

DOI: 10.18481/2077-7566-2017-13-3-10-13

УДК: 616.314-002-08

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ КОЛЛОИДНОГО РАСТВОРА СЕРЕБРА, ЯВЛЯЮЩЕГОСЯ КОМПОНЕНТОМ ПРОТРАВОЧНОГО ГЕЛЯ ETCHMASTER AG

Згожиньска Э., Вальчевска А.

Лодзинский медицинский университет, г. Лодзь, Польша

Аннотация

Предмет. Проблема лечения вторичного кариеса постоянных зубов остается, несмотря на достигнутый в последние годы прогресс восстановительных технологий. Активную роль в патогенезе вторичного кариеса играют бактерии, обладающие протеолитическим действием, которые разжижают коллагеновые волокна в дентинной матрице. Актуальность изучения цитотоксичности серебра, входящего в состав стоматологического протравочного геля, продиктована клиническими потребностями врачей-стоматологов. Исследование проведено с целью определения концентрации, которая безопасна и дает терапевтический эффект.

Цель работы — определить *in vitro* на фибробластах десны человека цитотоксичность коллоидного раствора серебра, являющегося компонентом протравочного геля ETCHMASTER Ag.

Методология. В эксперименте использовали линию десневых фибробластов человека, полученных во время хирургического удаления гипертрофированной части десны у пациентов с затруднением прорезывания нижних зубов мудрости. В качестве исследуемого материала использовали нанокolloидный раствор серебра, содержащий 250 ppm nAg, имеющего размер частиц в диапазоне от 6 до 12 нм. Его цитотоксичность оценивали по стандартам: PN-EN ISO 10993-1, 2010 «Биологическая оценка медицинских изделий: оценка и тестирование в процессе управления рисками»; PN-EN ISO 10993-5, 2009 «Исследование цитотоксичности *in vitro*»; PN-EN ISO 10993-12, 2012 «Подготовка образца и сравниваемых материалов».

Результаты. Линия фибробластов, полученная непосредственно с десны человека, больше, чем коммерческие линии клеток, подходит для тестирования цитотоксичности стоматологической продукции, так как наиболее близка цитофизиологически в условиях *in vitro* к натуральным клеткам организма.

Из графика, представляющего зависимость ингибирования редукции МТТ от концентрации nAg, видно, что 9,4 ppm nAg тормозит редукцию соли тетразолия на 50% (EC50) во время инкубации клеток с испытуемыми растворами nAg в течение 24 часов.

Выводы данного исследования раствора nAg показали, что в течение 24-часового контакта с клетками цитотоксическая концентрация составляет $\geq 8,3$ ppm.

Ключевые слова: эмаль, дентин, кариес, протравочный гель, серебро.

ASSESSMENT OF CYTOTOXICITY OF COLLOIDAL SILVER SOLUTION IS A COMPONENT OF GEL ETCHMASTER AG

E. Zgozhinska, A. Valchevska

Medical University of Łódź (Poland, Lodz)

Abstract

Background The problem of treatment of permanent teeth's secondary caries remains topical, despite of the progress of the recovery technologies in recent years. An active role in the pathogenesis of secondary caries is played by bacteria that have a proteolytic effect and that dilute collagen fibers in the dentine matrix.

Адрес для переписки:	Correspondence address:
АБДУЛИНА Юлия Николаевна 620109, г. Екатеринбург, ул. Токарей, д. 31. Тел. +7 912 223 92 75 E-mail: asjn28@rambler.ru	ABDULINA Yulia N. «Urals State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. 620028, Ekaterinburg, str. Tokarey, 31 +7 912 223 92 75 E-mail: asjn28@rambler.ru
Образец цитирования:	For citation:
Згожиньска Э., Вальчевска А. ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ КОЛЛОИДНОГО РАСТВОРА СЕРЕБРА, ЯВЛЯЮЩЕГОСЯ КОМПОНЕНТОМ ПРОТРАВОЧНОГО ГЕЛЯ ETCHMASTER Ag Проблемы стоматологии, 2017, т. 13, № 3, стр. 10–13 © Згожиньска Э. и др. 2017	Emilia Zgozhinska, Anna Valchevska ASSESSMENT OF CYTOTOXICITY OF COLLOIDAL SILVER SOLUTION IS A COMPONENT OF GEL ETCHMASTER AG The problems of dentistry, 2017. Vol. 13, № 3, pp. 10–13

Relevance of this study is dictated by the clinical needs of dentists. A study of the cytotoxicity of silver nanocolloid as a component with which a dental etching gel was enriched, was conducted to determine the concentration that is safe and gives a therapeutic effect.

Objective was to determine the cytotoxicity of the colloidal silver solution, which is a component of etchmaster Ag etching gel, in vitro on human gingival fibroblasts.

Methods. The experiment used a line of human gingival fibroblasts obtained during the surgical removal of the gingival's hypertrophied part of the patients which have a difficulty in eroding the lower wisdom teeth. A nanocolloid silver solution containing 250 ppm nAg and having a particle size in the range of 6 to 12 nm was used as the test material. The cytotoxicity of the silver nanocolloid solution was evaluated in accordance with the following standards: PN-EN ISO 10993-1: 2010 "Biological evaluation of medical devices: Evaluation and testing in the risk management process"; PN-EN ISO 10993-5: 2009 "In vitro cytotoxicity study"; PN-EN ISO 10993-12: 2012 "Preparation of sample and compared materials".

Results. The fibroblast line obtained directly from the human gingiva is more suitable than commercial cell lines, for testing the cytotoxicity of dental products, as it is cytophysiologically closer to the natural cells of the body in the condition in vitro.

According to the graph representing the inhibition of MTT reduction from nAg concentration, it is evident that 9.4 ppm nAg inhibits the reduction of the tetrazolium salt by 50% (EC50) during the incubation of the cells with the test nAg solutions for 24 hours.

Conclusions of this study of the nAg solution showed that during a 24-hour exposure to cells, the cytotoxic concentration is ≥ 8.3 ppm.

Keywords: enamel, dentin, cavity, etching gel, silver.

Введение

Проведено исследование цитотоксичности стоматологического протравочного геля, производителем которого является лаборатория стоматологической фармакологии «АРКОНА» под руководством Гжегожа Кальбарчик. Стоматологический протравочный гель ETCHMASTER Ag — единственный стоматологический материал на рынке, обладающий особенностью снижения скорости появления вторичного кариеса за счет уменьшения количества микроорганизмов в кариозной полости. Улучшенная формула протравочного геля наночастицами серебра размером от 6 до 12 нм при концентрации 5 ppm оказывает влияние на эффективность предотвращения образования краевой щели между тканями зуба и пломбой благодаря бактериостатическому действию на микроорганизмы, вызывающие кариес.

Цель проведенных исследований цитотоксичности нанокolloида серебра в качестве компонента протравочного геля — определение концентрации, которая безопасна и выше которой нанокolloидный раствор действует цитотоксично на клетки фибробластов десны человека.

Материалы и методы

В эксперименте использована линия фибробластов десны человека. Клетки выращивали в DMEM Дульбекко в модификации Дульбекко [Dulbecco's Modified Eagle Medium с 4,5 г/л D-глюкозы, 3,7 г/л NaHCO₃, пирувата натрия и стабильного глутамина (Biochrom AG)] с 10% FBS (эмбриональной бычьей сыворотки) и антибиотиков [пенициллин / стрептомицин (100 МЕ/мл /100 мг/мл) (Biochrom AG)] при температуре 37° С в инкубаторе для выращивания клеток в атмосфере с 5% CO₂. Среду в пластинах меняли каждые 2-3 дня. Через 8–10 дней, прошедших после помещения секции в чашки, фибробласты мигрировали из десневой ткани благодаря адгезии к поверхности используемого сосуда. Когда клетки покрыли приблизительно 50% поверхности используемого сосуда, ткань десны перенесли в новую чашку для культивирования, содержащую DMEM, 10% FBS и антибиотики, а клетки обработали трипсином с использованием камеры Бюркера и перенесли в колбы для инкубации. Перед введением кле-

точной линии в соответствии с PN-EN ISO 10993-5 (раздел 5) провели испытание на наличие микоплазм (Mycoprobe Mycoplasma Detection Kit (R&DSystem)).

Анализ MTT проводили на фибробласты десны прохода от 2 до 4, были получены от одного пациента и показали логарифмическую скорость деления. Регулярно проверяли морфологию клеток, измеряли поглощение при длине волны 570 нм в планшет-ридере. Жизнеспособность клеток (X) рассчитали в соответствии со следующей формулой:

$$X = (A_p/A_k) \times 100\%,$$

где A_p — среднее поглощение испытуемого образца; A_k — среднее поглощение контрольного образца.

MTT-анализ проводили в соответствии с PN-EN ISO 10993-5 (приложение C), инкубируя фибробласты с испытуемыми растворами в течение 24 часов. Данные рассчитывали с использованием статистической программы GraphPad v6 с минимум 6 повторениями для каждой концентрации NAG.

Результаты и их обсуждение

Протравочный гель ETCHMASTER Ag содержит наночастицы серебра размером от 6 до 12 нм, имеет форму геля с содержанием фосфорной кислоты 36–37% по массе. Окрашен в интенсивно синий цвет для того, чтобы был хорошо виден. Изделие содержит в своем составе коллоидное серебро в количестве 5 ppm.

Проведены многочисленные исследования in vitro и клинические испытания, направленные на проверку соответствия свойств и действий медицинского изделия основным требованиям и определение побочных действий, а также на оценку приемлемости создаваемого риска, учитывая назначение изделия и пользу для пациентов. Наносеребро добавлено в состав из-за его бактериостатического действия и это единственное изменение в составе по сравнению с исходной формулой геля, присутствующего на рынке с 1997 г.

В ходе проведенных исследований с использованием геля ETCHMASTER Ag 5 ppm не обнаружено никаких побочных реакций ни в пульпе, ни в мягких тканях, поверхность пломбы и краевое прилегание остались без изменений. Не обнаружены также побочные/

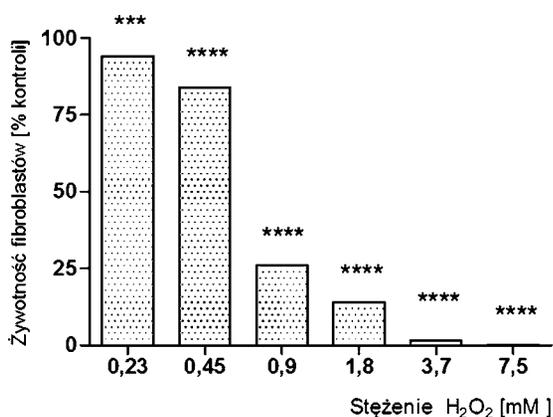


Рис. 1. График зависимости жизнеспособности десневых фибробластов от концентрации перекиси водорода, воздействующей на клетки в течение 2 часов (Zywotność fibroblastów – жизнеспособность фибробластов, Stężenie – концентрация).

Fig. 1. The graph of dependence of gingival fibroblasts' viability on the concentration of hydrogen peroxide which acts on the cells for 2 hours (Zywotność fibroblastów – the viability of fibroblasts, Stężenie – the concentration).

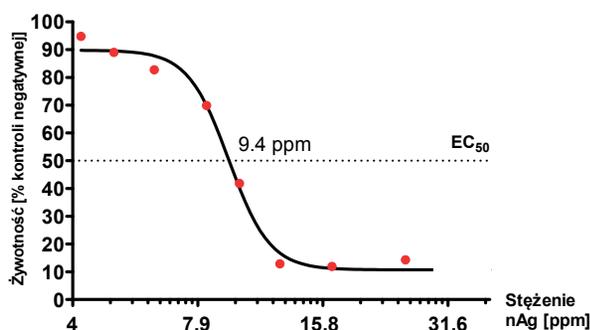


Рис. 2. Кривая зависимости концентрации nAg в диапазоне от 4,2 до 25 ppm и ингибирование редукции МТТ после 24-часовой инкубации фибробласты десны с растворами nAg.

Fig. 2. The curve of the dependence of the nAg concentration in the range from 4,2 to 25 ppm and the inhibition of MTT reduction after the 24-hour incubation of gingival fibroblasts with nAg solutions.

аллергические реакции ни у одного из исследователей, персонала или пациентов, имеющих контакт с протравочным гелем ETCHMASTER Ag. На основании критерия значимости (испытание разумной разности Тьюки, на уровне значимости $p < 0,05$) среднее число микроорганизмов после применения геля снизилось более чем в 7 раз.

Поэтому протравочный гель ETCHMASTER Ag по полученным данным является единственным продуктом на рынке, имеющим признак снижения скорости появления вторичного кариеса за счет уменьшения количества микроорганизмов.

Как известно, по биологическим свойствам наночастиц серебра (цитотоксичность, бактерицидность) определяют такие характеристики, как размер, форму,

концентрацию и способность связываться друг с другом или другими частицами материала. Считается, что концентрация наночастиц является одним из факторов, влияющих на их антибактериальные и цитотоксические действия, которые проявляются изменениями в структуре ДНК или клеток [1, 2]. Наночастицы, имеющие малые размеры, распознаются рецепторами, присутствующими на поверхности клеток, в качестве собственных белков и с помощью эндоцитоза всасываются в клетку, где аккумулируются, вызывая хроническое воспаление [3, 4]. Этот же механизм имеет положительный эффект, приводящий к гибели бактерий [2].

Обзор имеющихся публикаций показывает, что цитотоксичность наночастиц серебра зависит от их размера. Исследование Хуссейна и др. [5] на клетках печени крысы показало, что концентрация Ag, которая снижает на 50% сокращение МТТ (EC₅₀) частиц, имеющих размер 15 нм, составляет $24 \pm 7,3$ мг/мл. Кроме того, не обнаружено большой цитотоксичности полимеров polyvinylpyrrolidony, покрытых слоем NAG, с размером частиц 8 и 38 нм на наличие Caenorhabditis elegant по сравнению с цитотоксичностью металлического серебра и ионами серебра [6].

В качестве исследуемого материала использован нанокolloидный раствор серебра, имеющий начальную концентрацию 250 ppm nAg с величиной частиц в диапазоне от 6 до 12 нм. Раствор хранили в стеклянном контейнере, в защищенном от света месте, чтобы предотвратить окисление частиц серебра. Этот коллоид был предназначен для добавления к протравочному гелю, используемому в медицинских процедурах до 60 секунд. Таким образом, в соответствии с PN-EN ISO 10993-1 коллоид серебра имеет наружный контакт с твердыми тканями зуба.

Поскольку коллоид nAg представляет собой раствор, в соответствии с нормой PN-EN ISO 10993-12 проведено непосредственное исследование его цитотоксичности с помощью кривой биологической реакции фибробластов десны (кривая доза-эффект). В соответствии с этим же стандартом для определения цитотоксичности медицинских материалов, как и для правильного выполнения кривой доза-эффект, следует использовать отрицательный и положительный контроль. PN-EN ISO 10993-12 (приложение А) содержит справочный материал для отрицательного и положительного контроля, который может быть использован для выполнения цитотоксичности прямых и косвенных твердых веществ. В случае растворов, которые применяются непосредственно к клеткам (см. разделы 3.11 и 3.12 PN-EN ISO 10993-12), были использованы в качестве отрицательного контроля биологические реакции клеток, выращенных в чистой культуральной среде Игла (DMEM), что дает лучшие условия для роста клеток и воспроизводимые результаты. В качестве положительного контроля — перекись водорода (H₂O₂) в концентрации 7,5 mM. Ранее определена ее 100-процентная эффективность в уничтожении фибробластов [7]. Ниже приведен график зависимости жизнеспособности десневых фибробластов от концентрации перекиси водорода, воздействующей на клетки в течение 2 часов, на основе ингибирования редукции соли тетразолия (МТТ).

Обозначенная кривая — зависимость доза-эффект исследуемого раствора nAg при использовании метода МТТ. Анализ МТТ основан на преобразовании 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолийбромида слегка желтого цвета до нерастворимого в воде формазана фиолетового цвета. Редукция МТТ до формазана происходит пропорционально активности окислительно-восстановительных клеточных ферментов, зависящих от коферментов НАД⁺, НАДФ⁺ и ФАД, в том числе митохондриальной сукцинатдегидрогеназы. Этот тест точно отражает метаболические изменения в клетках, вызванные как изменениями внутренней среды клеток, так и внешней питательной среды (нехватка кислорода или глюкозы, не соответствующее рН, а также присутствие посторонних веществ, добавленных в питательную среду).

Выводы

Параметр EC50 — медиальная эффективная концентрация (статистически рассчитанная концентрация), которая индуцирует в медиум среды определенный эффект у 50% населения в определенных условиях (ингибирующее или стимулирующее физиологические процессы, такие как ферментативную активность, биолюминесценцию и т. д.). Этот параметр является наиболее надежным и сопоставимым между результатами цитотоксичности, полученными в разных лабораториях, потому что он рассчитан по кривой доза-реакция в клетках. Тем не менее надо принимать во внимание различия в процессе самого измерения, например тип клеток, на которых изучали цитотоксичность. Линия фибробластов, полученная непосредственно с десны человека, больше, чем коммерческие линии клеток, подходит для тестирования цитотоксичности стоматологической продукции, так как наиболее близка цитофизиологически в условиях *in vitro* к натуральным клеткам организма.

Из графика, представляющего зависимость ингибирования редукции МТТ от концентрации nAg, видно,

Литература (References)

1. Hamouda I. M. Current perspectives of nanoparticles in medical and dental biomaterials. *J. Biomed. Res.*, 2012, vol. 26, pp. 143-151.
2. Pal S., Tak Y. K., Song J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, vol. 73, pp. 1712-1720.
3. Pan Y., Neuss S., Leifer A., Fischler M., Wen F., Simon U., Schmid G., Brandau W., Jahnke-Dechent W. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*, 2007, vol. 3, pp. 1941-1949.
4. Coradeghini R., Gioria S., Garcia C. P., Franchini F., Gilliland D., Ponti J., Rossi F. Size-dependent toxicity and cell interaction mechanisms of gold nanoparticles on mouse fibroblasts. *Toxicol. Lett.*, 2013, vol. 217, pp. 205-216.
5. Hussain S. M., Hess K. L., Gearhart J. M., Geiss K. T., Schlager J. J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol. in Vitro*, 2005, vol. 19, pp. 975-983.
6. Yang X., Gondikas A. P., Marinakos S. M., Auffan M., Liu J., Hsu-Kim H., Meyer J. N. Mechanism of Silver Nanoparticle Toxicity Is Dependent on Dissolved Silver and Surface Coating in *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Sci. Technol.*, 2012, vol. 46, pp. 1119-1127.
7. Zgórzyńska E., Wierzbicka-Ferszt A., Dziedzic B., Witusik-Perkowska M., Zwolinska A., Janas A., Walczewska A. Docosahexaenoic fatty acid attenuates oxidative stress and protects human gingival fibroblasts against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide and butyric acid. *Arch Oral Biol*, 2015, vol. 60, pp. 144-153.

Таблица

Жизнеспособность фибробластов в тесте МТТ после 24-часовой инкубации с коллоидом nAg

Table

The vitality of fibroblasts in MTT-test after 24-hour incubation with colloid nAg

Исследуемый раствор	Средняя продолжительность жизни фибробластов +/- SEM, ARE (% по отношению к отрицательному контролю)
Отрицательный контроль	99,9 +/- 0,36
nAg 4,2 ppm	94,8 +/- 1,48
nAg 5,0 ppm	89,0 +/- 1,02
nAg 6,2 ppm	82,8 +/- 1,84
nAg 8,3 ppm	69,9 +/- 2,37
nAg 10,0 ppm	41,9 +/- 4,14
nAg 12,5 ppm	12,9 +/- 5,15
nAg 16,7 ppm	11,9 +/- 4,21
nAg 25,0 ppm	14,3 +/- 3,82
Положительный контроль (7,5 mM H ₂ O ₂)	2,5 +/- 0,28

что 9,4 ppm nAg тормозит редукцию соли тетразолия на 50% (EC50) во время инкубации клеток с испытуемыми растворами nAg в течение 24 часов.

Стандарт PN-EN ISO 10933-5 в качестве цитотоксической концентрации тестируемого соединения определяет такую, которая снижает жизнеспособность клеток по меньшей мере на 30%. Таким образом, данное исследование раствора nAg показало, что в течение 24-часового контакта с клетками цитотоксическая концентрация составляет $\geq 8,3$ ppm.

Авторы:

Згожиньска Эмилия

prof. UM Łódźi Dr n. med., г. Лодзь, Польша

Вальчевска Анна

prof. UM Łódźi Dr hab. n. med., г. Лодзь, Польша

Authors:

ZGOZHINSKA Emilia

Medical University of Łódź, prof. UM

Łódźi Dr n. med., Lodz, Poland

VALCHEVSKA Anna

Medical University of Łódź, prof. UM Łódźi

Dr hab.n.med., Lodz, Poland

Поступила 23.07.2017 Received
Принята к печати 15.08.2017 Accepted