

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

Firma

LuKo Pharm GmbH

Mayrwiesstrasse 25-27

A-5300 Hallwang

Auf der Voßhardt 25

D-49419 Wagenfeld, Germany

Fon: +49 5444 980 1322

Fax: +49 5444 980 1332

Mobil: +49 151 2272 1294

Email: info@dartsch-scientific.com

Web: www.dartsch-scientific.com

16. Juli 2016

TESTBERICHT & FACHINFORMATION

Tierversuchsfreie Untersuchungen zu förderlichen Wirkeffekten des Nahrungsergänzungsmittels „Vitalstoff Schutzschild“

1 Hintergrund und Fragestellung der vorliegenden Untersuchung

Ohne Sauerstoff können wir nicht leben, aber Sauerstoff in Form von hochreaktiven freien Sauerstoffradikalen (ROS = reactive oxygen species) kann pathophysiologische Veränderungen bewirken und auch den vorzeitigen Alterungsprozess fördern. Freie Radikale werden als natürliche Stoffwechselprodukte permanent in unserem Körper produziert und erfüllen grundsätzlich wichtige Aufgaben bei der zellulären Signalübermittlung. Umweltbelastungen, Ernährungsmängel, körperlicher oder seelischer Stress, aber auch Medikamente, Verletzungen und Entzündungen können zu einer unkontrollierten Überproduktion der Radikale führen. Die Selbstregulation durch den Körper ist gestört. Übersteigt die Aufnahme oder Bildung freier Radikale deren körpereigene Entgiftung, so spricht man von „oxidativem Stress“. Die schnell und aggressiv wirkenden freien Radikale stören und zerstören wichtige Funktionen und Strukturen im Körper; sie können oxidative Veränderungen verursachen und damit Schädigungen aller wichtigen Biomoleküle wie Nukleinsäuren, Proteine, Lipide und Kohlenhydrate.

Vitalstoff Schutzschild wird vom Hersteller als „diätetisches Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke“ ausgelobt, welches einen hohen Anteil an Vitamin C-Verbindungen sowie bioaktive Pflanzenstoffe (beispielsweise Polyphenole) enthält. Gerade die enthaltenen Vitamin C-Verbindungen und Pflanzenstoffe sollten dem Produkt ausgeprägte Wirkeffekte bei der Neutralisierung überschüssiger exogener und endogener Radikale verleihen. Daher war es das Ziel der vorliegenden experimentellen Studie zu untersuchen, ob nach der Applikation von Vitalstoff Schutzschild diese Wirkeffekte in zellfreien Testverfahren und bei kultivierten Zellen nachweisbar sind.

2 Blutflüssigkeits- und Testkonzentrationen, Stammlösungen

Die Tagesdosis richtet sich bei dem Produkt nach der Empfehlung des Therapeuten oder wird vom Hersteller mit 1-3 Kapseln pro Tag vor den Mahlzeiten angegeben. Eine Kapsel enthält 900 mg Inhalt, so dass sich bei der Einnahme von 1 bis 3 Kapseln/Tag eine Tagesdosis von 900 bis 2.700 mg ergibt.

Nimmt man eine 100%ige Resorption der Wirkstoffe im Magen-Darm-Trakt an, so ergibt sich eine Blutflüssigkeitskonzentration (Blutflüssigkeitsvolumen ohne korpuskuläre Blutbestandteile entspricht ca. 3,3 Liter) von etwa 275 µg/ml (eine Kapsel pro Tag) bis 820 µg/ml (drei Kapseln pro Tag). Bei einer realistischeren Einschätzung der Wirkstoffresorption von 30 % ergibt sich somit eine Blutflüssigkeitskonzentration von etwa 85 bis 250 µg/ml. Unter Zugrundelegung dieser Werte wurden die Testkonzentrationen für die nachfolgenden Untersuchungen im Bereich zwischen 0 µg/ml (= Kontrolle) und 2.000 µg/ml bzw. 5.000 µg/ml gewählt.

Vitalstoff Schutzschild wurde für die am höchsten konzentrierte wässrige Stammlösung in ei-ner Konzentration von 50 mg/ml in Phosphatpuffer mit Calcium und Magnesium (PBS+) hergestellt und durch kurzes Erwärmen auf 37 °C sowie starkes Schütteln bestmöglichst gelöst. Die weiteren Verdünnungen für die anderen 10x-konzentrierten Stammlösungen wurden gleichfalls mit PBS+ durchgeführt.

3 Experimentelles Design & Versuchsdurchführung

3.1 Antioxidative Wirkung im zellfreien Testsystem bei frei im Blut zirkulierenden oder von außen einwirkenden Radikalen

In diesem zellfreien Testsystem wurde ohne die Verwendung von Zellen im Testansatz geprüft, ob die Testsubstanz in der Lage ist, freie Sauerstoffradikale zu inaktivieren. Für die Untersuchung wurden die verschiedenen Konzentrationen von Vitalstoff Schutzschild in Aqua dest. vorgelegt und dazu Kaliumsuperoxid in Aqua dest. (1 mg/ml) pipettiert.

Die nicht durch die Mischung inaktivierten und damit noch aggressiven und reaktionsfreudigen Superoxidanion-Radikale führen dabei zu einer Spaltung und zu einer Änderung der optischen Dichte des ebenfalls zum Ansatz zugegebenen wasserlöslichen Tetrazoliumfarbstoffes WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim).

Die optische Dichte wurde als Differenzmessung $\Delta OD = 450 - 690$ nm kontinuierlich am Elisareader (BioTek SLx808) aufgezeichnet und nach linearer Regression der erhaltenen Kurvenzüge in Form der Steigung (Zeitintervall 0-10 min) in mOD/min ausgewertet. Die Ergebnisse wurden als Relativwerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt und gegen die Konzentration aufgetragen.

3.2 Entzündungshemmende Wirkung im zellbasierten Testsystem bei einem lokalen Überschuss endogen gebildeter Sauerstoffradikale

Zunächst wurden humane Promyelozyten (Zelllinie HL60, ECACC 98070106) als permanente Zelllinie in Routinekultur durch sechstägige Behandlung mit Dimethylsulfoxid zu sog. funktionalen Neutrophilen differenziert. Dies sind Zellen, welche die Eigenschaften von phagozytierenden und entzündungsvermittelnden Zellen (neutrophile Granulozyten) im Blut besitzen. Nach Stimulation bilden diese Zellen in einem sog. oxidativen oder respiratorischen Burst Superoxidanion-Radikale, welche das Gewebe lokal zerstören können. Ein solcher Burst stellt nach der Einwanderung dieser Zellen aus dem Blut ins betroffene Gewebe einen Teilaspekt des komplexen Entzündungsprozesses dar und kann durch die weitere Gewebeerstörung diesen Prozess dauerhaft in Gang halten. Die funktionalen Neutrophilen wurden durch Zugabe eines Phorbolesters (PMA; Phorbol-12-myristat-13-acetat, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) dazu angeregt, Superoxidanion-Radikale zu bilden. Die Radikale führen zu einer Spaltung des ebenfalls dem Versuchsansatz zugesetzten Tetrazoliumfarbstoffes WST-1. Dabei ist die Menge der gebildeten Sauerstoffradikale direkt proportional zur Farbstoffspaltung, d. h. je mehr reaktive Radikale vorhanden sind, desto stärker ist die Farbstoffspaltung und damit auch die Änderung der optischen Dichte. Werden die von den Zellen gebildeten Radikale durch den Wirkstoff inaktiviert, so verändert sich die optische Dichte weniger stark. Es wurde die optische Dichte als Differenzmessung $\Delta OD = 450 - 690 \text{ nm}$ kontinuierlich am Elisareader (BioTek SLx808) aufgezeichnet und nach linearer Regression der erhaltenen Kurvenzüge in Form der Steigung (Zeitintervall 10-30 min) in mOD/min ausgewertet. Dabei wurde auch der basale Stoffwechsel der Zellen ohne PMA-Stimulation, der ja auch zu einer – wenn auch nur erheblich geringeren – Bildung von Radikalen führt, berücksichtigt. Die Ergebnisse wurden als Relativwerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt und gegen die Konzentration aufgetragen.

4 Versuchsergebnisse

4.1 Antioxidative Wirkung bei frei im Blut zirkulierenden oder von außen einwirkenden Radikalen

In allen durchgeführten Einzeltests zeigte sich eine dosisabhängige Inaktivierung der freien Superoxidanion-Radikale mit einem sehr geringen Unterschied zwischen den verschiedenen unabhängigen Einzeltests. Wie in Abbildung 1A dargestellt, lag die Radikalneutralisierung im Bereich der berechneten Blutflüssigkeitskonzentration bei etwa 60 %. Durch den recht steilen Anstieg der Wirkungskurve sind auch genügend Wirkreserven für die Einnahme von nur einer Kapsel pro Tag (Radikalneutralisierung bereits ca. 20 %) vorhanden. Die ED_{50} , also die Konzentration, bei der die Hälfte der freien Radikale inaktiviert wurde, lag bei 600 $\mu\text{g/ml}$ Vitalstoff Schutzschild.

4.2 Entzündungshemmende Wirkung im zellbasierten Testsystem bei einem lokalen Überschuss endogen gebildeter Sauerstoffradikale

Der Kurvenverlauf für die Inaktivierung der endogen und lokal im Gewebe gebildeten Sauerstoffradikale (Abbildung 1B) zeigt auf den ersten Blick einen vergleichbaren Verlauf wie die Kurve in Abbildung 1A: Eine dosisabhängige Radikalneutralisierung, welche erst über der berechneten Blutflüssigkeitskonzentration für die Einnahme von drei Kapseln pro Tag nahezu vollständig war. Bei genauerer Betrachtung offenbaren sich jedoch deutliche Unterschiede. Der Kurvenverlauf in Abbildung 1B ist deutlich steiler, so dass auch bei der Einnahme von nur einer Kapsel pro Tag die Inaktivierung der endogen gebildeten Radikale bereits bei etwa 65 % lag. Dies kam auch in der ED₅₀ zum Ausdruck, die hier 120 µg/ml betrug, also bei einer 4,5x geringeren Konzentration als für die antioxidative Wirkung. Diese hohe entzündungshemmende Wirkeffizienz ist sicherlich auf den Gehalt an sekundären Pflanzenfarbstoffen zurück zu führen. Durch die gleichzeitige Registrierung des basalen Stoffwechsels der funktionalen Neutrophilen ergab sich, dass durch Vitalstoff Schutzschild vor-wiegend die Bildung der endogenen Radikale gehemmt wird (nicht dargestellt).

5 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Zusammengefasst zeigte Vitalstoff Schutzschild in den hier durchgeführten Untersuchungen eine hohe antioxidative und entzündungshemmende Wirkung, wobei letztere aufgrund der außerordentlich hohen Effizienz das dominierende Wirkprinzip des Produktes darstellen dürfte. Beruhigend ist die Tatsache, dass trotz der hohen Wirksamkeit von Vitalstoff Schutzschild im Bereich der berechneten Blutflüssigkeitskonzentration nicht alle Radikale inaktivi-ert werden, da diese auch zur intrazellulären Signalübermittlung und unspezifischen Fremdkörperabwehr benötigt werden. Dies spricht für die sorgfältige Komposition der Inhaltsstoffe und ihrer Konzentration. Durch die Untersuchungsergebnisse ist die Einnahme von Vitalstoff Schutzschild zur Reduzierung von oxidativem Stress durch freie Sauerstoffradikale sowie als Nahrungszusatz zur Besserung der gesundheitlichen Situation bei entzünd-lichen Prozesse sehr empfehlenswert.



Prof. Dr. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemiker

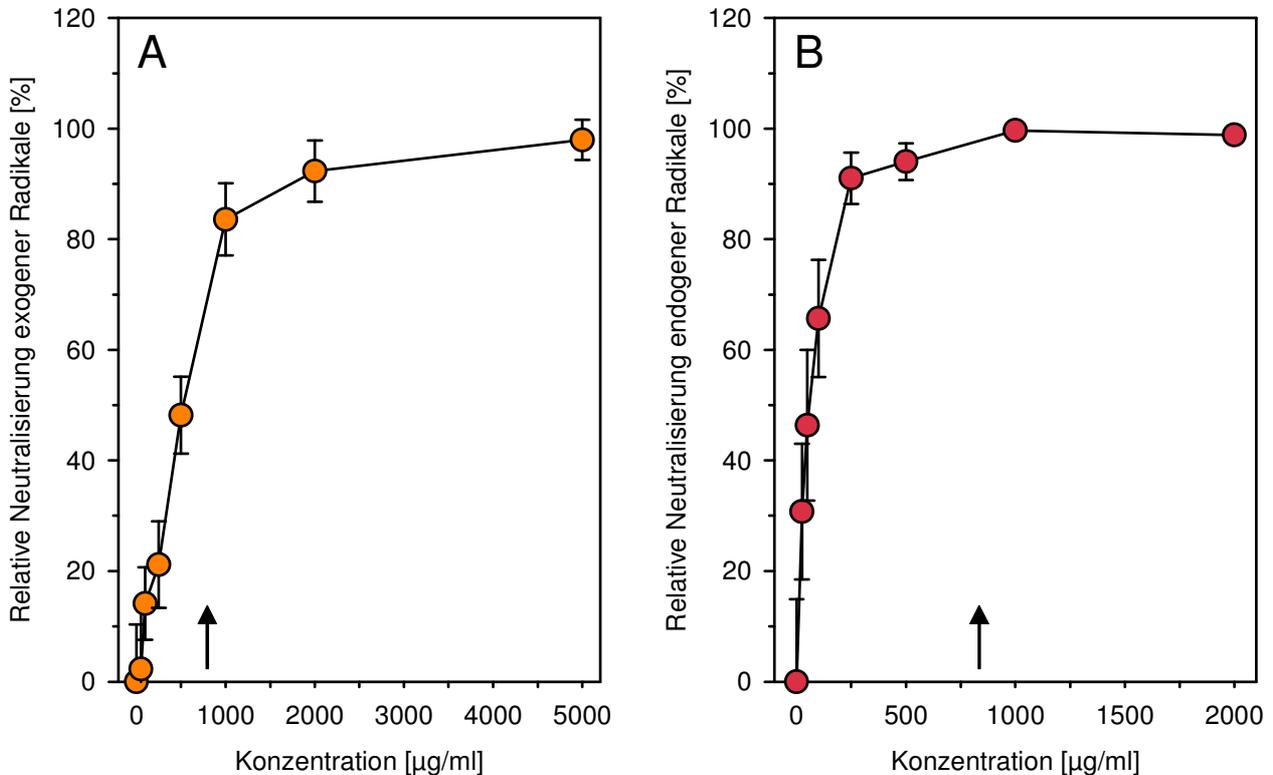


Abbildung 1: Darstellung der Versuchsergebnisse für Vitalstoff Schutzschild. (A) Antioxidative Wirkung im zellfreien Testsystem bei frei im Blut zirkulierenden oder von außen einwirkenden Sauerstoffradikalen. (B) Entzündungshemmende Wirkung im zellbasierten Testsystem bei einem lokalen Überschuss endogen gebildeter Sauerstoffradikale. Der senkrechte Pfeil markiert die berechnete Blutkonzentration einer Tagesdosis von drei Kapseln unter der Voraussetzung einer vollständigen Wirkstoffresorption. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen ($n = 3$).