

## Системна токсична дія ендогерметиків на нервову тканину за умов їх прямого впливу *in vitro*

О.А. Значкова<sup>1</sup>, І.В.Лушнікова<sup>2</sup>, Г.Г.Скібо<sup>2</sup>, М.Ю.Антоненко<sup>1</sup>, Н.В.Войтенко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, Київ;

<sup>2</sup>Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: nana@biph.kiev.ua

*Досліджено безпосередній вплив матеріалів для пломбування корневих каналів in vitro на культивовані зрізи нервової тканини, зокрема гіпокампа. За результатами досліджень до групи матеріалів з мінімальним токсичним ефектом віднесено резилонові штифти, ендогерметики AH-Plus та acroseal, до групи з вираженим нейротоксичним впливом – матеріали RealSeal та foredent. За ступенем підвищення токсичності дослідні матеріали можна розподілити наступним чином: резилонові штифти < AH-Plus < acroseal < RealSeal < foredent. Результати роботи можуть бути використані як рекомендації стоматологам щодо вибору ендогерметиків з урахуванням їх нейротоксичних властивостей для запобігання небажаних ускладнень.*

*Ключові слова: ендогерметики, цитотоксичний вплив, культивовані зрізи гіпокампа.*

### ВСТУП

Ендодонтичне втручання – складна мікрохірургічна операція, яка потребує від лікаря глибоких знань та високого рівня мануальних навичок у володінні обраною методикою [1]. Втілення в практичну стоматологію новітніх технологій інструментального формування та очищення корневих каналів зубів, методик їх пломбування сприяло значному підвищенню якості ендодонтичного лікування як органозберігаючого втручання [2]. Результат великою мірою залежить від матеріалів для obturaції. Ідеальний герметик кореневого каналу повинен мати такі якості: оптимальну щільність, стабільне розширення, тривалий час полімеризації, не розчинність в тканинних рідинах, адекватну адгезію до стінок каналу і біосумісність [3–5]. Незважаючи на успіхи, які притаманні сучасній ендодонтії, достатньо гостро стоїть питання про якість ендогерметиків. Як свідчать дані літератури, питома вага ускладнень ендодонтичних втручань залишається досить високою [6].

Нині одним з поширених ускладнень ендодонтичних втручань є вивільнення пломбувального матеріалу за межі анатомічної

верхівки кореня зуба в періапикальній тканині, здорову кісткову тканину та сусідні анатомічні зони – канал щелепи та зону ментального отвору [7]. Це може бути зумовлено не тільки помилками на етапах ендодонтичного втручання та відсутністю рентгенологічного контролю, але й з особливостями будови щелепи та співвідношенням площі кореня зуба та каналу [8]. Надлишкове виведення пломбувального матеріалу в періапикальній тканині чи сусідні анатомічні зони зустрічається в багатьох випадках ускладнень ендодонтичних втручань [9].

Безпосередній контакт ендогерметика з альвеолярним нервом зумовлює механічну та хімічну подразнювальну дію нервових волокон та призводить до розвитку стійкого больового синдрому, запальних процесів кісткової тканини, компресійно-токсичної невропатії з різним ступенем втрати функції нервового апарату [10, 11]. Це викликає низку фізіологічних і морфологічних змін у тканинах щелепно-лицевої ділянки, що у певних випадках може потребувати хірургічного втручання або видалення причинного зуба [12, 13].

© О.А. Значкова, І.В.Лушнікова, Г.Г.Скібо, М.Ю.Антоненко, Н.В.Войтенко

Цитотоксичні властивості герметиків для кореневого каналу можна оцінювати проведенням лабораторних досліджень. Відомо, що більшість силерів, які використовуються в сучасній ендодонтії, є токсичними. Їх вплив на навколишні тканини та організм загалом, зумовлений активними хімічними речовинами у складі ендogerметика, які деякий час після замішування знаходяться в стадії полімеризації [14]. Ендogerметики є сильними подразниками перерадікулярних тканин та алергенами, а їх дія може приводити до негативних реакцій різного характеру та ступеня [15]. Водночас відсутні експериментальні дані щодо прямого впливу ендogerметиків на нервову тканину. Метою нашого дослідження було вивчення нейротоксичного впливу пломбувальних матеріалів для корневих каналів в умовах *in vitro* з використанням культивованих зрізів нервової тканини.

## МЕТОДИКА

Усі експериментальні процедури проводилися згідно з нормами Комітету з біоетики тварин Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України і вони відповідали директивам європейської комісії (86/609/ЕЕС). Були докладені всі зусилля для зменшення страждання тварин та мінімізування їх кількості. При проведенні усіх маніпуляцій дотримувалися умов антисептики та асептики.

Дослідження нейротоксичності ендogerметиків *in vitro* проведено на органотиповій культурі нервової тканини, а саме з використанням культивованих зрізів гіпокампа, які зберігають цитоархітектоніку відповідної ділянки мозку та основні зв'язки між клітинами та їх відростками, характерні для мозкової тканини *in vivo*. Цей об'єкт широко використовується для експериментальних досліджень в фізіологічних умовах, а також для моделювання і вивчення патологічних процесів *in vitro* [16, 17]. Уніфіковані системи посадки матеріалу та його експозиції дають змогу отримати і оцінити відтворені

результати, які придатні для кількісного аналізу.

Для отримання зрізів гіпокампа використовували щурів 7-добового віку. За допомогою автоматичного чопера (McIlwain, Англія) було зроблено зрізи товщиною 350 мкм. Їх культивували за методом Stoppini [18] на напівпроникних мембранах, які розміщували на межі газового (суміш атмосферного повітря з 5% CO<sub>2</sub>) та рідкого середовищ (50% MEM – Minimum Essential Medium, 25% збалансованого сольового розчину Хенкса, 25% термічно-інактивованої кінської сироватки, рН 7,3) при +35°C. Середовище культивування замінювали на другий день інкубації, далі двічі на тиждень. Через 12-14 діб *in vitro* стан культур стабілізувався і вони ставали придатними до експериментів.

Життєздатність культивованих зрізів оцінювали за допомогою флуоресцентного барвника йодиду пропідіуму (ЙП) [16, 17]. Відомо, що він проходить через плазматичну мембрану клітин у разі її пошкодження та взаємодіючи з ДНК проявляє червону флуоресценцію. Кількість забарвлених клітин обернено пропорційна життєздатності культур. ЙП додавали до культурального середовища у кінцевій концентрації 10 мкмоль/л та проводили прижиттєвий підрахунок кількості забарвлених нейронів у межах прямокутної зони фіксованого розміру 1 мм<sup>2</sup> за допомогою флуоресцентного мікроскопа “Ломо” (збільшення у 200 разів).

Для вивчення прямого впливу ендogerметиків на нервову тканину було відібрано найбільш поширені в повсякденній стоматологічній практиці силери: foredent («Спофа», Чехія), AN-Plus («Dentsply», США), acroseal («Septodont», Франція), RealSeal («SybronEndo», США), резилонові штифти RealSeal № .06/.45. Всього було проаналізовано 60 культур, в тому числі контрольні, в які ендogerметики не додавали.

Проведено дві серії дослідів. В першій серії оцінювали швидкість полімеризації та рН середовища за наявності силеру. Матеріали,

що підлягали тестуванню (acroseal, AN-Plus, foredent, RealSeal) змішували на спеціальних планшетах згідно з інструкцією для кожного ендогерметика та вносили до планшетів з середовищем культивування, але без тканинних зрізів. У стерильних умовах досліду точно дозувати пломбувальний матеріал складно, тому об'єм силери, який додавали до культурального середовища, становив 1–3 мм<sup>3</sup>. Швидкість полімеризації оцінювали через 2, 4 та 24 год. Аналіз рН середовища проводили одразу після внесення ендогерметика до культурального середовища, через 2 та 4 год. У другій серії дослідів оцінювали нейротоксичний вплив ендогерметиків за схемою, зображеною на рис. 1.

Досліджувальні матеріали (acroseal, AN-Plus, foredent, RealSeal, резилоніві штифти) вносили у середовище культивування з органотиповою культурою відразу після змішування та через 24 год після остаточної полімеризації. Певний час полімеризації, закладений виробником, забезпечує комфортну роботу лікаря на етапі obturaції кореневого каналу, але хімічні складові ендогерметика можуть зумовлювати значний токсичний вплив на тканини, з якими він контактує. Вищезазначені пломбувальні матеріали були досліджені трічі кожний, що відповідає вимогам дослідження *in vitro*.

Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення “Origin Pro8.5” (“OriginLab Corporation” США). Вибірка результатів отримана з 3 експериментів наведені у вигляді середнього арифметичного ( $n=10$ ) у кожній експериментальній групі

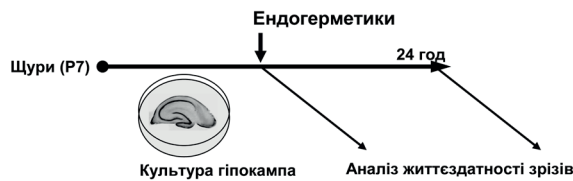


Рис. 1. Схема експерименту для дослідження впливу ендогерметиків на життєздатність нервових клітин органотипової культури гіпокампа

± стандартна похибка середнього (SEM). Результати характеризувалися нормальним розподілом, статистична вірогідність різниць визначалась з використанням Tukey-тесту (ANOVA), відмінності вважалися достовірними при  $P<0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під час експериментальних досліджень найбільш швидку полімеризацію виявили у матеріалу acroseal. Вона становила менше ніж 2 год, що відповідає інструкції використання від виробника. Швидкість полімеризації ендогерметика AN-Plus була в межах від 2 до 4 год, що також збігається з протоколом використання ендогерментика. Повільну полімеризацію в умовах культурального середовища спостерігали у силера RealSeal – вона становила понад 4, але менше 24 год. Найбільш повільну полімеризацію виявили у пломбувального матеріалу foredent, яка становила більше ніж 24 год. Через добу консистенція внесеного до культурального середовища матеріалу залишалася пастоподібною (таблиця).

Показано, що силери acroseal та AN-Plus не приводить до зміни рН середовища культивування, який у контролі був 7,3. При введенні до культурального середовища ендогерметика foredent, рН різко зменшувалося та становило  $5,35\pm 1,2$  ( $P<0,01$ ). За наявності RealSeal у середовищі культивування рН суттєво збільшувалося та становило  $8,04\pm 2,5$  ( $P<0,01$ ). На рис. 2 представлені графічні результати змін рН культурального середовища у часі за наявності ендогерметиків.

Досліджено вплив ендогерметиків на стан нервової тканини. У контролі забарвлення культивованих зрізів гіпокампа ЙП було практично відсутнім, що свідчить про високу життєздатність культур на період проведення експерименту.

У пломбувального матеріалу AN-Plus при внесенні його до планшета з органотиповою культурою відразу або через 4 год після

**Швидкість полімеризації досліджуваних ендogerметиків**

| Ендogerметики | acroseal        | АН-Plus | RealSeal  | foredent          |
|---------------|-----------------|---------|-----------|-------------------|
| 1-й дослід    | Менше ніж 2 год | 2–4 год | До 24 год | Більше ніж 24 год |
| 2-й дослід    | 2 год           | 2–4 год | 24 год    | Більше ніж 24 год |
| 3-й дослід    | Менше ніж 2 год | 2–4 год | До 24 год | Більше ніж 24 год |

змішування (до полімеризації), кількість забарвлених клітин становила  $9,2 \pm 2,0$ , а при додаванні матеріалу через 24 год після замішування (термін остаточної полімеризації) –  $3,2 \pm 1,1$  (рис. 3). В серії з вивчення впливу ендogerметика acroseal було виявлено  $14,0 \pm 1,9$  забарвлених нервових клітин при внесенні ендogerметика до полімеризації та  $5,0 \pm 1,1$  – через 24 год від моменту замішування. У разі наявності в культуральному середовищі ендogerметика RealSeal відразу після замішування цей показник становив  $47,0 \pm 3,2$ , а після полімеризації (через 24 год) –  $40,0 \pm 2,1$ . Тестування пломбувального матеріалу foredent показало такі результати: відразу після замішування –  $51,0 \pm 4,6$ , а через 24 год –  $42,1 \pm 2,9$ . Штифти полімеризуються в умовах виготовлення. При їх наявності у середовищі, кількість забарвлених клітин становила  $6,3 \pm 1,3$ .

Як видно на рис. 3, усі матеріали, при дослідженні їх впливу до полімеризації, проявляли цитотоксичну дію на життєздатність нейронів по-різному. Ендogerметики, які тестували після полімеризації, мали менш ви-

ражену нейротоксичність. За впливом на життєздатність нейронів ендogerметики умовно розподілили на матеріали, що мають пригнічувальний або надмірно пригнічувальний вплив. Якщо різниця в кількості забарвлених нейронів був дещо більшим, ніж у контролі, вважали, що матеріал має пригнічувальний вплив. Якщо забарвлення клітин було значно більшим щодо контролю – надмірно пригнічувальний вплив. До 1-ї групи віднесено резилонові штифти, ендogerметики АН-Plus та acroseal, до 2-ї групи – матеріали RealSeal та foredent. За ступенем підвищення токсичності дослідні матеріали можна розподілити наступним чином: резилонові штифти < АН-Plus < acroseal < RealSeal < foredent.

Вивчення нейротоксичності ендogerметиків із використанням методу культивованих зрізів гіпокампа є зручною та ефективною методикою, яка, внаслідок стандартизації умов дослідження, дає змогу отримати результати для порівняння впливів різних силерів. Цю модель можна рекомендувати як тест-систему для контролю нейротоксичних властивостей

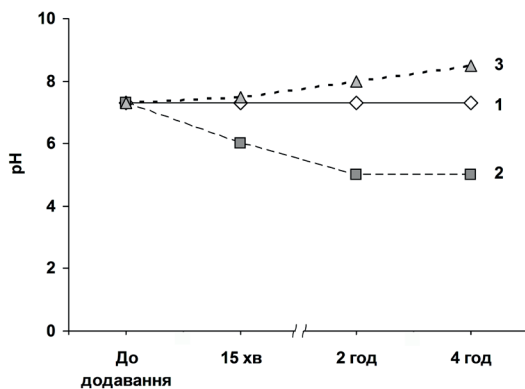


Рис. 2. Зміни рН бікарбонатного буфера (1) при додаванні до нього ендogerметиків foredent (2) та RealSeal (3)

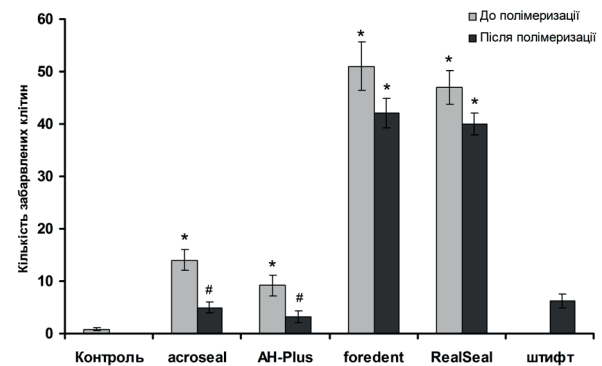


Рис. 3. Вплив ендogerметиків на життєздатність нейронів в умовах експериментальної моделі. \*  $P < 0,05$  порівняно з контролем, \*\*  $P < 0,05$  порівняно з впливом неполімеризованих матеріалів

інших ендогерметиків, що дає можливість оптимізувати результати ендодонтичного лікування та запобігти небажаних ускладнень.

Узагальнюючи отримані результати щодо прямого впливу ендогерметиків на нервову тканину можна сказати, що пломбувальний матеріал на основі параформальдегіду foredent має найбільш виражений нейротоксичний ефект, низьку швидкість полімеризації та призводить до зміни кислотно-лужної рівноваги середовища в кислий бік. Для практичного застосування найбільш доцільно, але з певною обережністю, дотримуючись протоколу лікування щодо рівня obturaції кореневого каналу, використовувати силери acroseal, AH-Plus та резилонові штифти. На нашу думку, слід відмовитися від використання ендогерметиків foredent та RealSeal. Аналіз отриманих результатів щодо фізико-хімічних властивостей ендогерметиків дає змогу припустити, що виражений токсичний вплив ендогерметиків на нервову тканину може бути однією з патофізіологічних складових у розвитку невропатії як ускладнення ендодонтичного лікування.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.*

**О.А. Znachkova<sup>1</sup>, I.V. Lushnikova<sup>2</sup>, G.G. Skibo<sup>2</sup>, M.Y. Antonenko<sup>1</sup>, N.V. Voitenko<sup>2</sup>**

#### **SYSTEMIC TOXIC ACTION OF DENTAL SEALANTS ON NERVOUS TISSUE IN THE CONDITION OF THEIR DIRECT INFLUENCE *IN VITRO***

Here we present the results of *in vitro* studies of the direct effect of various dental sealants on cultured hippocampus slices. According to the results of the study, the materials can be divided in two groups - with the minimum toxic effect (resin nails, AH-Plus and acroseal), and with pronounced neurotoxic effects (RealSeal and foredent). By the degree of toxicity, the

test materials can be distributed as follows: resin pins<AH-Plus<acroseal<RealSeal<foredent. The results of the work can be used as recommendations for dentists to choose the dental sealants according to their neurotoxic properties to prevent unwanted complications.

Key words: dental sealants, cytotoxic effect, cultured sections of the hippocampus.

<sup>1</sup>*Bogomolets National Medical University;*

<sup>2</sup>*Bogomolitz Institute of Physiology NASU;*

*e-mail: nana@biph.kiev.ua*

**Е.А.Значкова<sup>1</sup>, И.В.Лушников<sup>2</sup>, Г.Г.Скибо<sup>2</sup>, М.Ю.Антоненко<sup>1</sup>, Н.В.Войтенко<sup>2</sup>**

#### **СИСТЕМНОЕ ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭНДОГЕРМЕТИКОВ НА НЕРВНУЮ ТКАНЬ ПРИ ИХ ПРЯМОМ ВОЗДЕЙСТВИИ *IN VITRO***

В данной работе изложены результаты исследований непосредственного воздействия материалов для пломбирования корневых каналов *in vitro* на культивируемые срезы нервной ткани. По результатам исследований к группе материалов с минимальным токсическим эффектом отнесены резилоновые штифты, эндогерметики AH-Plus и acroseal, в группу с выраженным нейротоксичным влиянием - материалы RealSeal и foredent. По степени повышения токсичности исследовательские материалы можно разделить следующим образом: резилоновые штифты<AH-Plus<acroseal<RealSeal<foredent. Результаты работы могут быть использованы в качестве рекомендаций стоматологам, по выбору эндогерметиков с учетом их нейротоксических свойств, для предотвращения нежелательных осложнений.

Ключевые слова: эндогерметики, цитотоксическое влияние, культивированные срезы гиппокампа.

#### **REFERENCES**

1. Gansler W. Endodontic treatment - opportunities and limitations. Moscow: Novoe v stomatologii. 2010;5:12-27. [Russian].
2. Orstavik D. Materials used for root canal obturation: technical, biological and clinical testing. Endod Topics. 2005;12:25-38.
3. Gansler W. Filling root canals using heated gutta percha and technology of thermoplastic vertical condensation. Moscow: Novoe v stomatologii. 2006;7:28-48. [Russian].
4. Borisenko A, Polozov D, Dubok V. [Material for filling the root canals of teeth. Modern dentistry. 2003;4:15-6. [Russian].
5. Grossman LI. Endodontic Practice. Philadelphia: Henry Kimpton Publishers. 1981. 297 p.
6. Golovchanska O. Severe complications of root canal filling of the teeth, causes of occurrence, features of the clinic,



- treatment and prevention. Cand Med Sci. Kyiv. 2006. 20 p. [Ukrainian].
7. Politun A, Besharova T, Golovchanska O, Levchenko G. Removal of sealing materials beyond the root canal teeth as a serious complication of endodontic treatment. Bull Ukr Endod Association. 2007;2(3):4-5. [Ukrainian].
  8. Anderson L, Kosinski T. A review of the intraosseous course of the nerves of the mandible. J Oral Implantology. 2011;17:394-403.
  9. Levchenko G. Evaluation of the effectiveness of endodontic treatment with improved preparation of root canal teeth. Cand Med Sci. Kyiv. 2003. 20 p. [Ukrainian].
  10. Alves F, Coutinho M, Gonçalves L. Endodontic-related facial paresthesia: systematic review. J Can Dent Assoc. 2014;80-92.
  11. Astahova V, Panchenko L, Golovchanska A. Application of the method of cloning human bone marrow stromal cells for the study of (in vitro) direct action of endogenous hermetics. An Mechnikov Institute. 2006;4:38-44. [Russian].
  12. Hirsch J, Henrikson P, Heyden G. Periapical surgery. Int J Oral Surg. 2009;8: 173-185.
  13. Sirak S, Arutyunov A, Schetinina E, Sirak A, Kopylova I, Avanesyan R Surgical treatment of odontogenic injuries of the inferior alveolar nerve after endodontic surgery. Res J Pharmaceutical, Biol and Chem Sciences. 2014;5(5):673-81.
  14. Hui-min Zh, Shen Y, Zheng W, Li L, Zheng Y, Haapasalo M. [Physical properties of five root canal sealers]. Modern Dentistry. 2014;3:14-21. [Russian].
  15. Giuliani M, Lajolo C, Deli G. Inferior alveolar nerve paresthesia caused by endodontic pathosis: A case report of the literature. Oral Surg Pathol. 2001;92:670-4.
  16. Lushnikova I, Voronin K, Malyarevskyy P, Skibo G. Morphological and functional changes in rat hippocampal slice cultures after short-term oxygen-glucose deprivation. J Cell Mol Med. 2004;8(2):241-8.
  17. Skibo G, Lushnikova I, Voronin K, Dmitrieva O, Novikova T, Klementiev B, Vaudano E, Berezin V, Bock E. Synthetic NCAM-derived peptide, FGL, protects hippocampal neurons from ischemic insult both in vitro and in vivo. Eur J Neurosci. 2005;22(7):1589-96.
  18. Stoppini L, Buchs P, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. J Neurosci Methods. 1991;37:173-82.

*Матеріал надійшов до редакції 09.10.2017*