



DARTSCH SCIENTIFIC

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

Firma
OLEWO GmbH
c/o Herrn Karsten Depenau
Raiffeisenstraße 8

31311 Uetze

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

15. Oktober 2009

– Information für Fachpersonal –

Tierversuchsfreie zellbiologische Untersuchungen zu förderlichen Wirkeffekten von „Olewo Rote Bete Chips“

Zusammenfassung & Schlussfolgerungen

Mit tierversuchsfreien zellbiologischen Testmethoden wurden Olewo Rote Bete Chips, ein Beifutter für Pferde (und Hunde), welches aus geschnitzelten und sehr schonend getrockneten Rote Bete ohne weitere Zusatzstoffe oder Aromen besteht, auf seine förderlichen Wirkeffekte untersucht.

Die Untersuchungsergebnisse mit Olewo Rote Bete Chips zeigen ein geringes antioxidatives Potenzial zur Inaktivierung von exogenen Sauerstoffradikalen. Im Gegensatz dazu weisen sie aber eine sehr starke Wirksamkeit bei der Inaktivierung von endogenen Radikalen auf, wie sie von entzündungsvermittelnden Zellen gebildet werden. Somit können Olewo Rote Bete Chips zur Verminderung eines unerwünschten Überschusses an freien endogen gebildeten Sauerstoffradikalen beitragen. Dieser Radikalüberschuss kann aufgrund von Ernährungsmängeln oder -umstellungen, Stress (z.B. Leistungswettbewerbe, Reisen, Stallwechsel), aber auch Verletzungen, Entzündungen oder den Kontakt mit bestimmten Umweltsubstanzen wie Schadstoffen oder Allergenen, auftreten.

Zusätzlich ist die deutliche Stimulation des zellulären Energiestoffwechsels bei Bindegewebszellen besonders positiv hervorzuheben, da dies zu einer Förderung von Zellregeneration und Wundheilung führen kann.

Schongau, den 15. Oktober 2009

Prof. Dr. Peter C. Dartsch

OLEWO ROTE BETE CHIPS

Testbericht

Allgemeine Eigenschaften

Olewo Rote Bete Chips sind geschnitzelte und sehr schonend getrocknete Rote Bete ohne weitere Zusatzstoffe oder Aromen, die bereits in 110 g etwa 1,2 kg Frischware vereinen. Sie sind als Trockenschnitzel lange lagerfähig und sollten vor allem in Rationen von Pferden in Regenerationsphasen oder bei Immunproblemen nicht fehlen. Rote Bete ist ein guter Lieferant natürlicher Spurenelemente. Sie enthält reichlich Kupfer, Eisen, Folsäure, Chrom, Mangan, Zink und Selen, sowie das Vitamin B12. Folsäure und Eisen sind bei der Blutbildung von zentraler Bedeutung. Kupfer, Zink, Mangan und Selen dienen als Baustoffe bei vielen Gelenkserkrankungen. Bei allergischen Reaktionen und Haut- bzw. Fellproblemen ist eine gute Versorgung mit diesen Elementen ebenfalls wichtig.

Betain, das „Betenrot“ der Wurzel, wirkt hemmend auf Bakterien und Viren; der Eiweißbaustein Betain hingegen leberstärkend und stoffwechselstabilisierend. Der Hersteller empfiehlt bei Pferden die Rote Bete Chips als Beifutter bei:

- alten und geschwächten Pferden
- gestressten Pferden
- zur Appetitanregung
- Robustpferden als leichte, abwechslungsreiche Kost
- bei Pferden mit Neigung zum Sommerekzem
- Nierenproblemen oder Harngrieß
- equidem Sarkoid (krankhafte und tumorbildende Hautveränderung)
- Pferden mit degenerativen Gelenkserkrankungen

Olewo Rote Bete Chips – Fütterungsempfehlung & Testkonzentrationen

Um in den hier durchgeführten tierversuchsfreien zellbiologischen Untersuchungen mit verschiedenen Testsystemen die Testkonzentration von Olewo Rote Bete Chips abschätzen zu können, wurde von den folgenden Überlegungen ausgegangen: Entsprechend der Fütterungsempfehlung des Herstellers können je nach Bedarf und Größe des Pferdes die Rote Bete Chips trocken oder aufgeweicht (ca. 15 min quellen lassen) gefüttert werden. Es werden als tägliche Menge etwa 1 bis 2 Handvoll (ca. 100 g) empfohlen.

Bei einer angenommenen Resorption von 100% und einer Verteilung in 40 Litern Blutflüssigkeit bei einem Pferd mit 500 kg Körpergewicht, ergibt sich so eine Testkonzentration von 2.500 µg/ml. Geht man von einer Verteilung in 350 Litern Körperflüssigkeit aus, so beträgt die Testkonzentrationen etwa 300 µg/ml bei einer ebenfalls angenommenen 100%igen Resorption. Die hier dargestellten zellbiologischen Untersuchungen wurden daher im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 5.000 µg/ml durchgeführt und waren wie folgt gestaffelt: 0 – 100 – 250 – 500 – 1.000 – 2.500 – 5.000 µg/ml. Dabei bezeichnet die Konzentration „0“ die unbehandelte Kontrolle.

OLEWO ROTE BETE CHIPS

Testbericht

Fragestellungen der durchgeführten Untersuchungen

- Können Olewo Rote Bete Chips exogene reaktive Sauerstoffradikale inaktivieren und somit einer Schädigung des Organismus durch oxidativen Stress vorbeugen?
- Können Olewo Rote Bete Chips endogene, d.h. durch ein Ungleichgewicht im Zellstoffwechsel gebildeten überschüssigen Sauerstoffradikale inaktivieren? Ein solcher lokaler Radikalüberschuss kann beispielsweise bei Entzündungsprozessen durch die aus dem Blut eingewanderten neutrophilen Granulozyten gebildet werden.
- Kann durch Olewo Rote Bete Chips der Energiestoffwechsel von Bindegewebszellen stimuliert und so eine Zellregeneration bzw. Wundheilung gefördert werden?

Reaktive Sauerstoffradikale und oxidativer Stress

Ohne Sauerstoff können Säugetiere (und damit auch der Mensch) 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 Katalase, Superoxid-Dismutase oder Glutathion.

Umweltbelastungen, Ernährungsmängel oder -umstellungen, körperlicher oder seelischer Stress (z.B. Leistungswettbewerbe, Reisen, Stallwechsel), aber auch Verletzungen und Entzündungen oder der Kontakt mit bestimmten Umweltsubstanzen wie Schadstoffen oder Allergenen können zu einer unkontrollierten Überproduktion freier Radikale führen. Die Selbstregulation durch den Körper ist gestört.

Übersteigt die Bildung freier Radikale die 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 Nucleinsäuren (DNA und RNA), Proteine, Lipide und Kohlenhydrate.

Die Folge können bei Tieren – ebenso wie beim Menschen – vielfältig sein, führen jedoch meist zu verminderter Leistungsfähigkeit und einem eingeschränkten Wohlbefinden. Bei Menschen ist oxidativer Stress auch mit der Entstehung einer ganzen Reihe von verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht worden. Es wird vermutet, dass oxidativer Stress auch bei Tieren mit ähnlichen Krankheitsbildern eine Rolle spielt.

OLEWO ROTE BETE CHIPS

Testbericht

Antioxidative Wirkung von Olewo Rote Bete Chips im zellfreien Testsystem bei Einwirkung exogener freier Sauerstoffradikale

Testprinzip: In diesem zellfreien Testsystem wird ohne die Verwendung von Zellen im Testansatz überprüft, ob verschiedene Konzentrationen der Testsubstanz in der Lage sind, freie Sauerstoffradikale zu inaktivieren. Für die Untersuchung werden die verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz in Aqua dest. vorgelegt und dazu eine wässrige Lösung von Kaliumsuperoxid pipettiert. Die nicht durch den Wirkstoff inaktivierten und damit noch reaktionsfähigen Radikale führen zu einer Spaltung und damit auch einer Änderung der optischen Dichte des ebenfalls zum Ansatz zugegebenen wasserlöslichen Tetrazoliumfarbstoffes. Dessen optische Dichte wird als Differenzmessung $\Delta OD = 450 - 690 \text{ nm}$ kontinuierlich aufgezeichnet und nach linearer Regression in Form der Steigung in mOD/min ($t = 0$ bis 10 min) ausgewertet. Die erhaltenen Ergebnisse werden dann als Relativwerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gegen die Konzentration aufgetragen.

Ergebnis: Geringe antioxidative Wirkung der Olewo Rote Bete Chips im zellfreien Test bei der Einwirkung freier Sauerstoffradikale von außen. Nur bei der höchsten Testkonzentration von $5.000 \mu\text{g/ml}$ wurde eine signifikante Inaktivierung der freien exogenen Sauerstoffradikale im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle festgestellt (Abb. 1).

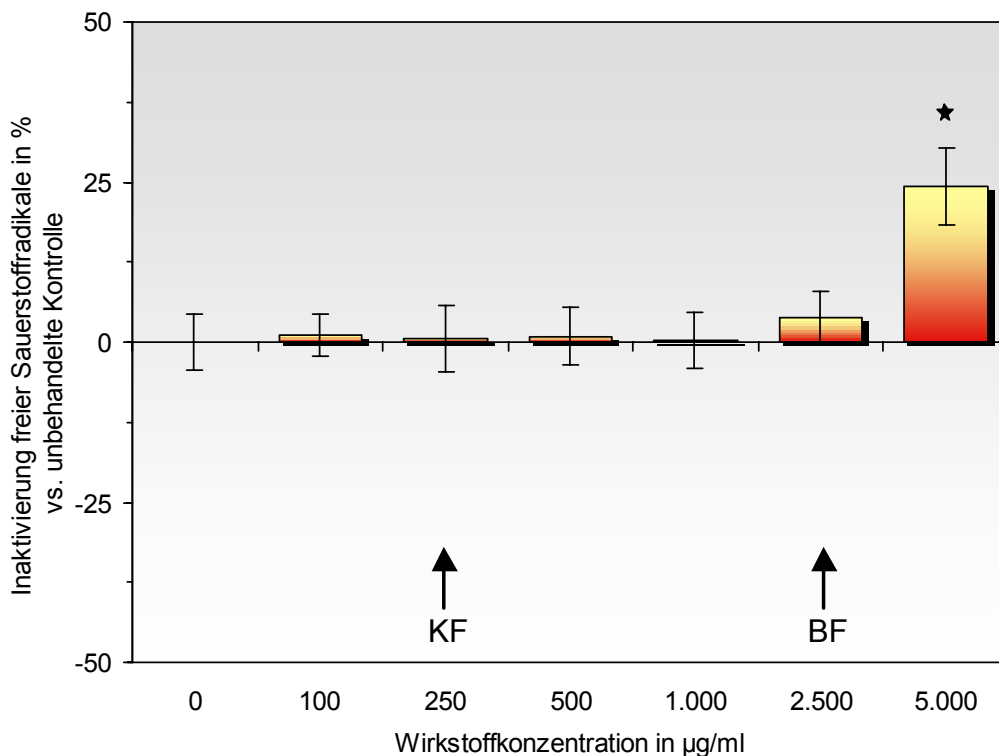


Abb. 1: Antioxidative Wirkung von Olewo Rote Bete Chips. BF: Berechnete Konzentration in der Blutflüssigkeit; KF: Berechnete Konzentration in der Körperflüssigkeit. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei Messungen ($n = 3$). Der Stern markiert eine signifikante Inaktivierung der Sauerstoffradikale im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($p < 0,05$; Student's t -Test).

OLEWO ROTE BETE CHIPS

Testbericht

Antioxidative Wirkung von Olewo Rote Bete Chips im zellbasierten Testsystem bei der Bildung endogener Sauerstoffradikale durch entzündungsvermittelnde Zellen

Testprinzip: Es werden humane Promyelozyten (Zelllinie HL60, ACC 3, DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) 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. Diese differenzierten Zellen werden durch Zugabe eines Phorbolesters dazu angeregt, Superoxidanion-Radikale zu bilden. Die Radikale führen zu einer Spaltung des ebenfalls dem Versuchsansatz zugesetzten wasserlöslichen Tetrazoliumfarbstoffes. 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 durch einen oxidativen Burst gebildeten Radikale durch den Wirkstoff inaktiviert, so verändert sich die optische Dichte weniger stark. Es wird die optische Dichte als Differenzmessung $\Delta OD = 450 - 690$ nm kontinuierlich aufgezeichnet und nach linearer Regression in Form der Steigung in mOD/min ($t = 10$ bis 30 min) ausgewertet. Die erhaltenen Ergebnisse werden dann als Relativwerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gegen die Konzentration aufgetragen.



Funktionale neutrophile Zelle
(erhalten durch chemische Differenzierung von humanen Promyelozyten)

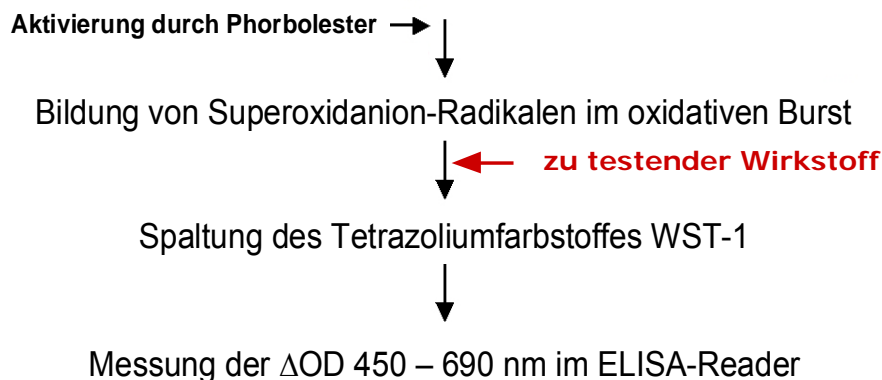


Abb. 2: Überblick über das Testprinzip zur Messung der von funktionalen Neutrophilen in einem oxidativen Burst gebildeten Superoxidanion-Radikale. Auf diese Weise kann das Potenzial eines Wirkstoffes zur Inaktivierung der im Überschuss endogen gebildeten Sauerstoffradikale wie sie beispielsweise bei Entzündungsprozessen auftreten, bewertet werden.

OLEWO ROTE BETE CHIPS

Testbericht

Ergebnis: Ausgeprägte antioxidative Wirkung von endogen gebildeten freien Sauerstoffradikalen. Bereits nur knapp über der berechneten Konzentration in der Körperflüssigkeit kommt es zu einer signifikanten Inaktivierung der gebildeten Radikale, welche im Bereich der berechneten Blutflüssigkeitskonzentration fast 40% beträgt. Ein weitere Steigerung der Dosis führt zu einer verstärkten Radikalinaktivierung auf Werte über 50%. Dadurch kann oxidativer Stress, wie er beispielsweise bei Entzündungsprozessen durch ein Überangebot der von entzündungsvermittelnden Zellen gebildeten Radikale auftritt, effizient reduziert werden.

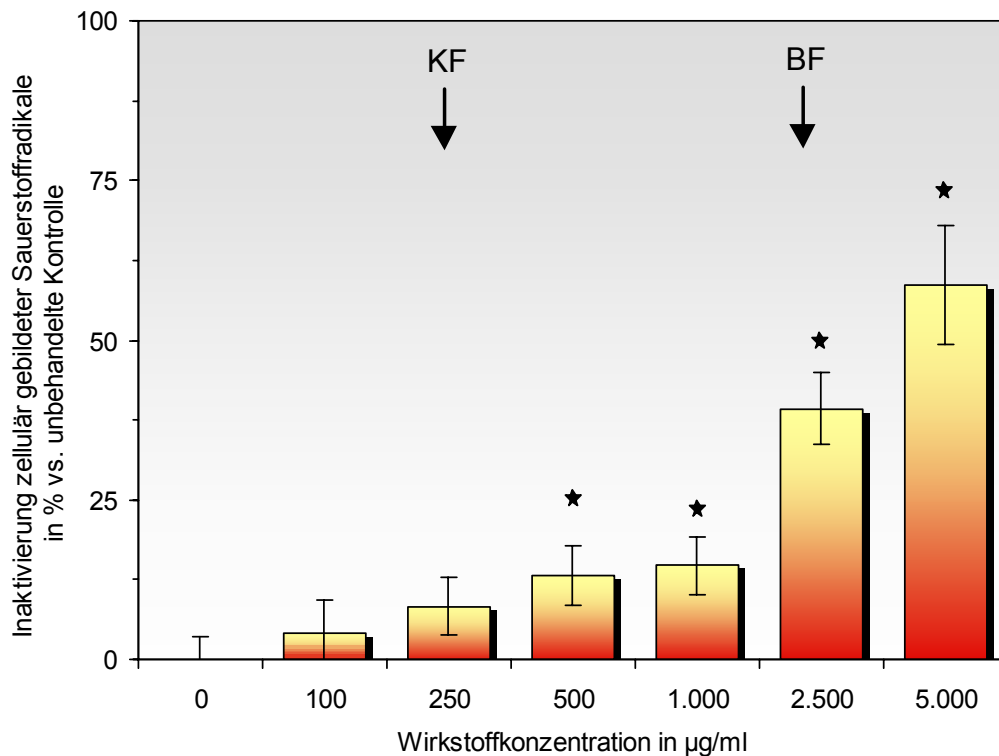


Abb. 3: Dosisabhängige Inaktivierung von endogenen Sauerstoffradikalen, die von entzündungsvermittelnden Zellen in einem oxidativen Burst gebildet werden. Dadurch kann oxidativer Stress von innen reduziert werden. BF: Berechnete Konzentration in der Blutflüssigkeit; KF: Berechnete Konzentration in der Körperflüssigkeit. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei Messungen ($n = 3$). Der Stern markiert eine signifikante Inaktivierung der Sauerstoffradikale im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($p < 0,05$; Student's t -Test).

Wirkung von Olewo Rote Bete Chips auf den Energiestoffwechsel von Bindegewebszellen (zellregenerierende bzw. wundheilende Wirkung)

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 Wundheilung fördern kann.

Testprinzip: Für eine solche Untersuchung werden Bindegewebsfibroblasten (Zelllinie L-929, ACC 2, DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) in

OLEWO ROTE BETE CHIPS

Testbericht

einer Dichte von 20.000 Zellen/Vertiefung in 96-Loch-Platten ausgesät. Nach 48 Stunden, welche die Zellen zur Adhäsion und zur Normalisierung ihres Stoffwechsels brauchen, werden sie durch die Zugabe von Phosphatpuffer mit 10 mM Glucose stimuliert. Der Energiestoffwechsel mit seinen verschiedenen Redoxprozessen führt dabei zu einer Spaltung und damit auch einer Änderung der optischen Dichte des ebenfalls zum Ansatz zugegebenen wasserlöslichen Tetrazoliumfarbstoffes. Dessen optische Dichte wird als Differenzmessung $\Delta OD = 450 - 690 \text{ nm}$ kontinuierlich aufgezeichnet und nach linearer Regression in Form der Steigung in mOD/min ($t = 30 \text{ bis } 120 \text{ min}$) ausgewertet. Die erhaltenen Ergebnisse werden dann als Relativwerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gegen die Konzentration aufgetragen.

Ergebnis: Olewo Rote Bete Chips stimulieren den Energiestoffwechsel von Bindegewebszellen bereits 30 min nach Applikation mit einem maximalen Effekt (20 bis 25%ige Stimulation) bei Konzentrationen zwischen der berechneten Konzentration in der Körper- und Blutflüssigkeit und einer angenommenen 100%igen Wirkstoffresorption. Durch diese förderliche Wirkung kann es zu einer verbesserten Regeneration und einer Förderung der Wundheilung kommen (Abb. 4).

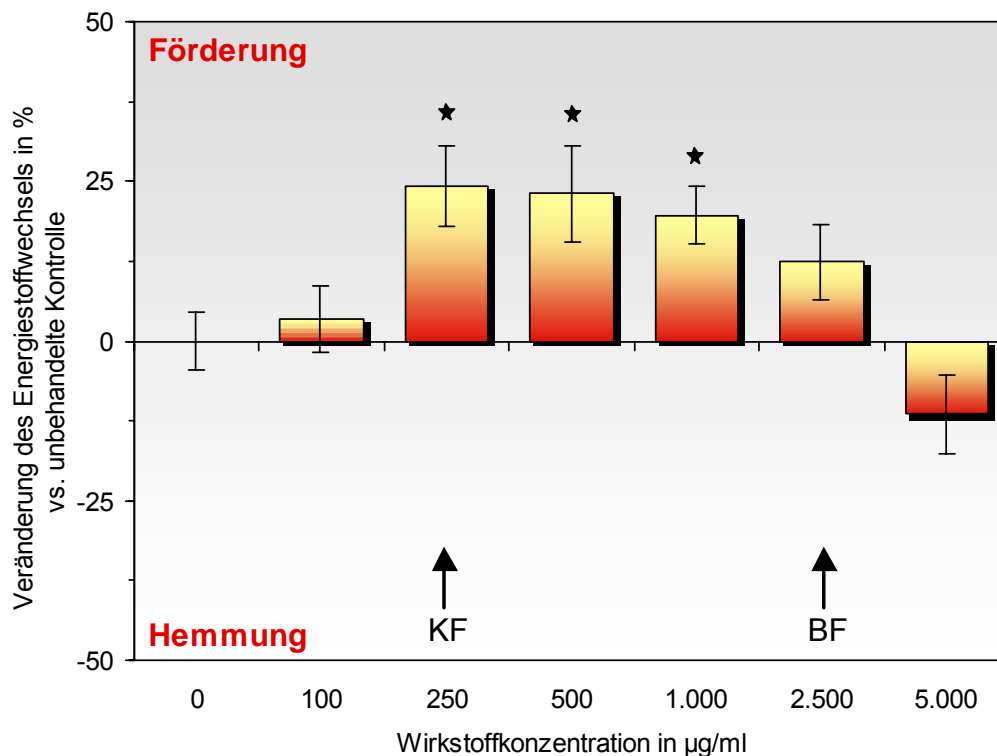


Abb. 4: Stimulierung des Energiestoffwechsels von Bindegewebsfibroblasten durch Olewo Rote Bete Chips mit einem maximalen Effekt bei Konzentrationen zwischen der berechneten Konzentration in der Körper- und Blutflüssigkeit bei einer angenommenen 100%igen Wirkstoffresorption. Durch diese förderliche Wirkung kann es zu einer verbesserten Regeneration und einer Förderung der Wundheilung kommen. BF: Berechnete Konzentration in der Blutflüssigkeit; KF: Berechnete Konzentration in der Körperflüssigkeit. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei Messungen ($n = 3$). Der Stern markiert eine signifikante Inaktivierung der Sauerstoffradikale im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($p < 0,05$; Student's t -Test).