

# Magnolythe S100

## Nachweis förderlicher Wirkstoffe mit tierversuchsfreien zellbiologischen Testmethoden

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



### Eigenschaften von Magnolythe S100

Im Gegensatz zum Weidepferd hat ein physisch und psychisch gefordertes Sport- oder Rennpferd einen deutlich erhöhten Bedarf an Nährstoffen, damit es gesund und leistungsfähig bleibt. Zwangsläufig ist sowohl der gesamte Stoffwechsel als auch der Zellstoffwechsel entsprechend der erhöhten Leistungsanforderung und Arbeitsleistung mehr gefordert.

Genau hier liegt der Einsatz von Magnolythe S100, einem Nährstoffkonzentrat mit einer Vielzahl sorgfältig aufeinander abgestimmter Vitamine, Mineralstoffe, Elektrolyte, Spurenelemente und essenziellen Aminosäuren. Diese sind notwendig zur Optimierung der Stoffwechselvorgänge und zur Deckung des erhöhten Bedarfes an essenziellen Nährstoffen insbesondere bei intensiv geforderten Sportpferden. Magnolythe S100 führt dem Organismus sämtliche Nähr- und Vitalstoffe in ausgewogener und besonders gut resorbierbarer Form zu. Dadurch können alle Stoffwechselvorgänge – selbst unter Extrembedingungen – geordnet und ungestört ablaufen.

Bereits anhand der Auflistung der Inhaltsstoffe wird die komplexe Zusammensetzung von Magnolythe S100 mit Vitaminen, Vital- und Nährstoffen deutlich: Brennnesselblätter, kolloidales Siliziumdioxid, Magnesiumaspartat, Magnesiumzitrat, Haferflocken, Weizenkeime, DL-Methionin, Algenkalk, Leinöl, Dinatriumphosphat, L-Lysin, Kaliumchlorid, Saccharose, Dextrose, Betain, Natrium-bicarbonat, L-Tryptophan, Traubenkernextrakt, Inosit, sowie die Zusatzstoffe Vitamin A, Vitamin D3, Vitamin E, Vit. C, Vit. B1, Vit. B2, Vit. B6, Vit B12, Nikotinsäureamid, Pantothenensäure, Folsäure, Biotin, Cholinchlorid,  $\beta$ -Carotin, Eisen, Mangan, Zink, Kupfer, Jod, Selen, Kobalt.

Zahlreiche Berichte von Magnolythe S100-Anwendern dokumentieren, dass dieses einzigartige Produkt bei Pferden eine verkürzte Lösungsphase und Erholungszeiten, eine aktivierte Arbeitsleistung der Muskulatur ohne Verspannung, erhöhte physische und psychische Belastbarkeit, vermehrte Ausgeglichenheit und Lernbereitschaft, ruhige Gelassenheit, sowie insgesamt eine Steigerung des allgemeinen Wohlbefindens bewirkt.

### Reaktive Sauerstoffradikale und ihre unerwünschten Wirkungen

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 lebenswichtige Aufgaben. Zudem stehen sie in einem ständigen Gleichgewicht mit den regulierenden natürlichen Entgiftungsmechanismen wie die Enzyme Glutathion, Katalase und Superoxid-Dismutase. Umweltbelastungen, Ernährungsmängel, körperlicher oder seelischer Stress, aber auch Medikamente, Verletzungen und Entzündungen können zu einer unkontrollierten Überproduktion freier 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 (DNA und RNA), Proteine, Lipide und Kohlenhydrate hervorrufen.

Wirkstoffe oder Wirkstoffkombinationen, welche in der Lage sind, diese reaktiven und aggressiven Radikale zu inaktivieren bzw. entgiften, werden als Antioxidantien bezeichnet. Ist die körpereigene Selbstregulation überfordert, so helfen diese Wirkstoffe, den Radikalüberschuss abzubauen und die sonst resultierenden unerwünschten Wirkungen zu reduzieren oder gar zu vermeiden.

Gerade bei Pferden, denen kurzzeitig oder über längere Zeit viel Leistung abverlangt wird, können diese Antioxidantien helfen, die Regenerationszeit zu verkürzen und die sich aus dem psychischen und physischen Stress ergebende höhere Belastung rascher zu kompensieren. Die vermehrte körperliche Belastung des Pferdes durch eine verstärkte Arbeitsleistung geht i.d.R. mit einer erheblichen Mehrbelastung des gesamten Bewegungsapparates einher, so dass Muskeln, Sehnen, Bänder und Gelenke stärker strapaziert werden. Auch hier kann es zu einer lokalen Anhäufung von Radikalen kommen, die von bestimmten entzündungsvermittelnden Zellen gebildet werden.

Dies passiert in einem ohnehin bereits geschädigten Gewebeareal (beispielsweise durch Verletzung), so dass durch die lokal gebildeten Radikale ein (chronisch) entzündlicher Prozess angeworfen werden kann. Wirkstoffe, welche aufgenommen werden und im Blut zirkulieren, können solche Prozesse durch das Inaktivieren der im Gewebe gebildeten Radikale in ihrer Wirkung erheblich abschwächen oder sogar ganz unterbinden.

## Fragestellungen der durchgeführten Untersuchungen

Eine ganze Reihe der mit erhöhtem psychischen und physischen Stress einhergehenden unerwünschten Folgeerscheinungen basieren unter anderem auch auf einem Überschuss an reaktiven Sauerstoffradikalen – unabhängig, ob sie von außen auf den Organismus einwirken oder von innen durch ein Ungleichgewicht im Stoffwechsel.

Daher lag der Schwerpunkt der durchgeführten und hier dargestellten Untersuchungen auf der antioxidativen Wirksamkeit von Magnolythe S100.

Das heißt, es wurde untersucht, inwieweit Magnolythe S100 in der Lage ist, überschüssige Sauerstoffradikale zu inaktivieren und so ein Stoffwechselgleichgewicht wieder herzustellen. Wie an Hand der Inhaltsstoffe zu erkennen ist, sind einige der Inhaltsstoffe für ihre starken antioxidativen Wirkungen bekannt, und es steht zu erwarten, dass durch die sorgfältige Auswahl der enthaltenen Wirkstoffe ein synergistischer und damit wirkungsverstärkender Effekt auftritt. Konkret wurde den beiden folgenden Fragestellungen nachgegangen:

- Kann Magnolythe S100 einen Überschuss der im Blut zirkulierenden freien reaktiven Sauerstoffradikale neutralisieren und somit einer Schädigung des Organismus durch äußere (exogene) Umwelteinflüsse und/oder oxidativem Stress aufgrund eines Ungleichgewichts im Stoffwechsel vorbeugen?
- Kann Magnolythe S100 endogene und lokal im Gewebe gebildete überschüssige Sauerstoffradikale inaktivieren? Ein solcher Radikalüberschuss direkt im Gewebe kann beispielsweise nach Verletzungen oder bei Entzündungsprozessen durch die, aus dem Blut eingewanderten, neutrophilen Granulozyten als entzündungsvermittelnde Zellen hervorgerufen werden.

Zur Klärung dieser Fragestellungen wurde Magnolythe S100 mit zwei verschiedenen tierversuchsfreien Testverfahren untersucht. Beide Testverfahren werden in dieser Form schon über mehrere Jahre hinweg erfolgreich durchgeführt und haben zu zahlreichen Veröffentlichungen in internationalen Fachjournalen geführt.



1

Trotz der Limitierung, dass die Testverfahren nicht das Verhalten des Gesamtorganismus, sondern nur Teilaspekte des Stoffwechsels erfassen können, sind sie inzwischen ein wichtiges Kriterium geworden, um das antioxidative Potential von Wirkstoffen oder Wirkstoffgemischen ermitteln, bewerten und vergleichen zu können.

## Überlegungen zu den verwendeten Testkonzentrationen

Um in den hier durchgeführten tierversuchsfreien zellbiologischen Untersuchungen mit verschiedenen Testsystemen eine annähernd realistische Konzentration von Magnolythe S100 abschätzen zu können, wurde von den folgenden Überlegungen ausgegangen:

Die Dosierung bzw. Fütterungsempfehlung ist seitens des Herstellers angegeben mit 30 bis 100 g Magnolythe S100 pro Tag für ein Pferd mit ca. 550 bis 600 kg Körpergewicht. Abhängig vom Trainingszustand hat ein Pferd mit diesem Körpergewicht etwa 40 Liter Blut; Sport- und

Rennpferde, für die speziell Magnolythe S100 konzipiert wurde, sogar 50 Liter. 40 % des Blutvolumens verteilt sich dabei auf die zellulären Bestandteile des Blutes (der Hämatokrit liegt beim Pferd bei 33 bis 45%) und umfasst in erster Linie die Erythrozyten (rote Blutkörperchen), welche für den Sauerstofftransport im Blut verantwortlich sind.

Somit verteilen sich – bei einer angenommenen 100 %igen Wirkstoffresorption – die 30 bis 100 g Magnolythe S100 auf etwa 30 Liter Blutflüssigkeit. Rechnet man dies auf ein Volumen von einem Milliliter um, so beträgt die so erhaltene Konzentration 1 mg/ml bis 3,5 mg/ml. Der Einfachheit halber wird nachfolgend von einer mittleren Konzentration in der Blutflüssigkeit von 2,5 mg/ml ausgegangen.

Abb.1: Auftrennung von Magnolythe S100 in einer wässrigen Lösung nach dem Mörsern und Zentrifugieren wie im Text beschrieben. Dargestellt ist ein Zentrifugenglas, in dem die unterschiedlich gefärbten festen Einzelbestandteile optisch gut erkennbar sind. Die beiden verschiedenen Phasen sind deutlich getrennt: Unten befindet sich das wasserunlösliche Sediment und oben die flüssige Phase mit den wasserlöslichen Wirkstoffen. Die gelb-braune und klare Flüssigkeit wurde für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Ausgehend von diesen Überlegungen wurde eine 10fach-konzentrierte Stammlösung von Magnolythe S100 hergestellt, indem das entsprechende Verhältnis von Nahrungsergänzungsmittel und Flüssigkeitsvolumen berücksichtigt und alles gut in einem Mörser zerkleinert und zerrieben wurde. Nach dieser Zerkleinerung im simulierten Magen-Darm-Trakt wurde die erhaltene Suspension aus gelösten und ungelösten Bestandteilen hochtourig zentrifugiert und der so erhaltene flüssige und klare gelb-braune Überstand für die weiteren Untersuchungen verwendet.

(Abb. 1).

Natürlich ist diese Vorgehensweise ohne Berücksichtigung einer realitätsnahen Verdauung sehr vereinfachend, jedoch der wissenschaftlich übliche Weg, um wasserlösliche Bestandteile abzutrennen und zu untersuchen. Die so erhaltene Stammlösung wurde dann weiter verdünnt, so dass im Endeffekt die tatsäch-

lichen Konzentrationen in den Tests den Bereich zwischen 0 und 10 mg/ml abdeckten und so die berechneten Blutflüssigkeitskonzentrationen ungefähr in der Mitte dieses Testbereiches lagen. Im Einzelnen betragen die effektiven Testkonzentrationen von Magnolythe S100: 0 – 0,1 – 0,25 – 0,5 – 1 – 2,5 – 5 – 10 mg/ml. Dabei bezeichnet die Konzentration „0“ die unbehandelte Kontrolle ohne Magnolythe S100 und diente als Referenz bzw. Vergleichswert ohne Wirkstoff.

### **Wirkung im zellfreien Testsystem bei frei im Blut zirkulierenden Radikale (exogene Sauerstoffradikale)**

In diesem zellfreien Testsystem wurde ohne die Verwendung von Zellen im Testansatz überprüft, ob verschiedene Konzentrationen der Testsubstanz in der Lage sind, frei im Blut zirkulierende Sauerstoffradikale zu inaktivieren.

Für die Untersuchung wurden die verschiedenen Konzentrationen Magnolythe S100 zusammen mit Kaliumsuperoxid in einen Testansatz gebracht. Kaliumsuperoxid zerfällt in wässriger Lösung unter Bildung von reaktiven und aggressiven Superoxidanion-Radikale. Die Radikale führen zu einer Spaltung des ebenfalls dem Versuchsansatz zugesetzten Tetrazoliumfarbstoffes WST-1, so dass der zunächst rote Farbstoff gelb wird. Beim Durchstrahlen mit Licht einer bestimmten Wellenlänge verändert sich die optische Dichte im Testansatz.

Diese Veränderung ist direkt proportional zur Anzahl der noch vorhandenen reaktiven Radikale. Werden die von den Zellen gebildeten Radikale durch den Wirkstoff inaktiviert, so verändert sich die optische Dichte weniger stark.

Diese Farbveränderung wird kontinuierlich in einem speziellen Messgerät (Elisareader) als Differenzmessung zwischen zwei Wellenlängen ( $\Delta OD = 450 - 690 \text{ nm}$ ) aufgezeichnet. Nach komplexen mathematischen Auswertungen wurden die erhaltenen Ergebnisse als Relativwerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt und gegen die Konzentration aufgetragen. Speziell berücksichtigt wurde hier nur die in der Blutflüssigkeit zirkulierende Wirkstoffkonzentration.

Wie in Abb. 2 dargestellt, bewirkte Magnolythe S100 eine dosisabhängige Inaktivierung der freien Sauerstoffradikale.

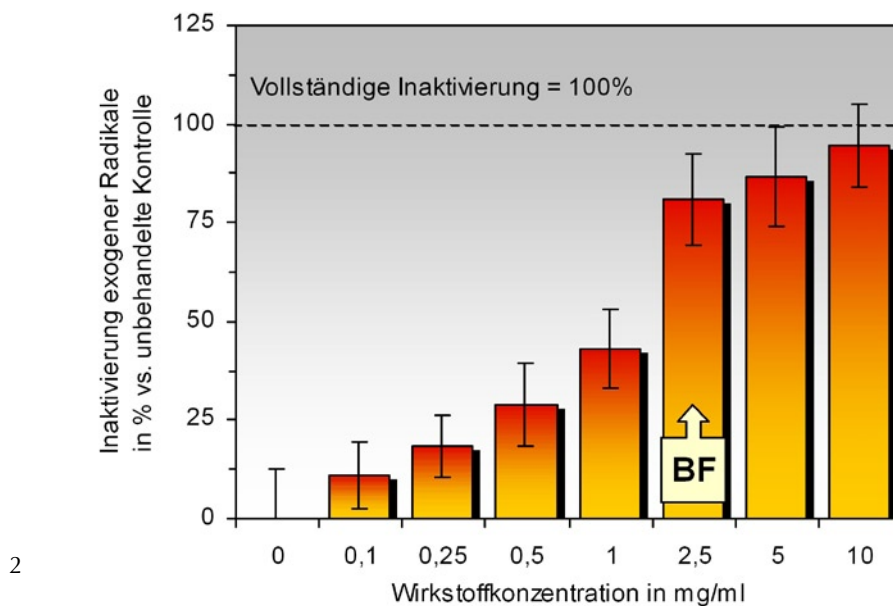


Abb. 2: Dosisabhängige Inaktivierung exogener freier Sauerstoffradikale durch Magnolythe S100 im zellfreien Testsystem. Eine vollständige Inaktivierung ergibt einen Wert von 100%. Es ist leicht zu erkennen, dass Magnolythe S100 bei der berechneten mittleren Blutflüssigkeitskonzentration (BF) von 2,5 mg/ml annähernd 80% der freien Radikale inaktiviert und so eine ausgeprägte antioxidative Wirkung hat. Die EC50, d.h. die Wirkstoffkonzentration, bei der es zu einer 50%igen Inaktivierung der freien Radikale kommt, liegt bei etwa 1,5 mg/ml. Durch die antioxidative Wirkung können frei im Blut zirkulierende Radikale, welche aus der Umwelt stammen oder durch ein metabolisches Ungleichgewicht (z.B. oxidativer Stress) entstehen, inaktiviert werden. Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus jeweils drei Messungen ( $n = 3$ ). BF = Berechnete mittlere Wirkstoffkonzentration in der Blutflüssigkeit nach vollständiger Resorption.

Das bedeutet, dass mit zunehmender Wirkstoffkonzentration immer mehr Radikale unschädlich gemacht werden. Im Bereich der berechneten mittleren Blutflüssigkeitskonzentration von 2,5 mg/ml wurden annähernd 80 % der Radikale inaktiviert. Dies verdeutlicht eine ausgeprägte antioxidative Wirkung von Magnolythe S100.

Aus Vergleichsgründen wird in der Wissenschaft gerne ein EC50-Wert angegeben, d.h. der Wert für die Testkonzentration, bei der die Hälfte der Radikale inaktiviert wird. Mit diesem Wert kann man die Effizienz verschiedener Wirkstoffe oder Formulierungen miteinander vergleichen.

Die EC50 in diesem Versuch lag für Magnolythe S100 bei 1,5 mg/ml. Im direkten Vergleich wurde für die bekanntermaßen stark antioxidativ wirkende Ascorbinsäure (Vitamin C) in diesem Versuch eine EC50 von 1,3 mg/ml ermittelt (nicht dargestellt).

Durch die antioxidative Wirkung können frei im Blut zirkulierende Radikale, welche aus der Umwelt stammen oder durch ein metabolisches Ungleichgewicht (z.B. oxidativer Stress) entstehen, durch die Gabe von Magnolythe S100 sehr gut inaktiviert werden.

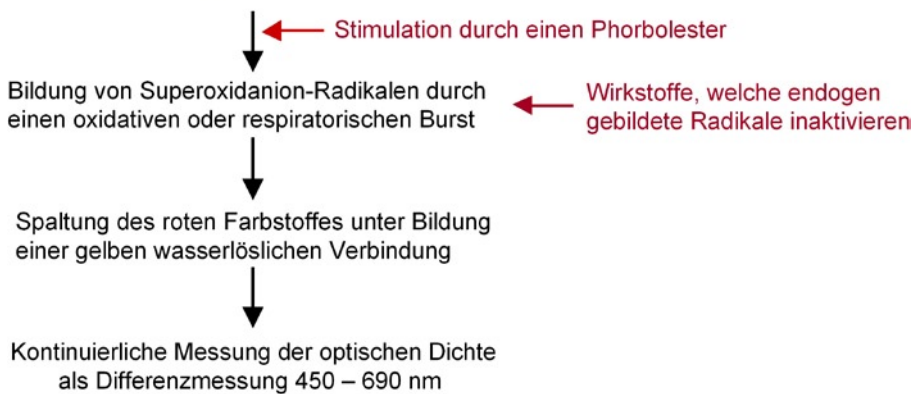
### **Wirkung im zellbasierten Testsystem bei einem lokalen Überschuss körpereigener (endogener) Sauerstoffradikale**

Zunächst wurden humane Promyelozyten (Zelllinie HL60, ECACC 98070106) als permanente Zelllinie in Routinekultur durch sechsstägige Behandlung mit Dimethylsulfoxid zu sog. funktionalen neutrophilen Granulozyten differenziert. Dies sind Zellen, welche die Eigenschaften von phagozytierenden und entzündungsvermittelnden Zellen 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

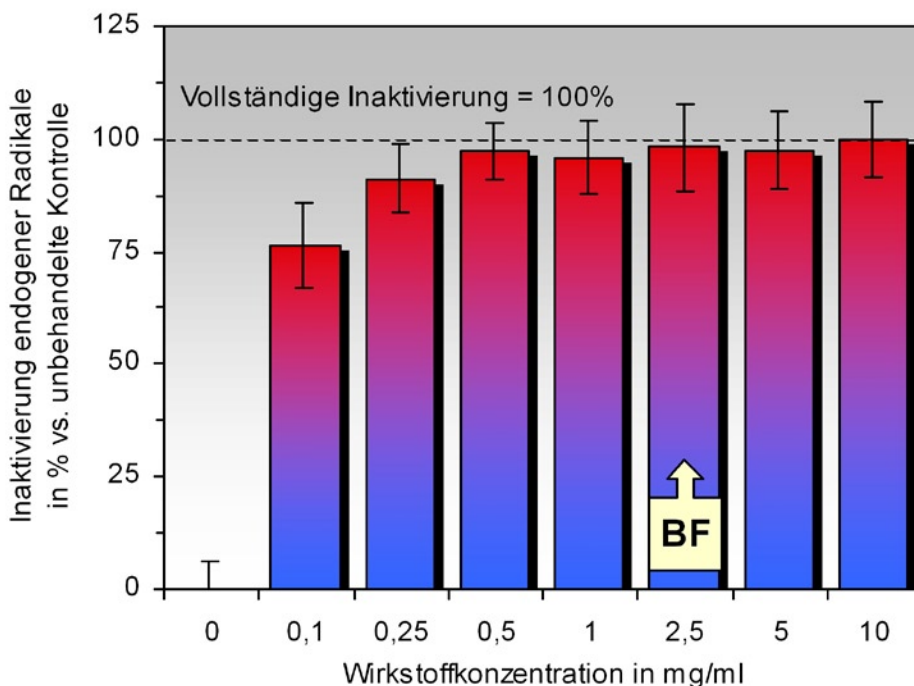


Funktionaler neutrophiler Granulozyt, welcher durch chemische Differenzierung aus einer Zellkultur mit Promyelozyten (Zelllinie HL60) erhalten wird.



3

Abb. 3: Schematische Darstellung zum zellbasierten Testverfahren. Humane Promyelozyten werden chemisch innerhalb von 6 Tagen zu funktionalen neutrophilen Granulozyten differenziert. Nach Stimulation durch einen Phorbol ester bilden diese Zellen in einem sog. oxidativen oder respiratorischen Burst reaktive Sauerstoffradikale (Superoxidanion-Radikale), welche den in den Testansatz ebenfalls zugesetzten roten Farbstoff spalten, so dass eine gelbe wasserlösliche Verbindung (Formazan) entsteht. Diese Farbveränderung wird kontinuierlich in einem speziellen Messgerät (Elisareader) als Differenzmessung zwischen zwei Wellenlängen ( $\Delta OD = 450 - 690 \text{ nm}$ ) aufgezeichnet. Je mehr Radikale durch die Testsubstanz entgiftet werden, desto langsamer verläuft dieser Farbumschlag.



4

die weitere Gewebeerstörung diesen Prozess dauerhaft in Gang halten.

Wie in Abb. 3 veranschaulicht, wurden die funktionalen neutrophilen Granulozyten durch Zugabe eines Phorbol esters dazu angeregt, Superoxidanion-Radikale zu bilden. Die Radikale führen zu einer Spaltung des ebenfalls dem Versuchsansatz zugesetzten Tetrazoliumfarbstoffes WST-1, so dass der zunächst rote Farbstoff gelb wird. Das weitere Messprinzip wurde schon im vorhergehenden Abschnitt erläutert.

Noch weitaus stärker als beim zellfreien Test zur Untersuchung der antioxidativen Wirkung bei freien exogenen Radikalen, war das Ergebnis für die Inaktivierung der endogen gebildeten Radikale (Abb. 4).

Hier wurden die Superoxidanion-Radikale selbst bei der niedrigsten Testkonzentration von 0,1 mg/ml, die immerhin um das mehr als Zwanzigfache geringer ist als die berechnete mittlere Blutflüssigkeitskonzentration, schon zu 75 % inaktiviert. Ab einer Konzentration von 0,5 mg/ml wurde eine nahezu vollständige Inaktivierung der Radikale erzielt.

Die EC<sub>50</sub>, d.h. die Wirkstoffkonzentration, welche die endogenen Sauerstoffradikale zu 50 % inaktiviert, lag unter 0,1 mg/ml. Diese außerordentlich starke Inaktivierung der Superoxidanion-Radikale war zunächst an Hand der Zusammensetzung nicht zu erwarten. Daher wurde zur Sicherheit noch geprüft, ob allein nur die Gabe von Magnolythe S100 ohne Zugabe von Radikalen dazu führt, dass der Farbstoff gespalten wird und so ein falsches Ergebnis resultiert.

Dies war jedoch nicht der Fall, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die synergistischen Effekte der Inhaltsstoffe so stark sind, dass Magnolythe S100 schon in geringen Konzentrationen die schädigende Wirkung von einem lokalen Überangebot reaktiver Sauerstoffradikale direkt im Gewebe erheblich vermindert bzw. sogar vollständig neutralisiert.

Abb. 4: Sehr ausgeprägte dosisabhängige Inaktivierung von endogenen Sauerstoffradikalen durch Magnolythe S100, welche in einem zellbasierten Test von speziell differenzierten entzündungsvermittelnden Zellen (funktionale neutrophile Granulozyten) in einem oxidativen Burst gebildet werden. Diese endogenen Radikale entstehen bei Entzündungsprozessen oder nach Gewebeerletzungen und können zu weiteren Schädigungen des Gewebes führen. Selbst bei der niedrigsten Testkonzentration von 0,1 mg/ml, welche um das mehr als Zwanzigfache geringer ist als die berechnete mittlere Konzentration in der Blutflüssigkeit (BF), werden die endogenen Radikale schon zu 75% inaktiviert. Ab einer Konzentration von 0,5 mg/ml wird eine nahezu vollständige Entgiftung der Radikale erzielt. Die EC50, d.h. die Wirkstoffkonzentration, welche die endogenen Sauerstoffradikale zu 50% inaktiviert, liegt unter 0,1 mg/ml. So kann durch Magnolythe S100 die schädigende Wirkung von einem lokalen Überangebot reaktiver Sauerstoffradikale direkt im Gewebe erheblich vermindert werden. Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus jeweils drei Messungen (n = 3). BF = Berechnete Wirkstoffkonzentration in der Blutflüssigkeit nach vollständiger Resorption.



## Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Mit tierversuchsfreien zellbiologischen Testmethoden wurde Magnolythe S100 aus der Produktpalette der Firma iWEST® Tierernährung Dr. Meyer & Co. KG aus Hohenpeißenberg auf seine förderlichen Wirkeffekte untersucht. Die Testergebnisse haben gezeigt, dass die sorgfältig zusammengestellte Wirkstoffkombination die schädigende Wirkung von exogenen Radikalen aus der Umwelt oder bei einem metabolischen Ungleichgewicht durch oxidativen Stress dosisabhängig reduziert.

Im Bereich der berechneten Blutflüssigkeitskonzentration nach Gabe der empfohlenen täglichen Menge werden die freien Radikale zu 75 % inaktiviert. Sogar noch wirkungsstärker ist Magnolythe S100 bei der Inaktivierung eines lokalen Überschusses endogener Sauerstoffradikale, wie

er beispielsweise im Gewebe nach Verletzungen oder im Verlauf von Entzündungen auftreten kann. Hier werden im Bereich der berechneten Blutflüssigkeitskonzentration die reaktiven Sauerstoffradikale nahezu vollständig neutralisiert.

***Somit hat sich Magnolythe S100 mit Bravour die Bewertung „starke antioxidative Wirkung im tierversuchsfreien Test bestätigt“ mehr als verdient und kann für die beschriebenen Anwendungsbereiche bestens empfohlen werden.***

### Autor

Prof. Dr. rer. nat. habil. Peter C. Dartsch,  
Diplom-Biochemiker Dartsch Scientific  
GmbH – Institut für zellbiologische  
Testsysteme

Oskar-von-Miller-Straße 10

D-86956 Schongau

Email: info@dartsch-scientific.com