



DARTSCH SCIENTIFIC

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

Firma
Medicaris GmbH
c/o Herrn Mario Kummer
Falkenstraße 9

D-21614 Buxtehude

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
Internet www.dartsch-scientific.com

21. September 2011

– Information für Angehörige von Heilberufen nach § 12 LFGB –

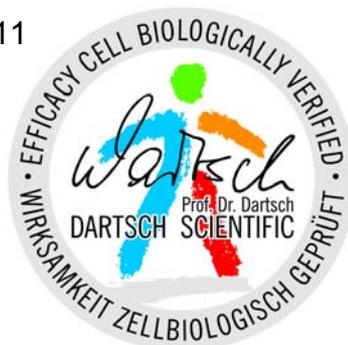
Tierversuchsfreie zellbiologische Untersuchungen zu förderlichen Wirkeffekten von Lithoderm®

1 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Mit tierversuchsfreien zellbiologischen Testmethoden wurde Lithoderm der Firma Medicaris GmbH, D-21614 Buxtehude, auf seine förderlichen Wirkeffekte für Gewebe und Haut untersucht. In den Untersuchungen zeigte Lithoderm eine ausgeprägte dosisabhängige Inaktivierung von exogenen freien Sauerstoffradikalen. Auch endogene, durch entzündungsvermittelnde Zellen gebildete Radikale, wurden annähernd im gleichen Ausmaß statistisch signifikant gehemmt. Lithoderm bewirkte eine moderate Stimulierung des Energiestoffwechsels von Bindegewebszellen im unteren Konzentrationsbereich. Im Vergleich dazu wurde der Energiestoffwechsel und damit die Zellaktivität von Monozyten-ähnlichen Fresszellen als unspezifische Fremdkörperabwehr deutlich stärker stimuliert. Im Wundheilungstest kam es durch Lithoderm zu einer ausgeprägten Förderung der Wundheilung.

Die Untersuchungsergebnisse verifizieren einen Teil der therapeutisch zu beobachtenden entzündungshemmenden und die Regeneration und den Wundheilungsverlauf der Haut positiv beeinflussenden Effekte. Gerade für diese Anwendungszwecke kann Lithoderm bestens empfohlen werden.

Schongau, den 21. September 2011




Prof. Dr. Peter C. Dartsch

TESTBERICHT LITHODERM®

2 Lithoderm – Zusammensetzung

Lithoderm besteht zur Hälfte, also 50 Vol.-%, aus Original Rügenger Dreikronen-Heilkreide® und zu 45 Vol.-% aus Klinoptilolith und 5 Vol.-% Montmorillonit. Die Rügenger Heilkreide ist ein schneeweißes Naturprodukt mit einem basischen pH-Wert von 9,0, welches aus 60 bis 70 Millionen Jahre alten Ablagerungen von Schalen und Gehäusen Milliarden kleinster Lebewesen und der sich daraus gebildeten dicken Kreideschicht hervorgeht. In trockenem Zustand besteht die Heilkreide zu ca. 98,2% aus reinem Calciumcarbonat und geringen Teilen an Silizium-, Magnesium-, Aluminium-, Eisen-, Jod- und Phosphorverbindungen. Klinoptilolith und Montmorillonit gehören beide zur Gruppe der Zeolithe, eine komplexe Gruppe von verschiedenen natürlichen Silizium-Mineralien. Zeolithe weisen eine regelmäßige Anordnungen von Hohlräumen und Kanälen auf. Solche Materialien besitzen daher eine außerordentlich große innere Oberfläche von zum Teil weit über 1000 Quadratmetern pro Gramm. Freie Radikale, aber auch Giftstoffe, können daher von Zeolithen in ihren Hohlräumen gebunden und so inaktiviert werden.

3 Fragestellungen der durchgeführten Untersuchungen

- Kann Lithoderm endogene und lokal im Gewebe gebildete überschüssige Sauerstoffradikale inaktivieren? Ein solcher Radikalüberschuss direkt im Gewebe kann beispielsweise bei komplizierten Wundheilungs- und Entzündungsprozessen durch die aus dem Blut eingewanderten neutrophilen Granulozyten als entzündungsvermittelnde Zellen hervorgerufen werden.
- Kann Lithoderm freie Radikale inaktivieren, die von außen auf den Organismus einwirken und im Blut zirkulieren (antioxidative Wirkung)?
- Kann durch Lithoderm der Energiestoffwechsel von kultivierten Bindegewebszellen stimuliert und so eine Zellerneuerung bzw. -vitalisierung gefördert werden?
- Kann durch Lithoderm der Energiestoffwechsel und somit die basale Zellaktivität von Monozyten-ähnlichen Fresszellen (Zellen der unspezifischen Abwehr, welche körperfremde Strukturen durch Phagozytose zerstören) gefördert werden?
- Kann Lithoderm den Wundheilungsprozess positiv beeinflussen?

4 Testkonzentrationen

Da Lithoderm auf die Haut aufgetragen wird, ist die Berechnung einer lokalen Konzentration in der Haut ohne entsprechende klinische Untersuchungen zur Wirkstoffaufnahme nicht möglich. Zudem fehlt in den hier durchgeführten Untersuchungen auch die Barrierefunktion der Haut, da die Untersuchungen auf Einzelzellebene durchgeführt wurden. Für

TESTBERICHT LITHODERM®

die Untersuchungen wurde – in Abhängigkeit von der Sensitivität des verwendeten Zellmaterials – eine maximale Konzentration von 5 mg/ml verwendet. Untersucht wurde die Aufschlammung von Lithoderm. Grundsätzlich wurde die unbehandelte Kontrolle ohne Lithoderm als Konzentration „0“ bezeichnet.

5 Antioxidative Wirkung von Lithoderm

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 den Enzymen Glutathion, Katalase und Superoxid-Dismutase. Umweltbelastungen, Ernährungsmängel, körperlicher oder seelischer Stress, aber auch Medikamente, Verletzungen, komplizierte Wundheilungsprozesse 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 allgemein 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.

5.1. Antioxidative Wirkung im zellfreien Testsystem bei frei im Blut zirkulierenden Radikalen (exogene Sauerstoffradikale)

Versuchsdurchführung und -auswertung: In diesem zellfreien Testsystem wurde ohne die Verwendung von Zellen im Testansatz geprüft, ob verschiedene Konzentrationen der Testsubstanz in der Lage sind, frei im Blut zirkulierende Sauerstoffradikale zu inaktivieren. Für die Untersuchung wurden die verschiedenen Konzentrationen von Lithoderm in Aqua dest. vorgelegt und dazu Kaliumsuperoxid in Aqua dest. (1 mg/ml) pipettiert. Die nicht durch Lithoderm gebundenen resp. inaktivierten und damit noch reaktionsfreudigen Superoxidanion-Radikale führen dabei zu einer Spaltung und damit auch zu einer Änderung der optischen Dichte des ebenfalls zum Ansatz zugegebenen Tetrazoliumfarbstoffes WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim). Dessen optische Dichte wurde als Differenzmessung $\Delta OD = 450 - 690$ nm kontinuierlich aufgezeichnet und nach linearer Regression der erhaltenen Kurvenzüge in Form der Steigung (Zeitintervall 0-10 min) in mOD/min ausge-

TESTBERICHT LITHODERM®

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

Ergebnis: Wie in Abb. 1 dargestellt, bewirkte Lithoderm eine ausgeprägte dosisabhängige Inaktivierung der freien Sauerstoffradikale, welche ab einer Konzentration $\geq 250 \mu\text{g/ml}$ statistisch signifikant war (Student's t -Test, $p < 0,05$). Die maximale Inaktivierung der Radikale wurde auch bei der maximalen Testkonzentration erreicht und betrug etwa 40 %. Durch die antioxidative Wirkung können frei im Blut zirkulierende Radikale, welche aus der Umwelt stammen oder durch ein metabolisches Ungleichgewicht entstehen, effizient inaktiviert werden.

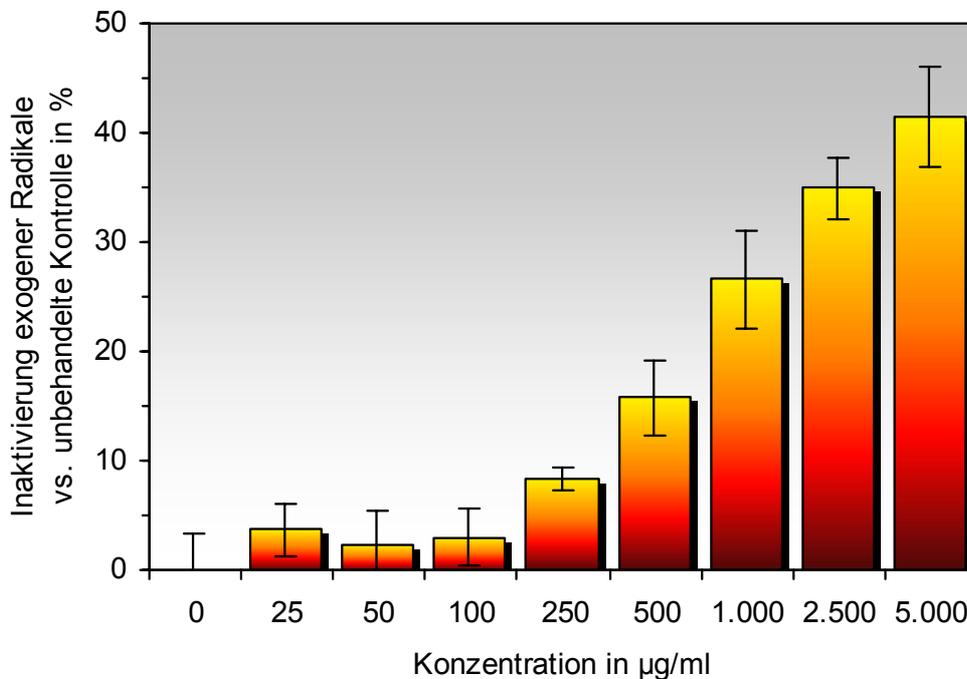


Abb. 1: Dosisabhängige Inaktivierung der freien Sauerstoffradikale durch Lithoderm. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei Versuchen.

5.2. Entzündungshemmende Wirkung im zellbasierten Testsystem bei einem lokalen Überschuss endogen gebildeter Sauerstoffradikale

Versuchsdurchführung und -auswertung: Zunächst wurden humane Promyelozyten (Zelllinie HL60, ECACC 98070106) als permanente Zelllinie in Routinekultur durch sechstägige Behandlung mit Dimethylsulfoxid zu sog. funktionalen Neutrophilen differenziert. 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

TESTBERICHT LITHODERM®

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 Phorbol-12-myristat-13-acetat; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) dazu angeregt, Superoxidanion-Radikale zu bilden. Die gebildeten 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 weniger stark. Es wurde die optische Dichte als Differenzmessung $\Delta OD = 450 - 690 \text{ nm}$ kontinuierlich aufgezeichnet und nach linearer Regression der erhaltenen Kurvenzüge anhand der Steigung (Zeitintervall 10-30 min) in mOD/min ausgewertet. Die erhaltenen Ergebnisse wurden dann als Relativwerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt und gegen die Konzentration aufgetragen.

Ergebnis: Wie in Abb. 2 dargestellt, inaktivierte Lithoderm die endogen durch einen oxidativen Burst entzündungsvermittelnder Zellen gebildeten Sauerstoffradikale (entzündungshemmender Effekt). Dieser war ebenfalls ab einer Konzentration $\geq 250 \mu\text{g/ml}$ statistisch signifikant (Student's *t*-Test, $p < 0,05$). Die maximale Inaktivierung der Radikale wurde bei der maximalen Testkonzentration erreicht und betrug knapp 40 %. Auffällig ist der zur Inaktivierung exogener Radikale in Abb. 1 nahezu gleiche Kurvenverlauf. Durch die entzündungshemmende Wirkung von Lithoderm können so lokal im Gewebe gebildete Radikale, wie sie u.a. bei entzündlichen oder komplizierten Wundheilungsprozessen oder auch bei massiven Irritationen der Haut auftreten, effizient inaktiviert werden.

6 Wirkung auf Zellregeneration, Zellvitalität und Zellaktivität

Zellregenerative Vorgänge oder Wundheilungsprozesse sind u.a. durch eine zeitweilige Erhöhung des Energiestoffwechsels der beteiligten Zellen und auch eine verstärkte Zellteilungsrate über einen mehrtägigen Zeitraum charakterisiert. Ist ein Wirkstoff oder ein Wirkstoffgemisch in der Lage, den zellulären Energiestoffwechsel zu stimulieren, so kann daraus gefolgert werden, dass auch die Zellregeneration und Zellvitalität in vivo stimuliert wird. Ähnlich verhält es sich auch mit der unspezifischen Abwehr von im Blut zirkulierenden Zellen. Neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen werden über chemische Botenstoffe angelockt und sind in der Lage, eingedrungene Fremdkörper durch Phagozytose aufzufressen. Dabei werden die Fremdkörper zuerst von Ausläufern der Zellen umschlossen und dann in die Zelle aufgenommen. Durch eine Stimulation des Stoffwechsels dieser Zellen sollte auch in vivo die unspezifische zelluläre Abwehr gefördert werden.

TESTBERICHT LITHODERM®

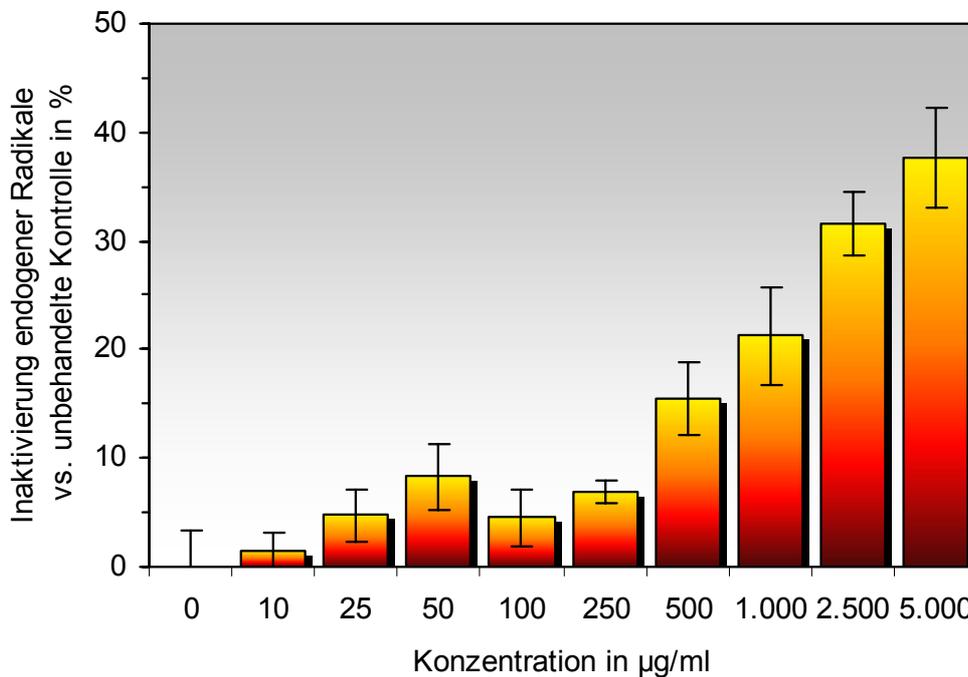


Abb. 2: Dosisabhängiger entzündungshemmender Effekt von Lithoderm durch die Inaktivierung endogen durch entzündungsvermittelnde Zellen gebildeten Radikale. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei Versuchen.

Versuchsdurchführung und -auswertung: Für die Untersuchung wurden Bindegewebsfibroblasten (Zelllinie L-929, DSMZ) bzw. adhärenente HL60-Zellen (Subklon mit Monozyten-ähnlichen Eigenschaften von ECACC 98070106) in einer Dichte von 20.000 Zellen/Vertiefung in 96-Loch-Platten ausgesät. Nach 48 Stunden wurden sie durch die Zugabe von Phosphatpuffer mit 10 mM Glucose \pm unterschiedliche Lithoderm-Konzentrationen stimuliert. Der Energiestoffwechsel mit seinen verschiedenen Redoxprozessen führt dabei zu einer Spaltung und damit einer Änderung der optischen Dichte des ebenfalls zum Ansatz zugegebenen Tetrazoliumfarbstoffes WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim). Dessen optische Dichte wurde als Differenzmessung $\Delta OD = 450 - 690$ nm kontinuierlich für 180 min aufgezeichnet und nach linearer Regression der erhaltenen Kurvenzüge anhand der Steigung (30-90 min) in mOD/min ausgewertet. Die erhaltenen Ergebnisse wurden dann als Relativwerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt und gegen die Konzentration aufgetragen.

Ergebnis: Lithoderm bewirkte im unteren Konzentrationsbereich eine Stimulierung des Energiestoffwechsels der Bindegewebsfibroblasten um etwa 10 bis 12 % (Abb. 3A). Die adhärenenten HL60-Zellen wurden dagegen deutlich stärker stimuliert (Abb. 3B). Auch wenn die Wirkung auf den Energiestoffwechsel beider Zelltypen nur moderat ausfiel, dürfte Lithoderm in vivo zu einer verbesserten Zellregeneration und -vitalität sowie einer effizienteren unspezifischen zellulären Abwehr beitragen.

TESTBERICHT LITHODERM®

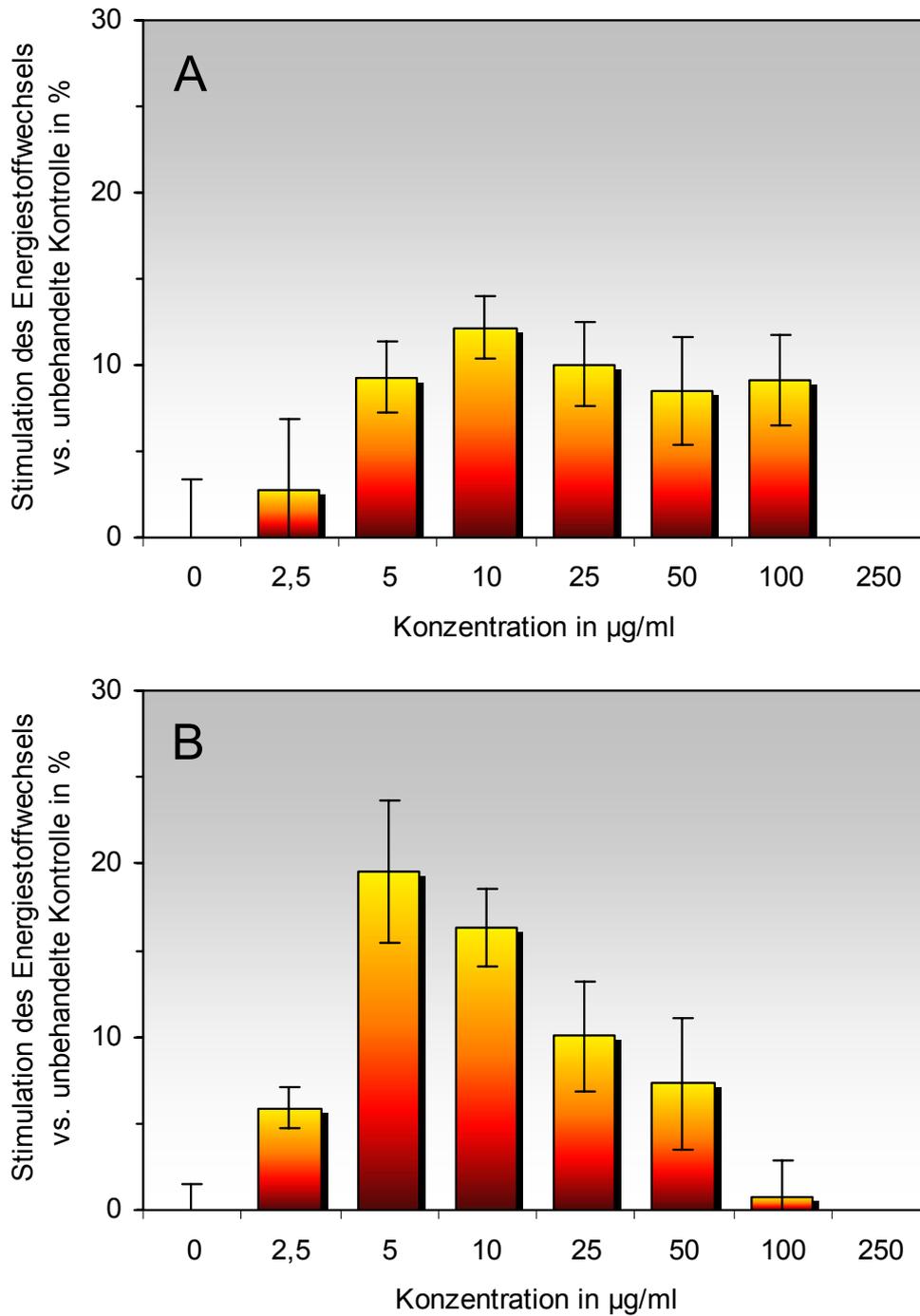


Abb 3: Wirkung von Lithoderm auf den Energiestoffwechsel von kultivierten Bindegewebsfibroblasten (A) und adhärenen HL60-Zellen mit Monozyten-ähnlichen Eigenschaften (B). Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei Versuchen.

TESTBERICHT LITHODERM®

7 Wirkung auf den Wundheilungsprozess

Beim Wundheilungsprozess kann zwischen der Reinigungsphase (Exsudation und Resorption), der Granulationsphase (Proliferation und Festigung) und der Differenzierungsphase (Epithelialisierung und Narbenbildung) unterschieden werden. Speziell die Granulationsphase wird in dem hier verwendeten Testsystem simuliert. Diese Phase zeichnet sich durch das Auftreten von Zellwanderung und Zellproliferation zur Defektauffüllung aus. Vorherrschender Zelltyp sind hier Fibroblasten sowohl aus dem umgebenden als auch aus dem darunter liegenden intakten Gewebe.

Versuchsdurchführung und -auswertung: Bindegewebszellen der Zelllinie L-929 wurden in einer Dichte von 50.000 Zellen/Vertiefung in 12-Loch-Platten ausgesät und für zwei Tage bis zum Erreichen einer konfluenten Zellschicht inkubiert. Danach wurde mit einer Kunststoffspitze (Breite ca. 1,2 bis 1,5 mm) in Form eines kreuzförmigen Schnittes der Zellrasen in jeder Vertiefung entfernt (= künstliche Wunde). Das Kulturmedium wurde abgesaugt, die Zellschicht einmal vorsichtig mit Phosphatpuffer gewaschen und danach frisches Kulturmedium mit reduziertem Serumgehalt sowie die entsprechenden Konzentrationen von Lithoderm zugegeben. An den Wundrändern erfolgt nun durch eine Stimulation von Zellteilung und Zellwanderung eine Besiedlung des zellfreien Raumes unter Schließung der Wunde. Nach drei Tagen wurden die Zellen fixiert und nach Romanowski-Giemsa gefärbt (Abb. 4). Die Breite der Wunde wurde an in jeder Vertiefung an mindestens drei verschiedenen Stellen anhand von Mikrofotografien bestimmt. Pro Testkonzentration wurden mindestens zwei Vertiefungen angelegt. Die Auswertung erfolgte in der Auftragung in Form der Absolutwerte und zusätzlich in Form der Relativwerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Ergebnis: Wie in Abb. 5 dargestellt, förderte Lithoderm den simulierten Wundheilungsprozess, d.h. Proliferation und Migration der Fibroblasten in die künstliche Wunde, in einer dosisabhängigen Weise. Ab einer Konzentration $\geq 250 \mu\text{g/ml}$ war diese Förderung der Wundheilung statistisch signifikant ($p < 0,05$; Student's t -Test) und betrug bis zu 60 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dieses Versuchsergebnis dokumentiert, dass die Inhaltsstoffe von Lithoderm den Verlauf der Granulationsphase *in vivo* positiv beeinflussen können.

TESTBERICHT LITHODERM®

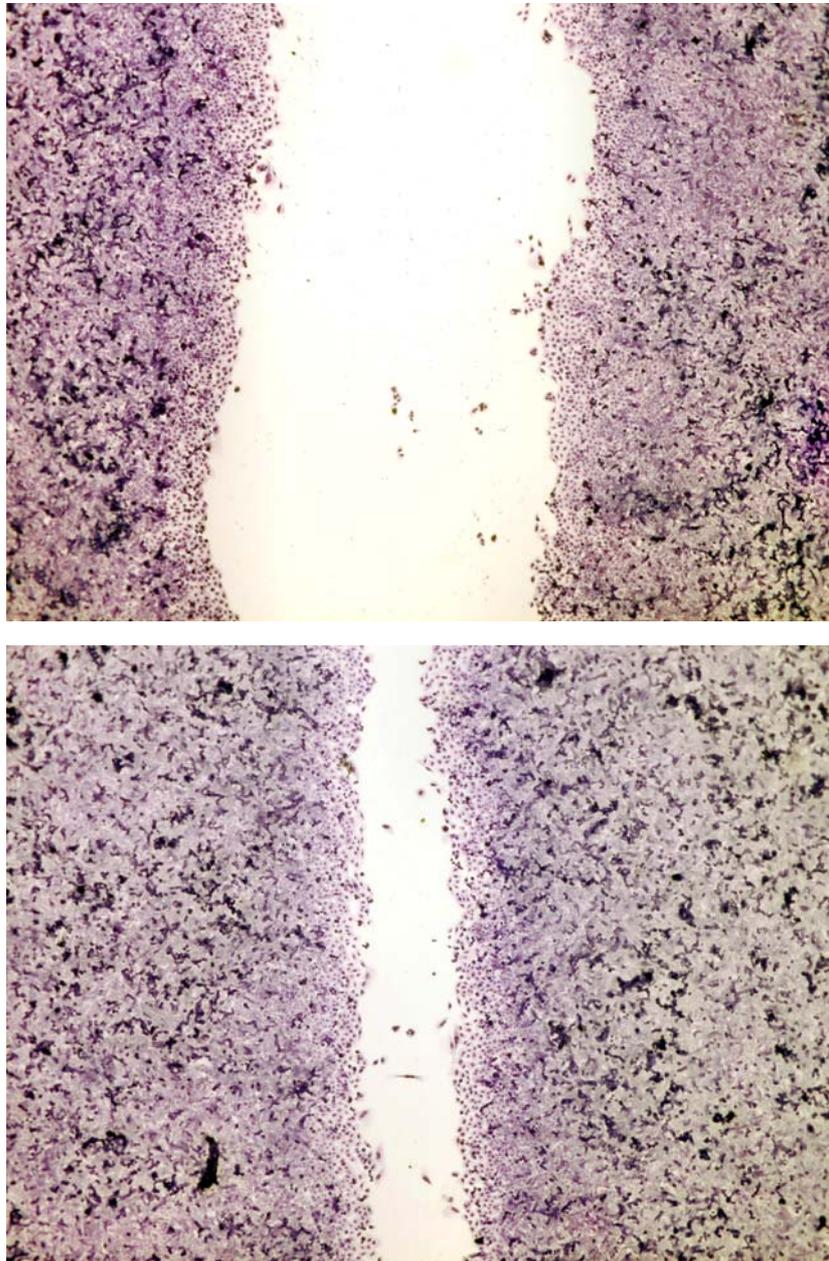


Abb. 4: Verdeutlichung des Tests zur Untersuchung des Wundheilungsprozesses in vitro. In die konfluente Zellschicht der Bindegewebsfibroblasten wird mit einer Kunststoffspitze mit einer Breite von etwa 1,2 mm ein zellfreier Raum (= künstliche Wunde) geschaffen. An den Wundrändern erfolgt durch eine Stimulation von Zellteilung und Zellwanderung eine Besiedlung des zellfreien Raumes unter Schließung der Wunde. Die Mikrofotos zeigen eine Kontrollkultur drei Tage nach dem Anbringen der künstlichen Wunde (oberes Bild) und eine mit 1.000 µg/ml Lithoderm behandelte Kultur. Mikroaufnahmen im Hellfeld-Verfahren nach Romanowski-Giemsa-Färbung an einem Olympus IX50-Inversmikroskop mit einer Olympus Digitalkamera E-10 bei 4 Megapixeln Auflösung.

TESTBERICHT LITHODERM®

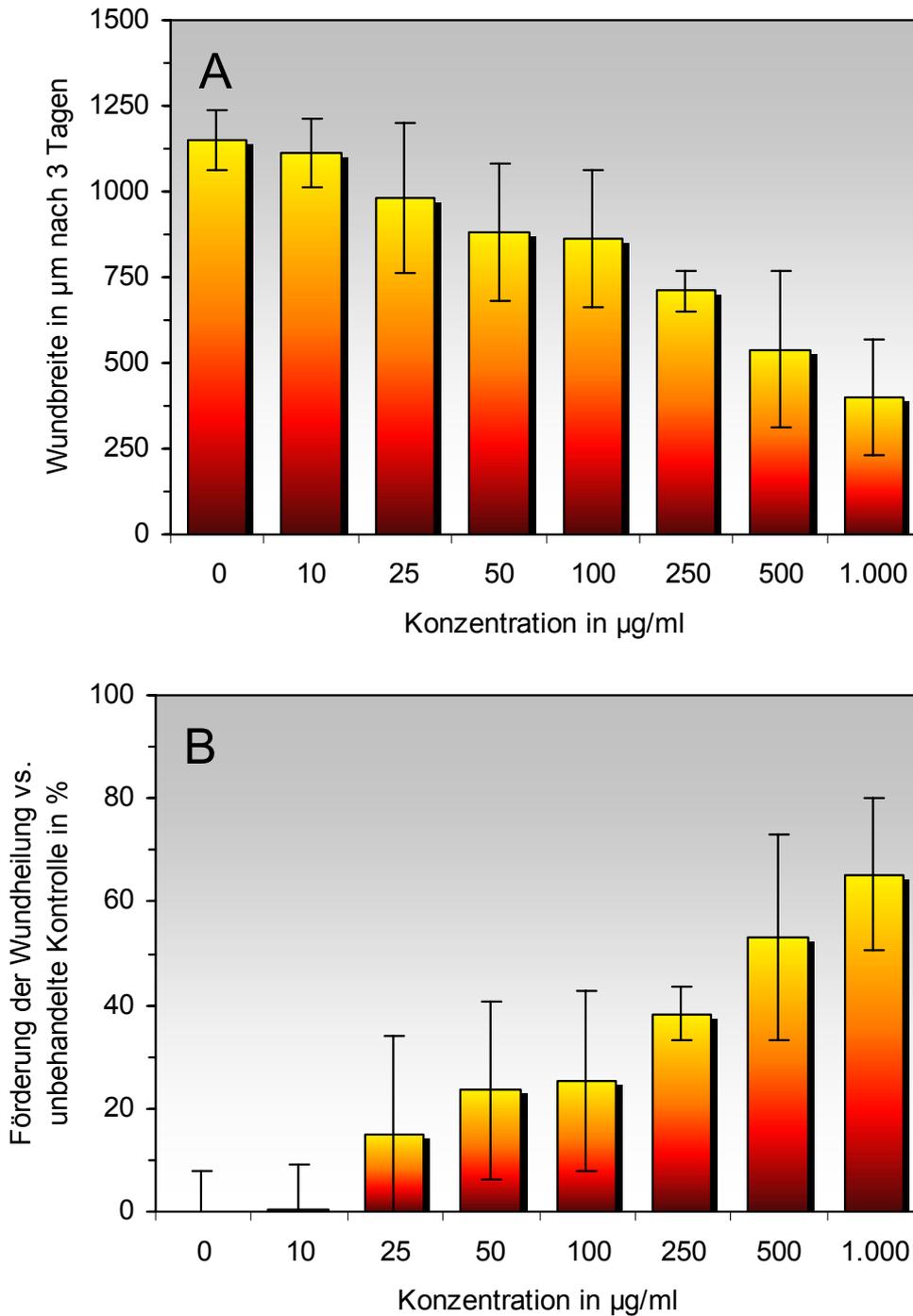


Abb. 5: Verlauf der Wundheilung unter dem Einfluss von Lithoderm bei Auftragung der Absolutwerte gegen die Wirkstoffkonzentration (A) oder der Relativwerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gegen die Wirkstoffkonzentration (B). Angegeben ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus jeweils drei Messungen an mindestens zwei verschiedenen künstlich gesetzten Wunden.