

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

Обґрунтування використання нового засобу місцевої дії в комплексному лікуванні генералізованого пародонтиту (експериментальне дослідження, частина 2)

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

Мета: обґрунтувати вибір фармакологічної композиції місцевої дії для комплексного лікування хворих на генералізований пародонтит в умовах експериментальної гіпоксії.

Методи. Для проведення експериментального дослідження була використана фармакологічна композиція. У клітинах індукували гіпоксію хлоридом кобальту в кінцевій концентрації 250 мкмоль/л та культивували протягом 12 та 24 год. Антигіпоксичну дію фармакологічної композиції оцінювали на культурі клітин HeLa з використанням МТТ-тесту.

Результати. На клітинній лінії HeLa хлорид кобальту викликав стан гіпоксії за тривалості дії 12 і 24 год. та при концентрації понад 250 мкмоль/л. У цих умовах розроблена фармакологічна композиція демонструє збільшення кількості живих клітин в обидва строки часу експозиції аплікації. При 24-годинних умовах гіпоксії та часі експозиції аплікації 5 хв. кількість живих клітин збільшилась на 12 %, а при 10 хв. – на 25 %. Дані свідчать про значну антигіпоксичну ефективність фармакологічної композиції за умов гіпоксії.

Висновок. Обґрунтовано вибір фармакологічної композиції місцевої дії для комплексного лікування хворих на генералізований пародонтит, яка має антигіпоксичну властивість в умовах гіпоксії в експерименті.

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

Незважаючи на стрімкий розвиток сучасної пародонтології, надзвичайно актуальною й невирішеною залишається проблема підвищення ефективності комплексного лікування хворих на генералізований пародонтит [3, 14].

Стан повноцінного кисневого забезпечення тканин пародонту відіграє одну з головних ролей в особливостях початку й подальшого розвитку генералізованого пародонтиту, характеру та динаміки його перебігу, а також є важливою передумовою успішного лікування. І саме можливість якісної фізіологічної реалізації захисних механізмів усіх його клітинних елементів визначається переважно кисень-залежними біохімічними процесами. Важливе місце посідають як повноцінна структура, так і характер метаболічно-енергетичного обміну тканин пародонту. Першим захисним бар'єром на шляху реалізації дії патогенних факторів є епітеліальні клітини зубоясенної борозни та ясен. Численні пародонтопатогенні чинники ендо- та екзогенного характеру місцевого та загального значення призводять до функціональних, а в подальшому і структурних змін у клітинах тканин пародонту. Основними причинами таких змін є порушення мікроциркуляції крові, розвиток запальних процесів з вивільненням багатьох біологічно активних речовин і медіаторів у ділянці ураження, пригнічення енергетичних та обмінних процесів, порушення механізмів клітинного дихання. Результатом є розвиток тканинної гіпоксії, при якій, з одного боку, клітинам не вистачає достатнього запасу кисню для їх функціонування та життєздатності, з іншого – це потужний стимул для розвитку ангиогенезу на етапах компенсаторно-приспосувальних реакцій організму [2, 5, 13]. Проблеми розвитку тканинної гіпоксії при запальних і дистрофічно-запальних процесах у тканинах пародонту висвітлені в численних наукових дослідженнях [6, 7, 11]. Отже, тканинна

гіпоксія є не тільки одним із провідних етіологічних факторів, а й одним з основних факторів патогенезу генералізованого пародонтиту.

Таким чином, постає потреба в обґрунтуванні застосування нової фармакологічної композиції для комплексного лікування генералізованого пародонтиту, яка б не тільки мала антимікробні властивості, а й ліквідувала явища гіпоксії та нормалізувала метаболічно-енергетичні функції тканин пародонту [1]. А значить, актуальним є питання визначення ефективності розробленої фармакологічної композиції на життєздатність епітеліальних клітин в умовах гіпоксії в експерименті [8, 9, 12].

Мета роботи – обґрунтувати вибір фармакологічної композиції місцевої дії для комплексного лікування хворих на генералізований пародонтит в умовах експериментальної гіпоксії.

Матеріали та методи дослідження

Для проведення дослідження була використана розроблена нами фармакологічна композиція місцевої дії, у склад якої входять такі препарати: Метронідазол, Хлорексидин і Цитофлавін® у відповідних співвідношеннях [1].

Дію розробленої фармакологічної композиції із трьох препаратів як окремо, так і в їх поєднанні оцінювали на культурі клітин епітеліального походження HeLa з використанням МТТ-тесту згідно з методом [10] у власній модифікації. Принцип методу полягає в тому, що відбувається реакція відновлення клітинами в культурі тетразолієвого барвника МТТ (3,4,5-диметилтіазол-2,5-дифенілтетразоліум броміду) з МТТ-формаза-ном, інтенсивність якого відображає ступінь життєздатності клітин у результаті відновлення барвника мітохондріальними, а також частково цитоплазматичними дегідрогеназами.

Клітини-мішені епітеліального походження HeLa в концентрації $2,5 \times 10^5$ кл/мл вносили у 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°C). Гіпоксію різної тривалості викликали внесенням у середовище інкубації клітин розчину хлориду кобальту в кінцевій концентрації 250 мкмоль/л і культивували протягом 12 та 24 год. [4].

На початку проведення аналізу інкубаційне середовище відбирали, а клітини промивали фосфатно-сольовим буфером PBS (англ. Phosphate buffered saline, $\text{pH} = 7,4$) та проводили інкубування (аплікацію) клітин з досліджуваними препаратами протягом 5 та 10 хв. Після цього клітини промивали буфером PBS, додавали по 100 мкл розчину МТТ (M5655, Sigma-Aldrich, США) у концентрації 1 мг/мл у натрій-фосфатному буфері PBS і культивували протягом 4 год. при 37°C . Для вибору оптимальної концентрації розчину хлориду кобальту, яка викликає гіпоксію епітеліальних клітин, досліджували його вплив на клітини, зробивши серію розведень, вносили його безпосередньо в нове культуральне середовище та інкубували в ньому клітини протягом 12 год., при цьому аплікацію не проводили. 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. Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми Microsoft Excel 2010. Результати представлені у вигляді $M \pm m$, 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

Для визначення ефективності розробленої фармакологічної композиції, а саме її антигіпоксичних властивостей, необхідно було індукувати гіпоксію у клітинах епітеліального походження HeLa в експерименті. Згідно з даними літературних джерел, для експериментального моделювання умов, наближених до гіпоксичного стану, використовують розчин хлориду кобальту, оскільки вважають його одним з ефективних агентів, за допомогою якого можна викликати гіпоксію при дослідженні клітин [8, 9, 12].

Для встановлення оптимальної концентрації розчину хлориду кобальту, який викликає стан гіпоксії, але не призводить до значної загибелі клітин, було досліджено його вплив у межах концентрацій у 50–450 мкмоль/л на життєздатність клітин HeLa за умов інкубації 12 год. Як свідчать представлені на рис. 1 дані, розчин хлориду кобальту при внесенні його в інкубаційне середовище в межах концентрацій 50–200 мкмоль/л не призводив до повної загибелі досліджуваних клітин лінії HeLa. Однак, починаючи з його концентрації 250 мкмоль/л і вище, спостерігалася часткова загибель клітин, яка прямо пропорційно посилювалася у міру зростання концентрації хлориду кобальту, що свідчить про розвиток гіпоксії.

Отже, для визначення антигіпоксичної дії досліджуваної фармакологічної композиції та її складових було вирішено використовувати розчин хлориду кобальту в концентрації 250 мкмоль/л, який викликає гіпоксію та призводить до часткової, але не тотальної загибелі епітеліальних клітин.

У першій частині експериментального дослідження було розроблено нову фармакологічну композицію місцевої дії для комплексного лікування хворих на генералізований пародонтит, яка має цитопротекторну дію на епітеліальні клітини, та обґрунтовано вибір оптимальних концентрацій, еквівалентних співвідношень і часу експозиції [1].

Для визначення ефективності розробленої фармакологічної композиції, а саме її антигіпоксичних властивостей, було проведено МТТ-тест при інкубації епітеліальних клітин зі створенням умов гіпоксії хлоридом кобальту протягом 12 год. Дані свідчать, що почала розвиватись гіпоксія, однак рівень її був незначним. У цих умовах не було виявлено достовірної різниці у впливі ні окремо Цитофлавіну, ні Метрогілу із Хлоргексидином, ні фармакологічної композиції із трьох препаратів в обидва строки експозиції аплікації препаратів (5 і 10 хв.). Однак навіть при цьому рівень життєздатності епітеліальних клітин при аплікації фармакологічної композиції є кращим у порівнянні з контролем кобальт-індукованої гіпоксії (рис. 2).

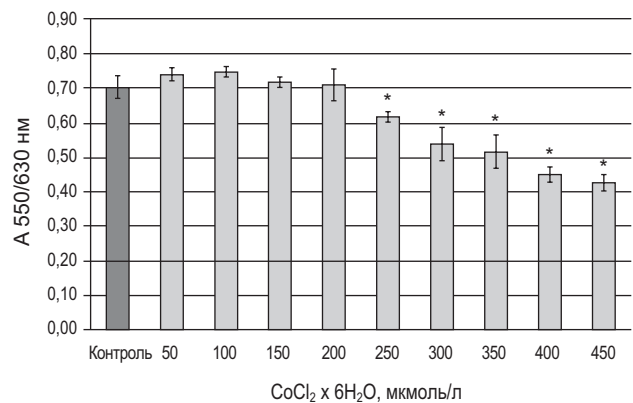


Рис. 1. Вплив хлориду кобальту у межах концентрацій 50–450 мкмоль/л на життєздатність клітин HeLa в умовах інкубації 12 год, $M \pm m$.

Примітка: * – $p < 0,05$ відносно контролю.

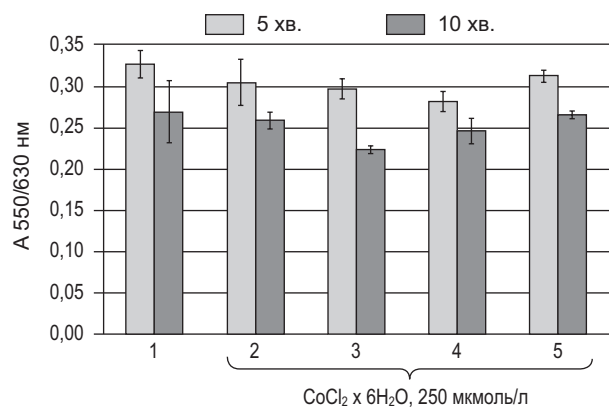


Рис. 2. Вплив препаратів Метрогіл, Хлоргексидин і Цитофлавін на життєздатність клітин HeLa в умовах кобальт-індукованої гіпоксії (12 год.) при аплікації 5 і 10 хв., $M \pm m$.

Умовні позначення:

- 1 – контроль; 2 – CoCl_2 -індукована гіпоксія; 3 – Цитофлавін;
- 4 – Метрогіл + Хлоргексидин + фіз. Розчин як 1:1:8;
- 5 – фармакологічна композиція.

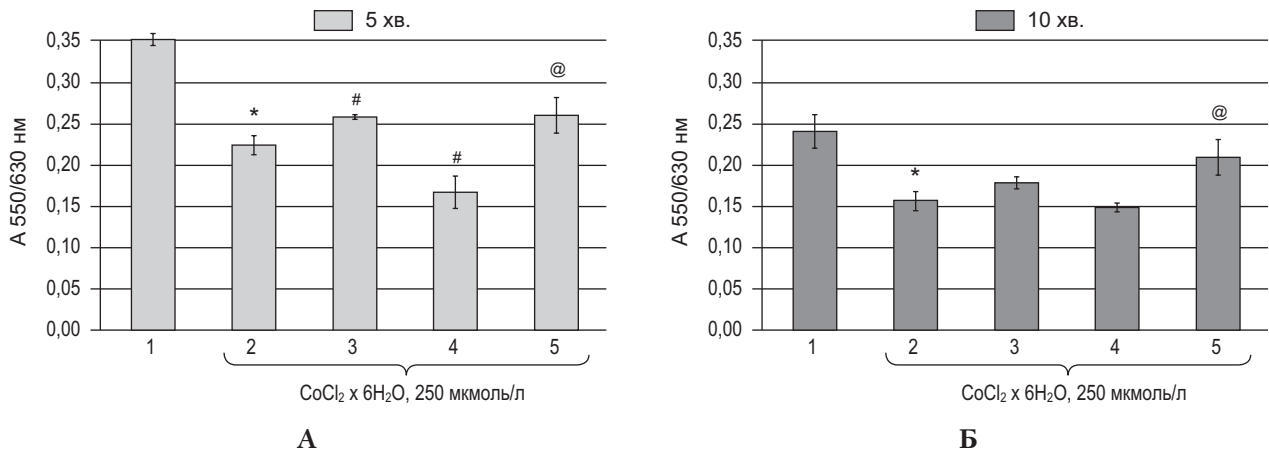


Рис. 3. Вплив препаратів Метрогіл, Хлоргексидин і Цитофлавін на життєздатність клітини HeLa в умовах кобальт-індукованої гіпоксії (24 год.) при аплікації 5 (А) та 10 хв. (Б), М±m.

Умовні позначення:

1 – контроль; 2 – CoCl₂-індукована гіпоксія; 3 – Цитофлавін; 4 – Метрогіл + Хлоргексидин + фіз. Розчин як 1:1:8; 5 – фармакологічна композиція.

Примітки: * – p < 0,05 відносно контролю; # – p < 0,05 відносно CoCl₂-індукованої гіпоксії;

@ – p < 0,05 відносно аплікації композиції Метрогіл + Хлоргексидин + фіз. розчин.

Тому доцільним було збільшити строк створення умов гіпоксії до 24 год. Така часова експозиція призвела до розвитку гіпоксії, при якій кількість живих клітин знизилась на 37–38 % в обидва строки часу експозиції аплікації. Ці дані відображені на рис. 3 (А, Б; стовпчики 2). На рис. 3 (А, Б; стовпчики 3) наведені результати дослідження окремо препарату «Цитофлавін». Дані свідчать, що він має виражену антигіпоксичну дію, оскільки кількість живих епітеліальних клітин зростає на 12–17 % у порівнянні з контроль-гіпоксією в обидва строки часу експозиції аплікації (5 і 10 хв.) відповідно. На рис. 3 (А, Б; стовпчики 4) наведені результати дослідження препаратів «Метрогіл» із Хлоргексидином і фізрозчином у співвідношенні 1:1:8 відповідно. При цьому було виявлено їх значну токсичну дію на клітини. На рис. 3 (А, Б; стовпчики 5) наведені результати дослідження розробленої фармакологічної композиції із трьох препаратів. Отримані дані демонструють збільшення кількості живих епітеліальних клітин лінії HeLa в обидва строки часу експозиції аплікації, що свідчить про значну антигіпоксичну ефективність в умовах гіпоксії. Таким чином, при часі експозиції аплікації 5 хв. кількість живих клітин збільшилась на 12 %, а при часі експозиції 10 хв. – на 25 %. Експериментальні дані свідчать про значні антигіпоксичні властивості фармакологічної композиції на культурі епітеліальних клітин в умовах гіпоксії.

Ці дослідження можуть стати основою для створення нових ефективних фармакологічних композицій у комплексному лікуванні захворювань пародонту. Ретельно проаналізувавши отримані дані, можна вважати, що створена фармакологічна композиція має не тільки цитопротекторну та відновлювальну дію на клітини епітеліального походження, а й антимікробну та протипро-

тозоїну завдяки сумісному застосуванню трьох препаратів у відповідному співвідношенні. Фармакологічна композиція має також значну антигіпоксичну дію в умовах розвитку гіпоксії. Не виключено, що саме наявність у складі композиції препарату «Цитофлавін» сприяє регенерації, відновлює функціональну активність досліджуваних епітеліальних клітин і запобігає їх загибелі. Оптимальна тривалість аплікації становить 5–10 хв. Саме протягом такого строку препарати, що входять у склад створеної фармакологічної композиції, будуть проявляти оптимальну позитивну лікувальну дію на епітеліальні клітини в умовах гіпоксії.

Висновки

1. Установлено, що розчин хлориду кобальту викликає стан гіпоксії на клітинній лінії HeLa при його концентрації понад 250 мкмоль/л. Незначна гіпоксія та загибель клітин розвиваються вже в умовах інкубації клітин протягом 12 год. Більш значна гіпоксія має місце при збільшенні строку інкубації до 24 год.
2. Експериментально встановлено, що в умовах створення кобальт-індукованої гіпоксії на епітеліальні клітини розроблена нова фармакологічна композиція місцевої дії для комплексного лікування хворих на генералізований пародонтит, у склад якої входять протимікробний, протипрозоїдний та антигіпоксичний препарати метаболічного типу дії, має антигіпоксичні властивості.
3. Обґрунтовано вибір оптимальних концентрацій, еквівалентних співвідношень і часу експозиції протимікробного, протипрозоїдного та антигіпоксичного препаратів у новій фармакологічній композиції, яка має цитопротекторну та антигіпоксичну дію на епітеліальні клітини.

ЛІТЕРАТУРА

1. А.В. Борисенко, Т.М. Кучеровська, І.А. Воловик. Обґрунтування використання нового засобу місцевої дії в комплексному лікуванні генералізованого пародонтиту (експериментальне дослідження) // Современная стоматология. – 2016. – № 2. – С. 116–119.
 2. Artese L., Piattelli A., de Gouveia Cardoso L.A., Ferrari D.S., Onuma T., Piccirilli M., Favari M., Perrotti V., Simion M., Shibli J.A. Immunoeexpression of angiogenesis, nitric

oxide synthase, and proliferation markers in gingival samples of patients with aggressive and chronic periodontitis // Journal of Periodontology. – 2010. – V. 81, № 5. – P. 718–726.
 3. Da Rocha H.A., Silva C.F., Santiago F.L., Martins L.G., Dias P.C., De Magalhães D. Local Drug Delivery Systems in the Treatment of Periodontitis: A Literature Review // J. Int. Acad. Periodontol. – 2015. – V. 17, № 3. – P. 82–90.

4. Goel R.K., Bagga P. Cobalt chloride induced cytotoxic cerebral hypoxia: A new experimental model to study neuroprotective effect // J. Pharm. Educ. Res. – 2010. – В. 1, № 2. – P. 88–95.
5. Greijer A.E., Vanderwall L.E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis // J. Clin. Pathol. – 2007. – V. 57. – P. 1009–1014.
6. Götz L., Memmert S., Rath-Deschner B., Jdger A., Appel T., Baumgarten G., Götz W., Frede S. Hypoxia and P. gingivalis synergistically induce HIF-1 and NF- κ B activation in PDL cells and periodontal diseases // Mediators Inflamm. – 2015: 438085, doi: 10.1155/2015/438085.
7. Huang L.E., Bunn H.F. Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278. – P. 19575–19578.
8. Kong D., Zhang F., Shao J., Wu L., Zhang X., Chen L., Lu Y., Zheng S. Curcumin inhibits cobalt chloride-induced epithelial-to-mesenchymal transition associated with interference with TGF- β /Smad signaling in hepatocytes // Lab. Invest. – 2015. – V. 95, № 11. – P. 1234–1245, doi: 10.1038/labinvest.2015.107.
9. Li G., Zhao Y., Li Y., Lu J. Up-Regulation of Neuronal Nitric Oxide Synthase Expression by Cobalt Chloride Through a HIF-1 α Mechanism in Neuroblastoma Cells // Neuromolecular Med. – 2015. – V. 17, № 4. – P. 443–453, doi: 10.1007/s12017-015-8373-7.
10. 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.
11. Pugh C.W., Ratcliffe P.J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system // Nat. Med. – 2003. – V. 9. – P. 677–684.
12. Rath S., Anand A., Ghosh N., Das L., Kokate S.B., Dixit P., Majhi S., Rout N., Singh S.P., Bhattacharyya A. Cobalt chloride-mediated protein kinase C α (PKC α) phosphorylation induces hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α) in the nucleus of gastric cancer cell // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2016. – V. 471, № 1. – P. 205–212, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.140.
13. Semenza G.L. Life with oxygen // Science. – 2007. – V. 318. – P. 62–64.
14. Wong R.M., Ng S.K., Corbet E.F., Keung Leung W. 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.

Обоснование использования нового средства местного действия в комплексном лечении генерализованного пародонтита (экспериментальное исследование, часть 2)

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

Цель: обосновать выбор фармакологической композиции местного действия для комплексного лечения больных на генерализованный пародонтит в условиях экспериментальной гипоксии.

Методы. Для проведения экспериментального исследования была использована фармакологическая композиция. В клетках индуцировали гипоксию хлоридом кобальта в конечной концентрации 250 мкмоль/л и культивировали 12 и 24 часа. Антигипоксическое действие фармакологической композиции оценивали на культуре клеток линии HeLa с использованием МТТ-теста.

Результаты. На клеточной линии HeLa хлорид кобальта вызывал состояние гипоксии при длительности действия 12 и 24 часа и при концентрации свыше 250 мкмоль/л. При этих условиях разработанная фармакологическая композиция демонстрирует увеличение количества живых клеток при обоих строках времени экспозиции аппликации. При 24-часовых условиях гипоксии и времени экспозиции аппликации 5 мин. количество живых клеток увеличилось на 12 %, а при 10 мин. – на 25 %. Данные свидетельствуют о значительной антигипоксической эффективности фармакологической композиции в условиях гипоксии.

Вывод. Обосновано выбор фармакологической композиции местного действия для комплексного лечения больных на генерализованный пародонтит, которая имеет антигипоксические свойства в условиях гипоксии в эксперименте.

Ключевые слова: генерализованный пародонтит, жизнеспособность эпителиальных клеток, гипоксия, препараты, фармакологическая композиция, эксперимент.

The rationale for the use of the new remedy of local action in complex treatment of generalized periodontitis (experimental study, part 2)

A. Borisenko, T. Kuchmerovska, I. Volovyk

Aim. To substantiate the choice of a pharmacological composition of local action for the complex treatment of patients with generalized periodontitis in the conditions of experimental hypoxia.

Material and methods. For the experimentally study was used pharmacological composition. In cells induced hypoxia by cobalt chloride at a final concentration of 250 μ mol/l, and cultured for 12 and 24 hours. Antihypoxic action of the pharmacological composition was evaluated in cell culture the HeLa line by utilizing MTT-Test.

Results. At the cellular line HeLa cobalt chloride caused a state of hypoxia when the duration of 12 and 24 hours and at concentrations above 250 μ mol/L. Under these conditions, the pharmacological composition demonstrates an increase in the number of living cells in both terms of time of exposure of the application. With 24 time zones, hypoxia and exposure time of application 5 min the number of living cells increased by 12 %, and at 10 min – 25 %. Data establish significant antihypoxic efficiency of pharmacological compositions in conditions of hypoxia.

Conclusions. It substantiates the choice of a pharmacological composition of local action for the complex treatment of patients with generalized periodontitis, which has antihypoxic properties in the conditions of the experimental hypoxia.

Key words: generalized periodontitis, viability of the epithelial cells, hypoxia, preparations, pharmacological 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.