



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

28. Februar 2010

– Testbericht und Fachinformation –

Tierversuchsfreie zellbiologische Untersuchungen zu förderlichen Wirkeffekten der BIOEMSAN Zahncreme

1 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Mit tierversuchsfreien zellbiologischen Testmethoden wurde das Testmuster 11886-1 (optimierte Formulierung) der BIOEMSAN Zahncreme untersucht. Die Untersuchungsergebnisse zeigen, dass die Zahncreme dosisabhängig den Energiestoffwechsel von Bindegewebsfibroblasten um das bis zu 2,5fache im Bereich der berechneten Mundhöhlenkonzentration (= 5-10 mg/ml) stimuliert. Damit besitzt BIOEMSAN Zahncreme ein ausgeprägtes Potenzial zur Zellregeneration und –vitalisierung. Während die antioxidative Wirkung gegenüber exogenen freien Sauerstoffradikalen im zellfreien Test kaum ausgeprägt ist, werden die endogen gebildeten Radikale im Bereich der berechneten Mundhöhlenkonzentration um etwa 40% gehemmt.

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

Schongau, den 28. Februar 2010

Prof. Dr. Peter C. Dartsch

BIOEMSAN Zahncreme Testbericht

2 Allgemeine Eigenschaften der getesteten BIOEMSAN Zahncreme

„Natürliches Putzmittel für gesunde Zähne. Von Dr. med. dent. Gerhard Schneider praxiserprobt und empfohlen. Die Putzkörper der BIOEMSAN Zahncreme sind absolut zahnschmelzschonend bei gleichzeitig guter Reinigungswirkung. Basis hierfür bildet feinst vermahlene Calciumcarbonat, das in der Natur als Kreide oder Marmor vorkommt. Kreide, in gefällter Form, hat eine zahnschmelzschonende, geringe Abrasivität – zudem besitzt sie den Vorteil eines basischen pH-Wertes, was wiederum eine gesunde Mundflora zur Folge hat. Als weiterer natürlicher Putzkörper dient mineralstoffreiche gelbe Tonerde – ebenfalls basisch. Natürlich frischen Geschmack gibt die Pfefferminze.

In der Zahncreme werden Pflanzen verwendet, die seit jeher für die Mundpflege geschätzt werden und deren Wirkung auch von der modernen Zahnmedizin anerkannt sind: Ein Auszug aus der Wurzel der Ratanhiapflanze, die Rinde des indischen Neembaumes, Myrrhenharz und Propolis sind für ihre besondere Wirkung bekannt. Gesunde Süße liefern die Blätter der Steviapflanze, das „Honigblatt“ aus Brasilien, welches in Österreich kultiviert wird. Wichtig für frischen Geschmack und Wirkung sind nicht zuletzt reine ätherische Öle.“
Inhaltsstoffe: Kreide, Sorbit, belebtes Wasser und Manju, pflanzliches Glycerin*, biologischer Weingeist*, Keramikpulver, Rizinusöl*, Xanthan, gelbe Tonerde, Aloe Vera Gel*, Zuckertensid, Manju Meersalz, Stevia-Extrakt*; Kräuterextrakte*: Myrrhe*, Neemrinde*, Ratanhiawurzel*, Propolis-Extrakt*, Salbei*, römische Kamille*; Mischung ätherischer Öle*: Linalool**, Eugenol**, Limonene**.

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

3 Testmuster und Testkonzentrationen

Um in den hier durchgeführten tierversuchsfreien zellbiologischen Untersuchungen mit verschiedenen Testsystemen die Testkonzentration von BIOEMSAN Zahncreme (Testmuster 11886-1) abschätzen zu können, wurde von der folgenden Überlegung ausgegangen: Für das Zahnputzen werden ca. 0,25 g Zahnpasta verwendet, die sich auf 25-50 ml Spülflüssigkeit im Mund verteilen. Damit ergibt sich eine Konzentration von 5-10 mg/ml. Die Untersuchungen wurden im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 20 mg/ml durchgeführt. Dabei bezeichnet die Konzentration „0“ die unbehandelte Kontrolle.

4 Fragestellungen der durchgeführten Untersuchungen

- Kann durch BIOEMSAN der Energiestoffwechsel von Bindegewebszellen stimuliert und so eine Zellregeneration bzw. – vitalisierung gefördert werden?
- Kann BIOEMSAN exogene reaktive Sauerstoffradikale inaktivieren und somit einer Schädigung der epithelialen Mundhöhlenauskleidung oder des Zahnfleisches durch oxidativen Stress von außen (z.B. Nahrung) vorbeugen?

BIOEMSAN Zahncreme Testbericht

- Kann BIOEMSAN 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 Zahncreme 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 (60-150 min) in mOD/min ausgewertet.

Ergebnis (Abb. 1): Dosisabhängige Stimulierung des Energiestoffwechsels der Bindegewebsfibroblasten durch die BIOEMSAN Zahncreme. Der maximale förderliche Effekt liegt im Bereich der berechneten Mundhöhlenkonzentration von 5-10 mg/ml bei einer mehr als 2,5fach höheren Stimulation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Durch diese stimulierende Wirkung kann es nach Wirkstoffaufnahme in der Mundhöhle ebenfalls zu einer verbesserten Zellregeneration und -vitalität in vivo kommen.

5.2 Antioxidative Wirkung der BIOEMSAN Zahncreme

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.

BIOEMSAN Zahncreme Testbericht

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 Zahncreme 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): Hier zeigte die BIOEMSAN Zahncreme keine antioxidative Wirkung. Bei keiner Testkonzentration wurden die zugesetzten Sauerstoffradikale inaktiviert.

BIOEMSAN Zahncreme 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 – 35 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): Eine Inaktivierung der endogen gebildeten Sauerstoffradikale wurde nur für die beiden höchsten Testkonzentrationen mit 40% (bei 10 mg/ml) und 55% (bei 20 mg/ml) festgestellt. Dabei entspricht die Konzentration von 10 mg/ml dem oberen Bereich einer berechneten Mundhöhlenkonzentration, so dass auch in vivo diese endogen gebildeten Radikale inaktiviert bzw. entgiftet werden.

BIOEMSAN Zahncreme Testbericht

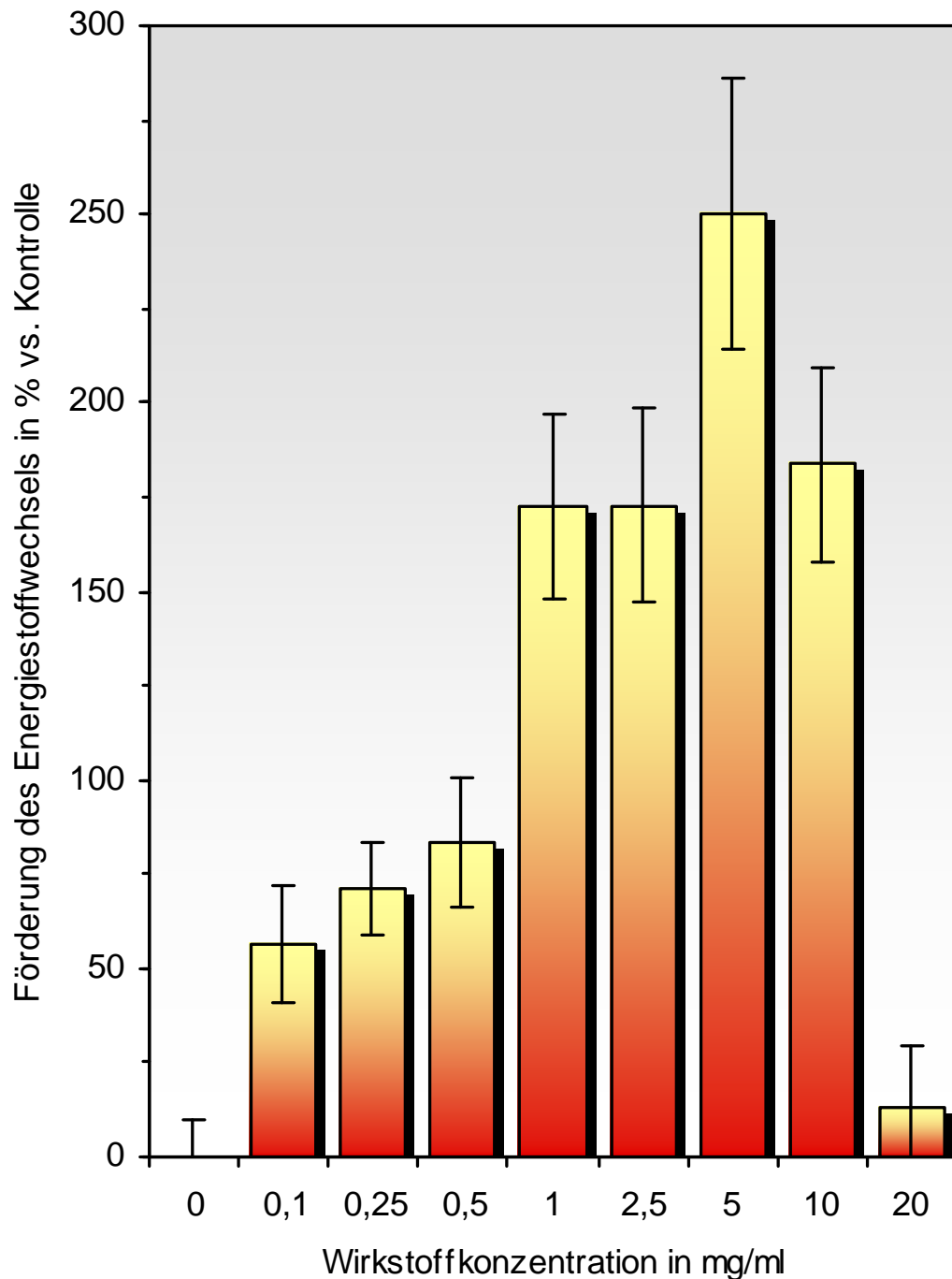


Abb. 1: Dosisabhängige Stimulation des Energiestoffwechsels von Bindegewebsfibroblasten durch BIOEMSAN Zahncreme. Der maximale förderliche Effekt liegt im Bereich der berechneten Mundhöhlenkonzentration von 5-10 mg/ml bei einer mehr als 2,5fach höheren Stimulation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Durch diese stimulierende Wirkung kann es nach Wirkstoffaufnahme in der Mundhöhle ebenfalls zu einer verbesserten Zellregeneration und -vitalität in vivo kommen. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus jeweils drei Messungen ($n = 3$).

BIOEMSAN Zahncreme Testbericht

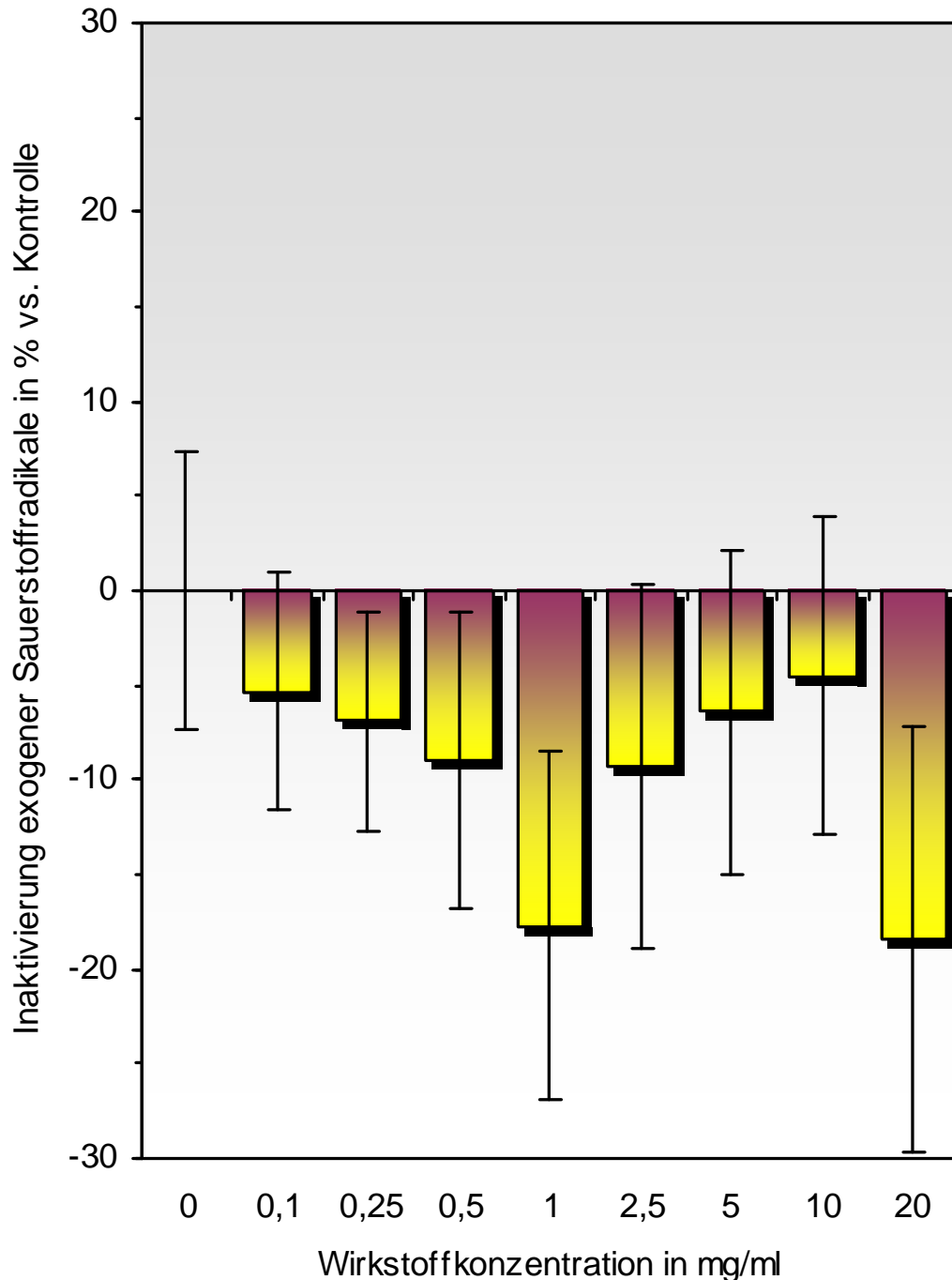


Abb. 4: Keine antioxidative Wirkung von BIOEMSAN Zahncreme, d.h. keine Inaktivierung freier exogener Sauerstoffradikale im zellfreien Test. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus jeweils drei Messungen ($n = 3$).

BIOEMSAN Zahncreme Testbericht

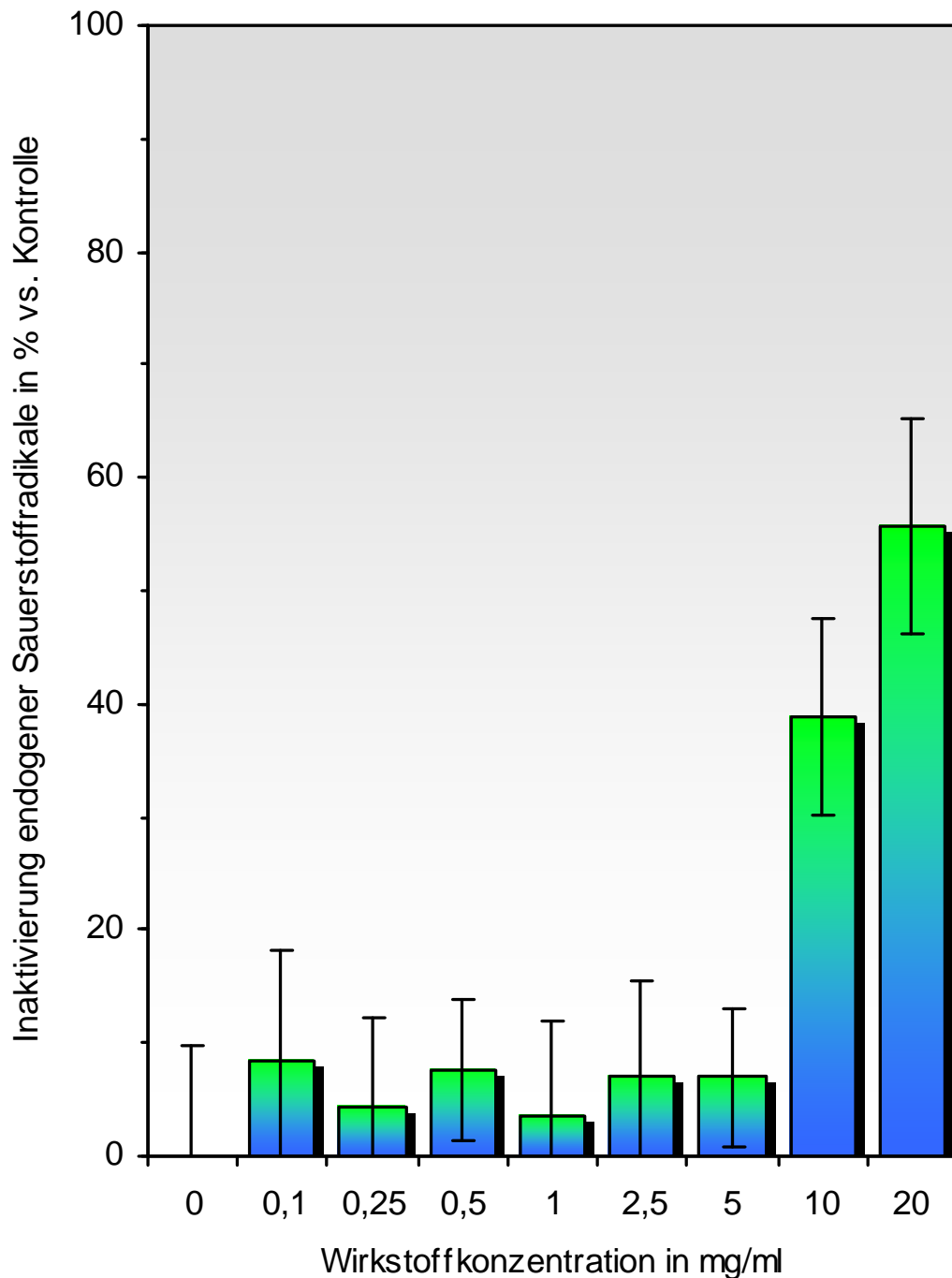


Abb. 5: Inaktivierung von endogenen Sauerstoffradikalen, die von entzündungsvermittelnden Zellen in einem oxidativen Burst gebildet werden, durch die BIOEMSAN Zahncreme nur bei den beiden höchsten Testkonzentrationen. Dadurch kann die Bildung von lokal im entzündeten Gewebe auftretenden reaktiven Sauerstoffradikalen reduziert werden. Die in der Mundhöhle relevante Konzentration der Zahncremes wurde mit 5-10 mg/ml berechnet. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus jeweils drei Messungen ($n = 3$).