УДК 616.311.2+616.314.16+616.716.85]-031.81-085.242:57.084

А.В. Борисенко, Т.М. Кучмеровська, І.А. Воловик

Обґрунтування використання нового засобу місцевої дії в комплексному лікуванні генералізованого пародонтиту (експериментальне дослідження)

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

Мета: розробити та експериментально обґрунтувати вибір фармакологічної композиції місцевої дії для лікування хворих на генералізований пародонтит.
Методи. Для проведення експериментального дослідження була використана фармакологічна композиція із протимікробними, протипротозойними та антигіпоксичними властивостями. Цитотоксичну або цитопротекторну дію досліджуваних препаратів оцінювали на культурі клітин епітеліального походження з використанням МТТ-тесту.
Результати. При внесенні в середовище інкубації епітеліальних клітин протимікробного та протипротозойного препаратів кількість живих клітин становить менше 15 % порівняно з контролем, що свідчить про значну цитотоксичну дію даних препаратів. При дослідженні впливу антигіпоксичного препарату в аналогічних умовах і в різних концентраціях виявлено виражену цитопротекторну дію. Установлено оптимальні співвідношення препаратів у розробленій фармакологічній композиції, при яких визначено їх ефективну сумісну дію на епітеліальні клітини в експерименті.
Висновок. Отримана фармакологічна композиція локальної дії не чинить цитотоксичної дії на життєздатність епітеліальних клітин.

Ключові слова: генералізований пародонтит, життєздатність епітеліальних клітин, препарати, фармакологічна композиція, експеримент.

Одну із провідних позицій у структурі розповсюдженості основних стоматологічних захворювань займає генералізований пародонтит [1, 2, 3, 11, 13]. Згідно з епідеміологічними даними, уже у віці 18–35 років генералізований пародонтит діагностують майже у 20 % обстежених [12].

Незважаючи на стрімкий розвиток сучасної пародонтології, запровадження новітніх методів, засобів і способів лікування, надзвичайно актуальною й невирішеною залишається проблема підвищення ефективності комплексного лікування хворих на генералізований пародонтит.

Важливою передумовою успішного лікування є глибинне розуміння етіологічних іпатогенетичних механізмів, що призводять до його розвитку. Важливе місце серед захисних факторів тканин пародонту посідає повноцінна структура його клітинних елементів, характер їх метаболічних та енергетичних процесів. Практично всі анаболічні процеси у клітинах є кисень-залежними. Численними науковими дослідженнями висвітлені проблеми розвитку тканинної гіпоксії при запальних і дистрофічно-запальних процесах у тканинах пародонту [5, 14]. У подальшому вони призводять до функціональних, метаболічних, енергетичних і навіть структурних порушень на рівні клітинних елементів. Це, у свою чергу, призводить до виникнення сприятливих умов для реалізації пошкоджуючої дії пародонтопатогенних чинників різного ґенезу.

Найчастіше для лікування захворювань пародонту застосовують такі фармакологічні препарати, як антибактеріальні та протизапальні [7]. Сучасні протимікробні препарати різного спектру дії є одними з основних та досить ефективних засобів. Але необхідно зазначити, що більшість із них залежно від концентрації та часу експозиції мають певну цитотоксичну дію на клітини тканин пародонту і слизової оболонки рота. Отже, постає потреба в застосуванні фармакологічних препаратів, які би призводили до повноцінного відновлення структури клітинних елементів тканин пародонту, ліквідації явищ гіпоксії та нормалізації всіх метаболічно-енергетичних функцій. Це зумовило подальший пошук і розробку ефективної фармакологічної композиції місцевої дії для лікування хворих на генералізований пародонтит.

Мета роботи – розробити та експериментально обґрунтувати вибір фармакологічної композиції місцевої дії для комплексного лікування хворих на генералізований пародонтит.

Матеріали та методи дослідження

Для вирішення поставлених задач і проведення досліджень були використані такі препарати: Метронідазол (5 мг/мл), Хлоргексидин-КР (0,05 % р-н), Цитофлавін® (амп).

Цитопротекторну дію досліджуваних препаратів, як окремо, так і в їх поєднанні, оцінювали на культурі клітин епітеліального походження HeLa з використанням МТТ-тесту, згідно з методом [9], у власній модифікації. Принцип методу полягає в тому, що в реакції відновлення клітинами в культурі тетразоліевого барвника МТТ до МТТ-формазану його інтенсивність відображає ступінь життєздатності клітин у результаті відновлення барвника мітохондріальними, а також частково цитоплазматичними дегідрогеназами.

Клітини-мішені епітеліального походження HeLa в концентрації $2{,}5\times10^5$ кл/мл вносили в лунки планшета на 96 лунок (Greiner, Німеччина) в об'ємі по 100 мкл суспензії в середовищі RPMI-1640 (Sigma) згідно з методом і культивували протягом 24 год. у стандартних умовах проведення досліджень (5 % CO_2, 100 % вологість, температура 37°С). На початку проведення аналізу інкубаційне середовище відбирали, а клітини промивали фосфатно-сольовим буфером PBS (англ. Phosphate buffered saline, pH = 7,4) та проводили інкубування (аплікацію) клітин з досліджуваними препаратами

протягом 5 та 20 хв. Після цього клітини промивали буфером PBS, вносили нове середовище (без фетальної сироватки ВРХ) та культивували протягом 12 год. у стандартних умовах. Далі обережно відбирали середовище інкубації, додавали по 100 мкл розчину МТТ (Sigma-Aldrich) у концентрації 1 мг/мл у натрій-фосфатному буфері PBS і культивували протягом 4 год. при 37°С. По закінченню інкубації, розчин МТТ відбирали, після чого додавали по 100 мкл розчину ДМСО та інкубували 5 хвилин при інтенсивному струшуванні. Оптичне поглинання розчину вимірювали при довжині хвиль 550 нм (дослід) і 630 нм (референт) на спектрофотометрі BioTech uQuant (BioTek Instruments, Inc США). Усі проби були проведені трьохкратно й відповідно проаналізовані. Обробку отриманих даних проводили за домопогою програми Microsoft Exscel 2010. Результати представлені у вигляді M±m, де M – середнє значення, а m – відхилення від вибіркової середньої. Різницю між груповими середніми вважали статистично вірогідною при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення

Незважаючи на те що протимікробні препарати різного спектру дії досить широко використовують у стоматологічній практиці, важливим питанням було з'ясування можливої цитотоксичної або цитопротекторної дії цих препаратів при їх сумісному використанні в різних концентраціях, експозиціях і співвідношеннях. Також важливо було оцінити вплив препарату з антигіпоксичними властивостями на епітеліальні клітини в різних концентраціях і в поєднанні з вищезазначеними препаратами.

Як свідчать результати проведеного МТТ тесту, які представлені на рис. 1 (стовпчики 2) при одночасному внесенні в середовище інкубації епітеліальних клітин еквімолярних концентрацій Метронідазолу (2,5 мг/мл) та Хлоргексидину (0,025 %) кількість живих клітин становила лише 15 і 4 %, у той час як загиблих – 85 і 96 % порівняно з контролем при інкубації клітин HeLa протягом 5 та 20 хв. відповідно. Це свідчить про цитотоксичну дію цих препаратів. За умов зменшення концентрацій Метронідазолу та Хлоргексидину у два рази при їх сумісному внесенні в середовище інкубації кількість живих клітин збільшувалася до 72 та 57 % порівняно із контролем при інкубації клітин HeLa протягом 5 та 20 хв. відповідно (рис. 1, стовпчики 3). Не виключено, що при цих концентраціях сумісна дія Метронідазолу та Хлоргексидину призводить до функціональних і метаболічних порушень у результаті розвитку оксидативного стресу, що, у свою чергу, викликає порушення структури й функції клітинних мембран [4]. Була також використана фармакологічна комбінація цих препаратів у співвідношеннях Метронідазолу 2,5 мг/мл до Хлоргексидину 0,0025 %, тобто висока першого й у десять разів нижча другого у порівнянні з 0,025 % (рис. 1, стовпчики 4). Отримані дані свідчать про те, що такий підбір співвідношень досліджуваних препаратів при їх сумісному використанні не призводить до загибелі досліджуваних епітеліальних клітин порівняно з контролем. При зменшенні концентрації в середовищі інкубації Метронідазолу у два рази (1,25 мг/мл) та при концентрації Хлоргексидину (0,00125 %) протягом досліджуваних строків життєздатність клітин також була на рівні контролю (рис. 1, стовпчики 5). Аналогічну картину спостерігали і при дуже низьких концентраціях Метронідазолу (0,625 мг/мл) та Хлоргексидину (0,000625 %) при їх одночасному внесенні в середовище інкубації рис. 1, стовпчики 6). Ці дані свідчать про те, що при сумісній дії Метронідазолу та Хлоргексидину більш низьких концентрацій життєздатність клітин епітеліального походження досягає рівня контролю. Однак їх антимікробна та протипротозойна дія нівелюється, оскільки ці препарати, за даними літературних джерел, застосовують у значно вищих терапевтичних концентраціях [6, 8].

Таким чином, постало питання пошуку препаратів для створення ефективної фармакологічної композиції, яка б володіла антибактеріальними та цитопротекторними властивостями. Увагу привернув препарат Цитофлавін, у склад якого входять біологічно активні сполуки. Було досліджено вплив Цитофлавіну на життєздатність епітеліальних клітин в аналогічних умовах і при його різних концентраціях. Було виявлено, що навіть концентрований розчин Цитофлавіну володів вираженою цитопротекторною дією та не володів цитотоксичною дією на епітеліальні клітини (рис. 1. стовпчики 7). При розведенні препарату у 2 та 4 рази він

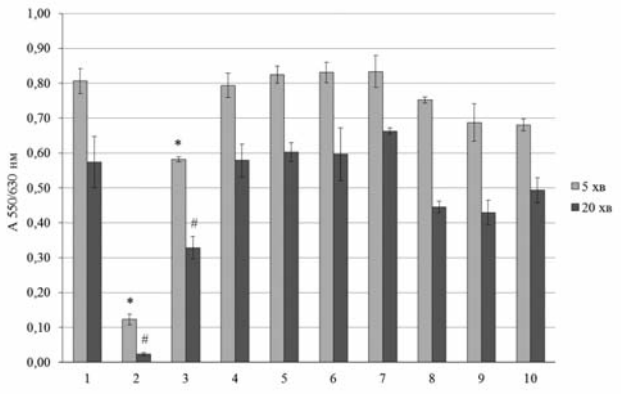

Рис. 1. Вплив препаратів на життєздатність клітини Hela, M±m.

Умовні позначення: 1 – контроль;
2 – Метрогіл 2,5 мг/мл + Хлоргесидин 0,025 %;
3 – Метрогіл 1,25 мг/мл + Хлоргесидин 0,0125 %;
4 – Метрогіл 2,5 мг/мл + Хлоргесидин 0,0025 %;
5 – Метрогіл 1,25 мг/мл + Хлоргесидин 0,00125 %;
6 – Метрогіл 0,625 мг/мл + Хлоргесидин 0,000625 %;
7 – Цитофлавін конц.; 8 – Цитофлавін розв. у 2 рази;
9 – Цитофлавін розв. у 4 рази; 10 – Цитофлавін розв. у 8 раз.
Примітки: * – $P < 0,05$ відносно контролю після аплікації протягом 5 хв.; # – $P < 0,05$ відносно контролю після аплікації протягом 20 хв.

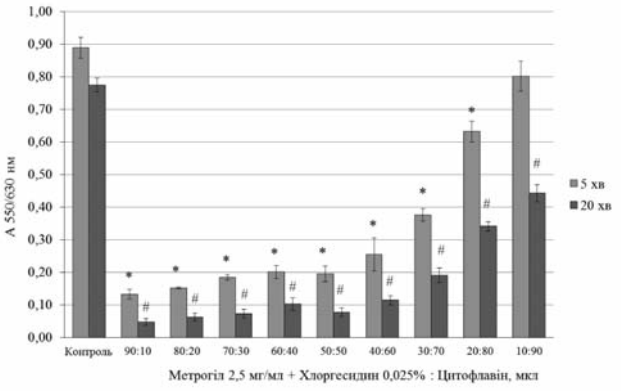

Рис. 2. Вплив фармакологічної композиції із трьох препаратів Метрогіл, Хлоргесидин і Цитофлавін у різних співвідношеннях на життєздатність клітин Hela, M±m.

Примітки: * – $P < 0,05$ відносно контролю після аплікації протягом 5 хв.; # – $P < 0,05$ відносно контролю після аплікації протягом 20 хв.

також був ефективним (рис. 1, стовпчики 8, 9), лише при його розведенні у 8 разів цитопротекторна дія в незначній мірі знизилась (рис. 1, стовпчики 10). Установлена виражена цитопротекторна дія Цитофлавіну реалізується за рахунок компонентів, що входять у його склад. Препарат володіє значною антиоксидантною та цитопротекторною дією при досліджуваній тривалості інкубування культури клітин епітеліального походження.

Оскільки Метрнідазол (2,5 мг/мл) та Хлоргексидин (0,025 %) при їх сумісному використанні в цих концентраціях проявляли цитотоксичну дію на життєздатність клітин протягом обох строків інкубації, то доцільним було з'ясувати, чи внесення Цитофлавіну в різних концентраціях дозволить створити нову ефективну фармакологічну композицію із трьох активних компонентів, яка б не призводила до загибелі досліджуваних клітин.

Як свідчать результати, представлені на рис. 2, при внесенні в середовище інкубації 100 мкл трьох-компонентної композиції, починаючи із 90 мкл (Метронідазол і Хлоргексидин у співвідношенні 1 до 1) та 10 мкл Цитофлавіну виявилося, що така композиція була цитотоксичною. Однак при послідовному збільшенні вмісту Цитофлавіну до 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 та 90 мкл у складі фармакологічної композиції спостерігали зниження її цитотоксичної дії, а при 80 мкл Цитофлавіну життєздатність клітин епітеліального походження практично повністю відновлювалась. Однак виявилося, що при короткому строку інкубації, а саме 5 хв., позитивний ефект композиції був більш вираженим у порівнянні зі строком інкубації 20 хв. Отримані результати узгоджуються з даними інших авторів, які показали, що цитотоксична дія поліметил-метакрилату на епітеліальні клітини ротової порожнини при монозастосуванні була усунена при його сумісній дії з N-ацетил-цистеїном, похідним амінокислоти цистеїну, що володіє антиоксидантними властивостями [10].

Ретельно проаналізувавши отримані дані, можна вважати, що створена фармакологічна композиція володіє не тільки цитопротекторною та відновлювальною дією на клітини епітеліального походження, а й антимікробною та протипротозойною завдяки сумісному застосуванню трьох препаратів у співвідношенні: Метронідазолу (2,5 мг/мл), Хлоргексидину (0,025 % розчин) та Цитофлавіну®, як 1:1:8. Оптимальна тривалість аплікації складає 5 хв. Саме протягом цього строку часу, методично підібраних і науково обґрунтованих співвідношеннях, препарати, що входять у склад створеної фармакологічної композиції, будуть проявляти позитивну лікувальну дію на епітеліальні клітини.

При місцевій медикаментозній терапії генералізованого пародонтиту епітеліальні клітини слизової оболонки ясен є основними клітинами-мішенями дії лікарських препаратів. Ці обставини й обумовили проведення даного експериментального дослідження з використанням клітин епітеліального походження. Отримані результати дослідження обґрунтовують доцільність застосування розробленої фармакологічної композиції в комплексному лікуванні хворих на генералізований пародонтит.

Проведені дослідження також сприятимуть пошуку та розробці нових ефективних препаратів для лікування захворювань пародонту, у склад яких входитиме або буде їх основою Цитофлавін. Не виключено, що саме він сприяє регенерації та відновлює функції досліджуваних клітин і запобігає їх загибелі.

Варто зазначити, що механізм деструкції клітин епітеліального походження складний. Особливо це стосується розвитку та перебігу у клітинах патогенетичних процесів. Їх професійне розуміння потребує сучасних методичних підходів для запобігання загибелі клітин, що можна буде вирішити при подальших дослідженнях.

Висновки

Експериментально встановлено, що сумісне застосування препаратів із протимікробними та протипротозойними властивостями в еквівалентному співвідношенні 1:1 їх концентрацій призводить до цитотоксичної дії на епітеліальні клітини. При зменшенні концентрацій досліджуваних препаратів зменшується їх цитотоксична дія. При збільшенні строку інкубації пропорційно збільшується й цитотоксичний вплив на епітеліальні клітини.

Установлено, що антигіпоксичний препарат є абсолютно нетоксичним і має виражену цитопротекторну дію на епітеліальні клітини.

Розроблено нову фармакологічну композицію місцевої дії для комплексного лікування хворих на генералізований пародонтит, у склад якої входить протимікробний, протипротозойний та антигіпоксичний препарат метаболічного типу дії.

Обґрунтовано вибір оптимальних концентрацій, еквівалентних співвідношень і часу експозиції протимікробного, протипротозойного та антигіпоксичного препаратів у новій фармакологічній композиції, яка володіє цитопротекторною дією на епітеліальні клітини.

ЛІТЕРАТУРА

1. Araъjo C.A., Gusmro E.S., Batista J.E., Cimxes R. Impact of periodontal disease on quality of life // Quintessence Int. – 2010. – V. 41. – P. e111–e118.

2. Brennan D.S., Spencer A.J., Roberts-Thomson K.F. Quality of life and disability weights associated with periodontal disease // J. Dent. Res. – 2007. – V. 86. – P. 713–717.

3. Cunha-Cruz J., Hujoel P.P., Kressin N.R. Oral health-related quality of life of periodontal patients // J. Periodontal Res. – 2007. – V. 42. – P. 169–176.

4. D'Aiuto F., Nibali L., Parkar M., Patel K., Suvan J., Donos N. Oxidative Stress, Systemic Inflammation, and Severe Periodontitis // Dent. Res. – 2010. – V. 89, № 11. – 1241–1246, doi: 10.1177/0022034510375830.

5. Gölz L., Memmert S., Rath-Deschner B., Jäger A., Appel T., Baumgarten G., Götz W., Frede S. Hypoxia and P. gingivalis synergistically induce HIF-1 and NF-κB activation in PDL cells and periodontal diseases // Mediators Inflamm. – 2015: 438085, doi: 10.1155/2015/438085.

6. Grudianov A.I., Ovchinnikova V.V., Dmitrieva N.A. Comparison of antibacterial efficacy of 1 and 25 % concentration of Metrogil-denta for inflammatory periodontal disease treatment // Stomatologiia (Russian). – 2006. – V. 85, № 4. – P. 26–29.

7. Gupta D., Jain A. Effect of Cinnamon Extract and Chlorhexidine Gluconate (0.2 %) on the Clinical Level of Dental Plaque and Gingival Health: A 4-Week, Triple-Blind Randomized Controlled Trial // J. Int. Acad. Periodontol. – 2015. – V. 17, № 3. – P. 91–98.

8. Karpiński T.M., Szkaradkiewicz A.K. Chlorhexidine--pharmaco-biological activity and application // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. – 2015. – V. 19, № 7. – P. 1321–1326.

9. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // Immunol. Methods. – 1983. – V. 65, № 1–2. – P. 55–63.

10. Nishimiya H., Yamada M., Ueda T., Sakurai K. N-acetyl cysteine alleviates inflammatory reaction of oral epithelial cells to poly (methyl methacrylate) extract // Acta Odontol. Scand. – 2015. – V. 73, № 8. – P. 616-625, doi: 10.3109/00016357.2015.1021834.

11. Patel R.R., Richards P.S., Inglehart M.R. Periodontal health, quality of life, and smiling patterns – an exploration // J. Periodontol. – 2008. – V. 79. – P. 224–231.

12. Sivakumar A., Raju M.A., Sunny J., Cyriac R., Bhat S., Mohandas A.A., Divya B. Collaborative management of a young patient with generalized aggressive periodontitis // Int. J. Orthod. Milwaukee. – 2014. – V. 25, № 4. – P. 27–31.

13. Wong R.M., Ng S.K., Corbet E.F., Keung LeungW. Non-surgical periodontal therapy improves oral health-related quality of life // J. Clin. Periodontol. – 2012. – V. 39, № 1. – P. 53–61, doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01797.

14. Yu X.J., Xiao C.J., Du Y.M., Liu S., Du Y., Li S. Effect of hypoxia on the expression of RANKL/OPG in human periodontal ligament cells in vitro // Int. J. Clin. Exp. Pathol. – 2015. – V. 8, № 10. – P. 12929–12935.

Обоснование использования нового средства местного действия в комплексном лечении генерализованного пародонтита (экспериментальное исследование)

А.В. Борисенко, Т.М. Кучмеровская, И.А. Воловик

Цель: разработать и экспериментально обосновать выбор фармакологической композиции местного действия для лечения пациентов с генерализованным пародонтитом.

Методы. Для проведения экспериментального исследования была использована фармакологическая композиция с противомикробными, противопротозойными и антигипоксическими свойствами. Цитотоксическое или цитопротекторное действие исследуемых препаратов оценивали на культуре клеток епителиального происхождения с использованием МТТ-теста.

Результаты. При внесении в среду инкубации епителиальних клеток противомикробного и противопротозойного препаратов количество живых клеток составило менше 15 % по сравнению с контролем, что свидетельствует о значительном цитотоксическом действии данных препаратов. При исследовании влияния антигипоксического препарата в аналогичных условиях и в разных концентрациях определено значительное цитопротекторное действие. Установлено оптимальное соотношение препаратов в разработанной фармакологической композиции, при котором определено их эффективное совместное действие на епителиальные клетки в эксперименте.

Вывод. Разработанная фармакологическая композиция локального действия не имеет цитотоксического действия на жизнеспособность епителиальных клеток.

Ключевые слова: генерализованный пародонтит, жизнеспособность епителиальных клеток, препарати, фармакологическая композиция, эксперимент.

The rationale for the use of the new remedy of local action in complex treatment of generalized periodontitis (experimental study)

A. Borysenko, T. Kuchmerovska, I. Volovyk

Aim: develop and experimentally substantiate the choice of a pharmacological composition of local action for the treatment of patients with generalized periodontitis.

Material and methods. For the experimentally study was used pharmaceutical composition with antimicrobial, antiprotozoal and antyhypoxic properties. A cytotoxic or cytoprotective effect of the preparations was assessed within the culture of cells of epithelial derivation with the application of MTT-Test.

Results. When anbacterial and antiprotozoal preparations were inserted in the habitat of epithelial cells incubation, the number of live cells accounted only 15 %, compared with the control, this proves a considerable cytotoxic effect of these preparations. When studying the effect of the antihypoxic preparation under similar conditions and in various concentrations, a marked cytoprotective effect has been revealed. The optimum ratios of preparations under, which the effective concerted effect on the epithelial cells in the experiment, have been identified.

Conclusions. Devisable pharmaceutical composition of local action does not carry cytotoxic effect to the viability of the cells of epithelial derivation.

Key words: generalized periodontitis, viability of the epithelial cells, preparations, pharmaceutical composition, experiment.

Борисенко Анатолий Васильевич *– д-р мед. наук,*
профессор, заведующий кафедрой терапевтической стоматологии Национального медицинского университета им. А.А. Богомольца.
Адрес рабочий: *ул. Зоологическая, 1, г. Киев, Украина, 03057.* ***Тел.:*** *+38(050)447-38-00.* ***E-mail:*** *tc@nmu.kiev.ua.*
Воловик Ирина Анатольевна *– аспирант кафедры терапевтической стоматологии*
Национального медицинского университета им. А.А. Богомольца. ***Адрес рабочий:*** *ул. Зоологическая, 1, г. Киев, Украина, 03057.*
Кучмеровская Тамара Муратовна *– д-р биол. наук,*
ведущий научный сотрудник Института биохимии им. А.В. Палладина. ***Адрес рабочий:*** *ул. Леонтовича, 9, г. Киев, Украина, 01601.*

НОВОСТИ ▪ НОВОСТИ ▪ НОВОСТИ ▪ НОВОСТИ ▪ НОВОСТИ ▪ НОВОСТИ ▪ НОВОСТИ ▪ НОВОСТИ

ПАТЧИ ДЛЯ УДАЛЕНИЯ СЛЮНЫ В ХОДЕ СТОМАТОЛОГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ

Шведская компания «Directa» сообщила о выпуске первых патчей для удобного и эффективного удаления слюны, производимой подъязычной и поднижнечелюстной железой в ходе стоматологического лечения.

В подъязычной области расположено большое количество трубочек, выводящих слюнный секрет, поэтому здесь образуется скопление жидкости, что мешает стоматологу в ходе лечения. «Патчи DryDent позволят эффективнее справиться с этой сложностью. В продаже уже есть патчи для удаления секрета околоушных слюнных желез, при этом аналогов патчей для подъязычной области не существует», – утверждает гендиректор компании «Directa» Хенрик Карск.

По словам производителя, благодаря абсорбирующему материалу подъязычная область остается сухой, даже если патч полностью пропитается слюной. Помимо вышеуказанного свойства патчи DryDent помогают избежать дискомфорта, когда стоматолог пользуется слюноотсосом. Дело в том, что патч служит прокладкой между отсосом и мягкими тканями подъязычной области, что минимизирует дискомфортные и болезненные ощущения для пациента, в особенности в процессе получения рентгеновских снимков или цифрового сканирования зуба. Кроме того, патчи обладают успокаивающим эффектом, за счет подавления стимуляции глотательного рефлекса.

www.dentalexpert.com.ua