

Eigenschaften eines Wirkstoffkonzentrats auf den Mitochondrienstoffwechsel

Proof-of-principle-Testung

Da die erste Testrunde mit dem fertigen Getränk negativ ausgefallen war, sollten die folgenden Untersuchungen mit der Wirkstoffgrundsubstanz zunächst nur als „proof-of-principle“ dienen. Es wurde der Mehrfruchtgrundstoff gelb ohne Meersalz (220 kg auf 1000 L), Muster Nr. 7.92731, Lieferung Nr. 81857047 vom 11. 12. 2014 verwendet. Es wurde EDTA-Blut von einem freiwilligen Spender ausgewählt, der keine chronischen Erkrankungen hatte. Das EDTA-Blut wurde in Aliquots aufgeteilt und für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Den Aliquots wurde entweder keine Substanz (Kontrolle), die unverdünnte Substanz oder die Substanz in verschiedenen Vorverdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000, 1:100000) hinzugefügt (Tabelle 1). Nach der Inkubationszeit von 4 Stunden wurden die PBMC jedes Aliquots isoliert und auf ausgewählte Mitochondrienparameter analysiert. Die Mitochondrienparameter waren der ATP-Gehalt, die Expression von PGC-1-alpha als Indikator für die mitochondriale Biogenese und auf das Verhältnis mtDNA:ntDNA.

ATP-Generierung

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass unabhängig von der eingesetzten Konzentration eine ATP-Generierung stattgefunden hat. Die bewegt sich zwischen 10 % und 20 % nach einer Einwirkzeit von 4 Stunden.

Mitochondriale Biogenese (PGC-1-alpha)

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass das Wirkstoffkonzentrat zu einer Steigerung der PGC -

1-alpha-Expression führt. Der Einfluß des Wirkstoffkonzentrats auf die PGC 1-alpha-Expression ist konzentrationsabhängig. Das Wirkstoffkonzentrat ist in der Lage, die PGC-1-alpha-Expression von 100 % auf > 400 % zu steigern.

Mitochondrienmasse-Verhältnis (mtDNA:ntDNA)

Zusätzlich wurde das Verhältnis mitochondrialer DNA zu nukleärer DNA (mtDNA:ntDNA) als Parameter für die Mitochondrienmasse bestimmt. Eine Veränderung der Mitochondrienmasse wurde bei der kurzen Einwirkzeit der Substanzen auf die Immunzellen nicht erwartet. Die Bestimmung des Verhältnisses mtDNA:ntDNA diente als Kontrollparameter für die Vitalität der peripheren Blutleukozyten (PBMC). Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Mitochondrienmasse innerhalb der kurzen Einwirkzeit von 4 Stunden nicht verändert. Die Werte bewegen sich innerhalb der normalen meßtechnischen Schwankungen (Abbildung 3).

Zusammenfassung

Der proof-of-principle für eine pro-mitochondriale Wirkung des Wirkstoffkonzentrats ist gelungen. Die getesteten Parameter ATP-Generierung und PGC-1-alpha-Expression sind als Indikatoren für die Analyse der Mitochondrienfunktion geeignet. Da der pro-mitochondriale Effekt des Wirkstoffkonzentrats auch abhängig ist vom Zustand der Mitochondrien des Konsumenten, sollten weitere Untersuchungen zunächst in-vitro mit verschiedenen Konsumenten durchgeführt werden.

Eingesetzte Vorverdünnung der Wirkstoffgrundsubstanz	Wirkstoffgrundsubstanz auf 4 ml Blut (zwischen 1,2 und 1,5 × 10 ⁷ PBMC)	Wirkstoffgrundsubstanz auf 1 ml Blut	Wirkstoffgrundsubstanz auf 5 l Blut	Volumen Getränk auf 5 l Blut
unverdünnt	100 mg	25 mg	125.000 mg	500 ml
1:10	10 mg	2,5 mg	12.500 mg	50 ml
1:100	1 mg	0,25 mg	1250 mg	5 ml
1:1000	0,1 mg	0,025 mg	125 mg	0,5 ml
1:10000	0,01 mg	0,0025 mg	12,5 mg	0,05 ml
1:100000	0,001 mg	0,00025 mg	1,25 mg	0,005 ml

Tabelle 1: Eingesetzte Konzentrationen an Wirkstoffgrundsubstanz

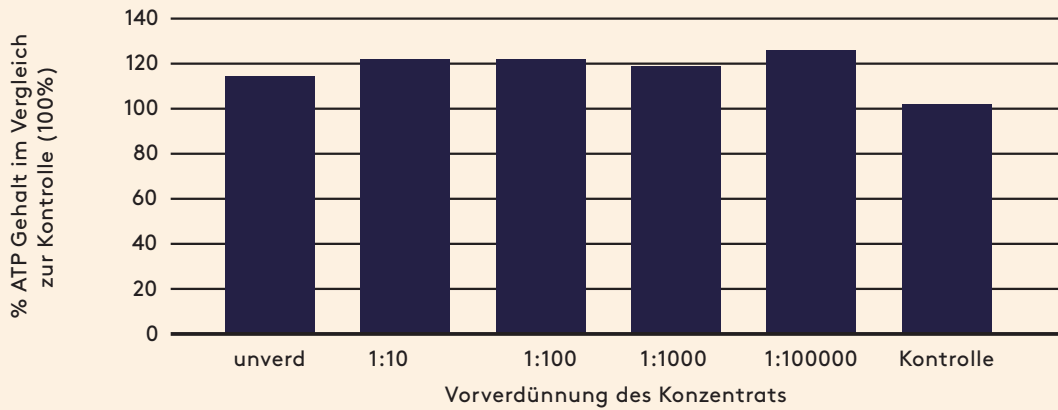


Abbildung 1: Einfluß des Wirkstoff konzentrats auf den mitochondrialen ATP-Gehalt. EDTA-Blut wurde für 4 Stunden ohne (Kontrolle) oder mit dem Wirkstoff konzentrat bei 37 °C inkubiert. Das Wirkstoff konzentrat wurde sowohl unverdünnt als auch verdünnt (Vorverdünnung 1:100, 1:100000, 1:1000000) eingesetzt. Anschließend wurden die PBMC isoliert und der ATP-Gehalt bestimmt. Der ATP-Gehalt der Kontrollstimulation wurde gleich 100 % gesetzt

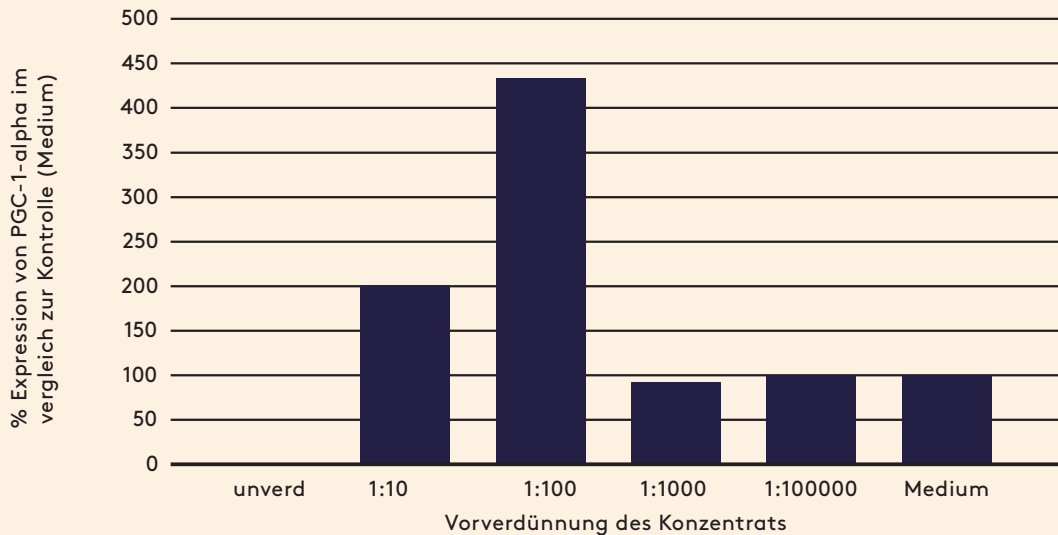


Abbildung 2: Einfluß des Wirkstoff konzentrats auf die PGC-1-alpha Expression in humanen PBMC. EDTA-Blut wurde für 4 Stunden ohne (Kontrolle) oder mit dem Wirkstoff konzentrat bei 37 °C inkubiert. Das Wirkstoff konzentrat wurde sowohl unverdünnt als auch verdünnt (Vorverdünnung 1:100, 1:10000, 1:100000) eingesetzt. Anschließend wurden die PBMC isoliert und die PGC-1-alpha-Expression bestimmt. Die PGC-1-alpha-Expression der Kontrollstimulation wurde gleich 100 % gesetzt.

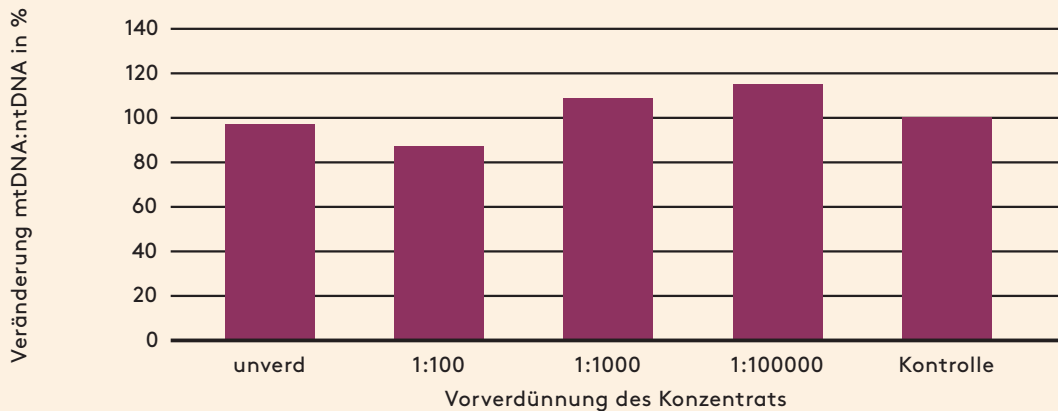


Abbildung 3: Einfluß des Wirkstoff konzentrats auf das Verhältnis mtDNA:ntDNA. EDTA-Blut wurde für 4 Stunden ohne (Kontrolle) oder mit dem Wirkstoff konzentrat bei 37 °C inkubiert. Das Wirkstoff konzentrat wurde sowohl unverdünnt als auch verdünnt (Vorverdünnung 1:100, 1:10000, 1:100000) eingesetzt. Anschließend wurden die PBMC isoliert und das Verhältnis mtDNA:ntDNA bestimmt. Das Verhältnis mtDNA:ntDNA der Kontrollstimulation wurde gleich 100 % gesetzt.