

© Добровольська М.К., Локота Є.Ю., 2009

УДК 616.31:575.224.4]001.8

РЕЗУЛЬТАТИ ГЕНЕТИЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ МУТАГЕННОЇ АКТИВНОСТІ КЛЕЙОВОЇ СТОМАТОЛОГІЧНОЇ КОМПОЗИЦІЇ СК-1

Добровольська М.К., Локота Є.Ю.

Кафедра терапевтичної та хірургічної стоматології стоматологічного факультету Ужгородського національного університету, м. Ужгород

Резюме: для лікування запальних захворювань пародонту запропонована композиція СК-1 на основі диоксидину, оротової кислоти та ціанаакрилатного клею.

В зв'язку з наявними літературними даними про мутагенну активність диоксидину проведено генетичне дослідження.

Доведено, що включення диоксидину до складу СК-1 дозволило ліквідувати його мутагенний ефект і рекомендувати пародонтальну пов'язку на основі ціаноакрилатів у клінічну практику.

Ключові слова: диоксидин, оротова кислота, ціанаакрилатна композиція, мутагенна дія

Вступ. Як відомо, основним завданням лікування запальних захворювань пародонту є ліквідація патологічного процесу з подальшим частковим або повним відновленням анатомо-функціональних особливостей тканин. Однією з найважливіших ланок протизапальної терапії є призначення антимікробних засобів, серед яких антибіотики займають одне з провідних місць. Проте широка і часто необгрунтована антибіотикотерапія призвела до зміни біологічних властивостей мікрофлори, реактивності макроорганізму і тканин пародонту. Це сприяло переходу гострих форм захворювань в хронічних, виникненню великого числа рецидивів і загострень [8, 1, 13, 14]. Тому таким необхідним став пошук антимікробних засобів з якісно новими механізмами дії. В цьому відношенні на особливу увагу заслуговує фармакологічний препарат диоксидин, що відноситься до окремого класу хіміотерапевтичних засобів – похідних ди-N-оксихіноксаліну. Він характеризується широким спектром антимікробної активності, легко проникає в тканини, ефективний при лікуванні різних форм інфекції, викликаного грампозитивною і грамотригативною флорою. Завдяки своєму позитивному впливу на перебіг раневого процесу, хорошій переносимості з боку хворих, універсальності шляхів введення, різноманітності лікарських форм, препарат знайшов широке застосування в багатьох галузях медицини, у тому числі в пародонтології [3, 6].

При запальних захворюваннях пародонту комплекс лікувальних призначень разом з антимікробними речовинами передбачає включення засобів патогенетичного характеру. Їх вплив має бути направлений на ліквідацію порушень нуклеїнового, білкового й інших видів обміну в уражених тканинах. З цього ряду речовин великий інтерес представляє оротова кислота (вітамін В13). Вона є попередником синтезу нуклеозидів пірамідінових основ цитозину, тиміну, урацила. Доцільність її призначення при захворюваннях пародонту підтверджується дослідженнями [5, 3]. Авторами встановлено, що спостережувані порушення нуклеїно-

вого обміну в уражених ділянках пародонту виявляються у відсутності виникнення попередників РНК – уридину і оротової кислоти. В той же час доведено, що похідні піримідинових основ, введення ззовні, в організмі можуть бути використані для побудови тканинних білків. Пластичні функції оротової кислоти охоплюють не лише сферу нуклеїнових кислот і білка, але і побудову інших біополімерів – глікогену, складних ліпідів і мукополісахаридів. У доступній літературі ми не знайшли відомостей про місцеве вживання оротової кислоти для лікування запальних захворювань пародонту.

Анатомічні, фізіологічні і функціональні особливості порожнини рота створюють певні труднощі в терапії захворювань пародонту. Це диктує необхідність призначення лікарських засобів у складі ясенних пов'язок, що забезпечують ізоляцію ураженої ділянки з одночасною пролонгацією дії лікарської речовини. Неприємний запах, мацерація епітелію, відсутність антимікробних властивостей і трудомісткість в роботі не дозволили пов'язкам на основі оксиду цинку і кісточкового масла знайти широке застосування в клініці. Якісно відрізняються від них клейові покриття на основі ціанаакрилатів [6, 2]. Біологічним клеєм притаманний ряд цінних властивостей. Вони здатні полімеризуватися у вологому середовищі, мають помірну протизапальну і антимікробну дію. При цьому відсутня гістотоксичність, загальний алергізуючий вплив на організм хворого і бластомогенний ефект. Всі препарати були об'єднані у складі стоматологічної композиції СК-1.

Однак у літературних джерелах [10, 11] ми знайшли дані, що свідчили про виражений мутагенний ефект диоксидину. В експерименті препарат викликав генні мутації у дрозофіли і мікроорганізмів у досліді з твариною-посередником, виявляв цитогенетичну активність щодо клітин кісткового мозку та індукував домінуючі летальні мутації у зародкових клітинах мишей, в культурі лімфоцитів периферійної крові людини.

Разом із тим, нас зацікавило повідомлення авторів [10, 11] про те, що деякі наповнювачі, розчинники, дюрантні препарати можуть змінювати фармакокінетику основної лікарської речовини і модифікувати її мутагенний ефект.

Метою дослідження стало вивчення мутагенної активності діоксидину в складі стоматологічної композиції СК-1, що включає попередник піримідинових основ – оротову кислоту та ціанакрилатний біологічний клей. Ми планували використати композицію СК-1 для виготовлення пародонтальних пов'язок, використовуючи її унікальну властивість полімеризуватись у вологому середовищі ротової порожнини.

Матеріал та методи. Клейова стоматологічна композиція СК-1 складається з рідкої основи і наповнювача. Основа є сумішшю мономерів α -ціанакрилової кислоти. Це однорідна темно-зелена рідина з питомою вагою 1,05-1,07 і в'язкістю 5-10 спз. Вона добре розчинна в безводних органічних розчинниках – ацетоні, ароматичних вуглеводнях і складних ефірах. При контакті з водними розчинами швидко полімеризується. СК-1 випускається у вигляді комплектів. Автостерильна клейова основа об'ємом 1,0 \pm 0,1 мл знаходиться в шприц-тюбіку з ін'єкційною голкою, захищеною ковпачком. Наповнювач, що містить 0,09 г діоксидина і 0,06 г оротової кислоти, поміщений в стерильний поліетиленовий тюбік. Перед вживанням обидві складові частини змішуються.

Для з'ясування мутагенної дії тієї або іншої речовини використовують набір тест-об'єктів, що дозволяє з достатньою точністю визначити частоту мутацій різних типів. У своїй роботі ми користувалися системою єдиного обліку мутагенної активності хімічних сполук, запропонованої науково-дослідним інститутом по біологічних випробуваннях хімічних сполук (НДІ по БВХС). Вона дозволяє провести як попередній облік мутагенної активності препарату на моделях, що володіють високою пропускнуною спроможністю (мікроорганізми і дрозофіла), так і поглиблене вивчення летальних мутацій і хромосомних аберацій в зародкових клітинах кісткового мозку ссавців.

Для первинної оцінки мутагенної активності діоксидина ми використовували методику із застосуванням штамів сальмонел *Salmonella typhimurium*, так званий напівкількісний чашковий тест Еймса. Він заснований на реєстрації мутагенної дії досліджуваних речовин шляхом обліку зворотних мутацій (реверсій) від ауксотрофності по гістидину до прототрофності [11]. Ми користувалися штамми *Salmonella typhimurium*, отриманими з НДІ по БВХС (м. Купавна Московської області), – штам TA1535, his v 46 bio, gal, uvr B, rfa і штам TA 1538, his D 3052, bio, gal, rfa, uvr B.

his – потреба в гістидині,

bio – потреба в біотині,

gal – поодинокі делеції в галактозному опероні,

uvr B – дефект ексцезійної репарації, що сприяє посиленню мутагенного ефекту,

rfa – дефект ліпополісахаридного шару клітинної стінки, що сприяє проникненню тестованих речовин у клітину.

За допомогою штаму TA 1535 можна тестувати мутагени, що викликають заміни паразотистих основ, а за допомогою штаму TA 1538 – мутагени, що викликають мутації “зрушення рамки зчитування”. Тому використання обох штамів дозволяє досліджувати речовини по двох різних механізмах мутації. Перед початком дослідів ми провели клонування і перевірку генетичних маркерів.

Суть тесту Еймса полягає в порівнянні числа колоній ревертантів, що виростили на дослідних чашках, що містять випробувані речовини, з числом спонтанних ревертантів і ревертантів, що виникають під впливом відомого мутагену. Тому ми готували дослідні чашки з досліджуваною лікарською речовиною, а як контроль визначали спонтанну частоту мутації штамів TA 1535 і TA 1538 до гістидин – незалежного фенотипу (His+) і індукцію мутацій *Salmonella typhimurium*, TA 1535 до нітрозогунідину. Останній відомий як сильний мутаген, викликає мутації типу заміни паразотистих основ у дозах, при яких життєдіяльність оброблених клітин дещо знижується.

Згідно з методикою Ames B.N. et al. (1973), речовини, досліджувані на мутагенну активність і культуру сальмонел, вносять до верхнього шару напіврідкого агару, що містить гістидин і біотин. Нижнім шаром служить мінімальне середовище заздалегідь розлите в чашки Петрі. Для постановки трьох паралельних дослідів ми використовували по 0,2* 10⁻³ розчинів діоксидина концентрацією 1*10⁻⁶, 1*10⁻⁵, 1*10⁻⁴, 1*10⁻³, г/чашку. Кожна чашка містила 15*10⁻³ л середовища і 0,1*10⁻³ л бактерійної суспензії щільністю 1*10⁸ – 1*10⁹ мікробних тіл/1* 10⁻³ л. Для обліку спонтанного утворення His+ – ревертантів у напіврідкий агар замість досліджуваних хімічних речовин вносили по 0,2*10⁻³ л ізотонічного розчину натрію хлориду. Для постановки “позитивного контролю” в напіврідкий агар із культурою сальмонел штаму TA 1535 вводили 0,2*10⁻³ л розчину нітрозогунідину. Оцінка мутагенної активності досліджуваних речовин проводилася згідно зі схемою (Л.М. Фонштейн 1978): якщо число колоній ревертантів на дослідних чашках перевищувало число колоній на контрольних чашках в 0 – 2,5 рази, то мутагенний ефект був відсутній “-”, в 2,5 – 10 разів – мутагенний ефект слабкий “+”, в 10 – 100 разів – мутагенний ефект середній “++”, в 100 – 1000 разів – мутагенний ефект сильний “+++”.

У подальшому проводили статистичну обробку отриманих даних [4].

На жаль, методи визначення мутагенної активності хімічних речовин з використанням мікроор-

ганізмів мають істотні недоліки, обумовлені труднощами екстаполяції результатів на людину в зв'язку з відсутністю у них ідентичних систем метаболічної активації. Звідси і впливає необхідність включення в мікробіологічні тест-системи елементів метаболізму ссавців. Цього можна досягти трьома способами: застосовуючи системи хімічного гідроксилування, використовуючи мікротомні тваринних клітин і вводячи тварину-посередника.

Найбільш широке застосування отримав метод метаболічної активації за допомогою мікросомальних ферментів. Він заснований на інкубації тест-штаму сальмонел з досліджуванним препаратом у присутності так званої мікросомальної активуючої суміші (МАС), що складається з мікросомальної фракції печінки ссавців і кофакторів, необхідних для активного функціонування ферментів, що здійснюють метаболічні перетворення препарату [11]. Складовою частиною МАС є мікросомальний супернатант. Для його отримання ми готували гомогенат печінки шурів. З цією метою використовували самців шурів лінії "Вістер" масою 150 -220 г. Для підвищення виходу фракції мікросом тваринам заздалегідь вводили фенобарбітал і за 24 години до забою припиняли подачу їжі. Отриманий мікросомальний супернатант використовували для приготування МАС, що включає додаткові кофактори НАДФ, глюкозо-6-фосфат і буфер, що містить хлорид калія магнію і фосфат калію. Схема досліду відповідала раніше описаний в методиці Еймса, з тією лише різницею, що в шар напіврідкого агару додатково вводили МАС.

В якості контролю інкубаційну суміш вносили відповідний об'єм розчинника діоксидину – дистильовану воду. Позитивним контролем був препарат з відомою мутагенною активністю на штам ТА 1538 – бензидин і нітрозогуанідин для штаму ТА 1535. Мутагенну активність діоксидину досліджували з МАС і без неї. Оцінку мутагенної дії проводили за раніше описаною схемою.

Система єдиного обліку мутагенної активності хімічних сполук передбачає дослідження не лише на мікроорганізмах, але і на інших біологічних видах. Найбільш поширеним генетичним об'єктом є плодова мушка дрозофіла *Drosophila melanogaster* [12]. Для дослідження складових частин СК-1 ми застосували її як тест-об'єкт у класичному методі Меллер-6 – методі обліку рецесивних зчеплених зі статтю леталей. У роботі була використана лінія дикого типу Oregon і лінія мутанта Меллер-5.

Здатність клейової композиції СК-1 викликати хромосомні порушення в теплокровних тварин ми вивчали за допомогою цитогенетичного методу хромосомного аналізу (С.А. Гостімський і співавт., 1974). З цією метою використовували кістковий мозок шурів.

Після забою тварин вищипували стегнові і великоомілкові кістки, вимивали кістковий мозок 1% розчином тризаміщеного цитрату натрію, заздалегідь підігрітим до 37°C. Аналіз вели під біологічним мікроскопом МВВ-1А фірми "Ломо", що дозволяло отримати збільшення в 2000 разів. Кращі метафазні пластинки фотографували за допомогою мікрофотонасадки МФН-11 фотокамерою "Зоркий-4". Після аналізу робили підрахунок загальної кількості проглянутих клітин і визначали відсоток клітин з аберациями.

Результати дослідження та їх обговорення. Дослідження мутагенної активності діоксидину за допомогою напівкількісного чашкового тесту Еймса дозволило встановити, що в досліджуваних концентраціях діоксидин не збільшує частоти виникнення не-залежних ревертантів у штамах сальмонел ТА 1535 і ТА 1538, і, отже, не проявляє мутагенного ефекту. Тестування діоксидина на мутагенну активність в системі метаболічної активації дало можливість говорити про наявність слабкої мутагенної дії діоксидину, яка проявляється по відношенню до штаму сальмонел ТА 1535, за допомогою якого тестуються реверсії типу заміни пар азотистих основ. У дослідях зі штамом ТА 1538 як в системі МАС, так і без неї максимальна кількість колоній-ревертантів на чашках з діоксидином дорівнювала 10, що перевищувало контроль лише в 2,5 разу. Останнє свідчило про відсутність мутагенного ефекту діоксидину по відношенню до сальмонел штаму ТА 1538, за допомогою якого тестуються мутації "зрушення рамки зчитування".

Вивчення мутагенної активності складових частин СК-1 шляхом обліку рецесивних зчеплених зі статтю леталей в *Drosophila melanogaster* з 1021 проаналізованої хромосоми жодна з культур не дала рецесивних зчеплених зі статтю леталей. У досліді з чистим діоксидином з 1006 досліджених хромосом леталь була виявлена лише в одній культурі. Цитогенетичний метод тестування СК-1 на мутагенну активність в клітинах кісткового мозку шурів на стадії метафазі показав, що лише одна метафаза містила хромосомну аберацию. Можна передбачити, що перебудова виникла в результаті первинного пошкодження, що супроводиться обміном ділянок хромосом. Отже, сталася асиметрична хромосомна транслокація, яка приводить до злиття двох центричних або ацентричних ділянок різних хромосом. У метафазі такий обмін зазвичай приводить до появи децентричної хромосоми. У наших дослідженнях частота хромосомних абераций складала 0,45%, що відповідає спонтанному рівню мутації. Під час вивчення хромосомних абераций у клітинах кісткового мозку шурів, що виникають під впливом СК-1, мутагенний ефект не був виявлений.

Висновки. Таким чином, дослідження діоксидину на мутагенну активність, яка проведена в системі метаболічної активації, виявило його слабку мутагенну дію по відношенню до штаму сальмонел ТА 1525, за допомогою якого тестуються реверсії типу заміни паразотистих основ. Введення препарату до складу СК-1 дозволило

ліквідувати його мутагенний ефект, що підтверджене методом обліку рецесивних зчеплених зі статтю леталей на дрозофілі і цитогенетичним виявленням хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку щурів. Результати комплексного

експериментального вивчення стоматологічної композиції дозволило обґрунтувати її використання в практичній парадонтології і прийти до висновку, що генетичних перешкод до використання СК-1 немає.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бернадський Ю.Й. Гнойная челюсно-лицевая хірургія/ Заславський Н.И., Бернадская Г.П. – К.: Здоров'я, 1983.- 248 с.
2. Иванов В. С. Заболевания пародонта. – М.: Медицина, 1987. – 255 с.
3. Каминский Л. С. Статистическая обработка лабораторных и клинических данных. – Л.: Медицина, 1964. – 250 с.
4. Кодола Н.А. Пародонтоз. Ультроструктура десны и пародонта / Хомутовський О.А., Центило Т.Д. – К.: Наукова думка, 1980. – 318 с.
5. Лукьяненко В.И. Применение полимеров медицинского назначения в стоматологии / Штурм А.А. – Л.: Медицина, 1977. – 152 с.
6. Максименко П.Т. Медикаментозная патология в стоматологии. – Полтава, 2004.-138 с.
7. Максименко П.Т. Побічна дія медикаментозних засобів у стоматологічній практиці. – Полтава, 2004. – 184 с.
8. Терапевтична стоматологія: Підручник. – у 4-х томах/ М.Ф. Данилевський, А.В. Борисенко, А.М. Полтун, Л.Ф. – К.: Здоров'я, 2004. – Т.2. – 400 с.; Іл.
9. Фонштейн Л.М. Оценка мутагенности лекарств./ Ревазова Ю.А.// Цитология и генетика. – 1976, №6. – С.10-19.
10. Фонштейн Л.М. О характере мутагенного действия диоксида на бактерии /Абилев С.К., Облапенко Н.Г. // Цитология и генетика. – 1980. – Т.14, С.60-65.
11. Ames B.N. An improved bacteriae test system for detection and classification of mutagens and carcinogens/ Lee F.D.,Durstun W.E. //Proc. Nat. Acad Sci USA. – 1973. – Vol.70. – P.782.
12. Muller Y. Mutagenicity of DNOC in drosophila melanigaster /Haberzette R. // Arch. Foxicol. – 1980. – Vol. 4. – P.59-61.
13. Ferner K. Jydgyszer meleknetisik a szajjiiri – yben /Javar Y.//Forgov. szl., – 1982. – kot. 75, №11. – old 329-337.
14. Valkova E. Vyskyt mnohocetnych paradontalnich abscess po lecbе antibiotiky. – Prakt. zubni leksii – 1976. – sv. 24, №1. – S.8-12.

SUMMARY

RESULTS OF GENETIC STUDIES OF MUTAGENIC ACTIVITY OF DENTAL ADHESIVE COMPOSITION SK-1 Dobrovolska M.K., Lokota Y.Y.

For treatment of inflammatory diseases of paradontium composition of SK-1 is offered on the basis of dioksidina, orotovoy acid and cianakrilatnogo gluing.

In connection with literary information about mutagene activity of dioksidina genetic research is conducted.

It is proved that including of dioksidina in the complement of SK-1 allowed to liguidate his mutagene effect and recommend a paradontal'nyu bandage on the basis of cyanoacrylates in clinical practice.

Key words: dioksidin, orotovaya acid, cianakrilatnaya composition, mutagene action