



DARTSCH SCIENTIFIC

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

Firma
Multikraft Produktions- und HandelsgmbH
Sulzbach 17

A-4632 Pichl/Wels

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

8. März 2010

– Testbericht und Fachinformation –

Tierversuchsfreie zellbiologische Untersuchungen zu förderlichen Wirkeffekten der BIOEMSAN Feuchtigkeitscreme

1 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Mit tierversuchsfreien zellbiologischen Testmethoden wurde das Testmuster 2/14.01.2010 (optimierte Formulierung) der BIOEMSAN Feuchtigkeitscreme untersucht. Die Untersuchungsergebnisse zeigen, dass die Feuchtigkeitscreme

- eine dosisabhängige Stimulierung des Energiestoffwechsels kultivierter Bindegewebsfibroblasten zur Folge hat. Der maximale förderliche Effekt bewirkt eine 1,7fache Stimulation des Zellstoffwechsels im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Durch diese stimulierende Wirkung kann es nach Wirkstoffaufnahme zu einer verbesserten Zellregeneration und -vitalität der strapazierten Haut in vivo kommen.
- bei keiner Konzentration eine statistisch signifikante antioxidative Wirkung zeigt
- die endogen gebildeten Sauerstoffradikale in einem sehr großen Konzentrationsbereich effektiv zu etwa 35% inaktiviert. Somit kann die Creme die schädigende Wirkung von einem körpereigenen lokalen Überangebot reaktiver Sauerstoffradikale (z.B. auch bei Entzündungsprozessen) deutlich vermindern.

Zusammengefasst steht bei der getesteten BIOEMSAN Feuchtigkeitscreme die zellregenerative und –vitalisierende Wirkung (z.B. auch bei Wundheilungsprozessen und zur allgemeinen Aktivierung der Hautfunktionen) im Vordergrund, welche durch das Potenzial zur Inaktivierung von endogen gebildeten Sauerstoffradikalen ergänzt wird.

Schongau, den 8. März 2010

Prof. Dr. Peter C. Dartsch

BIOEMSAN Feuchtigkeitscreme Testbericht

2 *Eigenschaften der getesteten BIOEMSAN Feuchtigkeitscreme*

Die BIOEMSAN Feuchtigkeitscreme für normale und fettende Haut ist ein natürlicher Feuchtigkeitsspender für einen strahlenden Teint. Sie aktiviert die Hautfunktionen und ist die ideale Tages- und Nachtpflege für junge und fette Haut und eignet sich auch als leichte Sommercreme für normale bis trockene Haut. Konserviert mit Sorbinsäure. Frei von synthetischen Emulgatoren, Duft- und Farbstoffen und gentechnikfrei.

Anwendung: Morgens und abends nach der Gesichtreinigung einfach auf die Haut auftragen und einziehen lassen.

Inhaltsstoffe: Orangenblütenhydrolat*, Aloe Vera Gel*, Distelöl*, Jojobaöl*, Sheabut-ter*, biologischer Weingeist*, belebtes Wasser und Manju, Emulgator aus Olivenöl, pflanzliches Glycerin*, Korallenkalzium, Bienenwachs*, pflanzlicher Fettalkohol, Kera-mikpulver, Pongamia Extrakt – pflanzlicher Lichtschutz, Manju Meersalz, natürliches Vitamin E, Hyalu-ronsäure, Xanthan; Kräuterextrakte*: Ehrenpreis*, römische Kamille*, Schachtelhalm*, Ringelblume*, Eibischwurzel*, Melisse*, Lavendel*, Iriswurzel*; Salz der Sorbinsäure; Mischung ätherischer Öle: Limonene**, Linalool**. Konserviert mit Sorbinsäure.

* = aus kontrolliert biologischem Anbau; ** = als Bestandteil natürlicher ätherischer Öle

3 *Testkonzentrationen und Testmuster*

Um in den hier durchgeführten tierversuchsfreien zellbiologischen Untersuchungen mit verschiedenen Testsystemen die Testkonzentration der Feuchtigkeitscreme abschätzen zu können, wurde von der folgenden Überlegung ausgegangen: Die Creme wird unverdünnt auf die Haut aufgetragen und einziehen lassen. Durch die Verdünnung mit der in den tieferen Hautschichten befindlichen inter- und intrazellulären Gewebsflüssigkeit kommt es zu einer Verdünnung der Wirkstoffe um den geschätzten Faktor 1:5 oder höher. Daher wurde (auch aus technischen Gründen) als die am stärksten konzentrierte wässrige Stammlösung (10x) eine Konzentration von 200 mg/ml hergestellt und dann entsprechend weiter verdünnt.

Die Untersuchungen wurden im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 20 mg/ml durchgeführt: 0 – 0,1 – 0,25 – 0,5 – 1 – 2,5 – 5 – 10 – 20 mg/ml. Dabei bezeichnet die Konzentration „0“ die unbehandelte Kontrolle.

Untersucht wurde die BIOEMSAN Feuchtigkeitscreme, Testmuster 2 vom 14.01.2010.

BIOEMSAN Feuchtigkeitscreme Testbericht

4 Fragestellungen der durchgeführten Untersuchungen

- Kann durch die BIOEMSAN Feuchtigkeitscreme der Energiestoffwechsel von Bindegewebszellen stimuliert und so eine Zellregeneration bzw. –vitalisierung gefördert werden?
- Kann die BIOEMSAN Feuchtigkeitscreme **exogene** reaktive Sauerstoffradikale inaktivieren und somit einer Schädigung der Haut durch Umwelteinflüsse resp. oxidativem Stress vorbeugen?
- Kann die BIOEMSAN Feuchtigkeitscreme **endogene**, d.h. durch ein Ungleichgewicht im Zellstoffwechsel gebildete überschüssige Sauerstoffradikale inaktivieren? Ein solcher lokaler Radikalüberschuss kann beispielsweise bei Entzündungsprozessen durch die aus dem Blut eingewanderten neutrophilen Granulozyten gebildet werden.

5 Versuchsbeschreibung und Ergebnisse

5.1 Wirkung der BIOEMSAN Feuchtigkeitscreme auf den Energiestoffwechsel von Bindegewebsfibroblasten (zellregenerierende und –vitalisierende 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 Zellvitalität fördern kann.

Für diese Untersuchung wurden Bindegewebsfibroblasten (Zelllinie L-929, DSMZ) in 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, wurden sie durch die Zugabe von Phosphatpuffer mit 5 mM Glucose stimuliert. Der Energiestoffwechsel mit seinen verschiedenen Redoxprozessen führt dabei zu einer Farbstoffspaltung und damit auch einer Änderung der optischen Dichte des ebenfalls zum Ansatz zugegebenen wasserlöslichen Tetrazoliumfarbstoffes WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim). Dessen optische Dichte wurde als Differenzmessung $\Delta OD = 450 - 690 \text{ nm}$ kontinuierlich für 180 min aufgezeichnet und nach linearer Regression der erhaltenen Kurvenzüge in Form der Steigung (30-90 min) in mOD/min ausgewertet.

Ergebnis (Abb. 1): Dosisabhängige Stimulierung des Energiestoffwechsels der Bindegewebsfibroblasten durch die BIOEMSAN Feuchtigkeitscreme. Der maximale förderliche Effekt liegt bei einer Konzentration von 20 mg/ml. Hier ist der Energiestoffwechsel der Zellen annähernd 1,7fach höher als bei der unbehandelten Kontrolle. Durch diese stimulierende Wirkung kann es nach Wirkstoffaufnahme zu einer verbesserten Zellregeneration und -vitalität der strapazierten Haut in vivo kommen.

BIOEMSAN Feuchtigkeitscreme Testbericht

5.2 Antioxidative Wirkung der BIOEMSAN Feuchtigkeitscreme

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 die Enzyme Glutathion, Katalase und Superoxid-Dismutase. Umweltbelastungen, Ernährungsmängel, körperlicher oder seelischer Stress, aber auch Medikamente, Verletzungen und Entzündungen können zu einer unkontrollierten Überproduktion freier Radikale führen. Die Selbstregulation durch den Körper ist gestört.

Übersteigt die 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 (DNA und RNA), Proteine, Lipide und Kohlenhydrate.

5.2.1 Antioxidative Wirkung im zellfreien Testsystem bei Einwirkung freier Radikale von außen (exogene Sauerstoffradikale)

In diesem zellfreien Testsystem wurde ohne die Verwendung von Zellen im Testansatz überprüft, ob verschiedene Konzentrationen der Testsubstanz in der Lage sind, freie Sauerstoffradikale zu inaktivieren. Für die Untersuchung wurden die verschiedenen Konzentrationen der Feuchtigkeitscreme in Aqua dest. vorgelegt und dazu eine Lösung von Kaliumsuperoxid in Aqua dest. (1 mg/ml; Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) pipettiert.

Die nicht durch den Wirkstoff inaktivierten und damit noch aggressiven und reaktionsfreudigen Radikale führen dabei zu einer Spaltung und damit auch einer Änderung der optischen Dichte des ebenfalls zum Ansatz zugegebenen wasserlöslichen Tetrazoliumfarbstoffes WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim). Dessen optische Dichte wurde als Differenzmessung $\Delta OD = 450 - 690 \text{ nm}$ kontinuierlich aufgezeichnet und nach linearer Regression der erhaltenen Kurvenzüge in Form der Steigung (Zeitintervall 0 – 10 min) in mOD/min ausgewertet. Die erhaltenen Ergebnisse wurden dann als Relativwerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt und gegen die Konzentration aufgetragen.

Ergebnis (Abb. 2): Die BIOEMSAN Feuchtigkeitscreme zeigte bei keiner Konzentration eine statistisch signifikante antioxidative Wirkung. Es kam nicht zu einer Inaktivierung der zugesetzten freien Sauerstoffradikale.

BIOEMSAN Feuchtigkeitscreme Testbericht

5.2.2 Antioxidative Wirkung im zellbasierten Testsystem bei einem Überangebot körpereigener (endogener) Sauerstoffradikale

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.

Diese differenzierten Zellen 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 weniger stark. 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 (Zeitintervall 15 – 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 (Abb. 3): BIOEMSAN Feuchtigkeitscreme war in der Lage, die endogen gebildeten Sauerstoffradikale effektiv zu etwa 35% zu inaktivieren. Dies konnte für einen sehr großen Konzentrationsbereich festgestellt werden. Somit kann die Creme die schädigende Wirkung von einem körpereigenen lokalen Überangebot reaktiver Sauerstoffradikale (z.B. auch bei Entzündungsprozessen) deutlich vermindern.

BIOEMSAN Feuchtigkeitscreme Testbericht

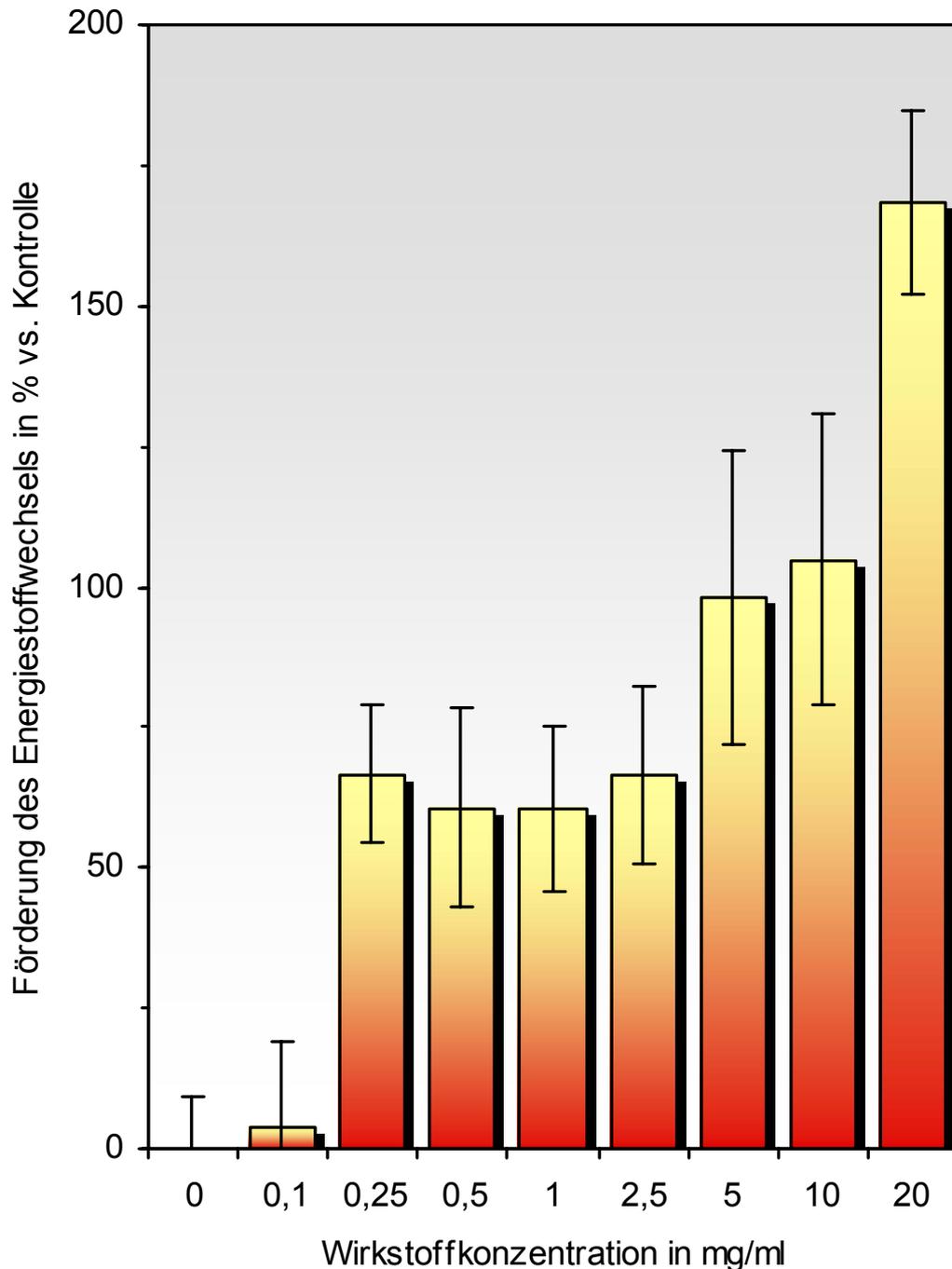


Abb. 1: Dosisabhängige Stimulierung des Energiestoffwechsels von Bindegewebsfibroblasten durch BIOEMSAN Feuchtigkeitscreme. Der maximale förderliche Effekt liegt bei einer Konzentration von 20 mg/ml mit einem annähernd 1,7fach höheren Energiestoffwechsel der Zellen als die unbehandelte Kontrolle. Durch diese stimulierende Wirkung kann es nach Wirkstoffaufnahme zu einer verbesserten Zellregeneration und -vitalität der strapazierten Haut in vivo kommen. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus jeweils drei Messungen ($n = 3$).

BIOEMSAN Feuchtigkeitscreme Testbericht

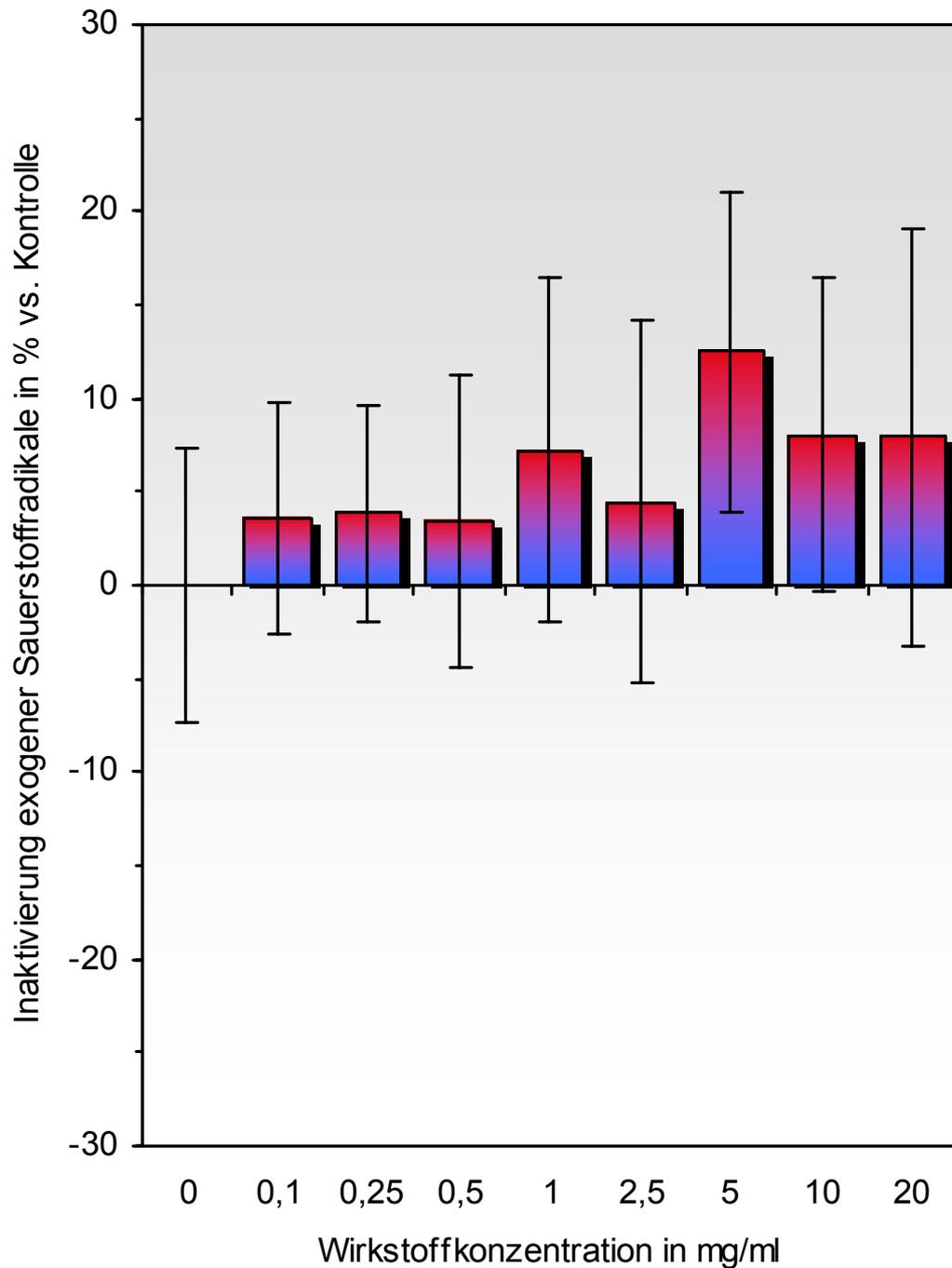


Abb. 2: Keine statistisch signifikante antioxidative Wirkung von BIOEMSAN Feuchtigkeitscreme, d.h. keine Inaktivierung freier exogener Sauerstoffradikale im zellfreien Test. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus jeweils drei Messungen ($n = 3$).

BIOEMSAN Feuchtigkeitscreme Testbericht

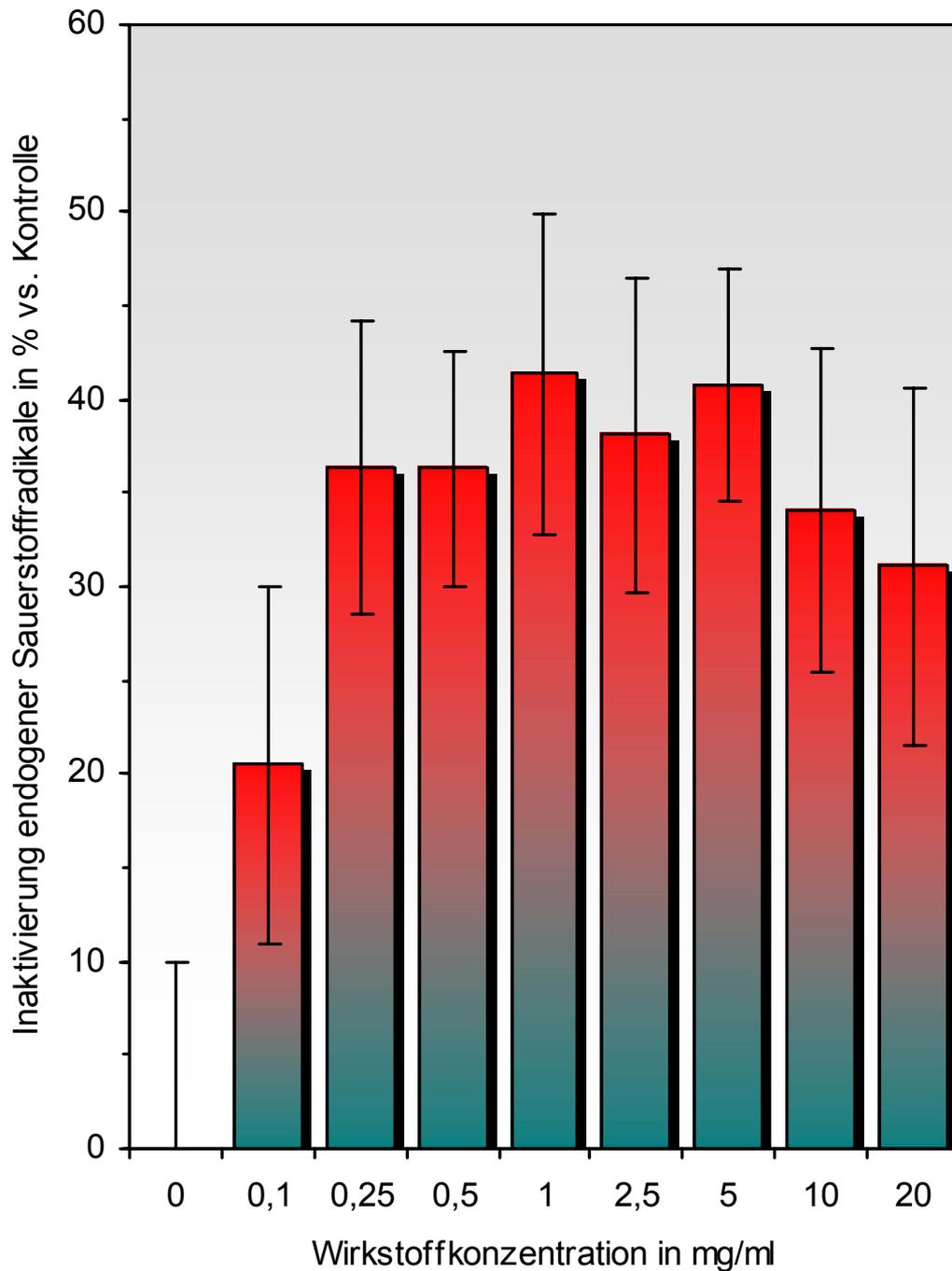


Abb. 3: Inaktivierung von endogenen Sauerstoffradikalen, die von speziell differenzierten Zellen (funktionale neutrophile Granulozyten) in einem oxidativen Burst gebildet werden, durch die BIOEMSAN Feuchtigkeitscreme. Die maximale Inaktivierung endogener Radikale liegt über einen sehr weiten Konzentrationsbereich bei etwa 35%. Dadurch kann die schädigende Wirkung von einem körpereigenen lokalen Überangebot reaktiver Sauerstoffradikale vermindert werden. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus jeweils drei Messungen ($n = 3$).