



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

Firma  
Multikraft Produktions- und HandelsgmbH  
Sulzbach 17

**A-4632 Pichl/Wels**

Dartsch Scientific GmbH  
Institut für zellbiologische Testsysteme  
Oskar-von-Miller-Straße 10  
D-86956 Schongau

Fon +49 (0) 8861 256-5250  
Fax +49 (0) 8861 256-7162  
E-Mail [info@dartsch-scientific.com](mailto:info@dartsch-scientific.com)  
Internet [www.dartsch-scientific.com](http://www.dartsch-scientific.com)

27. Mai 2010

**– Testbericht und Fachinformation –**

**MULTIKRAFT EFFEKTIVE MIKROORGANISMEN (URLÖSUNG PLUS)**  
**Tierversuchsfreie zellbiologische Untersuchungen zu förderlichen Wirkeffekten**

***Zusammenfassung und Schlussfolgerungen***

Mit tierversuchsfreien zellbiologischen Testmethoden wurde Effektive Mikroorganismen (Urlösung Plus) aus der Produktpalette der Firma Multikraft Produktions- und HandelsgmbH aus A-4632 Pichl/Wels, Österreich, auf ihre förderlichen Wirkeffekte untersucht. Die Testergebnisse haben gezeigt, dass die EM-Urlösung Plus nicht nur den Zellstoffwechsel und damit die Zellerneuerung/-regeneration bzw. Zellvitalität um mehr als 200% steigern kann, sondern auch die schädigende Wirkung von exogenen Radikalen aus der Umwelt oder bei einem metabolischen Ungleichgewicht durch oxidativen Stress dosisabhängig reduziert. Ebenfalls effizient ist die EM-Urlösung Plus bei der Inaktivierung eines lokalen Überschusses endogen gebildeter Sauerstoffradikale, wie er beispielsweise im Gewebe nach Verletzungen oder im Verlauf von Entzündungen auftreten kann.

Somit hat sich Multikraft Effektive Mikroorganismen (EM-Urlösung Plus) in den tierversuchsfreien experimentellen Untersuchungen bewährt.

Schongau, den 27. Mai 2010



  
Prof. Dr. Peter C. Dartsch

# TESTBERICHT

## Multikraft Effektive Mikroorganismen (EM-Urlösung Plus)

### **Testkonzentrationen**

Untersucht wurde das zur Verfügung gestellte Rückhaltemuster vom 12.02.2010. Für EM-Urlösung Plus kann wegen seiner unterschiedlichen Einsatzgebiete keine konkrete Konzentration angegeben werden. Daher wurden die nachfolgenden Untersuchungen im Konzentrationsbereich von 0 bis 10 mg/ml durchgeführt. Dabei bezeichnet die Konzentration „0“ die unbehandelte Kontrolle.

### **Fragestellungen der durchgeführten Untersuchungen**

- Kann durch EM-Urlösung Plus der Energiestoffwechsel von Bindegewebszellen stimuliert und so eine Zellerneuerung/regeneration bzw. -vitalisierung gefördert werden?
- Kann durch EM-Urlösung Plus ein Überschuss der im Blut zirkulierenden freien reaktiven Sauerstoffradikale neutralisiert und somit einer Schädigung des Organismus durch äußere (exogene) Umwelteinflüsse und/oder oxidativem Stress aufgrund eines Ungleichgewichts im Stoffwechsel vorgebeugt werden?
- Können durch EM-Urlösung Plus endogene und lokal im Gewebe gebildete überschüssige Sauerstoffradikale inaktiviert werden? 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 EM-Urlösung Plus mit drei verschiedenen tier-versuchsfreien zellbiologischen Testverfahren untersucht. Alle drei Testverfahren werden in dieser Form schon über mehrere Jahre hinweg erfolgreich durchgeführt und haben zu zahlreichen Veröffentlichungen in internationalen Fachjournals geführt. Die Testverfahren sind inzwischen ein wichtiges Kriterium geworden, um das Potenzial von Wirkstoffen oder Wirkstoffgemischen ermitteln, bewerten und vergleichen zu können.

### **Wirkung auf den Energiestoffwechsel von kultivierten Bindegewebszellen**

Zellregenerative Vorgänge oder Wundheilungsprozesse sind u.a. durch eine zeitweilige Erhöhung des Energiestoffwechsels der beteiligten Zellen charakterisiert. Ist ein Wirkstoff / Wirkstoffgemisch in der Lage, den zellulären Energiestoffwechsel zu stimulieren, so kann daraus gefolgert werden, dass dieser Wirkstoff auch die Zellregeneration und Zellvitalität fördern kann.

Für diese Untersuchung wurden Bindegewebsfibroblasten (Zelllinie L-929, DSMZ) in einer Dichte von 20.000 Zellen/Vertiefung in 96-Loch-Platten ausgesät. Nach 48 Stunden, wel-

# TESTBERICHT

## Multikraft Effektive Mikroorganismen (EM-Urlösung Plus)

che die Zellen zur Adhäsion und zur Normalisierung ihres Stoffwechsels brauchen, wurden sie durch die Zugabe von Phosphatpuffer mit Calcium und Magnesium und 10 mM Glucose stimuliert. Der Energiestoffwechsel mit seinen verschiedenen Redoxprozessen führt dabei zu einer Spaltung / Farbumschlag und damit auch einer Änderung der optischen Dichte des ebenfalls zum Ansatz zugegebenen wasserlöslichen Tetrazoliumfarbstoffes WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim). Dessen optische Dichte wurde als Differenzmessung  $\Delta OD = 450 - 690 \text{ nm}$  kontinuierlich für 180 min aufgezeichnet und nach linearer Regression der erhaltenen Kurvenzüge in Form der Steigung (Zeitintervall: 30 bis 120 min) in mOD/min ausgewertet. Die erhaltenen Ergebnisse wurden dann als Relativwerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt und gegen die Konzentration aufgetragen.

**Ergebnis (Abb. 1):** Die EM-Urlösung Plus bewirkte nach Zugabe eine erhebliche Förderung des Energiestoffwechsels von Bindegewebszellen. Der maximale stimulatorische Effekt mit über 200% Steigerung gegenüber der unbehandelten Kontrolle lag bei einer Konzentration von 5 mg/ml. Durch die stimulierende Wirkung kann es nach Wirkstoffaufnahme zu einer verbesserten Zellerneuerung/-regeneration und -vitalität in vivo kommen.

### **Antioxidative 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 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.

# TESTBERICHT

## Multikraft Effektive Mikroorganismen (EM-Urlösung Plus)

### ***Antioxidative Wirkung im zellfreien Testsystem bei freien Radikalen***

In diesem zellfreien Testsystem wurde ohne die Verwendung von Zellen im Testansatz überprüft, ob verschiedene Konzentrationen der Testsubstanz in der Lage sind, freie Sauerstoffradikale zu inaktivieren, welche von außen (exogen) einwirken oder frei im Blut zirkulieren

Für die Untersuchung wurden die verschiedenen Konzentrationen von Effektive Mikroorganismen in Phosphatpuffer vorgelegt und dazu eine Lösung von Kaliumsuperoxid in Aqua dest. (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) pipettiert. Die nicht durch den Wirkstoff inaktivierten und damit noch aggressiven und reaktionsfreudigen Radikale führen dabei zu einer Spaltung und damit auch einer Änderung der optischen Dichte des ebenfalls zum Ansatz zugegebenen wasserlöslichen Tetrazoliumfarbstoffes WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim). Dessen optische Dichte wurde als Differenzmessung  $\Delta OD = 450 - 690 \text{ nm}$  kontinuierlich aufgezeichnet und nach linearer Regression der erhaltenen Kurvenzüge in Form der Steigung (Zeitintervall: 0 bis 10 min) in mOD/min ausgewertet. Die erhaltenen Ergebnisse wurden dann als Relativwerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt und gegen die Konzentration aufgetragen.

**Ergebnis (Abb. 2):** In diesem Versuch zeigte die EM-Urlösung Plus eine dosisabhängige Inaktivierung exogener freier Sauerstoffradikale im zellfreien Testsystem. Bei einer Konzentration von 10 mg/ml inaktivierte die EM-Urlösung Plus nahezu alle freien Radikale. Die EC50, d.h. die Wirkstoffkonzentration, bei der es zu einer 50%igen Inaktivierung der freien Radikale kommt, lag bei etwa 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, inaktiviert werden.

### ***Antioxidative 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 sechstägige Behandlung mit Dimethylsulfoxid zu sog. funktionalen neutrophilen Granulozyten differenziert. Dies sind Zellen, welche die Eigenschaften von phagozytierenden und entzündungsvermittelnden Zellen im Blut besitzen. Diese differenzierten Zellen wurden durch Zugabe eines Phorbolesters (Phorbol-12-myristat-13-acetat; Sigma-Aldrich Chemie, 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 Sau-

# TESTBERICHT

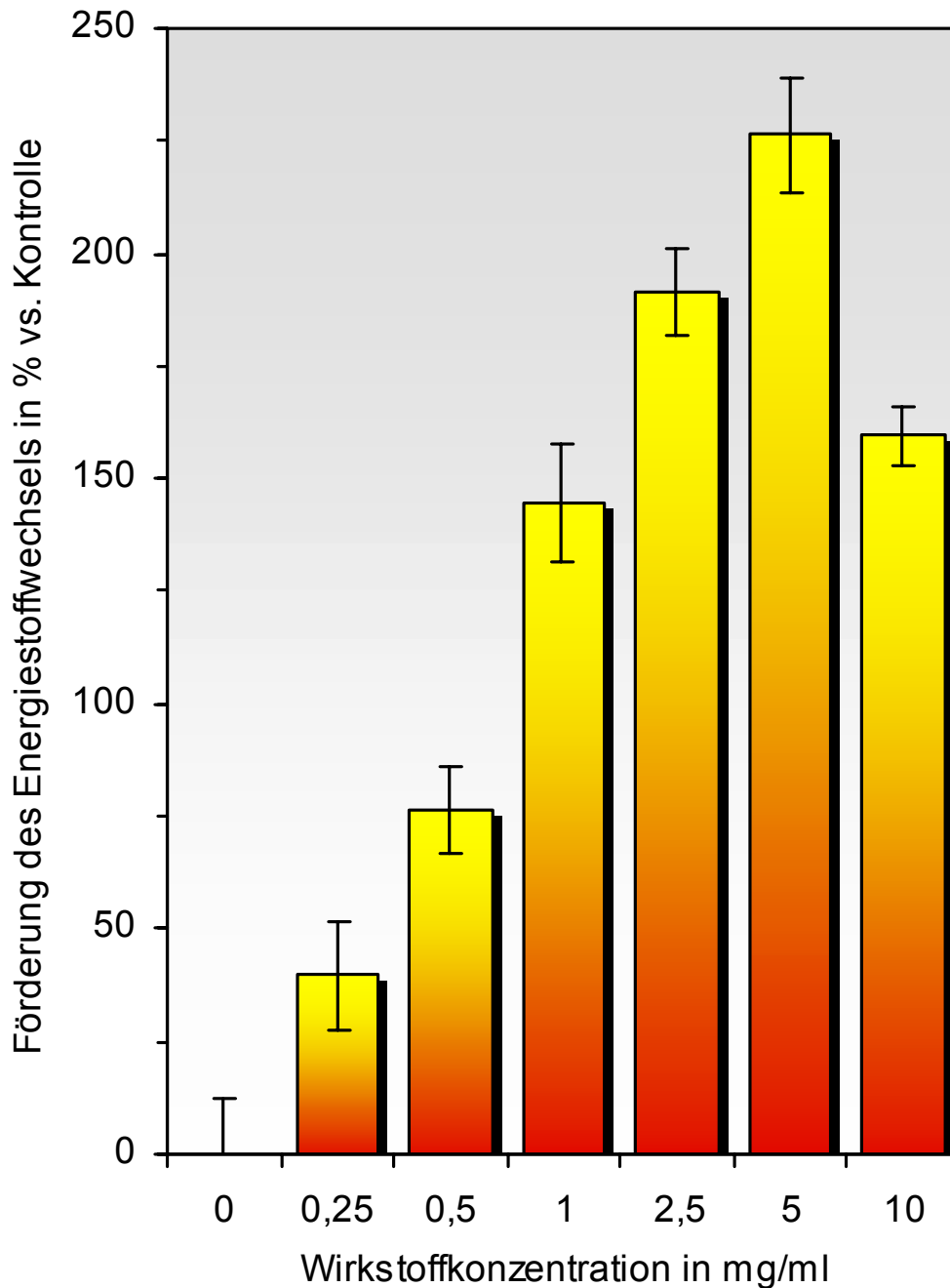
## Multikraft Effektive Mikroorganismen (EM-Urlösung Plus)

erstoffradikale 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 aufgezeichnet und nach linearer Regression der erhaltenen Kurvenzüge in Form der Steigung (Zeitintervall: 10 bis 30 min) in mOD/min ausgewertet. Die erhaltenen Ergebnisse wurden dann als Relativwerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt und gegen die Konzentration aufgetragen.

**Ergebnis (Abb. 3):** Die EM-Urlösung Plus bewirkte eine dosisabhängige Inaktivierung von endogenen Sauerstoffradikalen, welche von entzündungsvermittelnden Zellen in einem oxidativen Burst gebildet werden. Die maximale Inaktivierung lag bei 10 mg/ml im Bereich um 70%. Die EC50, d.h. die Wirkstoffkonzentration, welche die endogenen Sauerstoffradikale zu 50% inaktiviert, lag bei etwa 7,5 mg/ml. So kann bereits durch die EM-Urlösung Plus die schädigende Wirkung von einem lokalen Überschuss reaktiver Sauerstoffradikale direkt im Gewebe vermindert werden.

# TESTBERICHT

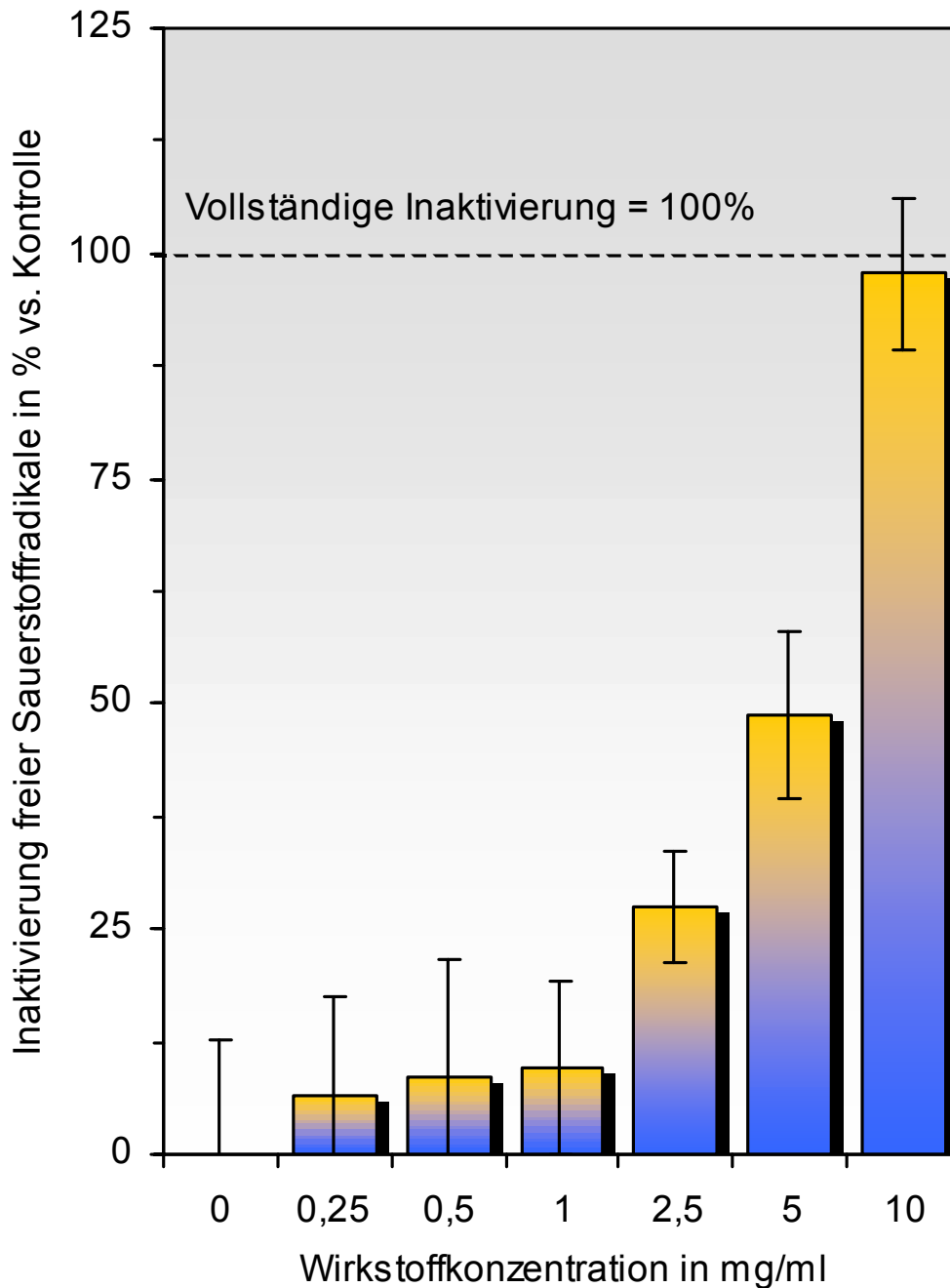
## Multikraft Effektive Mikroorganismen (EM-Urlösung Plus)



**Abb. 1:** Ausgeprägte Förderung des Energiestoffwechsels von Bindegewebszellen durch Multikraft Effektive Mikroorganismen (EM-Urlösung Plus). Der maximale stimulatorische Effekt liegt bei einer Konzentration von 5 mg/ml mit einer mehr als 200%igen Steigerung gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Durch die stimulierende Wirkung kann es nach Wirkstoffaufnahme zu einer verbesserten Zellerneuerung/-regeneration und -vitalität in vivo kommen. Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus jeweils drei Messungen ( $n = 3$ ). Bei Konzentrationen  $\geq 0,25$  mg/ml ist die Stimulation statistisch signifikant ( $p \leq 0,05$ ; Student's  $t$ -Test).

# TESTBERICHT

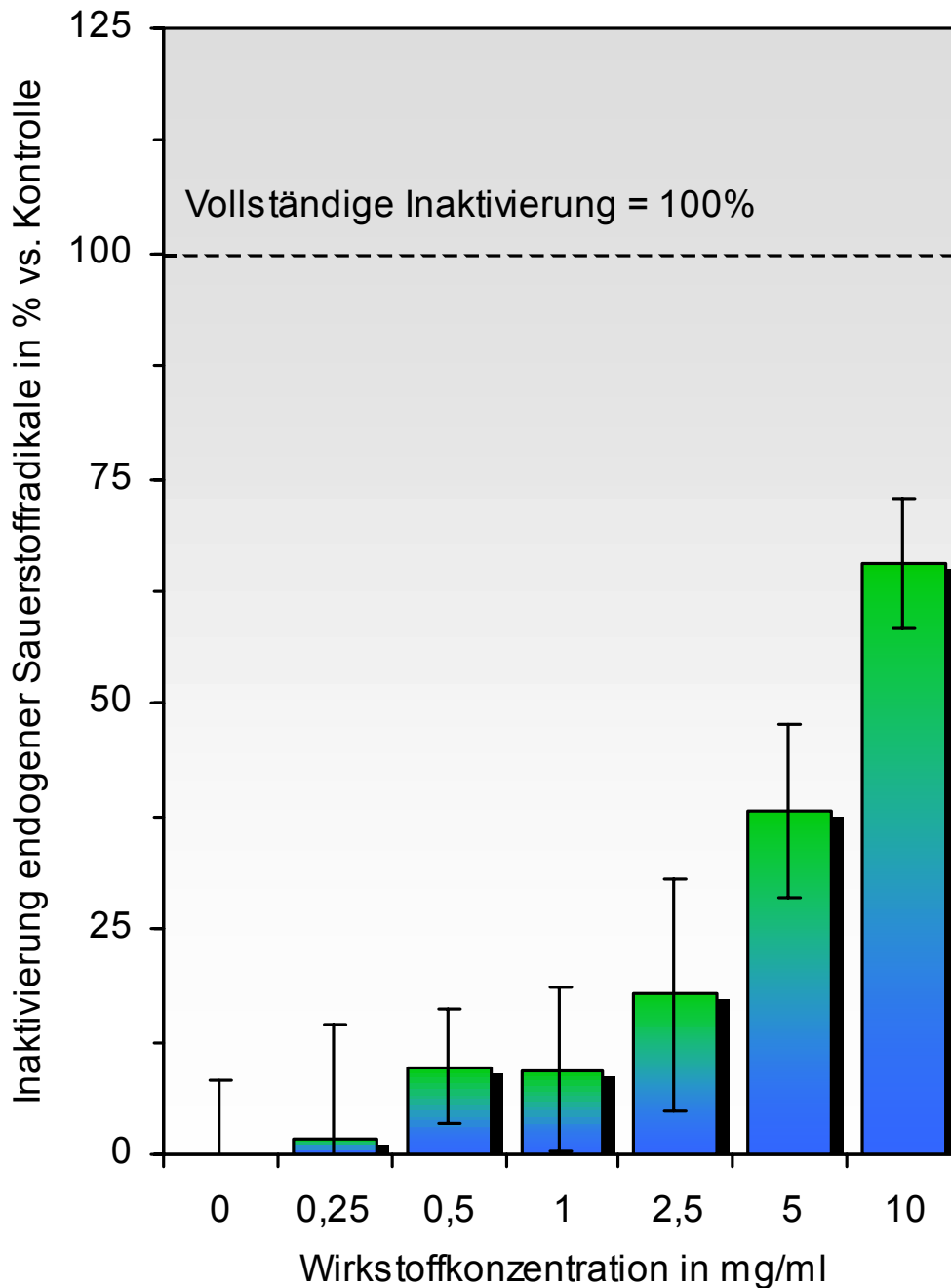
## Multikraft Effektive Mikroorganismen (EM-Urlösung Plus)



**Abb. 2:** Dosisabhängige Inaktivierung exogener freier Sauerstoffradikale durch Multikraft Effektive Mikroorganismen (EM-Urlösung Plus) im zellfreien Testsystem. Eine vollständige Inaktivierung ergibt einen Wert von 100%. Es ist zu erkennen, dass die EM-Urlösung Plus bei einer Konzentration von 10 mg/ml nahezu alle freien Radikale inaktiviert. Die EC50, d.h. die Wirkstoffkonzentration, bei der es zu einer 50%igen Inaktivierung der freien Radikale kommt, liegt bei etwa 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 ( $n = 3$ ). Bei Konzentrationen  $\geq 2,5$  mg/ml kommt es zu einer statistisch signifikanten Inaktivierung der Radikale ( $p \leq 0.05$ ; Student's  $t$ -Test).

# TESTBERICHT

## Multikraft Effektive Mikroorganismen (EM-Urlösung Plus)



**Abb. 3:** Dosisabhängige Inaktivierung von endogenen Sauerstoffradikalen durch Multikraft Effektive Mikroorganismen (EM-Urlösung Plus), welche in einem zellbasierten Test von speziell differenzierten entzündungsvermittelnden Zellen (funktionale neutrophile Granulozyten) in einem oxidativen Burst gebildet werden. Die EC50, d.h. die Wirkstoffkonzentration, welche die endogenen Sauerstoffradikale zu 50% inaktiviert, liegt bei etwa 7,5 mg/ml. So kann durch Multikraft Effektive Mikroorganismen (EM-Urlösung Plus) die schädigende Wirkung von einem lokalen Überschuss reaktiver Sauerstoffradikale direkt im Gewebe vermindert werden. Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus jeweils drei Messungen ( $n = 3$ ). Bei Konzentrationen  $\geq 5$  mg/ml kommt es zu einer statistisch signifikanten Inaktivierung der Radikale ( $p \leq 0.05$ ; Student's  $t$ -Test).