

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

PRO ENERGETIC
Wittmann GmbH & Co. KG
Werkstrasse 10

A - 8580 Köflach, Österreich

Auf der Voßhardt 25
D-49419 Wagenfeld, Germany

Fon: +49 5444 980 1322
Mobil: +49 151 2272 1294
Email: info@dartsch-scientific.com
Web: www.dartsch-scientific.com

8. April 2023

TESTBERICHT

Essential Caps – Untersuchungen zu förderlichen Wirkeffekten mit kultivierten Darmepithelzellen

1 Hintergrund der durchgeführten *in vitro*-Studie

In der vorliegenden Studie sollte mit aktuellen zellbiologischen Testverfahren – also komplett tierversuchsfrei – untersucht werden, ob die Essential Caps der Firma PRO ENERGETIC Wittmann GmbH & Co. KG aus A - 8580 Köflach, Österreich, auf Zellebene förderliche Wirkeffekte besitzen. Das Produkt ist eine Vitalstoffkombination, welche lt. Hersteller „zu einem normalen Energiestoffwechsel und zur Verringerung von Müdigkeit und Ermüdung beiträgt – insbesondere in Zeiten erhöhter Belastung“. Besonders ausgelobt wird die Normalisierung des Energiestoffwechsels und der Immunfunktion sowie der Schutz der Zellen vor oxidativem Stress.

2 Testkonzentrationen, Stammlösungen und Zellkulturen

Gemäß der Verzehrempfehlung sollte täglich eine Kapsel etwa eine Stunde vor dem Frühstück oder mindestens 2 Stunden nach der letzten Mahlzeit mit reichlich Wasser eingenommen werden. Eine Kapsel enthält 500 mg Vitalstoffe. Werden diese auf 1.000 ml Magensaft- und Dünndarmsaft verteilt, so ergibt sich eine Konzentration von 0,5 mg/ml. Bei einer vollständigen Resorption in der Blutflüssigkeit von 3.500 ml und einer theoretischen 100%igen Resorption ergibt sich rechnerisch eine Konzentration von 0,15 mg/ml. Genau in diesem *in vivo*-relevanten Konzentrationsbereich wurden die Konzentrationen in den Tests angelegt. Dazu wurden stets frisch angesetzte 10-fach konzentrierte Stammlösungen der Essential Caps in Phosphatpuffer hergestellt. Als Lösemittelkontrolle diente in den Tests die Zugabe der gleichen Menge Phosphatpuffer ohne Vitalstoffkombination.

Da nach Einnahme des Produktes speziell der Dünndarm einerseits für die Resorption der Wirkstoffe zuständig ist als auch die höchste Wirkstoffkonzentration erhält, wurden die hier dargestellten Untersuchungen ausschließlich mit kultivierten Darmepithelzellen (Zelllinie

IPEC-J2, ACC 701; Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) durchgeführt. Die Zellen wurden routinemäßig in DMEM-Kulturmedium (1 mg/ml Glucose) mit 10 % Wachstumsgemisch und 0,5 % Gentamycin kultiviert und in einem Brutschrank bei 37 °C und einer Atmosphäre aus 5 % CO₂ und 95 % Luft sowie nahezu 100%iger Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Zellen für die nachfolgenden Untersuchungen wurden aus 80 bis 90 % konfluenten Massenkulturen über mehrere aufeinanderfolgende Passagen hinweg verwendet.

3 Energiestoffwechsel

Der Energiestoffwechsel der Darmepithelzellen repräsentiert deren Vitalität und Stoffwechselaktivität und damit teilweise auch das Ausmaß einer Nährstoffresorption. Für die Versuche wurden die Zellen aus Massenkulturen in einer Zelldichte von 50.000 Zellen/Vertiefung in 96-Loch Kulturplatten (200 µl Kulturmedium/Vertiefung) ausgesät und für 48 Stunden bis zur vollständigen Adhäsion und Stoffwechselaktivität inkubiert. Danach wurde zu den Zellen ein Reaktionsgemisch bestehend aus Phosphatpuffer mit Calcium und Magnesium sowie 10 mM Glucose als Energiequelle, den entsprechenden Testkonzentrationen der Essential Caps sowie ein Tetrazoliumfarbstoff (WST-1; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) gegeben. Da die Farbstoffspaltung im Reaktionsgemisch der Aktivität des zellulären Energiestoffwechsels direkt proportional ist, wurde die optische Dichte als Differenzmessung $\Delta OD = 450 - 690$ nm am Elisareader (BioTek ELx808 mit Software Gen 5 Version 3.00) zum Zeitpunkt $t = 0$ sowie verschiedenen definierten Zeitpunkten bis zu 180 min nach Wirkstoffzugabe aufgezeichnet und die Veränderung der optischen Dichte mit Microsoft Excel 2016 ausgewertet. Die statistische Analyse wurde mit dem parameterfreien zweiseitigen Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest vorgenommen. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt.

Ergebnis: Wie in Abb. 1 dargestellt, bewirkte die Zugabe der Essential Caps eine erstaunlich ausgeprägte dosisabhängige Steigerung des Energiestoffwechsels der Darmepithelzellen, welche bei 0,15 mg/ml (berechnete Blutflüssigkeitskonzentration) das Zwei- bis Dreifache der Lösemittelkontrolle betrug und bei 0,5 mg/ml (berechnete Konzentration im Dünndarm) sogar das Vier- bis Sechsfache. Besonders bemerkenswert und auffällig ist auch die Tatsache, dass die Steigerung nach 30 min immer stärker war als nach 60 min. Dies lässt auf eine Art Booster-Effekt direkt nach der Einnahme des Produktes schließen. Die Steigerung war bei allen Konzentrationen und Zeitpunkten im Vergleich zur Lösemittelkontrolle statistisch signifikant.

In einer neuen und ergänzenden Versuchsreihe dürfte die Wirkung auf Bindegewebsfibroblasten sicherlich ebenfalls sehr interessant sein - auch wenn der dafür zu testende Konzentrationsbereich mit maximal 0,1 mg/ml deutlich tiefer liegen würde als in der jetzigen Untersuchung für die Darmepithelzellen.

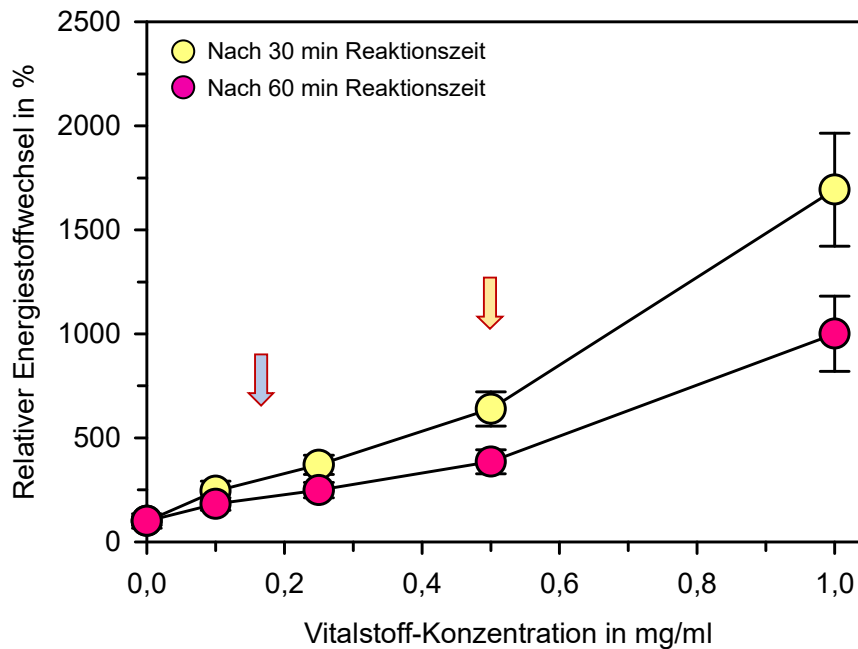


Abb. 1: Relative Zunahme des Energiestoffwechsels im Vergleich zur Kontrolle ohne Essential Caps (= 100 % gesetzt) nach 30 und 60 min Reaktionszeit. Blauer Pfeil: berechnete Blutflüssigkeitskonzentration bei theoretischer 100%iger Wirkstoffresorption; gelber Pfeil: berechnete Dünndarmkonzentration. Beachte die ungewöhnlich starke Zunahme in Abhängigkeit von der Dosis sowie die Tatsache, dass die Werte nach 30 min stets höher sind als nach 60 min. Angegeben ist der Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen.

4 Zellregeneration

Die Regeneration von den Epithelzellen spielt eine wichtige Rolle bei kleinflächigen Traumatisierungen der Darmwand durch unverträgliche Nahrungsmittel, Nahrungsmittel-Zusatzstoffe, oxidativen Stress etc. Die Darmepithelzellen sind dafür bekannt, eine besonders hohe Erneuerungsrate (Turnover-Rate) zu haben.

Die Darmepithelzellen wurden in einer Dichte von 100.000 Zellen/ml in die drei Kompartimente eines Silikonrahmens (3 well-culture inserts; ibidi, Gräfelfing) ausgesät. Die einzelnen Kompartimente sind durch einen 500 μ m dicken Silikonsteg voneinander getrennt. Wegen des speziellen Adhäsionsbereiches des Silikonrahmens haftet dieser fest auf dem Boden einer Kulturschale und bildet so einen zellfreien Raum, den die Zellen nach dem Entfernen des Rahmens durch Teilung und Wanderung neu besiedeln können. Nach Erreichen der Konfluenz (= Zellen liegen dicht an dicht) innerhalb von 48 Stunden nach der Zellaussaat wurden die Silikonrahmen mit einer Pinzette vorsichtig entfernt. So wurde ein scharfer Zellrand zwischen den einzelnen Kompartimenten des Rahmens erhalten.

Direkt nach dem Entfernen des Silikonrahmens wurden die Zellkulturen mit den verschiedenen Testkonzentrationen der Essential Caps im Kulturmedium für weitere 7 Stunden inkubiert. Als Kontrolle diente Kulturmedium ohne Vitalstoffzusatz, aber mit der entsprechenden Menge des Phosphatpuffers (= Lösemittelkontrolle). Schließlich wurden die Zellen mit

Phosphatpuffer gewaschen, mit Methanol fixiert, mit Giemsa-Methylenblau-Lösung (Merck, Darmstadt) in Phosphatpuffer, pH 6,5, gefärbt und luftgetrocknet.

Der prozentuale Anteil der nach Ablauf der Inkubationszeit besiedelten Fläche wurde an Hand von Mikrofotos an acht verschiedenen Stellen pro Präparat durch die Verwendung der Ikosa-Software mit künstlicher Intelligenz (AI) bestimmt (KML Vision, Graz, Österreich) bestimmt. Insgesamt wurden drei unabhängige Versuchsreihen durchgeführt. Die statistische Analyse wurde mit dem parameterfreien zweiseitigen Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest vorgenommen.

Ergebnis: Bezogen auf die besiedelte Gesamtfläche (zweidimensionale Auswertung) nahm die Steigerung der Besiedlung/Regeneration durch 0,1 mg/ml und 0,25 mg/ml der Essential Caps von annähernd 85 % für die Lösemittelkontrolle auf knapp 100 % (nahezu vollständige Besiedlung) signifikant zu ($p \leq 0,01$) und fiel bei Konzentrationen $> 0,25$ mg/ml wieder ab (Abb. 2). Dennoch war auch bei 0,5 mg/ml (berechnete Konzentration im Dünndarm) der Wert mit 93 % immer noch deutlich über dem der Lösemittelkontrolle. Erst bei noch höheren Konzentrationen kam es sogar zu einer Hemmung der Zellregeneration im Vergleich zur Lösemittelkontrolle. Dieser beschriebene Sachverhalt wird auch in der vergleichenden Gegenüberstellung der repräsentativen Mikrofotografien deutlich (Abb. 3).

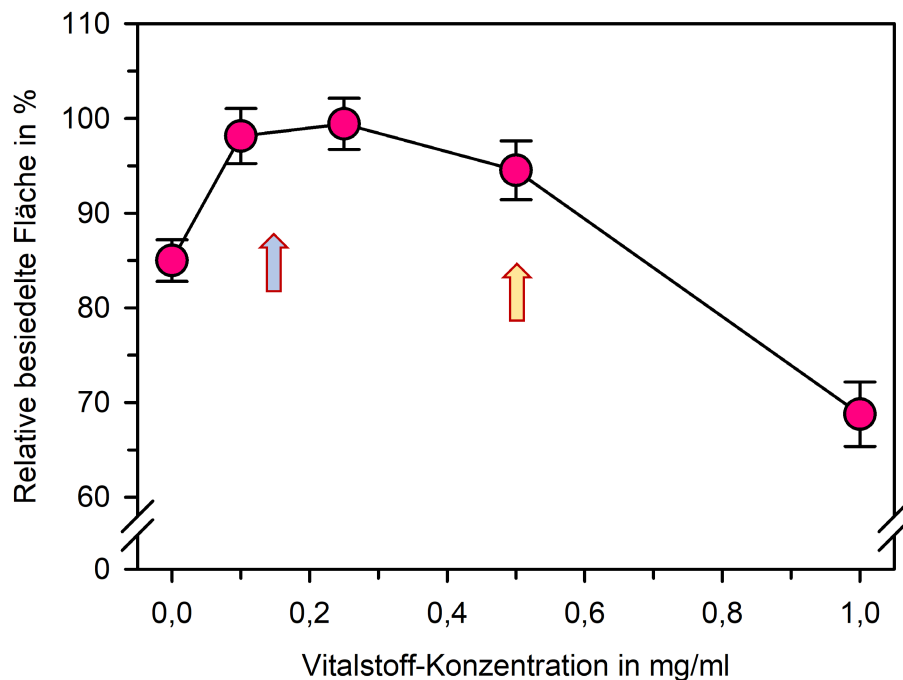


Abb. 2: Zunahme der relativen besiedelten Fläche durch die stimulierte Einwanderung und verstärkte Teilung der Darmepithelzellen nach Gabe der Essential Caps bis zu einer Konzentration von 0,25 mg/ml. Bei höheren Konzentrationen nimmt die Regeneration wieder sukzessive ab und wird bei der höchsten Testkonzentration von 1 mg/ml sogar gegenüber der Lösemittelkontrolle gehemmt. Blauer Pfeil: berechnete Blutflüssigkeitskonzentration bei angenommener 100%iger Wirkstoffresorption; gelber Pfeil: berechnete Dünndarmkonzentration. Angegeben ist der Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen.

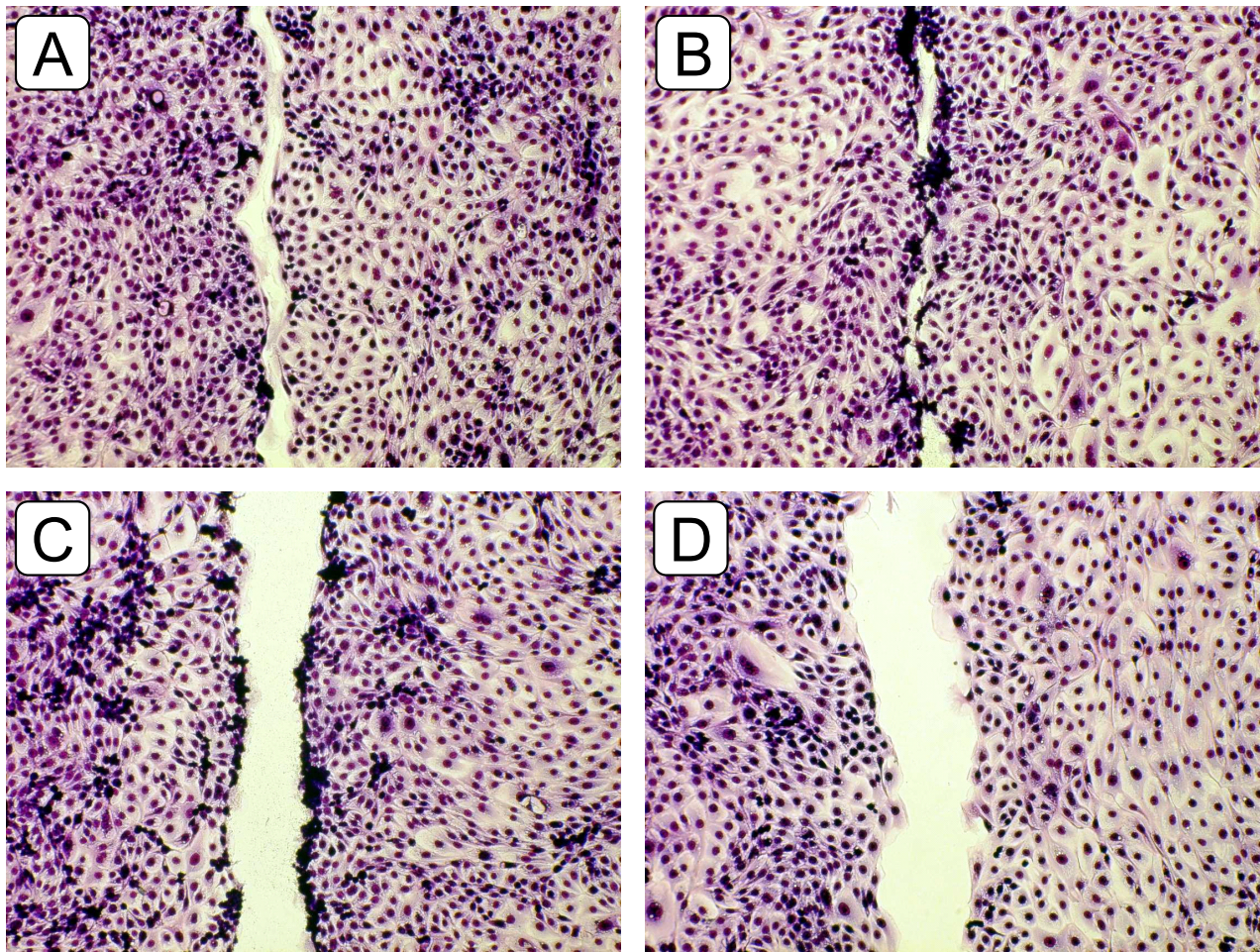


Abb. 3: Mikroskopische Darstellung der förderlichen Wirkung von verschiedenen Konzentrationen der Essential Caps auf die Besiedlung der zellfreien Fläche durch Darmepithelzellen innerhalb von 7 Stunden. (A) 0,1 mg/ml, (B) 0,25 mg/ml, (C) 0,5 mg/ml und (D) Lösemittelkontrolle. Fixierte und angefärbte Präparate im Olympus IX-50 Inversmikroskop mit 10x Planachromat und Olympus E-10 Digitalkamera bei 4 Megapixeln Auflösung im Durchlicht-Hellfeld-Verfahren.

5 Transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER)

Das einschichtige Darmepithel hat mehrere wichtige Aufgaben, nämlich eine physikalische Barriere zwischen dem Inhalt des Darmlumens und dem Rest unseres Körpers zu schaffen sowie eine effiziente Aufnahme essentieller Nährstoffe aus dem Darmlumen sicher zu stellen und Schleim und Substanzen mit immunregulatorischen Eigenschaften zu produzieren. Somit kann eine verminderte Barrierefunktion weitreichende Folgen nicht nur allein für die Darmgesundheit, sondern auch für die systemische Gesundheit haben. Die Bestimmung des TEER ist eine Methode, welche Informationen über die Gleichmäßigkeit der IPEC-J2-Zellschicht auf der mikroporösen Filtermembran und über die Integrität der zwischen den polarisierten Zellen gebildeten Tight Junctions liefert.

IPEC-J2-Zellen wurden 5 Tage lang auf der Oberfläche einer 0,4 µm porösen Membran (Transwell-Platte, Corning, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) gezüchtet, so dass sich zwei ge-

trennte Kompartimente innerhalb der Zellkulturschale ergaben. Tatsächlich stellt die Zellschicht, die die Oberfläche der Membran bedeckt, eine physikalische Barriere gegenüber dem unteren Kompartiment dar. Der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) wurde gemessen, indem eine Elektrode in das Kulturmedium in der oberen Kammer und eine Elektrode in das Kulturmedium in die untere Kammer gehalten wurde. Der Widerstand wurde direkt mit einem tragbaren Voltmeter (Millicell ERS-2 Voltmeter, Millipore/Merck, Darmstadt) gemessen.

Für die Experimente wurden nur Darmepithelzellschichten mit einem elektrischen Widerstand von mindestens $3.000 \Omega/\text{cm}^2$ genommen, was auch lt. der wissenschaftlichen Literatur eine intakte physikalische Barriere mit sehr guter Integrität darstellt. Der TEER der porösen Membranen ohne jegliche Zellbarriere wurde mit Werten zwischen 160 und $180 \Omega/\text{cm}^2$ gemessen. Die Epithelzellschichten wurden für 24 Stunden verschiedenen Konzentrationen der Essential Caps bei 37°C ausgesetzt. Danach wurde der TEER erneut gemessen und die Zunahme berechnet. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Ergebnis: Wie in Abb. 4 dargestellt, führte die Zugabe der Vitalstoffkombination zu einer dosisabhängigen und signifikanten Steigerung des TEER um über 40 % innerhalb von 24 Stunden bei der berechneten Blutflüssigkeitskonzentration von 0,15 mg/ml. Bei der berechneten Dünndarmkonzentration von 0,5 mg/ml war - trotz des einsetzenden Abfalls des TEER - die Steigerung immer noch über 30 %. Bei 1 mg/ml gab es keinen Unterschied mehr zur Lösemittelkontrolle.

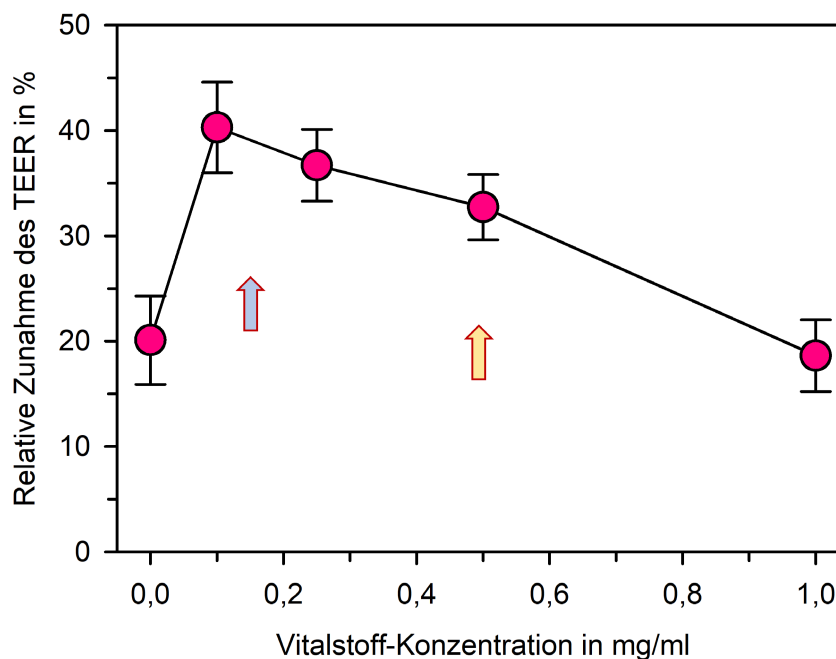


Abb. 4: Zunahme des TEER durch die Essential Caps im *in vivo*-relevanten Konzentrationsbereich. Blauer Pfeil: berechnete Blutflüssigkeitskonzentration bei angenommener 100%iger Wirkstoffresorption; gelber Pfeil: berechnete Dünndarmkonzentration. Angegeben ist der Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen.

6 Darmwandbarriere und oxidativer Stress

Eine intakte Darmwandbarriere ist viel besser in der Lage, oxidativen Stress und die damit verbundenen Folgen wie Zellschädigungen, Entzündungsprozesse, unspezifische Reizungen des Darmes etc. zu kompensieren. Basierend auf der deutlichen Verbesserung der Integrität der Darmwandbarriere gemäß dem gemessenen TEER in Abschnitt 5 wurden in ergänzenden Untersuchungen die Darmepithelzellschichten für 24 Stunden mit 250 $\mu\text{mol/l}$ Wasserstoffperoxid im Kulturmedium inkubiert, welches auf der apikalen Seite (oberes Kompartiment des Transwell-Kulturschaleneinsatzes) zugegeben wurde. Danach wurde der TEER erneut gemessen und die Veränderung berechnet. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Ergebnis: Tatsächlich zeigte sich auch in diesen Experimenten, dass die Stärkung der Darmwandbarriere durch die Essential Caps auch zu einer protektiven Wirkung gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies führte. Wie in Abb. 5 dargestellt, bewirkte die Zugabe der Vitalstoffkombination nicht nur eine Schutzwirkung, sondern verbesserte sogar noch die Integrität der Darmwand nach Einwirkung von Wasserstoffperoxid um bis zu 30 % bei 0,1 mg/ml. Bei der berechneten Dünndarmkonzentration von 0,5 mg/ml betrug die Verbesserung immerhin noch knapp 20 %. Die Darmwandbarriere wurde durch das Wasserstoffperoxid bei der Lösemittelkontrolle dagegen um etwa 25 % geschwächt.

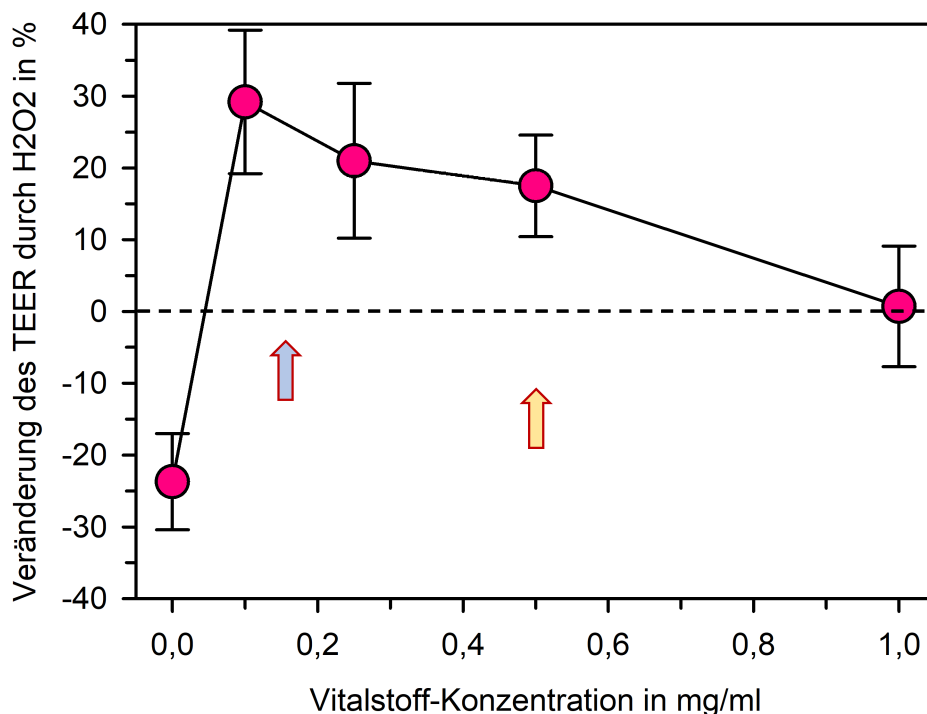


Abb. 5: Zunahme des TEER während der 24stündigen Exposition mit 250 $\mu\text{mol/l}$ Wasserstoffperoxid durch die Essential Caps im *in vivo*-relevanten Konzentrationsbereich sowie Abnahme in der Lösemittelkontrolle durch das Absterben von Zellen. Blauer Pfeil: berechnete Blutflüssigkeitskonzentration bei angenommener 100%iger Wirkstoffresorption; gelber Pfeil: berechnete Dünndarmkonzentration. Angegeben ist der Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen.

7 Zusammenfassung

In den hier durchgeführten tierversuchsfreien Untersuchungen mit kultivierten Darmepithelzellen haben die Essential Caps der Firma PRO ENERGETIC Wittmann GmbH & Co. KG ihre besonderen förderlichen Eigenschaften auf Zellebene zeigen können. In den durchgeführten Untersuchungen im *in vivo*-relevanten Konzentrationsbereich war die Vitalstoffkombination in der Lage

- einen ausgeprägten Booster-Effekt auf den Energiestoffwechsel der Zellen auszulösen und somit Nährstoffaufnahme und immunregulatorische Eigenschaften zu verbessern
- die Zellregeneration nach dem Absterben von Epithelzellen durch Nahrungsmittelunverträglichkeiten, Nahrungsmittelzusatzstoffe, oxidativen Stress etc. signifikant zu steigern und damit eine verbesserte Integrität und Funktionalität der Darmwandbarriere zu gewährleisten
- den transepithelialen elektrischen Widerstand und damit die Gleichmäßigkeit und Integrität der Darmwandbarriere zu verbessern
- die durch die Essential Caps erhöhte Integrität der Darmwandbarriere auch bei oxidativem Stress durch reaktive Sauerstoffradikale deutlich besser zu erhalten



Prof. Dr. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemiker