

# nutrition-press

Fachzeitschrift für Mikronährstoffe

SONDERAUSGABE  
DER PLANTAFOOD  
MEDICAL GMBH

plantafood  
MEDICAL



Prof. Dr. Brigitte König  
**Bioverfügbarkeit  
des Zellschutz-  
komplexes**

Bestimmung der Vitamin C  
Aufnahme im CaCo-2-  
Zellmodell

Mikronährstoffe

Vitalstoffe

Nahrungsergänzungsmittel

Hersteller und Vertriebe

Mit Nahrungsergänzungsmitteln  
können Sie *gesund älter werden!*





Die Plantafood Medical GmbH hat in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. habil Brigitte König einen Zellschutzkomplex entwickelt.

Plantafood Medical hat diesen Zellschutzkomplex zum Patent angemeldet.

Möchten Sie weitere Infos?

Hier die Kontaktdaten:

Plantafood Medical, Am Sportplatz 3

D-56291 Leiningen, Telefon: +49 6746 94110,

Telefax: +49 6746 941130

E-Mail: [contact@plantafood.de](mailto:contact@plantafood.de)



## Bestimmung der Vitamin C Aufnahme im CaCo-2- Zellmodell

# Bioverfügbarkeit des Zellschutz- komplexes

### Das Caco-2 Zellmodell:

Im menschlichen Darm wird die Absorption durch eine Barriere gesteuert, die aus einer einzelnen polarisierten Schicht von Epithelzellen besteht, die die Darmwand auskleiden. Die humane Caco-2-Kolonkarzinomzelllinie ahmt diese epitheliale Barriere in Kultur nach, indem sie eine gut differenzierte Monoschicht von Zellen bildet. Der Caco-2-Monolayer enthält eine apikale Bürstengrenze, Formen von Tight Junctions, und enthält viele der Enzyme und Transportproteine der Bürstengrenze, die die aktive Aufnahme oder den aktiven Fluss von Medikamenten, Chemikalien und diversen Substanzen im Darm vermitteln. Aus diesen Gründen wurde der Caco-2-Permeabilitätssassay zum Goldstandard für die In-vitro-Vorhersage der Permeabilität und Absorption von Darmmedikamenten.

### Fragestellung

a) Führt der Zellschutzkomplex in seiner innovativen Zusammensetzung zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit im Vergleich zu den Einzelsubstanzen?

und

b) führt der Zellschutzkomplex in seiner mikronisierten Form zu einer höheren Bioverfügbarkeit als der Zellschutzkomplex in der nicht-mikronisierten Form?

### Vorgehensweise

Es gibt zuverlässige Zellmodelle zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit bzw. Aufnahme über das Darmepithel. Anerkannt ist das Caco-2-Modell. Dieses wird auch in der Pharmakologie zur Bewertung der Bioverfügbarkeit verwendet.

### Vitamin C als Indikatorsubstanz der Bioverfügbarkeit des Zellschutzkomplexes:

Der Zellschutzkomplex enthält viele verschiedene Komponenten, von denen einige schon im Darmlumen durch die Darmbakterien metabolisiert werden. Häufig werden auch nur die Metabolite von den Zellen aufgenommen. Es wäre also ein nicht unerheblicher Aufwand, Nachweissysteme für die verschiedenen Ausgangsverbindungen und deren Metabolite des Zellschutzkomplexes zu etablieren (z. B. LC-GC-MS). Zudem sind die verschiedenen Substanzen unterschiedlichem Maße wasser-/fettlöslich, die Mechanismen derer Aufnahme größtenteils unbekannt und deren weitere Metabolisierung nicht geklärt. So bietet sich das Vitamin C als Indikatorsubstanz für den Aufnahmepro-

zess im menschlichen Darm an. Vitamin C ist komplett wasserlöslich und mittels ELISA quantitativ nachweisbar. Der Aufnahmeweg des Vitamin C im menschlichen Darm und im Caco-2 Zellmodell ist bekannt.

### Vitamin C-Aufnahme im menschlichen Darm

Vitamin C wird von zwei Transportern aktiv in das Zellinnere transportiert: SVCT1 und SVCT2. SVCT1 ist vermutlich die vorherrschende Isoform im menschlichen Darm. Diese Dominanz wird durch Hinweise gestützt, dass die SVCT1-mRNA-Expression durch das Vorhandensein von Vitamin C im Darmlumen herunterreguliert wird, während SVCT2 nicht beeinflusst wird<sup>1</sup>. Ein zweiter Weg besteht für die indirekte Erhöhung der intrazellulären Vitamin C Spiegel: Es tritt eine erleichterte Diffusion von oxidiertem Vitamin C, dem Dehydroascorbat auf, durch die GLUT1-, -3- und -4-Transporter<sup>(1,2)</sup>. Dehydroascorbat wird dann innerhalb der Zelle zu Vitamin C reduziert und mittels Glucosetransporter über die Basalmembran in den Kreislauf transportiert. Es wurde gezeigt, dass der Vitamin C-Transporter SVCT1 ausschließlich auf der apikalen Membran von Caco-2-Zellen exprimiert wird und daher den Basaltransport von Vitamin C nicht vermittelt<sup>(3)</sup>. Es gibt relativ wenig Forschung darüber, wie Vitamin C aus Zellen transportiert wird. Der Austritt von Vitamin C aus den Enterozyten in das Blut ist für die intestinale Aufnahme von Vitamin C unerlässlich.

### Durchführung

#### Vorversuche

Es mussten nachfolgend aufgeführte Vorversuche durchgeführt werden:

- Stabilität von reinen Vitamin C-Lösungen und wässrigen Lösungen der Zellschutzkomplexe (mikronisiert, nicht-mikronisiert) bei 37°C und -20°C.
- Zuverlässigkeit der quantitativen Vitamin-C-Bestimmungen mittels ELISA in verschiedenen Medien (Wasser, Zellkulturmedium).

Alle Vorversuche sind zufriedenstellend ausgefallen.

### Ergebnisse

**Vitamin C-Gehalt in wässriger Lösung des Zellschutzkomplexes:** Zunächst wurde der Vitamin C Gehalt im wässrigen Extrakt des mikronisierten und nicht-mikronisierten Zellschutzkomplexes bestimmt. Es wurden nicht-mikronisierte und mikronisierte Formen des Zellschutzkomplexes nicht-identischer sowie identischer Chargen verwendet. Die Ergebnisse nicht-identischer Chargen sind in Tabelle 1, die Ergebnisse identischer Chargen in Tabelle 2 dargestellt. Es wurden jeweils 100 mg/ml Medium-Lösungen vom mikronisierten und nicht-mikronisierten Zellschutzkomplex hergestellt und diese zentrifugiert. Nach Abnahme von 300 µl Überstand der ersten Zentrifugation erfolgte eine weitere Zentrifugation des restlichen Überstandes. Die Proben aus dem ersten und dem zweiten Zentrifugationsüberstand wurden jeweils 1:100, diese Verdünnung dann 1:2 und diese wiederum 1:3 verdünnt, um im zweiten

Probe	Soll-Konzentration	Konzentration in µg/ml	Wert wie erwartet?
nicht-mikronisiert	23-63 µg/ml	17,308	etwas geringer
mikronisiert	23-63 µg/ml	44,808	ja
nicht-mikronisiert	70-190 µg/ml	65,192	etwas geringer
Mikronisiert	70-190 µg/ml	99,038	ja

Tabelle 1: Die gemessenen Werte des Vitamin C im Zellschutzkomplex, mikronisiert versus nicht-mikronisiert (unterschiedliche Chargen), und die erwarteten Konzentrationsbereiche laut Herstellerangabe.

Probe	Soll-Konzentration	Konzentration in µg/ml	Wert wie erwartet?
nicht-mikronisiert	70-190 µg/ml	66,38	etwas geringer
Mikronisiert	70-190 µg/ml	91,94	ja

Tabelle 2: Die gemessenen Werte des Vitamin C im Zellschutzkomplex, mikronisiert versus nicht-mikronisiert (identische Chargen), und die erwarteten Konzentrationsbereiche laut Herstellerangabe.

Zentrifugationsschritt eine Probe im ungefähren Bereich zwischen 70 und 190 µg/ml sowie eine Probe zwischen 23-63 µg/ml zu erhalten.

Somit zeigt sich sowohl bei der Analyse des Vitamin C Gehaltes in Proben ungleicher wie auch gleicher Chargen, dass mehr Vitamin C aus der mikronisierten Version gewonnen werden kann.

### Überprüfung der Differenzierung der Caco-2-Zellen

#### mittels Widerstandmessung (TEER)

Caco-2 Zellen weisen im differenzierten Zustand laut Literatur je nach Passage, Zusammensetzung des Mediums und Temperatur Werte zwischen 200-600 Ωcm<sup>2</sup> auf. Um den Differenzierungsstatus der Caco-2 Zellen zu verfolgen, wurden am Tag der Aussaat sechs zusätzliche Wells (à 1,5 \* 10<sup>5</sup> Zellen pro Well) für das CellZscope E ausgesät und automatisch im Stundentakt gemessen.

Nach einer Differenzierungszeit von 23 Tagen (550 Stunden) war ein Widerstand von etwa 200 Ωcm<sup>2</sup> vorhanden.

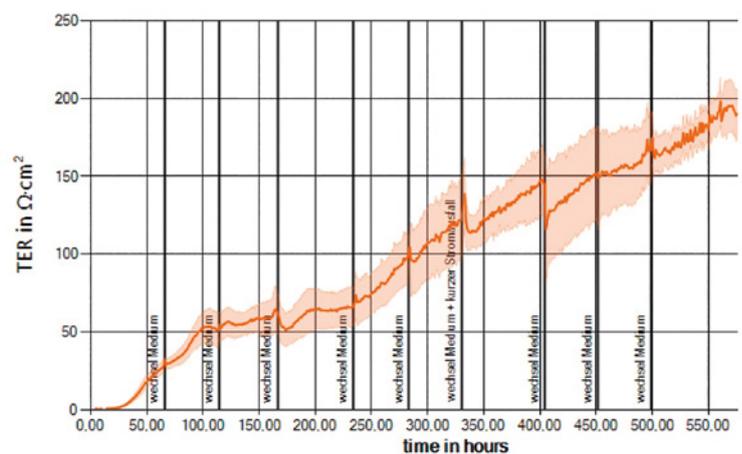


Abbildung 1: Der durchschnittliche TEER-Verlauf der ausgesäten Caco-2 Zellen inklusive Standardabweichung (hellroter Bereich). Nach etwa 23 Tagen (550 Stunden) wurde beinahe ein TEER-Wert von 200 Ωcm<sup>2</sup> erreicht.

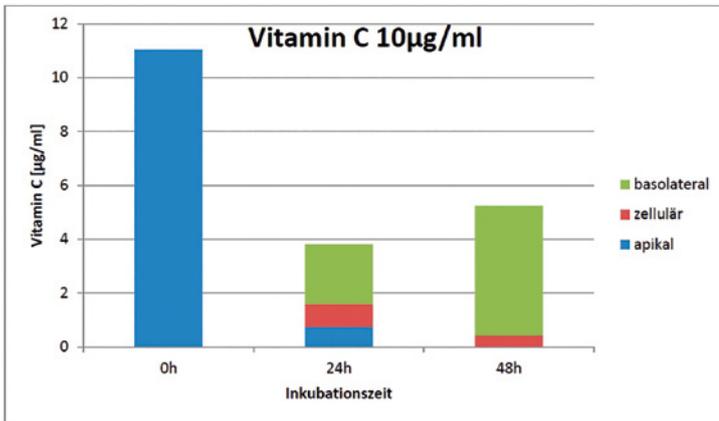


Abbildung 2: Gemessene Vitamin C Konzentrationen (synthetisch hergestellt) im Zellüberstand (apikale Darmlumenseite), in den Zellen (zellulär) und im basolateralen Unterstand (Blutstrom) zum Startzeitpunkt und nach 24 und 48 Stunden bei einer Ausgangskonzentration von 10 µg/ml

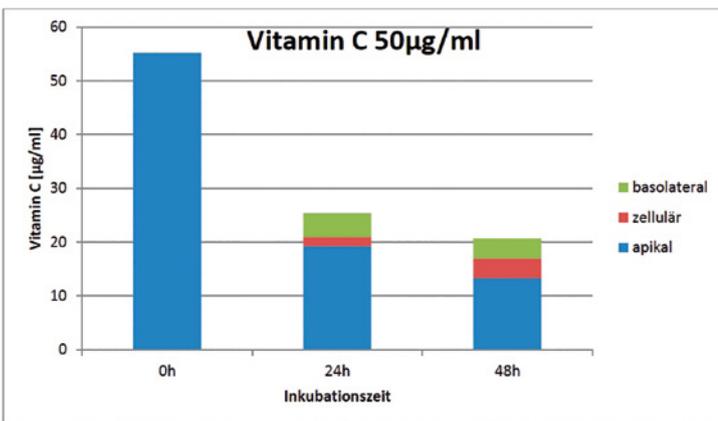


Abbildung 3: Gemessene Vitamin C Konzentrationen (synthetisch hergestellt) im Zellüberstand (apikale Darmlumenseite), in den Zellen (zellulär) und im basolateralen Unterstand (Blutstrom) zum Startzeitpunkt und nach 24 und 48 Stunden bei einer Ausgangskonzentration von 50 µg/ml.

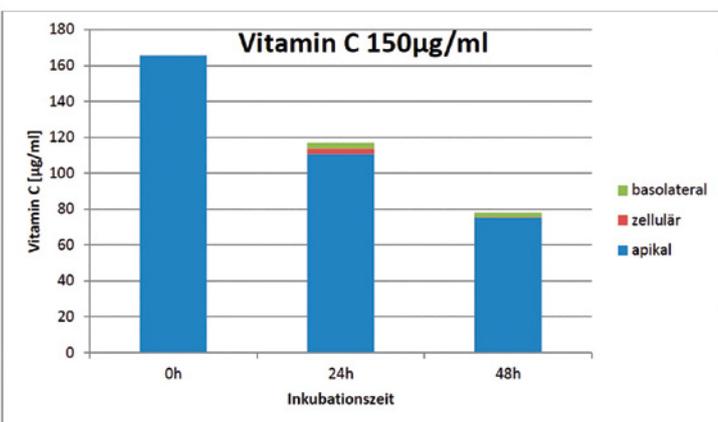


Abbildung 4: Gemessene Vitamin C Konzentrationen (synthetisch hergestellt) im Zellüberstand (apikale Darmlumenseite), in den Zellen (zellulär) und im basolateralen Unterstand (Blutstrom) zum Startzeitpunkt und nach 24 und 48 Stunden bei einer Ausgangskonzentration von 150 µg/ml.

#### mittels qRT-PCR

Um den Differenzierungsstatus der auf Inserts angezüchteten Caco-2 Zellen zu überprüfen, wurden diese neben der Messung des transepithelialen Widerstandes (siehe vorhergehenden Abschnitt) auch mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Hierbei wurden die Genexpressionen von Sucrose-Isomaltase (SI), alkalischer Phosphatase (ALPI), Cytochrom P450 (CYP3A4), Oligopeptidtransporter (SLC15A1) und protonen-gekoppeltem divalentem Metalionentransporter (SLC11A2) im Verhältnis zu den beiden internen Standards TATA-binding Protein (TBP) und Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA) betrachtet. Hierzu wurde die delta-delta-Ct Methode angewendet und die daraus resultierenden Verläufe über die Zeit anschließend mit denen aus dem Paper „Good Caco-2 cell culture practices“ von Natoli et al. verglichen. Zudem wurde anhand einer Schmelzkurvenanalyse kontrolliert, ob es sich immer um die richtigen DNA-Fragmente handelte.

Der Differenzierungsgrad der Caco-2-Zellen konnte mittels des Genexpressionsmusters von SI, ALPI, CYP3A4, SLC15A1 und SLC11A2 bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

#### Absorptionsrate von Vitamin C im Caco-2 Zellmodell

##### Synthetisches Vitamin C (Ascorbinsäure)

Es wurden drei verschiedene Vitamin C Lösungen hergestellt: 10 µg/ml; 50 µg/ml; 150 µg/ml. Die Konzentrationen von Vitamin C wurden zum Startzeitpunkt (0h), nach 24h und nach 48h Inkubation gemessen. Die Vitamin C Konzentrationen wurden im Überstand (apikale Seite; Darmlumen), in den Caco-2 Zellen (zellulär), und auf der



## Literatur

1. MacDonald L, Thumser AE & Sharp P (2002) Decreased expression of vitamin C transporter SVCT1 by ascorbic acid in a human intestinal epithelial cell line. *Br J Nutr* 87, 97–100.
2. Rumsey SC, Kwon O, Xu GW, et al. (1997) Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. *J Biol Chem* 272, 18982–18989.
3. Rumsey S, Daruwala R, Al-Hasani H, et al. (2000). Dehydroascorbic acid transport by GLUT4 in *Xenopus* oocytes and isolated rat adipocytes. *J Biol Chem* 275, 28246–28253.
4. Natoli M., et al.. Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicology in Vitro* Volume 26, 8, 2012, p. 1243-1246 <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.03.009>

basolateralen Seite (Blutstrom) bestimmt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 2 - 4 dargestellt.

## Zellschutzkomplex mikronisiert versus nicht-mikronisiert

Es wurden wässrige Lösungen der mikronisierten und nicht-mikronisierten Form des Zellschutzkomplexes in Konzentrationen von 10µg/ml; 50µg/ml; 150µg/ml hergestellt. Die entsprechenden Vitamin C Konzentrationen im Zellschutzkomplex betragen laut Herstellerangaben 1,4-3,8 µg/ml / 7-19 µg/ml / 21-57 µg/ml. Da die Zellsätze mit den Konzentrationen von 10µg/ml und 50µg/ml zu starken Standardabweichungen führten, sind in nachfolgender Abbildung 5 und 6 nur die Ergebnisse mit einer Zellschutzkonzentration von 150µg/ml dargestellt.

## Schlussfolgerung

Im Vergleich zum synthetisch hergestellten Vitamin C befinden sich bei Verwendung des Zellschutzkomplexes höhere Konzentrationen an Vitamin C auf der basolateralen Seite des Caco-2-Zelllayers. Daher kann man auf eine höhere Bioverfügbarkeit des natürlichen Vitamin C im Vergleich zum synthetisch hergestellten Vitamin C schließen.

Aus dem mikronisierten Zellschutzkomplex wird eine höhere Konzentration an Vitamin C gelöst (wässrige Phase). Dadurch steht dem Darm mehr Vitamin C für die Aufnahme zur Verfügung. Je nach den jeweiligen Vitamin C Konzentrationen erhöht sich dadurch auch die Bioverfügbarkeit des Vitamin C.

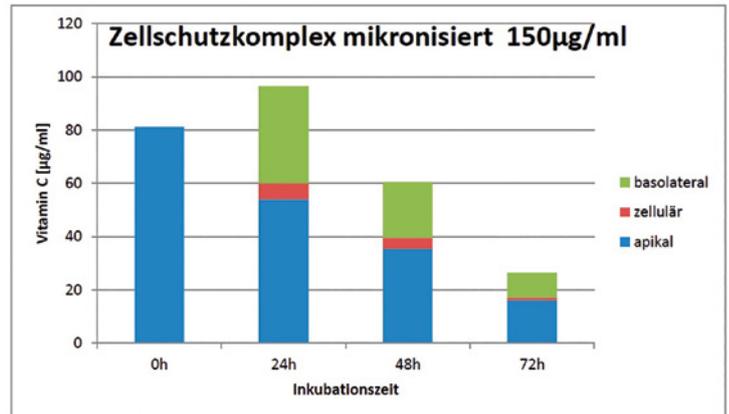


Abbildung 5: Gemessene Vitamin C Konzentrationen (mikronisierter Zellschutzkomplex) im Zellüberstand (apikale Darmlumenseite), in den Zellen (zellulär) und im basolateralen Unterstand (Blutstrom) zum Startzeitpunkt und nach 24 und 48 Stunden bei einer Ausgangskonzentration von 150µg/ml wässrigen Extraktes des Zellschutzkomplexes.

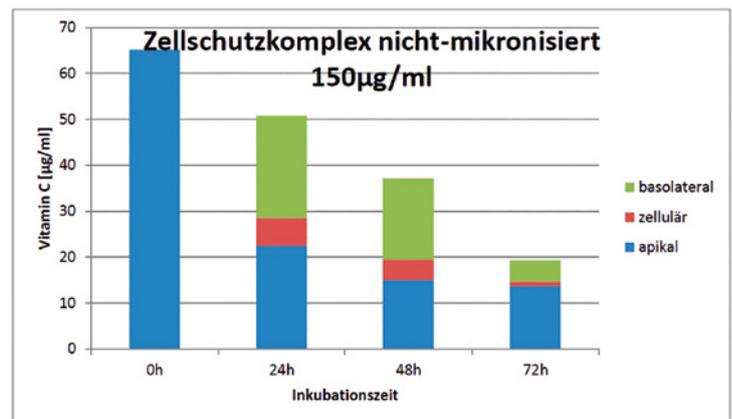


Abbildung 6: Gemessene Vitamin C Konzentrationen (nicht-mikronisierter Zellschutzkomplex) im Zellüberstand (apikale Darmlumenseite), in den Zellen (zellulär) und im basolateralen Unterstand (Blutstrom) zum Startzeitpunkt und nach 24 und 48 Stunden bei einer Ausgangskonzentration von 150µg/ml wässrigen Extraktes des Zellschutzkomplexes.



## Autorin

**Prof. Dr. habil  
Brigitte König**

Magdeburg Molecular  
Detections GmbH  
& Co. KG  
Tätigkeit am Univer-  
sitätsklinikum Leipzig,  
Otto-Von-Guericke  
Universität Magdeburg

# Zellschutz Komplex

## Zellschutz Komplex

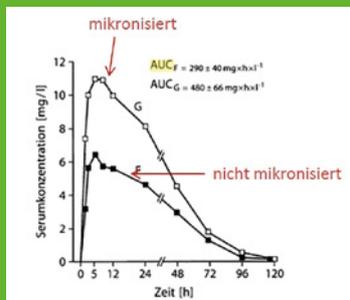
- Mikronisiert
- Innovative Biotechnologie
- Hochwertige Zutaten
- Hochgradig bioverfügbar
- Zulassung als Gebrauchsmuster

## Aufbau Zellschutz Komplex

- Camu Camu (20 % natürliches Vit C)
- L-Ascorbinsäure
- Jiaogulan
- Shiitake
- Cordyceps
- Kapern
- Astragalus
- Natürliches  $\beta$ -Glucan aus Gerste
- Melonenextrakt
- Chlorophyllin Na-Mg Komplex
- Schwarzer Pfeffer Extrakt (95 % Piperine)

Hauptmerkmal: der gesamte Komplex ist mikronisiert!

## Mikronisierung Zellschutz Komplex



Mikronisierung = deutliche Steigerung der Bioverfügbarkeit!  
Der gesamte Zellschutzkomplex ist mikronisiert und hat eine Zulassung als Gebrauchsmuster erhalten!

## Camu Camu Zellschutz Komplex

- Frucht aus Südamerika
- Sehr hoher natürlicher Gehalt an Vitamin C – bis zu 50 x mehr als in Zitrusfrüchten
- Stark antioxidativ
- zellschützend
- U. a Unterstützung der Kollagenbildung
- Anti-Aging
- Viel Eisen, Niacin, Riboflavin und Phosphor

## Jiaogulan Zellschutz Komplex

- „Kraut der Unsterblichkeit“
- Anregende Wirkung
- Stark antioxidativ
- Verbessert Nährstoffversorgung
- Verstärkt Herzleistung
- Regt Superoxidismutase Ausschüttung an
- Verbessert Blutfettwerte

## Shiitake Zellschutz Komplex

- Heilpilz, wird in der TCM seit Tausenden von Jahren eingesetzt
- Reich an Vitaminen und Mineralstoffen
- Reich an dem Polysaccharid Lentinan
- Immunmodulierend und antikanzerogen
- antimikrobielle Wirkung gegen Parasiten, Bakterien und Viren

## Cordyceps Zellschutz Komplex

- In TCM verwendeter Pilz „Raupenpilz“
- Antioxidativ
- Immun- und cholesterinregulierend
- Aphrodisierend
- Antiviral und antikanzerogen (wegen Cordycepin)
- Erhöht den ATP Spiegel – Leistungssteigerung

## Kapern Zellschutz Komplex

- Inhaltsstoff Quercetin = Flavonoid
- Appetitanregend
- Verdauungsfördernd
- Antioxidativ
- Zellschützend

## Astragalus Zellschutz Komplex

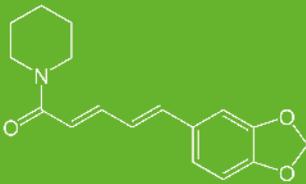
- In TCM stark vertreten
- Kräftigend
- Flavonoide
- Wundheilung
- Leber und Nieren schützend
- Herz Kreislauf System stärkend
- Astragaloside sind für Anti-Aging Effekte bekannt (gegen Telomerverkürzung)

## Melonenextrakt Zellschutz Komplex

- Hoher Gehalt an Superoxiddismutase (SOD) – ein hochwirksames Enzym
- Reguliert Blutzucker
- Reduziert Cellulite
- Beugt Burn-Out-Syndrom vor
- Beugt Atherosklerose vor

## Chlorophyll Zellschutz Komplex

- Verbesserte Qualität und Quantität roter Blutkörperchen
- Blutreinigend
- Entgiftend
- Biophotonen, versorgen Zelle mit Energie
- O<sub>2</sub> Lieferant, aerobe Darmbakterien arbeiten besser



## Schwarzer Pfeffer Extrakt Zellschutz Komplex

Wirkstoff Piperin 95%

Dadurch bessere Aufnahme aller anderen  
Mikronährstoffe aus anderen NEM

Plantafood medical GmbH

Laudert 19.12.2019

plantafood medical gmbh  
am sportplatz 3  
D - 56291 leiningen  
tel.: + 49 (0) 6746 9411 552  
fax: + 49 (0) 6746 9411 535  
[www.plantafood.de](http://www.plantafood.de)  
[www.animals-plantafood.de](http://www.animals-plantafood.de)

Haftungsausschluss: Ausschließlich für den internen Gebrauch bestimmt und darf nicht veröffentlicht werden. Für Inhalt, Aktualität, Korrektheit, Vollständigkeit oder Qualität der bereitgestellten Informationen übernimmt Plantafood medical GmbH keine Gewähr.





## Unsere Kompetenz: Innovation und Qualität

Als internationaler Lohnhersteller entwickelt und produziert die Plantafood Medical GmbH seit über 10 Jahren ein breites Sortiment an innovativen Lebensmitteln und Produkten für den Gesundheitsmarkt. Die Basis unserer Produkte sind pflanzliche Naturstoffe aus der ganzen Welt, sekundäre Pflanzenstoffe, alle Vitamine, Mineralien, Spurenelemente sowie Mikronährstoffe.

Marktführer in diversen Vertriebskanälen wie auch Unternehmensgründer vertreiben von uns entwickelte und/oder hergestellte Produkte. Innovationen sind unsere Herausforderung. Unser überdurchschnittliches Qualitätsmanagement entspricht dem Pharma-Qualitätsmanagement. Belegt wird dies u. a. durch einen internationalen Innovationspreis sowie häufig gelobte und mit „gut“ bewertete Produkte in deutschen Warentests.

Wir sind außerdem Gründungs-Mitglied im NEM Verband mittelständischer europäischer Hersteller und Distributoren von Nahrungsergänzungsmitteln und Gesundheitsprodukten e.V.

plantafood medical gmbh  
am sportplatz 3  
D - 56291 leiningen  
tel.: + 49 (0) 6746 9411 - 0  
fax: + 49 (0) 6746 9411 - 30  
contact@plantafood.de

[www.plantafood.de](http://www.plantafood.de)