

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

Medizinisches Beratungszentrum
GmbH & Co. KG
c/o Herrn Michael Schellenberger
Seestraße 38

82211 Herrsching

Oskar-von-Miller-Straße 10
D-86956 Schongau, Germany

Fon Diessen: +49 8807 2759-650
Fon Schongau: +49 8861 256-5250
Fax: +49 8861 256-7162
Email: info@dartsch-scientific.com
Web: www.dartsch-scientific.com

9. April 2013

– *Testbericht und Fachinformation* –

ARTHROBONUM – Tierversuchsfreie zellbiologische Untersuchungen zu antioxidativen und entzündungshemmenden Wirkeffekten

1 Hintergrund

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 wichtige Aufgaben bei der zellulären Signalübermittlung. Zudem stehen sie in einem ständigen Gleichgewicht mit den regulierenden natürlichen Entgiftungsmechanismen wie den Enzymen Glutathion, Katalase und Superoxid-Dismutase. Umweltbelastungen, Ernährungsmängel, körperlicher oder seelischer Stress, aber auch Medikamente, Verletzungen und Entzündungen können zu einer unkontrollierten Überproduktion der 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, Proteine, Lipide und Kohlenhydrate. Speziell bei Verletzungen und Entzündungen spielt die Freisetzung von reaktiven Radikalen in der Frühphase eine wichtige Schlüsselrolle, da in der Folge weitere Gewebeschädigungen resultieren, die ein rasches und unkompliziertes Abheilen des betroffenen Gewebes negativ beeinflussen können.

2 Produktbeschreibung

ARTHROBONUM ist ein Nahrungsergänzungsmittel, welches auch für Allergiker (außer bei Allergien gegen Meerestiere, oder Meerestierbestandteile) geeignet ist und keine Bestandteile von Schwein, Rind oder Huhn enthält. Es enthält Proteine aus Meeresschalen-

tieren und Haifischen und wird streng nach den pharmazeutischen Vorschriften bezüglich Reinheit und Gehalt in Deutschland hergestellt. Im Einzelnen enthält **ARTHROBONUM** Glucosaminsulfat (Meerestierextrakt), Chondroitinsulfat (Haifischknorpelextrakt), Mangan sowie die schwefelhaltigen Aminosäuren L-Methionin und L-Cystein. Das Produkt wird empfohlen bei Gelenk- und Arthrosebeschwerden sowie bei Verletzungen im Bereich von Bändern, Sehnen sowie dem Bindegewebe.

3 Dosierungsempfehlung und Testkonzentrationen

Die Dosierungsempfehlung sieht die tägliche Gabe von 2 bis 4 Kapseln (entsprechend etwa 2 bis 4 g) **ARTHROBONUM** vor. Somit verteilen sich 2 bis 4 g Wirkstoffe auf etwa 6 Litern Blutvolumen. Das Blut setzt sich beim Menschen zu etwa 55 % aus der Blutflüssigkeit und zu etwa 45 % aus den für die Verteilung der Wirkstoffe weitaus weniger wichtigen korpuskulären Bestandteilen (Blutkörperchen) zusammen. Damit verteilen sich 2 bis 4 g auf 3,3 Litern Blutflüssigkeit oder – umgerechnet – beträgt die Wirkstoffkonzentration in der Blutflüssigkeit etwa 0,6 bis 1,2 mg/ml. Diese Überlegungen gelten für eine vollständige Resorption der Wirkstoffe.

Entsprechend dieser Überlegungen betragen die Testkonzentrationen für **ARTHROBONUM**: 0 (= unbehandelte Kontrolle) – 0,1 – 0,25 – 0,5 – 1 – 2,5 – 5 – 10 mg/ml, die aus jeweils 10x konzentrierten Stammlösungen in phosphatgepufferter Salzlösung mit Calcium und Magnesium (PBS+) hergestellt wurden.

4 Antioxidative Wirkung bei frei im Blut zirkulierenden Sauerstoffradikalen

Ist eine Testsubstanz in der Lage, freie im Blut zirkulierende Sauerstoffradikale zu inaktivieren, so spricht man von einer antioxidativen Wirkung. Solche Radikale können durch ein metabolisches Ungleichgewicht (z.B. oxidativen Stress) oder auch durch Umwelttoxinen, Medikamente etc. entstehen.

Experimentelles Vorgehen: In diesem zellfreien Testsystem wurde ohne die Verwendung von Zellen im Testansatz geprüft, ob verschiedene Konzentrationen der Testsubstanz in der Lage sind, freie Sauerstoffradikale zu inaktivieren. Für die Untersuchung wurden die verschiedenen Konzentrationen **ARTHROBONUM** sowie der Tetrazoliumfarbstoff WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim) vorgelegt und dazu Kaliumsuperoxid in Aqua dest. (1 mg/ml) pipettiert. Die nicht durch **ARTHROBONUM** inaktivierten und damit noch reaktionsfreudigen Superoxidanion-Radikale führen dabei zu einer Spaltung und damit auch zu einer Änderung der optischen Dichte (Farbe) des Tetrazoliumfarbstoffes. Dessen optische Dichte wurde als Differenzmessung $\Delta OD = 450 - 690$ nm kontinuierlich aufgezeichnet und nach linearer Regression der erhaltenen Kurvenzüge in Form der Steigung in mOD/min ausgewertet. Die Ergebnisse wurden als Relativwerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt und gegen die Konzentration aufgetragen.

Ergebnis: Wie aus Abb. 1 hervorgeht, konnte **ARTHROBONUM** die exogenen und frei im Blut zirkulierenden Sauerstoffradikale dosisabhängig und statistisch signifikant reduzieren (Student's *t*-Test; $p < 0,01$). Die maximale Inaktivierung der Radikale von 95 % wurde bei einer Konzentration von 2 mg/ml erreicht. Bei der theoretisch berechneten Blutflüssigkeitskonzentration von 0,6 bis 1,2 mg/ml wurden die Radikale zu 70 bis 90 % inaktiviert. Die EC50, d.h. die Konzentration, bei der die Hälfte der Radikale inaktiviert wurde, betrug etwa 0,5 mg/ml. Eine prooxidative Wirkung, d.h. die verstärkte Bildung von Radikalen durch Oxidation der Inhaltsstoffe, wurde nicht beobachtet.

Durch die ausgeprägte antioxidative Wirkung von **ARTHROBONUM** können im Blut zirkulierende freie Radikale effizient inaktiviert und somit in ihrer unerwünschten Wirkung abgeschwächt werden.

5 Entzündungshemmende Wirkung bei einem lokalen Überschuss körpereigener (enener) Sauerstoffradikale

Bei Verletzungen, Entzündungen und komplizierten Wundheilungen kommt es durch die Einwanderung von entzündungsvermittelnden Zellen aus dem Blut ins Gewebe und die Bildung von Radikalen zu einer lokalen Gewebetraumatisierung. Ist eine Testsubstanz in der Lage, diese Bildung und/oder Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen zu hemmen, so kann sie positiv auf den Entzündungs- und Heilungsprozess einwirken.

Experimentelles Vorgehen: Humane Promyelozyten (Zelllinie HL60, ECACC 98070106) wurden als permanente Zelllinie in Routinekultur durch sechstägige Behandlung mit Dimethylsulfoxid zu sog. „funktionalen Neutrophilen“ differenziert (Abb. 2). Dies sind Zellen, welche die Eigenschaften von phagozytierenden und entzündungsvermittelnden Zellen (neutrophile Granulozyten) 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 die weitere Gewebeerstörung diesen Prozess dauerhaft in Gang halten.

Die funktionalen Neutrophilen wurden durch Zugabe eines Phorbolesters (Phorbol-12-myristat-13-acetat; Sigma-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 Sauerstoffradikale 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 (Farbe) weniger stark (Abb. 2). 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 in mOD/min ausge-

wertet. Die erhaltenen Ergebnisse wurden dann als Relativwerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt und gegen die Konzentration aufgetragen.

Ergebnis: Wie in Abb. 3 dargestellt, zeigte **ARTHROBONUM** eine ausgeprägte dosisabhängige entzündungshemmende Wirkung im zellbasierten Testsystem. Bereits bei der niedrigsten Testkonzentration von 0,1 mg/ml und damit deutlich unterhalb der berechneten Blutflüssigkeitskonzentration, war die Wirkung statistisch signifikant (Student's t-Test; $p < 0,01$). Bei der theoretisch berechneten Blutflüssigkeitskonzentration von 0,6 bis 1,2 mg/ml betrug die Inaktivierung der Radikale 75 bis 90 %; die maximale Inaktivierung lag bei 95 % ab einer Testkonzentration von 5 mg/ml. Die EC50 betrug 0,2 mg/ml; somit war die entzündungshemmende Wirkung mehr als doppelt so effektiv wie die antioxidative Wirkung. Offensichtlich beruhte die ausgeprägte entzündungshemmende Wirkung von **ARTHROBONUM** nicht auf dem Wegfangen bereits gebildeter Radikale, sondern auf einer dosisabhängigen Stoffwechsellhemmung der entzündungsvermittelnden Zellen. Dieser Effekt wird sehr gut im direkten Vergleich der beiden Darstellungen in Abb. 3 verdeutlicht. In der Folge dürften weniger Radikale in einem oxidativen Burst gebildet und zusätzlich die Einwanderung dieser Zellen aus dem Blut ins entzündete Gewebe reduziert werden.

Durch diese ausgeprägte Wirkung von **ARTHROBONUM** kann die Produktion und schädigende Wirkung von reaktiven Sauerstoffradikalen direkt im Gewebe vermindert und entzündliche Prozesse mit ihren lokalen Folgen für das Gewebe effizient gehemmt werden. Anschließend kommt es zu einem verbesserten Heilungsprozess des betroffenen Gewebes oder Gelenkes.

6 Zusammenfassung & Schlussfolgerungen

ARTHROBONUM wird vom Hersteller bei Gelenk- und Arthrosebeschwerden sowie bei Verletzungen im Bereich von Bändern, Sehnen sowie dem Bindegewebe empfohlen.


Die in den hier durchgeführten tierversuchsfreien Untersuchungen mit zellfreien und zellbasierten Testsystemen erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass

- **ARTHROBONUM** die exogenen und frei im Blut zirkulierenden Sauerstoffradikale dosisabhängig bis zu 95 % reduziert. Bei der berechneten Blutflüssigkeitskonzentration von 0,6 bis 1,2 mg/ml bewirkt **ARTHROBONUM** eine 70 bis 90 %ige Inaktivierung. Dadurch werden die im Blut zirkulierenden freien Radikale effizient inaktiviert und somit in ihrer unerwünschten Wirkung abgeschwächt (antioxidative Wirkung bei oxidativem Stress).
- **ARTHROBONUM** eine dosisabhängige entzündungshemmende Wirkung im zellbasierten Testsystem mit entzündungsvermittelnden Zellen besitzt und bis zu 95 % der Radikalbildung hemmen kann. Bei der berechneten Blutflüssigkeitskonzentration von 0,6 bis 1,2 mg/ml bewirkt **ARTHROBONUM** eine 75 bis 90 %ige Hemmung der Radikalbildung. So kann die Produktion und schädigende Wirkung von reaktiven Sauerstoffradikalen direkt im Gewebe vermindert und entzündliche Prozesse mit ihren lokalen Folgen für das Gewebe effizient gehemmt werden.

Anhand der vorliegenden Untersuchungsergebnisse kann daher die Einnahme von **ARTHROBONUM** zur Verbesserung der Situation bei entzündlichen Prozessen im Bereich der Gelenke, Sehnen und Bänder und damit zur schnelleren Heilung des Bewegungsapparates beim Menschen bestens empfohlen werden.

Versuchsleiter und verantwortlich für die Richtigkeit der dargestellten Testverfahren und Ergebnisse unter Einhaltung der GLP-Richtlinien.

Schongau, 9. April 2013



Prof. Dr. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemiker

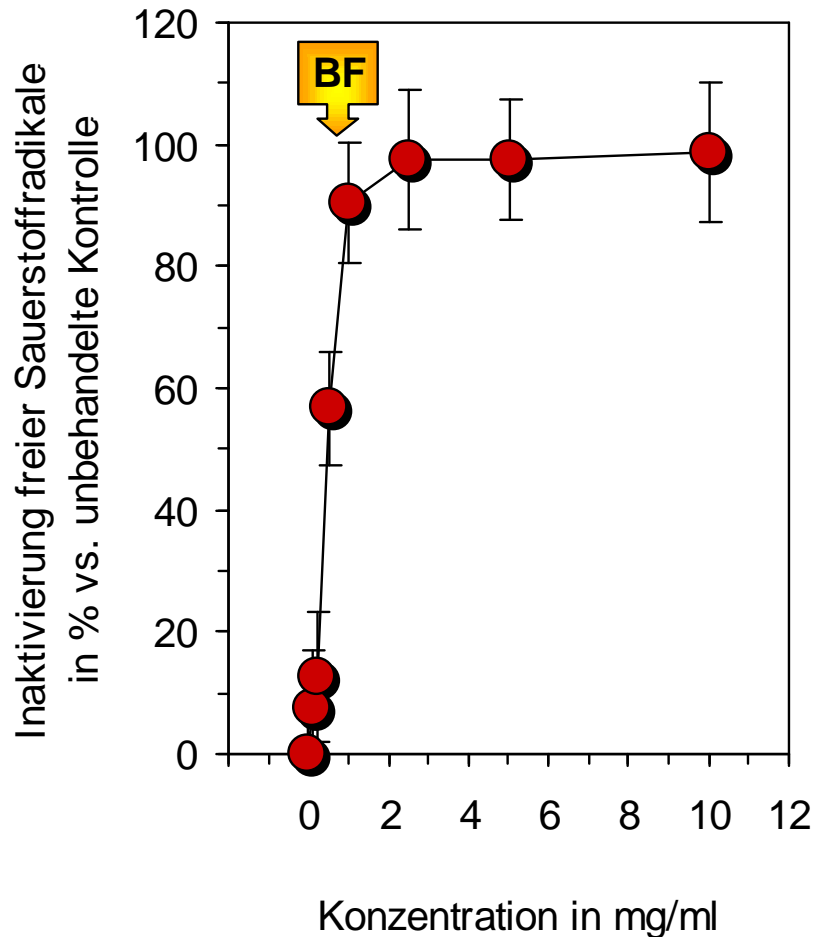


Abb. 1: Dosisabhängige Inaktivierung von exogenen Sauerstoffradikalen durch **ARTHRO-BONUM**. Bei der theoretisch berechneten Blutflüssigkeitskonzentration (= BF) von 0,6 bis 1,2 mg/ml werden die freien Radikale zu annähernd 90 % inaktiviert. Die EC50, d.h. die Konzentration, bei der die Hälfte der Radikale inaktiviert wird, liegt bei 0,5 mg/ml. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus jeweils drei Messungen.

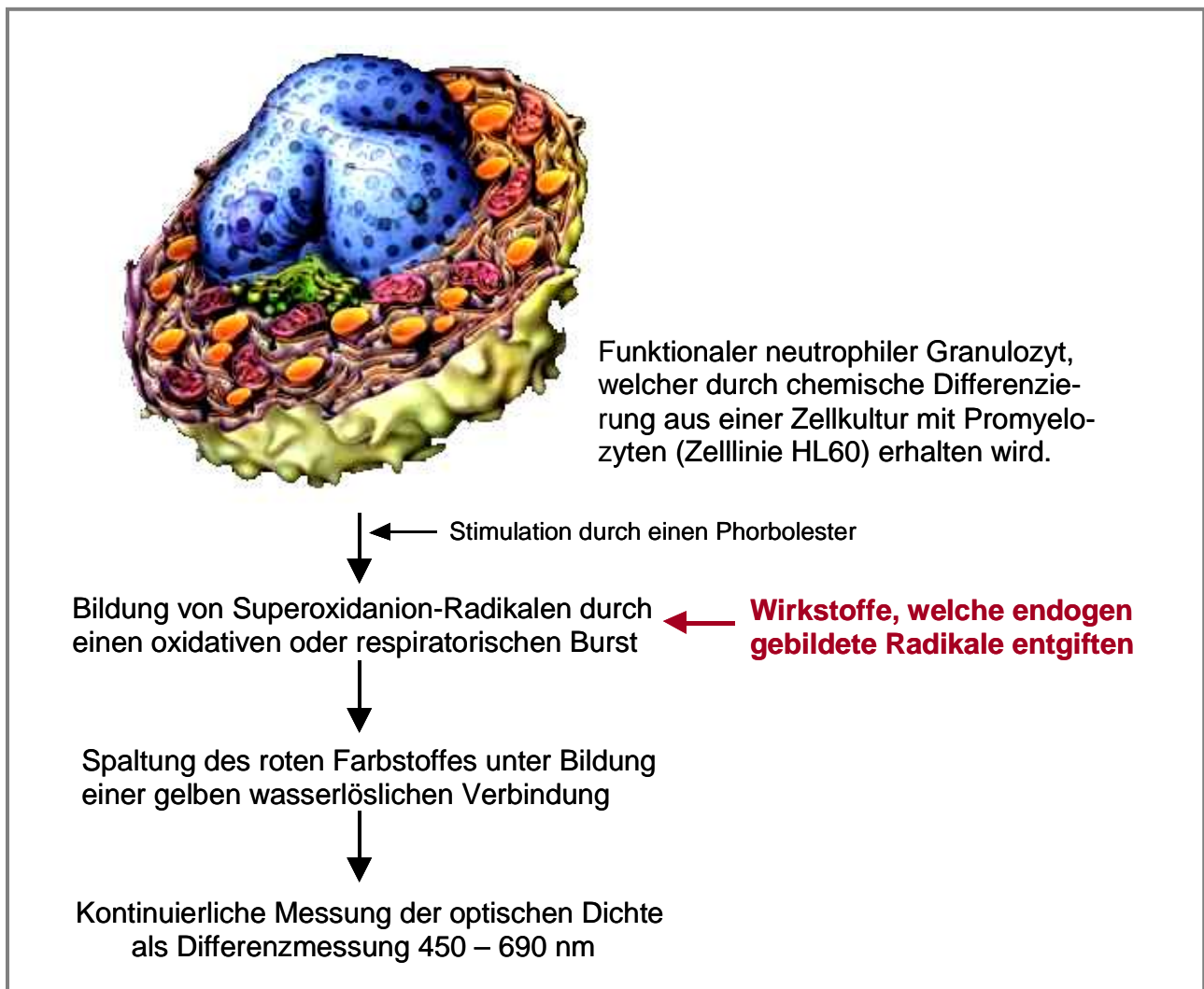


Abb. 2: Messprinzip des zellbasierten Testsystems zur Bewertung des entzündungshemmenden Potenzials von **ARTHROBONUM**. Weitere Erläuterungen im Text.

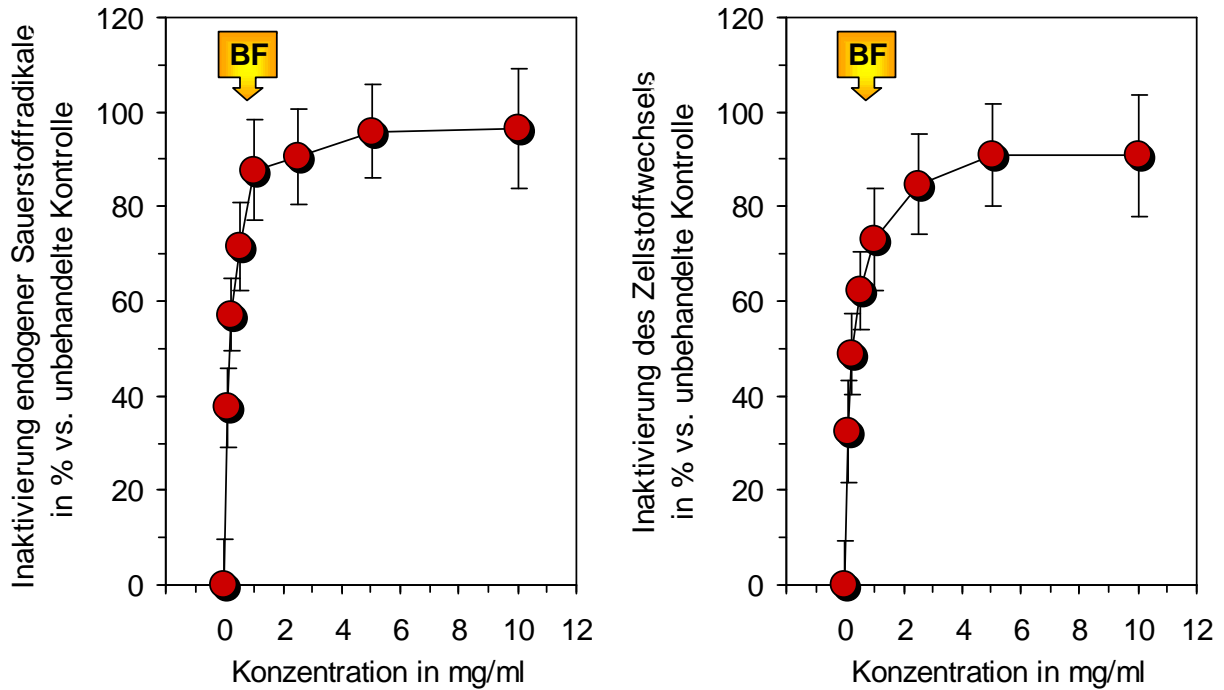


Abb. 3: Entzündungshemmende Wirkung durch die dosisabhängige Inaktivierung von endogen gebildeten Sauerstoffradikalen durch **ARTHROBONUM**. Auf der linken Seite ist die direkte Inaktivierung der gebildeten Radikale dargestellt und auf der rechten Seite die Wirkung von **ARTHROBONUM** auf den Stoffwechsel der funktionalen Neutrophilen. Es ist deutlich erkennbar, dass **ARTHROBONUM** in erster Linie die Bildung von Radikalen durch die entzündungsvermittelnden Zellen hemmt und weniger die bereits gebildeten Radikale inaktiviert. BF = theoretisch berechnete Blutflüssigkeitskonzentration von 0,6 bis 1,2 mg/ml. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus jeweils drei Messungen.