device were statistically not significant (student's *t*-test). The percentage stimulation in comparison to untreated controls was between 32 % and 38 %. This means that application of the device increased metabolic activity of the cells by approximately one third. This stimulatory effect of the Mini-Rayonex could be increased further to a percentage value up to 45 % after an application time of 24 hours (Table 3 and 4). Again, a significant difference between the cells below and above the Mini-Rayonex device were not observed (student's *t*-test).

In summary, the present *in vitro*-results with two different cell types confirmed the positive effect of Mini-Rayonex devices as already described by numerous users all over the world. The degree of cell metabolism stimulation up to 45 % is very impressive and is obtained after only one day of continuous application. Therefore, the use of the Mini-Rayonex device can be recommended in specific life situations such as physical burden, mental disturbances, healing processes and others.

Investigator and responsible for the correctness of the presented experiments and results.

Schongau – March 19, 2014



Prof. Dr. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemiker



Figure 1: Alignment of 96-well plates below and above a Mini-Rayonex device with its lettering pointing upside and to the front. The multiplates were placed exactly in this way into the external incubator at 37.2 ± 0.2 °C. The lower part of the figure represents the wells with seeded and exposed cells which have cleaved the tetrazolium dye due to their vitality and activity of mitochondrial dehydrogenases (orange coloured wells).

Table 1: Presentation of single measurement values of all experiments obtained with connective tissue fibroblasts (cell line L-929) after an exposure time of two hours to the Mini-Rayonex device. The summary of the experiments presents the mean stimulation \pm S.E.M. The difference between the cells below and above the Mini-Rayonex device is statistically not significant (student's *t*-test). S.E.M. = standard error of the mean.

Experiment # 1 - L-929 exposed for 2 h

Sample	Single measurement values of optical density					Mean value	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. control	\pm	S.E.M. in %
Untreated control	142	124	173	121	109	134	\pm	11	0	\pm	8.3
Culture plate placed above Mini-Rayonex	184	161	181	190	175	178	\pm	5	33.2	\pm	2.8
Culture plate placed below Mini-Rayonex	195	228	168	135	187	183	\pm	15	36.5	\pm	8.4

Experiment # 2 - L-929 exposed for 2 h

Sample	Single measurement values of optical density					Mean value	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. control	\pm	S.E.M. in %
Untreated control	110	123	119	118	107	115	\pm	3	0	\pm	2.6
Culture plate placed above Mini-Rayonex	206	180	153	128	119	157	\pm	16	36.2	\pm	10.3
Culture plate placed below Mini-Rayonex	136	163	159	182	174	163	\pm	8	41.1	\pm	4.8

Experiment # 3 - L-929 exposed for 2 h

Sample	Single measurement values of optical density					Mean value	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. control	\pm	S.E.M. in %
Untreated control	167	128	179	164	143	156	\pm	9	0	\pm	5.8
Culture plate placed above Mini-Rayonex	208	198	209	187	206	202	\pm	4	29.1	\pm	2.0
Culture plate placed below Mini-Rayonex	188	201	254	158	174	195	\pm	16	24.8	\pm	8.4

Summary

Sample	Mean stimulation in % for V1-V3	\pm	S.E.M. in %
Culture plate placed above Mini-Rayonex	32.8	\pm	2.1
Culture plate placed below Mini-Rayonex	34.1	\pm	4.8

Table 2: Presentation of single measurement values of all experiments obtained with HL-60 cells which have been differentiated to macrophages after an exposure time of two hours to the Mini-Rayonex device. The summary of the experiments presents the mean stimulation \pm S.E.M. The difference between the cells below and above the Mini-Rayonex device is statistically not significant (student's *t*-test). S.E.M. = standard error of the mean.

Experiment # 1 - HL-60 adh. exposed for 2 h

Sample	Single measurement values of optical density					Mean value	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. control	\pm	S.E.M. in %
Untreated control	96	123	178	145	131	135	\pm	13	0	\pm	10.0
Culture plate placed above Mini-Rayonex	246	198	148	187	152	186	\pm	18	38.3	\pm	9.6
Culture plate placed below Mini-Rayonex	166	206	211	165	175	185	\pm	10	37.1	\pm	5.4

Experiment # 2 - HL-60 adh. exposed for 2 h

Sample	Single measurement values of optical density					Mean value	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. control	\pm	S.E.M. in %
Untreated control	110	123	119	118	107	115	\pm	3	0	\pm	2.6
Culture plate placed above Mini-Rayonex	180	166	205	132	145	166	\pm	13	43.5	\pm	7.8
Culture plate placed below Mini-Rayonex	176	144	161	200	177	172	\pm	9	48.7	\pm	5.4

Experiment # 3 - HL-60 adh. exposed for 2 h

Sample	Single measurement values of optical density					Mean value	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. control	\pm	S.E.M. in %
Untreated control	136	147	159	133	154	146	\pm	5	0	\pm	3.4
Culture plate placed above Mini-Rayonex	181	177	189	203	206	191	\pm	6	31.1	\pm	3.0
Culture plate placed below Mini-Rayonex	166	213	223	169	175	189	\pm	12	29.8	\pm	6.3

Summary

Sample	Mean stimulation in % for V1-V3	\pm	S.E.M. in %
Culture plate placed above Mini-Rayonex	37.7	\pm	3.6
Culture plate placed below Mini-Rayonex	38.5	\pm	5.5

Table 3: Presentation of single measurement values of all experiments obtained with connective tissue fibroblasts (cell line L-929) after an exposure time of 24 hours to the Mini-Rayonex device. The summary of the experiments presents the mean stimulation \pm S.E.M. The difference between the cells below and above the Mini-Rayonex device is statistically not significant (student's *t*-test). S.E.M. = standard error of the mean.

Experiment # 1 - L-929 exposed for 24 h

Sample	Single measurement values of optical density					Mean value	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. control	\pm	S.E.M. in %
Untreated control	92	155	173	98	112	126	\pm	16	0	\pm	12.8
Culture plate placed above Mini-Rayonex	219	136	153	192	132	166	\pm	17	32.1	\pm	10.2
Culture plate placed below Mini-Rayonex	143	219	275	182	144	193	\pm	25	52.9	\pm	12.9

Experiment # 2 - L-929 exposed for 24 h

Sample	Single measurement values of optical density					Mean value	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. control	\pm	S.E.M. in %
Untreated control	89	90	120	139	98	107	\pm	10	0	\pm	9.1
Culture plate placed above Mini-Rayonex	137	171	203	184	127	164	\pm	14	53.4	\pm	8.7
Culture plate placed below Mini-Rayonex	208	198	125	130	98	152	\pm	22	41.6	\pm	14.3

Experiment # 3 - L-929 exposed for 24 h

Sample	Single measurement values of optical density					Mean value	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. control	\pm	S.E.M. in %
Untreated control	160	133	148	161	165	153	\pm	6	0	\pm	3.8
Culture plate placed above Mini-Rayonex	202	197	198	189	241	205	\pm	9	33.9	\pm	4.5
Culture plate placed below Mini-Rayonex	211	248	203	171	314	229	\pm	24	49.5	\pm	10.7

Experiment # 4 - L-929 exposed for 24 h

Sample	Single measurement values of optical density					Mean value	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. control	\pm	S.E.M. in %
Untreated control	244	177	235	322	244	244	\pm	23	0	\pm	9.4
Culture plate placed above Mini-Rayonex	324	338	298	294	303	311	\pm	8	27.4	\pm	2.7
Culture plate placed below Mini-Rayonex	316	246	336	369	435	340	\pm	31	39.3	\pm	9.1

Summary

Sample	Mean stimulation in % for V1-V4	\pm	S.E.M. in %
Culture plate placed above Mini-Rayonex	36.7	\pm	5.7
Culture plate placed below Mini-Rayonex	45.8	\pm	3.2

Table 4: Presentation of single measurement values of all experiments obtained with HL-60 cells which have been differentiated to macrophages after an exposure time of 24 hours to the Mini-Rayonex device. The summary of the experiments presents the mean stimulation \pm S.E.M. The difference between the cells below and above the Mini-Rayonex device is statistically not significant (student's *t*-test). S.E.M. = standard error of the mean.

Experiment # 1 - HL-60 adh. exposed for 24 h

Sample	Single measurement values of optical density					Mean value	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. control	\pm	S.E.M. in %
Untreated control	89	90	120	139	98	107	\pm	10	0	\pm	9.1
Culture plate placed above Mini-Rayonex	114	182	155	135	198	157	\pm	15	46.3	\pm	9.7
Culture plate placed below Mini-Rayonex	178	168	159	162	150	163	\pm	5	52.4	\pm	2.9

Experiment # 2 - HL-60 adh. exposed for 24 h

Sample	Single measurement values of optical density					Mean value	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. control	\pm	S.E.M. in %
Untreated control	184	133	149	136	129	146	\pm	10	0	\pm	6.9
Culture plate placed above Mini-Rayonex	203	256	207	220	229	223	\pm	9	52.5	\pm	4.2
Culture plate placed below Mini-Rayonex	196	248	212	165	208	206	\pm	13	40.8	\pm	6.5

Experiment # 3 - HL-60 adh. exposed for 24 h

Sample	Single measurement values of optical density					Mean value	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. control	\pm	S.E.M. in %
Untreated control	124	103	136	137	158	132	\pm	9	0	\pm	6.8
Culture plate placed above Mini-Rayonex	177	214	207	180	128	181	\pm	15	37.7	\pm	8.4
Culture plate placed below Mini-Rayonex	170	156	168	189	178	172	\pm	5	30.9	\pm	3.2

Experiment # 4 - HL-60 adh. exposed for 24 h

Sample	Single measurement values of optical density					Mean value	\pm	S.E.M.	Stimulation in % vs. control	\pm	S.E.M. in %
Untreated control	194	178	265	287	339	253	\pm	30	0	\pm	11.8
Culture plate placed above Mini-Rayonex	255	475	356	447	253	357	\pm	46	41.4	\pm	13.0
Culture plate placed below Mini-Rayonex	330	377	280	345	406	348	\pm	21	37.6	\pm	6.2

Summary

Sample	Mean stimulation in % for V1-V4	\pm	S.E.M. in %
Culture plate placed above Mini-Rayonex	44.5	\pm	3.2
Culture plate placed below Mini-Rayonex	40.4	\pm	4.5

Dartsch Scientific GmbH · Oskar-von-Miller-Str. 10 · D-86956 Schongau

Firma

Rayonex Biomedical GmbH
c/o Prof. Dietmar Heimes
Sauerland-Pyramiden 1

D-57368 Lennestadt

Oskar-von-Miller-Straße 10
D-86956 Schongau, Germany

Fon Diessen: +49 8807 2759-650
Fon Schongau: +49 8861 256-5250
Fax: +49 8861 256-7162
Email: info@dartsch-scientific.com
Web: www.dartsch-scientific.com

27. März 2014

– Testbericht und Fachinformation –

Mini-Rayonex

In vitro-Untersuchungen zur Stimulation der Wundheilung bei kultivierten Bindegewebsfibroblasten

Hintergrund & Fragestellung

Beim Wundheilungsprozess kann zwischen der Reinigungsphase (Exsudation und Resorption), der Granulationsphase (Proliferation und Festigung) und der Differenzierungsphase (Epithelialisierung und Narbenbildung) unterschieden werden. Speziell die Granulationsphase wird in dem hier verwendeten Testsystem simuliert. Diese Phase zeichnet sich durch das Auftreten von Zellwanderung und Zellproliferation zur Defektauffüllung aus. Vorherrschender Zelltyp sind hier Fibroblasten sowohl aus dem umgebenden als auch aus dem darunter liegenden intakten Gewebe.

Bei zahlreichen Anwendern weltweit hat der Mini-Rayonex seine Wertigkeit und Wirkung durch seine abgestrahlte positive Resonanz bisher unter Beweis stellen können. In dieser *in vitro*-Untersuchung sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Resonanz des Mini-Rayonex in der Lage ist, durch die bereits gezeigte Aktivierung des Zellstoffwechsels auch eine Förderung des Wundheilungsprozesses zu bewirken.

Versuchsdurchführung & Auswertung

Für die hier dargestellten *in vitro*-Untersuchungen zur Wundheilung wurden Bindegewebsfibroblasten der Maus verwendet. Diese werden auch für die Untersuchung der Biokompatibilität von Medizinprodukten nach EN ISO 10993-5 eingesetzt (Zelllinie L-929, ACC 173, Passage P132_{intern}). Die Zelllinie stammte vom Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38124 Braunschweig. Die Zellen wurden in einem CO₂-Begasungsbrutschrank in einer Atmosphäre mit 100 % Luft-

feuchtigkeit bei 37 °C und 5 % CO₂ und 95 % Luft inkubiert. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 verwendet, das mit 5 % fötalem Rinderserum, 100 Units/ml Penicillin & 100 µg/ml Streptomycin supplementiert war. Alle Zellkulturreagenzien stammten von GE Healthcare Life Sciences, D-35091 Cölbe.

Die Bindegewebszellen wurden in einer Dichte von 50.000 Zellen/Vertiefung in 12-Loch-Platten ausgesät (2 ml Kulturmedium/Vertiefung) und für drei Tage bis zum Erreichen einer konfluenten Zellschicht im CO₂-Brutschrank inkubiert. Dann wurde in einer Variation des Scratchtests mit einer Kunststoffspitze (Breite 1400 µm) der Zellrasen in jeder Vertiefung in Form eines kreuzförmigen Schnittes entfernt und so eine künstliche (= zellfreie) Wunde angelegt. Das Kulturmedium wurde abgesaugt, die Zellschicht einmal vorsichtig mit Phosphatpuffer mit Calcium und Magnesium gewaschen und danach 2 ml des frisch angesetzten pH-stabilen Expositionsmediums zugegeben. Dieses Medium bestand aus 1 Teil RPMI 1640, 1 Teil Phosphatpuffer mit Kalzium und Magnesium und 5 mM Glukose, 5 % fötalem Rinderserum, 100 Units/ml Penicillin & 100 µg/ml Streptomycin und 15 mM HEPES-Puffer.

Die Kulturplatten wurden wegen der relativ langen Inkubationszeit mit Klebeband abgedichtet, so dass keine Verdunstung des Mediums möglich war. Die Kulturplatten wurden dann in spezielle temperaturkonstante externe Inkubatoren überführt, welche zur Vermeidung einer ungewollten Beeinflussung durch die Resonanzen des Mini-Rayonex mehr als 3 m voneinander getrennt in zwei verschiedenen Räumen aufgestellt waren. Diese externen Inkubatoren lieferten über die gesamte Expositionszeit eine Temperaturkonstanz von 37,2 °C ± 0,2 °C. Im Inkubator mit den Kontrollzellen wurden die Kulturplatten einfach auf dem Boden des Inkubators übereinander aufgestellt. Bei den Zellen, die der Resonanz des Mini-Rayonex ausgesetzt wurden, wurden die Geräte zunächst für 30 Sekunden in lauwarms fließendes Wasser gehalten, abgetrocknet und danach im Inkubator "West – Ost" und mit der Schrift nach oben und nach vorne ausgerichtet. Die Kulturplatten wurden sowohl unterhalb dem Mini-Rayonex als auch direkt auf dem Mini-Rayonex plaziert.

An den Wundrändern kommt es durch die Verletzung der intakten Zellschicht zu einer Stimulation von Zellteilung und Zellwanderung und so zu einer Besiedlung des zellfreien Raumes unter Schließung der Wunde. Nach drei Tagen wurden die Zellen fixiert und nach Romanowski-Giemsa gefärbt. Dabei wird das Zytoplasma blauviolett und der Zellkern der Zellen rotviolett gefärbt. Die Breite der noch verbliebenen Wunde wurde nun in jeder Vertiefung an zwei verschiedenen Stellen anhand von Mikrofotografien bestimmt.

Die Auswertung erfolgte zunächst in tabellarischer Form und zur Veranschaulichung auch graphisch in der Auftragung der Wundbreite. Dargestellt wurde jeweils der Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.). Als statistisch signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurde ein p-Wert ≤ 0,01 im Student's *t*-Test angesehen.

Ergebnisse und Schlussfolgerungen

Wie in Abbildung 1 dargestellt, wanderten und proliferierten die Bindegewebszellen während der dreitägigen Inkubation in den zellfreien Raum der künstlichen Wunde. In den unbehandelten Kontrollen wurde die Wunde etwa zur Hälfte geschlossen (von 1.400 µm auf ca. 700 µm; Abbildung 2). Die Resonanzen des Mini-Rayonex-Gerätes stimulierten den Wundheilungsprozess bei den Kulturen, die sowohl oberhalb als auch unterhalb des Gerätes für die Dauer der dreitägigen Inkubation plaziert waren. Infolgedessen war in diesen Fällen die Wundbreite mit 490 resp. 549 µm deutlich geringer als für die unbehandelte Kontrolle (Abbildung 2). Berechnet man die prozentuale Stimulation, so erhält man eine annähernd 20 %ige Stimulation durch die Einwirkung des Mini-Rayonex. Diese Stimulation war statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrolle ($p \leq 0,01$; Student's *t*-Test). Ein signifikanter Unterschied zwischen der Plazierung der Kulturplatten oberhalb und unterhalb des Gerätes konnte nicht festgestellt werden.

Zusammengefasst konnten in den hier durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen die schon von Anwendern beobachtenden stimulierenden Wirkeffekte des Mini-Rayonex bei der Wundheilung bestätigt werden. Bemerkenswert ist dabei das Ausmaß der Stimulation um etwa 20 %. Somit kann die Anwendung des Mini-Rayonex in bestimmten Lebenssituationen wie beispielweise zur Beschleunigung von Wundheilungsprozessen bestens empfohlen werden.

Versuchsleiter und verantwortlich für die Richtigkeit der dargestellten Testverfahren und Ergebnisse.

Schongau, 27. März 2014



Prof. Dr. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemiker

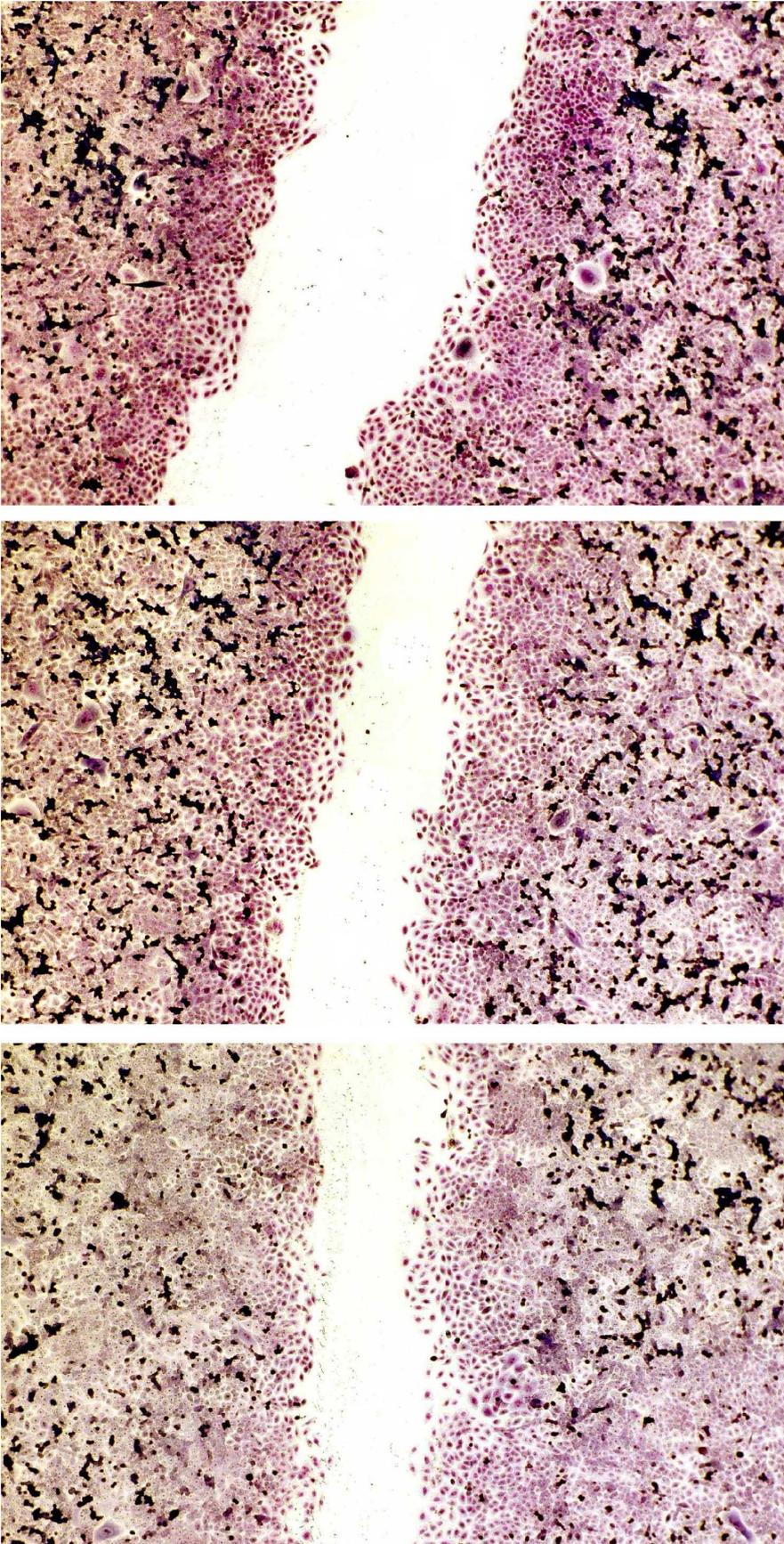


Abbildung 1: Mikrofotografien der gefärbten Zellkulturen im Hellfeld-Verfahren nach 3 Tagen. Die zellfreie Zone, in welche die Zellen einwandern und proliferieren konnten, ist in allen drei Aufnahmen gut erkennbar. Allerdings ist die Breite der Wunde in den unteren beiden Aufnahmen sichtbar geringer. Sehr schön erkennbar ist auch der aufgelockerte Wundrand, welcher wegen der vielen eingewanderten Zellen rötlicher erscheint als die viel dichter gepackten und zudem mit extrazellulärer Matrix überzogenen konfluenten Zellschichten am Rand. Oberes Bild: Unbehandelte Kontrolle. Mittleres Bild: Wundheilung oberhalb des Mini-Rayonex-Gerätes. Unteres Bild: Wundheilung unterhalb des Mini-Rayonex-Gerätes. Die Aufnahmen wurden nur beispielhaft herausgesucht und dienen der Veranschaulichung.

Probe	Wundbreite nach 3 Tagen (Einzelwerte in μm)				Mittelwert (n = 3)	S.E.M. (n = 3)
Unbehandelte Kontrolle	591	682	819	573	697	71
	591	727	764	682		
	545	672	736	986		
Oberhalb vom Mini-Rayonex	709	682	467	610	490	83
	473	564	362	228		
	482	364	364	571		
Unterhalb vom Mini-Rayonex	410	500	672	546	532	57
	400	510	474	624		
	476	541	506	729		

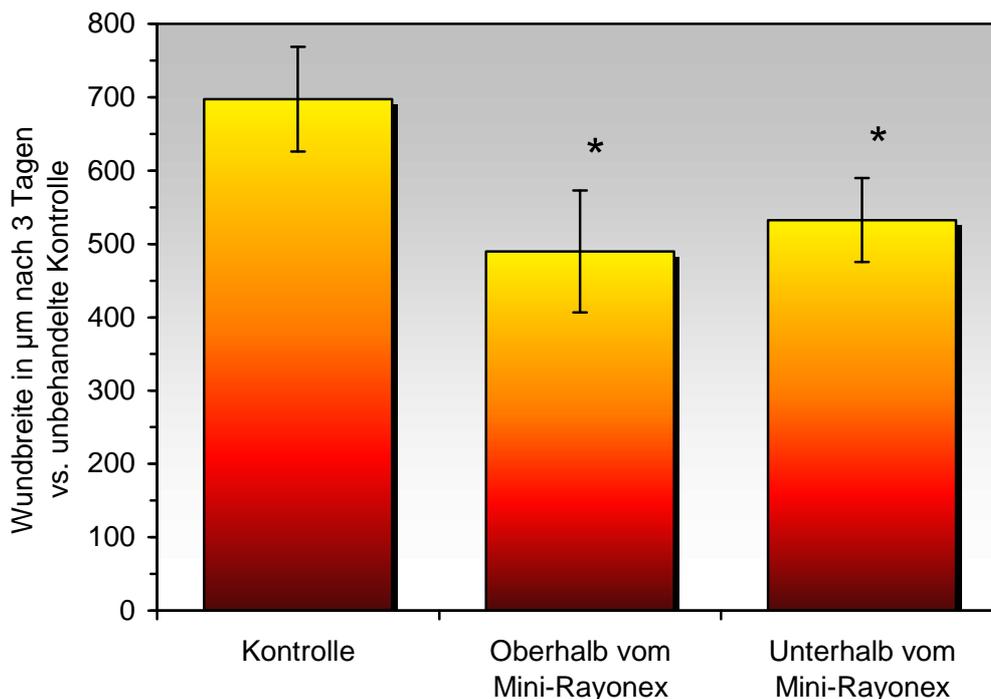


Abbildung 2: Darstellung der Messergebnisse zur Wundheilung in tabellarischer und graphischer Form. Die Daten zeigen die Ergebnisse nach 3 Tagen kontinuierlicher Inkubation der unbehandelten Kontrollen im Vergleich zu den Kulturplatten, die oberhalb und unterhalb des Mini-Rayonex-Gerätes aufgestellt waren. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.). Eine statistisch signifikante Förderung des Wundheilungsprozesses (= geringere Wundbreite) wurde in der graphischen Darstellung mit einem Stern markiert ($p \leq 0,01$; Student's *t*-Test).

Dartsch Scientific GmbH · Oskar-von-Miller-Str. 10 · D-86956 Schongau

Firma

Rayonex Biomedical GmbH

c/o Prof. Dietmar Heimes

Sauerland-Pyramiden 1

D-57368 Lennestadt

Oskar-von-Miller-Straße 10
D-86956 Schongau, Germany

Fon Diessen: +49 8807 2759-650

Fon Schongau: +49 8861 256-5250

Fax: +49 8861 256-7162

Email: info@dartsch-scientific.com

Web: www.dartsch-scientific.com

April 9, 2014

– Test report and professional information –

Mini-Rayonex

***In vitro*-investigations with cultured connective tissue fibroblasts on the stimulation of wound healing process**

Background & question of the study

The stages of wound healing are hemostasis, inflammation, proliferation or granulation, and remodeling or maturation. This test system used here simulates the phase of granulation which is characterised by the migration and proliferation of mainly connective tissue fibroblasts for closure of wound gap.

Numerous users all over the world have felt the positive resonance of Mini-Rayonex devices up to now. The present *in vitro*-investigation was performed to examine whether the application of the Mini-Rayonex device might be also beneficial by stimulating migration and proliferation of connective tissue fibroblasts for a faster closure of a wound gap.

This scratch wound healing assay has been widely adapted and modified by researchers to study the effects of a variety of experimental conditions on cell migration and proliferation. Its basic principle is that the wound gap (= cell-free space) in the cell monolayer is subsequently closed up towards the center of the gap.

Experimental design and data analysis

Mouse connective tissue fibroblasts, which are usually taken for the examination of biocompatibility of medical devices according to EN ISO 10993-5 (cell line L-929, ACC 173, passage P132) were taken for the investigations presented here. The cell line was purchased from Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38124 Braunschweig. Cells were cultivated as mass cultures in a CO₂

incubator at 37 °C with a moist atmosphere of 5 % CO₂ and 95 % air. Culture medium was RPMI 1640 supplemented with 5 % fetal bovine serum, 100 Units/ml of penicillin & 100 µg/ml of streptomycin. All cell culture reagents were from GE Healthcare Life Sciences, D-35091 Cölbe.

For the experiments, cells were taken from 80 to 90 % confluent mass cultures and were seeded into 12-well plates at a density of 50,000 cells/well (2 ml culture medium/well). The cells were incubated for 3 days in the incubator until confluency was obtained. Then, the cell monolayers in the wells were gently scratched with a new 5,000 µl pipette tip across the center of the well. While scratching across the surface of the well, the long-axial of the tip was always perpendicular to the bottom of the well. The resulting wound gap (= cell-free space) had a distance of 1,400 µm. A straight line in one direction was scratched and another scratched line perpendicular to the first one created a cross in each well. After scratching, the wells were washed with phosphate-buffered saline with calcium and magnesium to remove the detached cells. The wells were replenished with fresh pH-stable culture medium (2 ml/well) consisting of one part of RPMI 1640, one part of phosphate-buffered saline with calcium and magnesium, 5 mM glucose, 5 % fetal bovine serum, 100 Units/ml of penicillin & 100 µg/ml of streptomycin, and 15 mM HEPES buffer.

Culture plates were sealed with an adhesive tape to avoid drying-out of the wells during the 3 day incubation period and transferred to specially designed external incubators allowing temperature stability at 37.2 ± 0.2 °C. The incubators were placed in different rooms with a minimum distance of 4 m to avoid influence of bio-resonance of the Mini-Rayonex to untreated controls. The control wells were placed directly on the bottom of the external incubator, whereas the wells which were exposed to the resonance of the Mini-Rayonex were placed below and above the device in the other external incubator. Prior to use, the Mini-Rayonex devices were rinsed with running tap water and aligned in the incubator in the direction west – east with the lettering pointing to the upper and front side.

After 3 days of continuous exposure to the bio-resonance of the Mini-Rayonex device or without any bio-resonance (untreated controls), cells were fixed and stained according to Romanowsky-Giemsa yielding a blue-violet cytoplasm and red cell nuclei.

The distance of the gaps was measured for each well at two different positions after micrography. The evaluation was done in tabular and graphical form. A p-value ≤ 0.01 (Student's *t*-test) was used for calculation of statistical significance between exposed samples and untreated controls.

Results & conclusions

As depicted in Figure 1, the connective tissue fibroblasts migrated and proliferated in the cell-free space during the 3 days of incubation. In untreated controls, the wound gaps were closed from 1,400 µm to approximately 700 µm (Figure 2). The bio-resonance of the Mini-Rayonex device stimulated the wound healing process in the cultures which were placed

below or above the device. Thus, the wound gap was significantly closed to 490 μm or 549 μm , respectively (Figure 2). When calculating the percentage stimulation, one gets a stimulation due to Mini-Rayonex by about 20 % vs. untreated controls. This stimulation was statistically significant when compared with controls ($p \leq 0.01$; Student's *t*-test). A significant difference between the multiplates above and below the device was not obtained.

In summary, the present *in vitro*-results with connective tissue fibroblasts confirm the positive effect of the Mini-Rayonex device as already described by numerous users all over the world. The degree of wound healing stimulation by approximately 20 % is very impressive, because this process includes stimulation of both, cell migration and proliferation. Therefore, the use of the Mini-Rayonex device can be recommended as an application to induce and stimulate wound healing processes.

Investigator and responsible for the correctness of the presented experiments and results.

Schongau – April 9, 2014



Prof. Dr. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemist

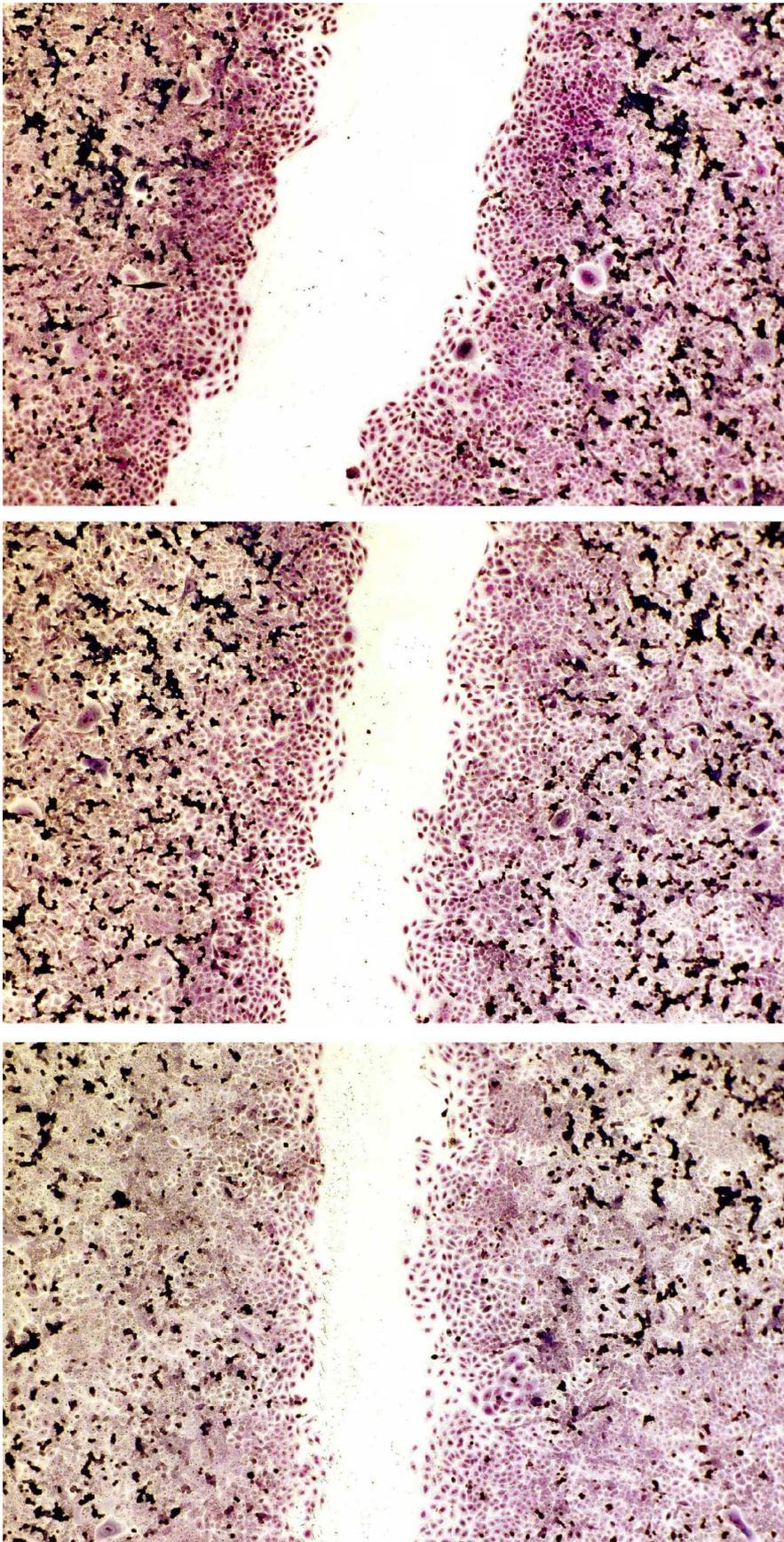


Figure 1: Micrographs of stained cell cultures using bright field after 3 days of wound healing. The cell-free area in which the cells have migrated and proliferated is good to be seen in all three micrographs. However, the wound gap is more prominent in the picture at the top. In addition, the loose wound edge due to cell migration can be easily distinguished from the densely packed cell layers covered with extracellular matrix and distant from the wound gap.

Top: Wound healing of untreated control.

Middle: Wound healing with the multiplate above the Mini-Rayonex device.

Bottom: Wound healing with the multiplate below the Mini-Rayonex device.

Sample	Wound gap after 3 days (single values in μm)				Mean value (n = 3)	S.E.M. (n = 3)
Untreated control	591	682	819	573	697	71
	591	727	764	682		
	545	672	736	986		
Multiplate above Mini-Rayonex	709	682	467	610	490	83
	473	564	362	228		
	482	364	364	571		
Multiplate below Mini-Rayonex	410	500	672	546	532	57
	400	510	474	624		
	476	541	506	729		

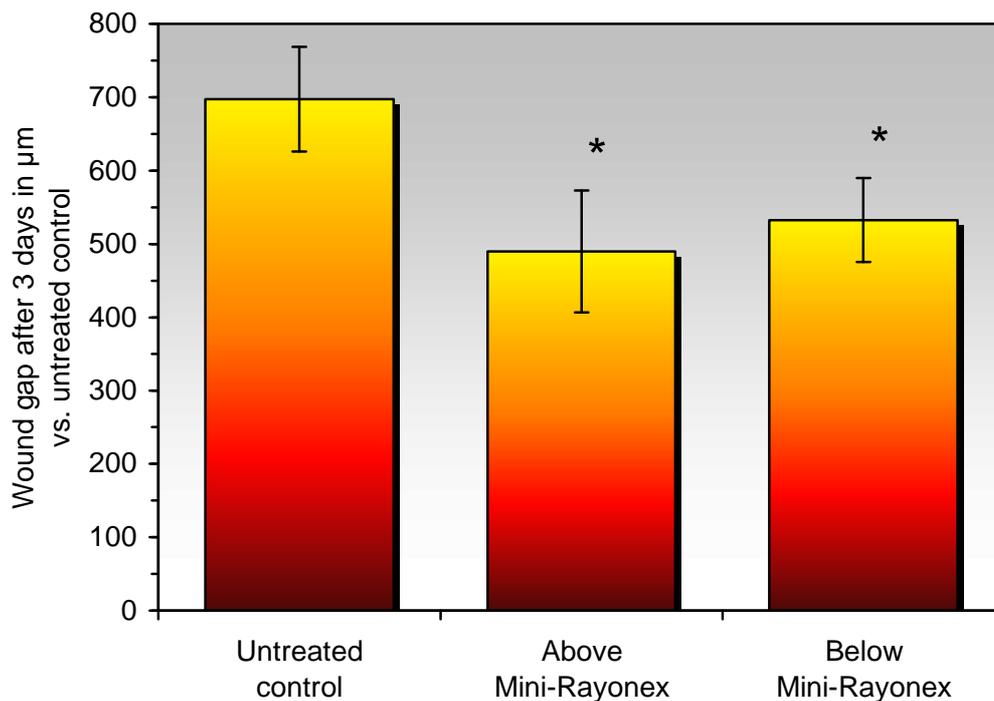


Figure 2: Presentation of measurement data in tabular and graphical form. The data show the results after 3 days of wound healing for untreated multiplates and multiplates which have been placed above and below the Mini-Rayonex device. Data represent mean value \pm standard error of the mean (S.E.M.). A statistically significant stimulation of wound healing process (= smaller wound gap distance) is marked by the arrows ($p \leq 0,01$; student's t -test).

ZERTIFIKAT · CERTIFICATE



DARTSCH SCIENTIFIC GMBH Institut für zellbiologische Testsysteme

bescheinigt hiermit, dass das Produkt

Mini-Rayonex

der Firma

Rayonex Biomedical GmbH aus D-57368 Lennestadt

mit tierversuchsfreien zellbiologischen Testmethoden auf
förderliche Wirkungen *in vitro* untersucht wurde.

Testergebnis:

Bei den von uns durchgeführten Untersuchungen mit kultivierten Bindegewebsfibroblasten und zu Makrophagen differenzierten Promyelozyten konnten wir unter dem Einfluss des Mini-Rayonex-Gerätes nach nur 24 Stunden eine Stimulation des Zellstoffwechsels um bis zu 45 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle beobachten. Ebenfalls von uns simulierte Wundheilungsprozesse wurden um annähernd 20 % im Vergleich zur Kontrolle gefördert und damit der Verlauf der Wundheilung durch die Anwendung des Gerätes günstig beeinflusst.

Aufgrund der Testergebnisse kann daher die Anwendung eines Mini-Rayonex-Gerätes in bestimmten Lebenssituationen (beispielsweise bei körperlichen oder seelischen Belastungen, Heilungsprozessen etc.) empfohlen werden.

Schongau, der 27. März 2014

Prof. Dr. rer. nat. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemiker

ZERTIFIKAT · CERTIFICATE



DARTSCH SCIENTIFIC GMBH Institute of Cell Biological Test Systems

herewith certifies that the product named

Mini-Rayonex

manufactured and distributed by

**Rayonex Biomedical GmbH from 57368 Lennestadt
Germany**

has been tested for its beneficial effects by using *in vitro* test systems
with organ-specific cultured cells.

Results of the Test Assays

The investigations with connective tissue fibroblasts and promyelocytes which have been differentiated to macrophages have shown that cell metabolism was stimulated by 45 % after treatment with the Mini-Rayonex device for only 24 hours when compared to untreated controls. In addition, the simulated wound healing process was also stimulated by approximately 20 % demonstrating that the use of the device is beneficial for the process of wound healing.

In summary, the application of the Mini-Rayonex device can be recommended in specific situations of life such as physical burden, mental disturbances, healing processes and others.

Schongau – March 27, 2014

Prof. Dr. rer. nat. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemiker