

P.C. Dartsch<sup>1</sup>, H. Mett<sup>1</sup>

# In-vitro-Untersuchung der antioxidativen und entzündungshemmenden Wirkung einer Zahnpasta mit pflanzlichen Inhaltsstoffen

*In vitro investigation on the antioxidative and anti-inflammatory action of a toothpaste with herbal ingredients*

**Einführung:** Zahnpasta gehört mit der Zahnbürste zu den wichtigsten Hilfsmitteln in der Zahnpflege. Die hier untersuchte Zahnpasta enthält aktive Inhaltsstoffe, welche für ihre entzündungshemmenden Eigenschaften bekannt sind.

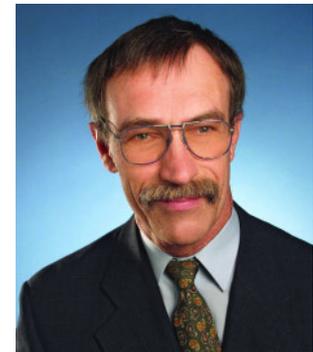
**Material und Methode:** Da es bisher zu Zahnpasta noch keine uns bekannten *In-vitro*-Untersuchungen zum Nachweis eines antioxidativen und entzündungshemmenden Potenzials gab, wurde untersucht, ob sich die aus klinischen Studien für die untersuchte Zahnpasta bekannte entzündungshemmende Wirkung auch im Labor experimentell verifizieren lässt. Die Untersuchungen wurden sowohl in einem zellfreien (antioxidative Wirkung) als auch in einem zellbasierten Testsystem (entzündungshemmende Wirkung) durchgeführt.

**Ergebnisse und Schlussfolgerung:** Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Zahnpasta sowohl eine deutliche antioxidative Wirkung gegenüber freien Radikalen besitzt als auch ausgeprägte entzündungshemmende Eigenschaften, die sowohl an unstimulierten als auch an stimulierten funktionalen neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden konnten. Damit hat sich auch in diesem experimentellen Ansatz die bekannte entzündungshemmende Wirkung der untersuchten Zahnpasta bestätigen lassen. Zudem haben die Untersuchungen gezeigt, dass die Kombination von zellfreiem und zellbasiertem Testsystem ein effizientes tierversuchsfreies physiologisches Screeningverfahren für die Untersuchung von Zahnpasten oder Mundspüllösungen darstellt. (Dtsch Zahnärztl Z 2011, 66: 265–270)

*Schlüsselwörter: Antioxidative Wirkung, Entzündung, Sauerstoffradikale, Zahnfleischentzündung, Zahnpasta, Zellkultur*



P.C. Dartsch



H. Mett

**Introduction:** Toothpaste in combination with a toothbrush is a very important adjuvant in dental care. The herbal toothpaste used for this study contains specific ingredients which are known to possess anti-inflammatory properties.

**Material and Method:** To our knowledge no *in vitro* investigations on the antioxidative and anti-inflammatory properties of toothpastes have been published to date. Using a cell-free and a cell-based test system, we investigated the antioxidative effects and anti-inflammatory potency of this herbal toothpaste as already described in clinical studies.

**Results and Conclusion:** Our experiments showed that the toothpaste exerts a significant antioxidative effect by neutralizing free superoxide anion radicals. Using non-stimulated functional neutrophils and cells stimulated with a specific phorbol ester, the anti-inflammatory effect of the toothpaste could be clearly demonstrated. We propose that the biochemical/cellular *in vitro* test system as described in this study is a good tool for the screening of beneficial effects of toothpastes and other oral hygiene articles.

*Keywords: antioxidant, cell culture, gingiva, inflammation, reactive oxygen species, toothpaste*

<sup>1</sup> Dartsch Scientific GmbH – Institut für zellbiologische Testsysteme, Oskar-von-Miller-Straße 10, 86956 Schongau

Peer-reviewed article: eingereicht: 13.07.2010, revidierte Fassung akzeptiert: 07.12.2010

DOI 10.3238/dzz.2011.0265

## Einleitung

Zahnpasta gehört zusammen mit der Zahnbürste zu den wichtigsten Hilfsmitteln in der Zahnpflege. Alle Zahnpasten enthalten – teilweise in unterschiedlichen Dosierungen und Variationen – aktive Inhaltsstoffe, die die Zahnpflege unterstützen und zur Härtung der Zähne beitragen [2]. Eine Zahnpasta sollte grundsätzlich folgende Aufgaben erfüllen: (1) Bakterielle Zahnbeläge an der Oberfläche der Zähne entfernen, (2) die Widerstandskraft des Zahnschmelzes gegenüber Säuren erhöhen und (3) gegebenenfalls Säuren in der Mundhöhle neutralisieren. Dabei scheint speziell die Verwendung fluoridhaltiger Zahnpasten für den Rückgang der Kariesprävalenz in den Industrieländern verantwortlich zu sein [6].

Neben Karies gehören Zahnfleischentzündungen zu den größten Gefahren für das Gebiss. Die Entzündung ist eine typische Abwehrreaktion des Organismus auf schädigende Einflüsse (Noxen) und ist gekennzeichnet durch verschiedene Phasen. Bei diesen Phasen spielt u. a. auch die Einwanderung von Entzündungszellen, z. B. neutrophilen Granulozyten, eine wichtige Rolle. Speziell die neutrophilen Granulozyten wandern aus dem Blut in den Entzündungsbereich ein, bilden in einem sog. oxidativen Burst reaktive Sauerstoffradikale (ROS), welche die eingedrungenen Keime und u. U. auch das umgebende Gewebe zerstören, und phagozytieren die hierbei freiwerdenden Zell- und Gewebestücke [15]. Zudem produzieren sie Chemokine, welche wiederum die Lymphozyten aktivieren. Die Regulation der einzelnen Entzündungsphasen erfolgt durch chemische Substanzen (Entzündungsmediatoren), die von verschiedenen Zellen im Reaktionsbereich gebildet werden oder bei primären Gewebeschädigungen entstehen. (Zur Übersicht, siehe die Arbeit von *Carl Nathan* [7].)

Die hier untersuchte Zahnpasta enthält aktive Inhaltsstoffe wie Natriumbicarbonat und natürliche Pflanzenextrakte und -öle. Dazu gehören Echinacea, Myrrhe, Salbei, Kamille und Ratanhia. Neben der besonderen Reinigungswirkung durch Natriumbicarbonat wurde für die Zahnpasta in klinischen Studien auch eine besondere Wirksamkeit bei Zahnfleischbluten oder Zahnfleischent-

zündungen belegt [10, 11, 16]. Die positive Wirkung der untersuchten Zahnpasta auf den Zustand des Zahnfleisches wurde vor allem auf die Entfernung von Plaque zurückgeführt. (Zur Übersicht, siehe auch die Publikation von *Wieland* und *Zimmer* [17].) Zu Zahnpasten überhaupt gab es bisher noch keine *In-vitro*-Untersuchungen zur Voraussage einer antioxidativen und entzündungshemmenden Wirkung. In der vorliegenden Arbeit wurde beispielhaft untersucht, ob sich für die pflanzliche Zahnpasta eine solche Wirkung auch *in vitro* verifizieren lässt.

## Fragestellungen

Im Einzelnen wurde in dieser Arbeit den folgenden Fragestellungen nachgegangen:

1. Können freie Radikale durch die pflanzliche Zahnpasta effizient inaktiviert bzw. neutralisiert werden?
2. Kann der Energiestoffwechsel von unstimulierten lokal entzündungsvermittelnden Zellen – und damit sowohl deren Einwanderung aus dem Blut ins Gewebe als auch die in einem oxidativen Burst gebildeten Sauerstoffradikale – durch die Zahnpasta gehemmt werden?
3. Können die von stimulierten entzündungsvermittelnden Zellen in einem oxidativen Burst gebildeten Sauerstoffradikale, welche den entzündlichen Prozess initiieren und in Gang halten, neutralisiert werden?
4. Gibt es grundsätzlich Wirkungsunterschiede zwischen der wasserlöslichen Fraktion der Zahnpasta im Vergleich zur Gesamtfraktion?

Bei den Fragestellungen muss dabei von einem „experimentellen Potenzial“ ausgegangen werden, da eine mögliche Inaktivierung der Zahnpastawirkung durch den Speichel und die darin enthaltenen Enzyme in einem *In-vitro*-Screeningsystem nur unzureichend berücksichtigt werden kann. Solche Untersuchungen wären nur mit erheblichem Aufwand (z. B. Verwendung von sterilisiertem Speichel aus einem Probandenpool) und damit nicht mehr als vororientierendes Screening möglich.

Auf eine vergleichende Untersuchung von mehreren verschiedenen Zahnpasten wurde verzichtet, da hier an einem exemplarischen Beispiel in erster

Linie das innovative Testsystem präsentiert werden soll.

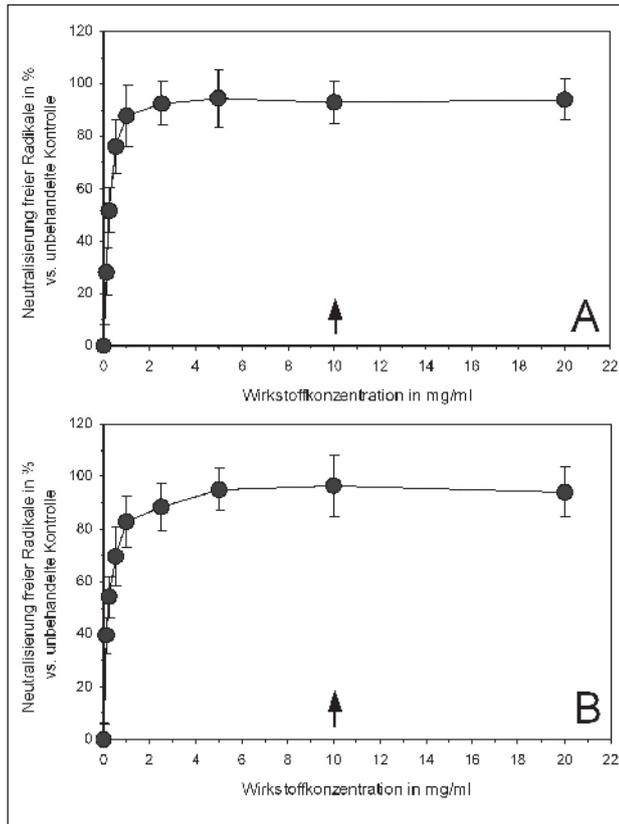
## Material und Methoden

### Untersuchte Zahnpasta und Testkonzentrationen

In den hier dargestellten Untersuchungen wurde *parodontax* Zahnpasta mit Fluorid (GlaxoSmithKline Consumer Healthcare GmbH & Co. KG, Bühl, Deutschland) untersucht, welche direkt aus dem örtlichen Handel beschafft wurde. Bei der Abschätzung einer *in-vivo*-relevanten Testkonzentration wurde von folgenden Überlegungen ausgegangen: In der Regel wird heutzutage ein Ausspülen der Zahnpasta nicht mehr empfohlen, da das Fluorid als wichtigster Inhaltsstoff einer Zahnpasta noch nachwirken soll. Daher verteilen sich ca. 1 g Zahnpasta während des Putzens auf etwa 3 ml Speichel, so dass man von einer Verdünnung 1:3 ausgehen muss. Dies würde einer minimalen Mundhöhlenkonzentration von annähernd 300 mg/ml entsprechen. Dennoch ist es in der Anwendung häufig so, dass mit Wasser der Mund nach dem Putzen ausgespült und somit die Konzentration der Zahnpasta, die über einen längeren Zeitraum einwirkt, nochmals um die Spülösung verdünnt wird. Daher wird in dieser Studie von einer geringeren minimalen und länger einwirkenden Zahnpasta-Konzentration in der Mundhöhle von 10 mg/ml ausgegangen. Es wurden Testkonzentrationen von 0 bis maximal 20 mg/ml verwendet. Dabei bezeichnet die Testkonzentration „0“ entsprechende unbehandelte Kontrollen ohne Zahnpasta.

### Testsystem zur Überprüfung der antioxidativen Wirkung

Zur Überprüfung der antioxidativen Wirkung wurde in einem zellfreien Testsystem untersucht, ob verschiedene Konzentrationen der Zahnpasta in der Lage sind, freie exogene Sauerstoffradikale zu inaktivieren, welche direkt in der Mundhöhle einwirken. Für die Untersuchung wurden die verschiedenen Konzentrationen der Zahnpasta in Phosphatpuffer vorgelegt und dazu eine



**Abbildung 1** Dosisabhängige Neutralisierung von freien Superoxidradikalen im zellfreien Testsystem durch die Gesamtfraktion (A) oder wasserlösliche Fraktion (B) der untersuchten Zahnpasta. Die Pfeile markieren die berechnete minimale Mundhöhlenkonzentration beim Zähneputzen. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei Versuchen.

**Figure 1** Dose-dependent neutralization of superoxide anion radicals in a cell-free system by (A) total suspension and (B) water soluble fraction of tested toothpaste. Arrows indicate the calculated minimal toothpaste concentration in the oral cavity during dental brushing. Data represent mean values  $\pm$  standard deviation of triplicate determinations.

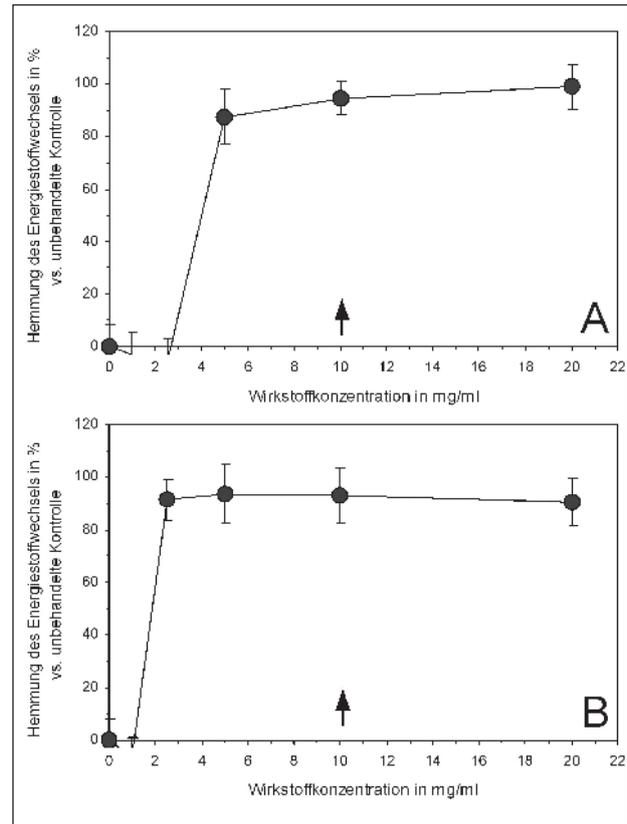
wässrige Lösung von 1 mg/ml Kaliumsuperoxid (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) in destilliertem Wasser pipettiert.

Die nicht durch die Zahnpasta inaktivierten und damit reaktionsfreudigen Superoxidanion-Radikale führen dabei zu einer Spaltung und damit auch einer Änderung der optischen Dichte des ebenfalls zum Testansatz zugegebenen wasserlöslichen Tetrazoliumfarbstoffes WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim) [5, 9]. Dessen optische Dichte wurde als Differenzmessung  $\Delta OD = 450 - 690$  nm mit einer Messung pro Minute kontinuierlich aufgezeichnet und nach linearer Regression der erhaltenen Kurvenzüge in Form der Steigung (Zeitintervall: 0

bis 10 min) in mOD/min ausgewertet. Die erhaltenen Ergebnisse wurden dann als Relativwerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt und gegen die Konzentration aufgetragen.

#### Testsystem zur Überprüfung der entzündungshemmenden Wirkung

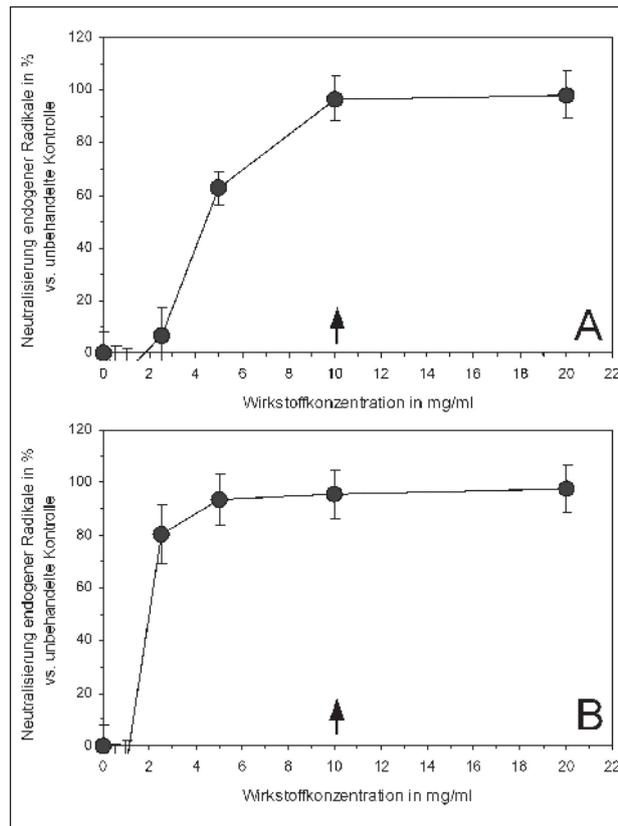
In diesem zellbasierten Testsystem wurden zunächst humane Promyelozyten (Zelllinie HL60, ECACC 98070106) als permanente Zelllinie in Routinekultur in der nötigen Zelldichte in RPMI 1640 mit 10 % fötalem Kälberserum und Zusatz von 100 U/ml Penicillin und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin in einem Brut-



**Abbildung 2** Hemmung des Energiestoffwechsels von unstimulierten funktionalen neutrophilen Granulozyten HL60 durch die Gesamtfraktion (A) oder wasserlösliche Fraktion (B) der untersuchten Zahnpasta. Die Pfeile markieren die berechnete minimale Mundhöhlenkonzentration beim Zähneputzen. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei Versuchen.

**Figure 2** Inhibition of energy metabolism in unstimulated functional neutrophils HL60 by (A) total suspension and (B) water soluble fraction of tested toothpaste. Arrows indicate the calculated minimal toothpaste concentration in the oral cavity during dental brushing. Data represent mean values  $\pm$  standard deviation of triplicate determinations.

schränk bei 37°C und einer Begasung mit 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luft herangezuchtet. Danach wurden die Zellen durch sechstägige Behandlung mit Dimethylsulfoxid zu sog. funktionalen neutrophilen Granulozyten differenziert [13, 14]. Dies sind Zellen, welche die Eigenschaften von phagozytierenden und entzündungsvermittelnden Zellen im Blut besitzen. Diese differenzierten Zellen wurden durch Zugabe eines Phorbolesters (Phorbol-12-myristat-13-acetat; Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) dazu angeregt, Superoxidanion-Radikale zu bilden. Die Radikale führen zur Spaltung des ebenfalls dem Versuchsansatz zugesetzten Tetrazoliumfarbstoffes WST-1. Dabei ist die



**Abbildung 3** Neutralisierung von endogenen reaktiven Sauerstoffradikalen in HL60 Zellen durch die Gesamtfraktion (A) oder die wasserlösliche Fraktion (B) der untersuchten Zahnpasta. Die Pfeile markieren die berechnete minimale Mundhöhlenkonzentration beim Zähneputzen. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei Versuchen.

**Figure 3** Neutralization of endogenous oxygen radicals in HL60 cells by (A) total suspension and (B) water soluble fraction of tested toothpaste. Arrows indicate the calculated minimal toothpaste concentration in the oral cavity during dental brushing. Data represent mean values  $\pm$  standard deviation of triplicate determinations.

(Abb. 1–3: P.C. Dartsch, H. Mett)

Menge der gebildeten Sauerstoffradikale direkt proportional zur Farbstoffspaltung, d. h. je mehr reaktive Radikale vorhanden sind, desto stärker wird der Farbstoff gespalten und die optische Dichte nimmt zu. Werden die von den Zellen gebildeten Radikale durch die Zahnpasta inaktiviert, so verändert sich die optische Dichte weniger stark. Analog zur Vorgehensweise beim Screening der antioxidativen Wirkung wurde auch hier die optische Dichte als Differenzmessung  $\Delta OD = 450 - 690$  nm kontinuierlich aufgezeichnet, im Zeitintervall 10 bis 30 min ausgewertet und als Relativwerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gegen die Konzentration aufgetragen. (Für weitere Details zum zellbasierten Testsystem, siehe [3].)

Zusätzlich wurde dieser Test mit funktionalen neutrophilen Granulozyten ohne Stimulation zur Bildung von Superoxidation-Radikalen durchgeführt. Dadurch konnte der zelluläre Energiestoffwechsel der entzündungsvermittelnden Zellen und damit u. a. auch deren Aktivität bei der Einwanderung ins entzündete Gewebe unter dem Einfluss der Zahnpasta untersucht werden.

## Ergebnisse

### Antioxidative Wirkung der Zahnpasta mit pflanzlichen Inhaltsstoffen im zellfreien Testsystem

Wie in Abbildung 1 dargestellt, bewirkte die untersuchte Zahnpasta im zellfreien Testsystem eine dosisabhängige Neutralisierung der freien Superoxidation-Radikale, welche dem Reaktionsgemisch zugesetzt worden waren. Im Bereich der berechneten minimalen Mundhöhlenkonzentration von 10 mg/ml nach dem Zähneputzen und Ausspülen (siehe oben) wurden nahezu alle freien Radikale entgiftet. Ein Unterschied zwischen der Gesamtfraktion und der wasserlöslichen Fraktion der Zahnpasta wurde dabei nicht festgestellt. Berechnet man zu Vergleichszwecken die  $EC_{50}$ , d. h. die Zahnpasta-Konzentration, welche zu einer 50%igen Neutralisierung der freien Radikale führte, lag diese für beide Fraktionen bei einer Konzentration von 0,25 mg/ml und war damit um das Vierzigfache niedriger als die berechnete minimale Mundhöhlenkonzentration. Durch diese Versuchsergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Zahnpasta ein antioxidatives Potential zur Inaktivie-

rung freier Radikale, wie sie beispielsweise durch bakterielle Stoffwechselprodukte bei mangelnder Mundhygiene oder auch durch andere Faktoren wie Zigarettenrauchen etc. vorkommen können, besitzt.

### Entzündungshemmende Wirkung der Zahnpasta mit pflanzlichen Inhaltsstoffen

Ähnlich ausgeprägt wie die antioxidative Wirkung bei freien Radikalen im zellfreien Testsystem war die entzündungshemmende Wirkung der Zahnpasta im zellbasierten Testsystem. Bereits Konzentrationen größer als 2 mg/ml (wasserlösliche Fraktion) bzw. 4 mg/ml (Gesamtfraktion) bewirkten eine starke Hemmung des Energiestoffwechsels der unstimulierten entzündungsvermittelnden funktionalen neutrophilen Granulozyten (Abb. 2). Durch die Hemmung des Energiestoffwechsels werden der Gesamtstoffwechsel und damit auch migratorische Prozesse, die bei der Einwanderung ins entzündete Gewebe eine Rolle spielen, gehemmt. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass hier die inhibitorische Aktivität in erster Linie in der wasserlöslichen Fraktion zu finden war.

Durch welche/n der wasserlöslichen Inhaltsstoffe diese Wirkung zustande kam, kann nicht gesagt werden. Hierfür wäre eine separate Prüfung eines jeden einzelnen Inhaltsstoffes notwendig.

Ergänzend zur Wirkung auf unstimulierte, funktionale neutrophile Granulozyten ist der Effekt der Zahnpasta auf die stimulierten Zellen, welche nach ihrer Einwanderung ins Gewebe in einem oxidativen Burst reaktive Sauerstoffradikale bilden. Wie in Abbildung 3 dargestellt, war die Zahnpasta sehr gut in der Lage, diese gebildeten Radikale zu neutralisieren. Auch wenn beide Fraktionen bei der berechneten minimalen Mundhöhlenkonzentration die Radikale nahezu vollständig neutralisieren konnten, war speziell der Anstiegsbereich der Kurven bei niedrigen Konzentrationen unterschiedlich. Dies fand seinen Ausdruck in der unterschiedlichen  $EC_{50}$ , d. h. der Zahnpasta-Konzentration, welche zu einer 50%igen Neutralisierung der endogenen Radikale führte. Die  $EC_{50}$  lag für die Gesamtfraktion bei 4,5 mg/ml und für die wasserlösliche Fraktion bei 2 mg/ml. Da auch hier die Gesamtformulierung untersucht wurde, könnte nur ein Screening der wasserlöslichen Inhaltsstoffe klären, welche dieser Stoffe für die Wirkung verantwortlich sind. Auch synergistische Effekte, d. h. die Gesamtwirkung ist größer als die Summe der Einzelwirkungen, sind nicht auszuschließen.

## Diskussion und Schlussfolgerungen

In mehreren Studien wurde seit mehr als zwei Jahrzehnten die entzündungshemmende Wirksamkeit der untersuchten Zahnpasta bei Gingivitis unter klinischen Bedingungen nachgewiesen. So untersuchten schon *Yankell* und *Emling* 1988 [19] in einer zweimonatigen Dop-

pelblindstudie mit 60 Probanden die antiinflammatorischen und die plaquereduzierenden Effekte dieser Zahnpasta gegenüber einer anderen am Markt verfügbaren Zahnpasta und einer Placebo-Zahnpasta. Dabei zeigte sich, dass ab dem zweiten Monat die pflanzliche Zahnpasta mit hoher Signifikanz Gingivitis stärker reduzieren konnte als die beiden anderen Produkte. Der positive Einfluss der Zahnpasta auf den Verlauf einer Gingivitis konnte auch in anderen klinischen Studien nachgewiesen werden [1, 4, 10, 18]. Als Grund für die positiven Effekte auf den Zustand des Zahnfleisches wurde vor allem die Entfernung der bakteriellen Plaques angesehen.

Mit der vorliegenden experimentellen Untersuchung wurden erstmals neue Wege beschritten und zellbiologische Ergebnisse mit dieser Zahnpasta vorgestellt. Dabei stand die antioxidative und entzündungshemmende Wirkung der Zahnpasta im Vordergrund.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass bei der berechneten minimalen Mundhöhlenkonzentration der Zahnpasta von 10 mg/ml eine nahezu vollständige Neutralisierung bzw. Entgiftung sowohl der freien exogenen Sauerstoffradikale als auch der endogen gebildeten Radikale stattfand. Interessanterweise war die wasserlösliche Fraktion in ihren Wirkungen in der Regel wirksamer als die Gesamtfraktion. Dies deutet darauf hin, dass die hier untersuchten Aktivitäten in den wasserlöslichen Inhaltsstoffen bzw. Pflanzenextrakten zu suchen sind. Obwohl mit diesem Versuchsansatz nur Teilaspekte komplizierter zellulärer Prozesse erfasst werden [7], erlauben die Ergebnisse dennoch Rückschlüsse auf die grundsätzliche Wirkung bei Probanden bzw. Patienten und bestätigen die klinischen Daten. Offensichtlich besteht die untersuchte Zahnpasta aus einer Kombination von In-

haltsstoffen, die entzündungshemmende Eigenschaften besitzen. Dies dürften in erster Linie die enthaltenen natürlichen Pflanzenextrakte sein. So wurden für Extrakte des Sonnenhuts (*Echinacea*) sowohl entzündungshemmende als auch immunstimulierende Eigenschaften nachgewiesen [8, 12]. Auch Myrrhe, Salbei, Kamille und *Ratanhia* sind in der Alternativmedizin und Pflanzenheilkunde als entzündungshemmende, wundheilungsfördernde, antibakterielle und fungizide Heilkräuter bekannt und werden zum Teil seit mehr als tausend Jahren eingesetzt. Die entzündungshemmende und antioxidative Wirkung dieser Pflanzenextraktkombination in der Zahnpasta konnte auch in dieser experimentellen Untersuchung bestätigt werden.

Die Zahnpasta besteht zu zwei Dritteln aus Natriumbicarbonat. Dieser aktive Inhaltsstoff dient als pH-Regulator und milder Abrasivstoff, der sich während des Putzens im Speichel allmählich auflöst [17]. Neben der besonderen Kombination von Pflanzenextrakten und -ölen in der Zahnpasta spielt somit auch die effiziente Reinigungswirkung des enthaltenen Natriumbicarbonats sowie die Neutralisation gebildeter Säuren eine wichtige Rolle bei der Entzündungsprophylaxe [18, 19]. D77

**Interessenkonflikt:** Die Autoren erklären, dass kein Interessenkonflikt im Sinne der Richtlinien des International Committee of Medical Journal Editors besteht.

### Korrespondenzadressen

Peter C. Dartsch und Helmut Mett  
Dartsch Scientific GmbH – Institut für  
zellbiologische Testsysteme  
Oskar-von-Miller-Straße 10  
86956 Schongau  
Tel.: 0 88 61 / 2 56 – 52 50  
Fax: 0 88 61 / 2 56 – 71 62  
E-Mail: pc.dartsch@dartsch-scientific.com

## Literatur

1. Bellet L, Bellet A: Comparative clinical trials of a European herbal sodium bicarbonate dentifrice and a widely-used dentifrice containing MFP, in brace-induced gingivitis. *J Clin Dent* 1 (Suppl A), A25–A26 (1988)
2. Bratthall D, Hansel-Petersson G, Sundberg H: Reasons for caries decline: What do the experts believe? *Eur J Oral Sci* 104, 416–422 (1996)
3. Dartsch PC: TIOS – a sensitive and cell-based test assay for the screening of biologically active substances for their antioxidant potential. *Innov Food Tech* 32, 72–75 (2006)
4. Ernst C-P, Owin K, Willershausen B, Meinert R: Schienenapplikation eines antimikrobiell wirkenden Gingivitisprophylaktikums mit pflanzlichen Wirkstoffen. Eine Pilotstudie. *ZWR – Das Deutsche Zahnärzteblatt* 10, 532–535 (1996)
5. Ishiyama M, Shiga M, Sasamoto K, Mizoguchi M, He P-G: A new sulfonated

- tetrazolium salt that produces a highly water-soluble formazan dye. *Chem Pharm Bull* 41, 1118–1122 (1993)
6. Marinho VCC, Higgins JPT, Logan S, Sheiham A: Topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels or varnishes) for preventing dental caries in children and adolescents. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 2 (2007)
  7. Nathan C: Points of control in inflammation. *Nature* 420, 846–852 (2002)
  8. Percival SS: Use of echinacea in medicine. *Biochem Pharmacol* 60, 155–158 (2000)
  9. Peskin AV, Winterbourn CC: A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clin Chim Acta* 293, 157–166 (2000)
  10. Saxer U, Jaschouz V, Ley F: The effect of Parodontax dentifrice on gingival bleeding. *J Clin Dent* 5, 63–64 (1994)
  11. Saxer UP, Menghini G, Bohnert KJ, Ley F: The effect of two toothpastes on plaque and gingival inflammation. *J Clin Dent* 6, 154–156 (1995)
  12. Sharma M, Schoop R, Hudson JB: Echinacea as an antiinflammatory agent: the influence of physiologically relevant parameters. *Phytother Res* 23, 863–867 (2008)
  13. Tan AS, Berridge MV: Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents. *J Immunol Methods* 238, 59–68 (2000)
  14. Teufelhofer O, Weiss RM, Parzefall W et al.: Promyelocytic HL60 cells express NADPH oxidase and are excellent targets in a rapid spectrophotometric microplate assay for extracellular superoxide. *Toxicol Sci* 76, 376–383 (2003)
  15. Ward PA, Warren JS, Johnson KJ: Oxygen radicals, inflammation, and tissue injury. *Free Radic Biol Med* 5, 403–408 (1988)
  16. Willershausen B, Gruber I, Hamm G: The influence of herbal ingredients on the plaque index and bleeding tendency of the gingiva. *J Clin Dent* 2, 75–78 (1991)
  17. Wieland K, Zimmer S: parodontax Zahnpasta – eine Übersichtsarbeit. *Prophylaxe Impuls* 12, 6–15 (2008)
  18. Yankell SL, Dolan MM, Emling RC, Bienvenido P: Six-month evaluation of Parodontax dentifrice compared to a placebo dentifrice. *J Clin Dent* 4, 26–30 (1993)
  19. Yankell SL, Emling RC: Two month evaluation of parodontax dentifrice. *J Clin Dent* 1 (Suppl A), A41–A43 (1988)