

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](mailto:info@dartsch-scientific.com)  
Web: [www.dartsch-scientific.com](http://www.dartsch-scientific.com)

8. April 2013

## – *Testbericht und Fachinformation* –

### **ARTHROBONUM dog – 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 dog** ist ein Naturprodukt nach Dr. Dehoust in höchster Reinheit und Lebensmittelqualität. Es wird empfohlen bei Gelenk- und Arthrosebeschwerden sowie bei Verletzungen im Bereich von Bändern, Sehnen sowie dem Bindegewebe.

Lt. Hersteller zeichnet sich das Produkt durch folgende Eigenschaften aus:

- Entwickelt auf der Grundlage von Arthrobonum, dem bewährten Produkt zur Arthrose-Behandlung aus dem Humanbereich
- Patentiertes Herstellungsverfahren in Lebensmittelqualität, erfüllt allerhöchste Ansprüche im Spitzensport sowie in der Aufzucht und Rekonvaleszenz
- Basiert auf den wissenschaftlichen Erkenntnissen über den Knorpelstoffwechsel und die Synovialbildung (Gelenkschmiere)
- Keine Verwendung von genmanipulierten Organismen gemäß Verordnung (EC) 1829/2003 und 1830/2003
- Therapiebegleitend in der Rehabilitation
- Kann bei NSAR (Nichtsteroidales Antirheumatikum)-Therapie unterstützend wirken
- Kann zur positiven Beeinflussung von Entzündungsmediatoren beitragen
- Kann körpereigene Stoffwechselprozesse unterstützen
- Kann zur Stabilisierung der Knorpelmatrix beitragen
- Keinerlei Belastung des Organismus

### **3 Fütterungsempfehlung und Testkonzentrationen**

Die Fütterungsempfehlung für Hunde sieht die tägliche Gabe von ca. 5 g **ARTHRO-BONUM dog** je 10 kg Körpergewicht vor. Bei Hunden entspricht etwa 8 bis 9 % des Körpergewichts dem Blutvolumen. Somit verteilen sich 5 g Wirkstoffe auf 800 bis 900 ml Blut je 10 kg Körpergewicht. Das Blut setzt sich beim Hund 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 5 g auf 450 ml Blutflüssigkeit oder – umgerechnet – beträgt die Wirkstoffkonzentration in der Blutflüssigkeit etwa 10 mg/ml. Diese Überlegungen gelten für eine vollständige Resorption der Wirkstoffe.

Entsprechend dieser Überlegungen betragen die Testkonzentrationen für **ARTHRO-BONUM dog**: 0 (= unbehandelte Kontrolle) – 1 – 2,5 – 5 – 10 mg/ml, die aus jeweils 10x konzentrierten Stammlösungen in phosphatgepufferter Salzlösung mit Calcium und Magnesium (PBS+) hergestellt wurden. Höhere Konzentrationen waren wegen des hohen Anteils an Schwebeteilchen in der Aufschlammung und der damit verbundenen ungleichmäßigen Lichtschwächung nicht sinnvoll.

### **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 Umwelt-oxen, 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 dog** sowie der Tetrazoliumfarbstoff WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim) vorgelegt und dazu Kaliumsuperoxid in Aqua dest. (1 mg/ml) pipettiert. Die nicht durch **ARTHROBONUM dog** 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 dog** die exogenen und frei im Blut zirkulierenden Sauerstoffradikale dosisabhängig und statistisch signifikant reduzieren (Student's *t*-Test;  $p < 0,01$ ). Bei der theoretisch berechneten Blutflüssigkeitskonzentration von 10 mg/ml wurden die Radikale zu zwei Dritteln inaktiviert. Die EC<sub>50</sub>, d.h. die Konzentration, bei der die Hälfte der Radikale inaktiviert wurde, betrug 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 dog** können im Blut zirkulierende freie Radikale effizient inaktiviert und somit in ihrer unerwünschten Wirkung abgeschwächt werden.

## **5 Entzündungshemmende Wirkung bei einem lokalen Überschuss körpereigener (endogener) 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

ses 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  $mOD/min$  ausgewertet. 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 dog** eine ausgeprägte dosisabhängige entzündungshemmende Wirkung im zellbasierten Testsystem. Bereits bei der niedrigsten Testkonzentration von 1 mg/ml und damit deutlich unterhalb der berechneten theoretischen Blutflüssigkeitskonzentration von 10 mg/ml, war die Wirkung statistisch signifikant (Student's t-Test;  $p < 0,01$ ). Die  $EC_{50}$  betrug 2,5 mg/ml; somit war die entzündungshemmende Wirkung doppelt so effektiv wie die antioxidative Wirkung. Die maximale Inaktivierung betrug 80 % bei der höchsten Testkonzentration von 10 mg/ml. Bemerkenswerterweise beruhte die entzündungshemmende Wirkung von **ARTHROBONUM dog** nicht auf dem Wegfangen bereits gebildeter Radikale, sondern auf einer dosisabhängigen Stoffwechselhemmung 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 dog** 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 dog** wird vom Hersteller als Naturprodukt nach Dr. Dehoust in höchster Reinheit und Lebensmittelqualität 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 dog** die exogenen und frei im Blut zirkulierenden Sauerstoffradikale dosisabhängig bis zu zwei Dritteln reduziert. Dadurch werden die im Blut zirkulierenden freien Radikale effizient inaktiviert und somit in ihrer unerwünschten Wirkung abgeschwächt (antioxidative Wirkung bei oxidativem Stress).
- **ARTHROBONUM dog** eine ausgeprägte dosisabhängige entzündungshemmende Wirkung im zellbasierten Testsystem mit entzündungsvermittelnden Zellen besitzt und bis zu 80 % der Radikalbildung hemmen kann. 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.

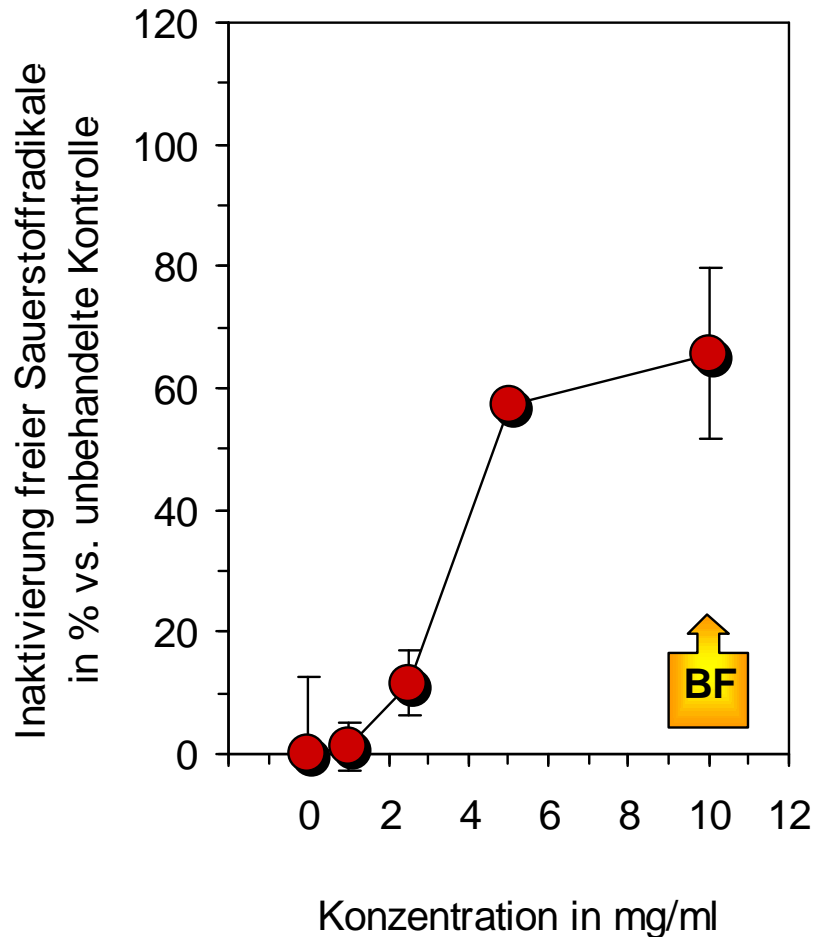
Anhand der vorliegenden Untersuchungsergebnisse kann daher die Einnahme von **ARTHROBONUM dog** zur Verbesserung der Situation bei entzündlichen Prozessen im Bereich der Gelenke, Sehnen und Bänder und damit zur schnelleren Heilung des Bewegungsapparates bei Hunden bestens empfohlen werden.

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

Schongau, 8. April 2013



Prof. Dr. Peter C. Dartsch  
Diplom-Biochemiker

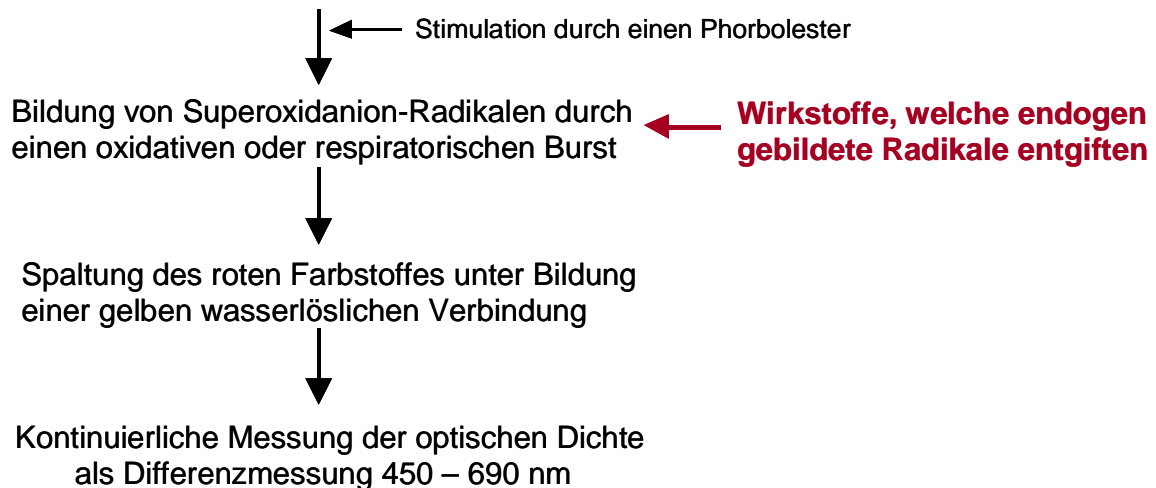


**Abb. 1:** Dosisabhängige Inaktivierung von exogenen Sauerstoffradikalen durch **ARTHRO-BONUM dog**. Bei der theoretisch berechneten Blutflüssigkeitskonzentration (= BF) von etwa 10 mg/ml werden die freien Radikale zu zwei Dritteln inaktiviert. Die EC50, d.h. die Konzentration, bei der die Hälfte der Radikale inaktiviert wird, liegt bei 5 mg/ml. Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus jeweils drei Messungen.

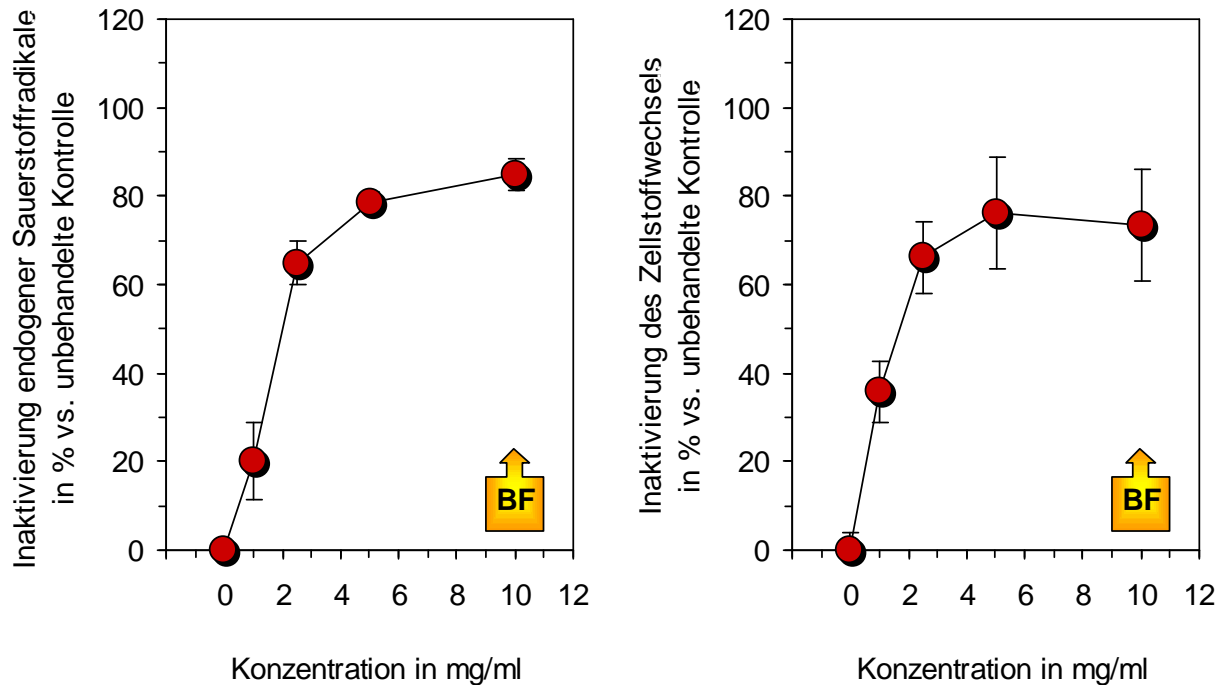




Funktionaler neutrophiler Granulozyt, welcher durch chemische Differenzierung aus einer Zellkultur mit Promyelozyten (Zelllinie HL60) erhalten wird.



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



**Abb. 3:** Entzündungshemmende Wirkung durch die dosisabhängige Inaktivierung von endogen gebildeten Sauerstoffradikalen durch **ARTHROBONUM dog**. Auf der linken Seite ist die direkte Inaktivierung der gebildeten Radikale dargestellt und auf der rechten Seite die Wirkung von **ARTHROBONUM dog** auf den Stoffwechsel der funktionalen Neutrophilen. Es ist deutlich erkennbar, dass **ARTHROBONUM dog** die Bildung von Radikalen durch die entzündungsvermittelnden Zellen hemmt und nicht die bereits gebildeten Radikale inaktiviert. BF = theoretisch berechnete Blutflüssigkeitskonzentration von 10 mg/ml. Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus jeweils drei Messungen.