

©Погоріла А.В., Шінкарук-Диковицька М.М., Ходаківський О.А. Черешнюк І.Л.

УДК: 615.216:616.833.16-002.4:577.13

Погоріла А.В.¹, Шінкарук-Диковицька М.М.¹, Ходаківський О.А.^{2,4}, Черешнюк І.Л.^{3,5}

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, кафедра терапевтичної стоматології¹, навчально-науково-дослідна лабораторія з доклінічної оцінки нових лікарських засобів та біологічно-активних сполук "Фармадар"², науково-дослідний центр³, кафедри фармакології⁴, кафедра очних хвороб⁵ (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, 21018, Україна)

ВПЛИВ АМАНТАДИНУ ГІДРОХЛОРИДУ НА АКТИВНІСТЬ АПОПТОТИЧНИХ ТА ПРОЛІФЕРАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ У НИЖНЬОМУ АЛЬВЕОЛЯРНОМУ НЕРВІ КРОЛІВ ІЗ ЙОГО ЯТРОГЕННИМ КОМПРЕСІЙНО-ТОКСИЧНИМ УРАЖЕННЯМ ПРИ ДИФЕРЕНЦІЙОВАНОМУ ПЛОМБУВАННІ МАТЕРІАЛАМИ "FOREDENT" ТА "AH-PLUS"

Резюме. Використовуючи метод протоково-цитометричного аналізу встановлено факт активації апоптозу та проліферації серед клітин Гасероного вузла при попередній 30-ти денній взаємодії паст "Foredent" або "AH-Plus" з нижньощелепним нервом. Такі деструктивно-дегенеративні зміни верифікувались наростанням пулу клітин, ядерна ДНК яких перебувала у періоді відповідно Sub-G0G1 (апоптоз) та синтетичній фазі S (проліферація). Найбільшою мірою описані феномени відмічались при внесенні у трепанаційний отвір пломбувальної суміші "Foredent", $p < 0,05$. Відсутність нейрональної компресії та токсичного впливу кожної із досліджуваних паст при проведенні кістково-пластичної трепанації нижнього щелепного нерву, жодним чином, вірогідно ($p < 0,05$) не змінило співвідношення клітин у різних фазах клітинного циклу у цитометричній суспензії із Гасероного вузла. Терапевтичне внутрішньошлункове щоденне упродовж 30-ти днів ятрогенного компресійно-токсичного ураження нижнього альвеолярного нерву кролів застосування препарату амантадину сульфату дозою 10 мг/кг проявляє нейроцитопротекторну дію на клітини трійчастого вузла.

Ключові слова: амантадину гідрохлорид, апоптоз, нейропротекція, ятрогенне компресійно-токсичне ураження нижнього альвеолярного нерву.

Вступ

Ефективне лікування ятрогенного компресійно-токсичного ураження нижнього альвеолярного нерву може бути здійснено при одночасному поєднанні терапевтичних заходів, направлених на його декомпресію, із паралельним застосуванням препаратів нейропротекторної активності. Останнє, є обґрунтованим, оскільки механізм первинного пошкодження структур нервових волокон пов'язаний із формуванням глутамат-кальцієвого каскаду та активацією NMDA-рецепторів нейронів трійчастого нерву (Гасероного вузла), аксони, яких безпосередньо і формують нервовий стовбур. Продукти перекисного окиснення ліпідів, нітрозативного стресу, енергетичного дефіциту та інші фактори,

що активують апоптоз і некроз, шляхом аксонального транспорту, через певний час, вражають нейрони трійчастого нерву. Після локалізації деструктивних явищ на периферії (нерв), у самому Гасероному вузлі активними є, і апоптоз, і некроз [2]. Таким чином відбувається генералізація процесу. На користь такого твердження свідчать результати власних досліджень стосовно вмісту сироваткових нейромаркерів: нейрон-специфічної енолази та білку S100 через 30-ть днів після моделювання ятрогенного компресійно-токсичного ураження нижнього альвеолярного нерву у кролів [1]. Обидва показники у тварин контрольної групи залишались достеменно вищими відносно фонових,

однак вірогідно знижувались при лікуванні амантадином гідрохлоридом [1].

Мета - з'ясувати ступінь активності процесів апоптозу та нейпроліферації у Гасеровому вузлі кролів із ятрогенним компресійно-токсичним ураженням нижнього альвеолярного нерву при диференційованому пломбуванні матеріалами "Foredent" та "АН- plus", а також при терапії амантадином гідрохлоридом.

Матеріали та методи

Експерименти проведено на кролях-самцях породи Шиншила, які знаходились у віварії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова на стандартному водно-харчовому раціоні та вільному доступі до води та корму. Під час роботи з лабораторними тваринами дотримувались методичних рекомендацій Державного фармакологічного центру Міністерства охорони здоров'я України і вимог біоетики згідно до Національних "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах" (2001), що відповідають положенням "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей". Попередньо наркотизованим пропофолом (40 мг/кг, Kabi, Австрія) кролям породи Шиншила, відтворювали власне розроблену модель компресійно-токсичного ураження нижнього альвеолярного нерву, шляхом інтраопераційного введення через трепанаційний отвір в ділянці нижньощелепного каналу пломбувальних матеріалів "Foredent" або "АН- plus" (патент України № 30029).

Трепанацію проводили за кістково-пластичною методикою зі збереженням цілісності окістя. Через годину після відтворення компресії нерву, відбувалось перше введення амантадину гідрохлориду ("Амантадин", Олайнфарма, Латвія) наступним дотриманням інтервалу кратності у 12 год упродовж 30-ти діб експерименту (тобто двічі на добу). Амантадин застосовували натще після 6 год депривації їжі, через орогастральний еластичний зонд. Зонд, щоразу перед процедурою, встановлювали у шлунок через спеціальну міжщелепну зубну капу для кролів, що розміщувалась у ротовій порожнині тварин між верхніми та нижніми різцями. По завершенню процедури, перед екстракцією зі шлунка, зонд промивали водою.

Наприкінці експерименту, після декапітації та препарування трійчастого вузла, останній видалявся повністю, готувалась суспензія клітин, в якій за допомогою протоково-цитометричного аналізатора верифікували фазу Sub-G0G1 - апоптоз та фазу S, яка вказує на нейпроліферацію і відповідає за активність нейроглії [3].

Кількісні дані обробляли за допомогою програми статистичної обробки StatPlus 2009. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати. Обговорення

Модельне ятрогенне компресійно-токсичне ураження нижнього альвеолярного нерву супроводжувалось активацією апоптотичних процесів, як при використанні в якості пломбувального матеріалу "Foredent", так і пасти "АН-Plus". Про наявні апоптотичні зміни у досліджуваній суспензії клітин трійчастого нерву свідчила поява ядерної ДНК із вмістом генетичного матеріалу меншого ніж 2n. Тобто, на отриманих ДНК-гістограмах суспензії з клітин Гасерового вузла кролів нарастали період Sub-G0G1, що у відсотковому та якісному аспекті верифікувалось як апоптоз (табл. 1.). Слід зауважити, що у псевдооперованих тварин, сама процедура кістково-пластичної трепанації нижньощелепного каналу, або застосування в цих умовах неомідантану дозою 10 мг/кг в/ш, не чинила вірогідного впливу на відсоткове співвідношення клітин у суспензії, отриманої із трійчастого вузла. Тобто в цих умовах зберігався рівень апоптотичних процесів в межах менше одного відсотка (табл. 1).

Внесення в трепанаційний отвір пломбувальних сумішей супроводжувалось достеменним зростанням відсотка клітин, ДНК яких перебуває в періоді Sub-G0G1, тобто має місце фрагментація ядерної ДНК, що дає підстави стверджувати про необоротність апоптотичних змін, у т.ч. нейронів Гасерового вузла. Якщо на тлі пасти "Foredent" рівень апоптозу збільшився відносно аналогічного показника псевдооперованих кролів в середньому у 21,15 рази, то на фоні використання пасти "АН-Plus" досліджуваний маркер зріс дещо менше, в середньому у 15,54 рази, однак, все одно, це є достовірним відносно псевдооперованих тварин. Отже, обидва пломбувальні матеріали при контакті з нижньощелепним нервом на 30-ту добу призводять до апоптотичних змін в клітинах трійчастого нерву, і, в першу чергу, мова йде саме за його нейронний пул.

Терапевтичне застосування амантадину гідрохлориду дозою 10 мг/кг в/ш гальмувало та профілакувало деструктивно-дегенеративні явища в клітинах Гасерового вузла. Це відбувалось саме за рахунок зменшення апоптотичної компоненти цього процесу. При пломбуванні нижньощелепного каналу кролів сумішшю "Foredent", через один місяць при щоденному введенні "Амантадину" знижувало активність апоптозу в клітинах трійчастого нерву відносно контрольної патології в середньому у 1,52 рази, проти 1,6-кратного зменшення при використанні пасти "АН- plus". Тобто, в умовах внутрішньоканального потрапляння і контакту нерву з пломбувальним матеріалом "АН- plus", апоптоз в клітинах Гасерового вузла виявився меншим, а антиапоптотична дія досліджуваного препарату проявилась вищою ніж за рівноцінних умов при бломбуванні резорцин-формаліновою сумішшю "Foredent".

Синхронною та закономірною відповіддю до апоптотичних процесів, є ініціація нейронпроліферативних

Таблиця 1. Вплив амантадину гідрохлориду на кількість клітин Гасероного вузла кролів в періоді Sub-G0G1 при ятрогенному компресійно-токсичному ураженні нижнього альвеолярного нерву при диференційованому пломбуванні матеріалами "Foredent" та "AH-plus" ($M \pm m$, $n=5$).

Дослідні групи	Період Sub-G0G1 на ДНК-гістограмах (% апоптотичних клітин) на 30-ту добу експерименту	
	Пломбування резорцин-формаліновою сумішшю "Foredent"	Пломбування епоксидним амінополімером "AH-Plus"
Псевдооперовані тварини	0,782 $\pm$ 0,05	
Псевдооперовані тварини+ Неомідантан (10 мг/кг в/ш)	0,766 $\pm$ 0,03	
Контрольна патологія	16,542 $\pm$ 0,26* [#]	12,156 $\pm$ 0,41* [#] [©]
Амантадину гідрохлорид, 10 мг/кг в/ш "Амантадин"	10,904 $\pm$ 0,27**	7,622 $\pm$ 0,266**

Примітки: в/ш - внутрішньошлунково; * - $p < 0,05$ відносно групи псевдооперованих тварин; # - $p < 0,05$ групи псевдооперованих тварин на тлі терапії неомідантаном; & - $p < 0,05$ відносно показників у тварин на тлі пломбування сумішшю "Foredent"; © - $p < 0,05$ відносно показників у тварин на тлі пломбування сумішшю "AH-Plus"

Таблиця 2. Вплив амантадину гідрохлориду на кількість клітин Гасероного вузла кролів в синтетичному періоді (фаза S циклу) при ятрогенному компресійно-токсичному ураженні нижнього альвеолярного нерву при диференційованому пломбуванні матеріалами "Foredent" та "AH-plus" ($M \pm m$, $n=5$).

Дослідні групи	Фаза S циклу на ДНК-гістограмах (% апоптотичних клітин) на 30-ту добу експерименту	
	Пломбування резорцин-формаліновою сумішшю "Foredent"	Пломбування епоксидним амінополімером "AH-Plus"
Псевдооперовані тварини	0,178 $\pm$ 0,01	
Псевдооперовані тварини+ Неомідантан (10 мг/кг в/ш)	0,19 $\pm$ 0,008	
Контрольна патологія	0,868 $\pm$ 0,025* [#]	0,63 $\pm$ 0,008* [#] [©]
Амантадину гідрохлорид, 10 мг/кг в/ш "Амантадин"	0,55 $\pm$ 0,018**	0,396 $\pm$ 0,025**

Примітки: в/ш - внутрішньошлунково; * - $p < 0,05$ відносно групи псевдооперованих тварин; # - $p < 0,05$ групи псевдооперованих тварин на тлі терапії неомідантаном; & - $p < 0,05$ відносно показників у тварин на тлі пломбування сумішшю "Foredent"; © - $p < 0,05$ відносно показників у тварин на тлі пломбування сумішшю "AH-Plus".

змін, шляхом поділу олігодендроцитів. Про цей процес, який типовий для будь-якого ураження нервової тканини, свідчить відсоткове збільшення пулу в клітинній в суміші з Гасероного вузла, ядерна ДНК котрих перебуває у синтетичній фазі S. Відомо, що регенерація після та під час нейродеструкції є можливою лише за рахунок низько диференційованих клітин. Тобто, при зменшенні питомої ваги нейронів, нервова тканина трійчастого вузла регенерує за рахунок

поділу нейроглії і поступово заміщується останньою. За нормальних умов, до яких можна наблизити і псевдооперованих кролів через 30-ть діб після кістково-неопластичної трепанації нижньощелепного каналу обов'язково існує фоновий рівень нейропроліферації за рахунок клітин, що перебувають у фазі S, а сам відсоток не переважає 0,2 (табл. 2). Курсове застосування неомідантану не супроводжується зміною клітинного співвідношення в тій частині вузла, що є справедливим не тільки для фонового апоптозу (табл. 1), а й для нейропроліферації (табл. 2).

Нарізне внесення в трепанаційний отвір пломбувальних сумішей "AH-Plus", або "Foredent" супроводжувалось вірогідним наростанням кількості клітин у фазі S відносно показника у псевдооперованих кролів в середньому відповідно у 4,88 та 3,54 рази. При цьому, контакт нижньоальвеолярного нерву із пломбувальним матеріалом "Foredent", аналогічно, як це мало місце і при аналізі ДНК-гістограм коли мова йшла за характеристики періоду Sub-G0G1, супроводжувався нейрогліальною проліферацією, яка за своєю активністю переважала синтетичні ефекти, що мали місце на тлі пасти "AH-Plus" в середньому 1,36 рази, $p < 0,05$.

Лікувальне застосування амантадину гідрохлориду дозою 10 мг/кг в/ш, як і при оцінці його антиапоптотичних ефектів, гальмувало та профілактувало проліферативні явища в клітинах Гасероного вузла, зменшуючи пул клітин, які перебувають у синтетичній фазі S при первинному пломбуванні сумішшю "Foredent" та "AH-Plus" однаковою мірою в середньому у 1,58 рази, $p < 0,05$.

Якщо оцінювати та проводити міжгрупову оцінку величини антипроліферативної активності у "Foredent" та "AH-Plus", то на тлі другої пасти синтетичні процеси виявились вірогідно меншими за такі, що виявились характерними для суміші "Foredent" в середньому у 1,39 рази.

Таким чином, використовуючи метод протоково-цитометричного аналізу було встановлено факт активації апоптозу та проліферації серед клітин Гасероного вузла при попередній 30-ти денній взаємодії паст "Foredent" або "AH-Plus" з нижньощелепним нервом. Такі деструктивно-дегенеративні зміни верифікувались наростанням пулу клітин, ядерна ДНК яких перебувала у періоді відповідно Sub-G0G1 (апоптоз) та синтетичній фазі S (проліферація). Найбільшою мірою описані феномени відмічались при внесенні у трепанаційний отвір пломбувальної суміші "Foredent", $p < 0,05$. Відсутність нейрональної компресії та токсичного впливу кожної із досліджуваних паст при проведенні кістково-пластичної трепанації нижнього щелепного нерву, жодним чином, вірогідно ($p < 0,05$) не змінило співвідношення клітин у різних фазах клітинного циклу у цитометричній суспензії із Гасероного вузла.

Курсове застосування в таких експериментальних умовах компресійно-токсичного ураження нерву і

клітин нервового вузла амантадину гідрохлориду дозою 10 мг/кг в/ш проявило нейроцитопротективну дію клітинні елементи Гассероного вузла.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. За допомогою методу протокової цитометрії шляхом, аналізу та оцінки періоду Sub-G0G1 на ДНК-гістограмах ядерних суспензій клітин, отриманих із Гассероного вузла тварин із ятрогенним компресійно-токсичним ураженням нижнього альвеолярного нерву на тлі пасти "Foredent", або "AH-Plus" рівень апоптозу вірогідно підвищився в середньому відповідно у 15,54 та 21,15 рази.

2. Дзеркально, аналогічним чином, у цих же тварин, одночасно верифіковано наростання кількості ядер із синтетичною фазою S на тлі пасти "Foredent", або "AH-Plus" в середньому відповідно у 4,88 та 3,54 рази.

3. Такі типові достеменні, валідизовані на значній кількості спостережень зміни у якісному складі ядер-

них суспензій клітин Гассероного вузла кролів на відтворених моделях ятрогенного компресійно-токсичного ураження нижнього альвеолярного нерву на тлі пасти "Foredent" або "AH-Plus", вказують на розвиток апоптозу та нейропроліферації у тканині трійчастого вузла на 30-ту добу спостереження.

4. Описані зміни носять вірогідно більший деструктивно-дегенеративний характер при використанні в якості пломбувального матеріалу пасти "Foredent" над "AH-Plus", а терапевтичне внутрішньошлункове щоденне упродовж 30-ти діб ятрогенного компресійно-токсичного ураження нижнього альвеолярного нерву кролів застосування препарату амантадину сульфату дозою 10 мг/кг проявляє нейроцитопротекторну дію.

Перспективним є провести клінічне вивчення нейропротекторної ефективності амантадину гідрохлориду при позаканальному потрапленні пломбувального матеріалу у пацієнтів із ятрогенним компресійно-токсичним ураженням нижнього щелепного нерву.

Список посилань

1. Погоріла, А. В. & Хомаківський О. А. (2016). Скринінг наявності та оцінка величини нейропротекторної активності церебраліну, берлітіону та нуклео ц.м.ф. форте при модельному ятрогенному компресійно-токсичному ураженні нижнього альвеолярного нерва за маркерами невротодеструкції. (с. 93-94). Матеріали VIII Національного з'їзду фармацевтів України. Харків.
2. Походенько-Чудакова І. О. Вилькицкая, К. В., & Попова І. І. (2014). Изменение биохимических показателей сыворотки крови при различных видах комплексного лечения травматического токсического повреждения нижнего альвеолярного нерва в эксперименте. *Вісник проблем біології і медицини*, Вип. 2, 2 (108), 89-103.
3. Хомаківський О. А. (2014). Патогенетичне обґрунтування доцільності використання нових похідних адамантану при експериментальній терапії гострої ішемії головного мозку та міокарда (експериментальне дослідження). (Дис. докт. мед. наук). Одеський національний медичний університет, Одеса.

Погорелая А.В., Шинкарук-Диковицкая М.М., Хомаковский А.А., Черешнюк И.Л. ВЛИЯНИЕ АМАНТАДИНА ГИДРОХЛОРИДА НА АКТИВНОСТЬ АПОПТОТИЧЕСКИХ И ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В НИЖНЕМ АЛЬВЕОЛЯРНОМ НЕРВЕ КРОЛИКОВ С ЕГО ЯТРОГЕННЫМ КОМПРЕССИОННО-ТОКСИЧЕСКИМ ПОРАЖЕНИЕМ ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОМ ПЛОМБИРОВАНИИ МАТЕРИАЛАМ "FOREDENT" И "AH-PLUS"

Резюме. Используя метод протоково-цитометрического анализа установлен факт активации апоптоза и пролиферации среди клеток Гассероного узла при предварительной 30-ти дневном взаимодействии паст "Foredent" или "AH-Plus" с нижнечелюстным нервом. Такие деструктивно-дегенеративные изменения верифицировались нарастанием пула клеток, ядерная ДНК которых находилась в периоде Sub-G0G1 (апоптоз) и синтетической фазе S (пролиферация). В наибольшей степени описанные феномены отмечались при внесении в трепанационное отверстие пломбировочной смеси "Foredent", $p < 0,05$. Отсутствие нейрональной компрессии и токсического воздействия, каждой из исследуемых паст при проведении костно-пластической трепанации нижнего челюстного нерва, никоим образом не изменило соотношение клеток в различных фазах клеточного цикла в цитометрической суспензии с Гассероного узла, $p < 0,05$. Терапевтическое внутрижелудочное ежедневное, в течение 30-ти суток ятрогенного компрессионно-токсического поражения нижнего альвеолярного нерва кроликов применения препарата амантадина сульфата в дозе 10 мг/кг проявляет нейроцитопротекторное действие на клетки тройничного узла.

Ключевые слова: амантадин гидрохлорид, апоптоз, нейропротекция, ятрогенное компрессионно-токсическое поражение нижнего альвеолярного нерва.

Pogorila A.V., Shinkaruk-Dykovitska M.M., Khodakovskiy A.A., Cheresnyuk I.L. INFLUENCE OF AMANTADINE HYDROCHLORIDE ON THE ACTIVITY OF APOPTOTIC AND PROLIFERATIVE PROCESSES IN THE LOWER ALVEOLAR NERVE OF RABBITS WITH ITS IATROGENIC COMPRESSION-TOXIC LESION WITH DIFFERENTIATED FILLING OF THE MATERIALS "FOREDENT" AND "AH-PLUS"

Summary. Using the method of protocol-cytometric analysis, the fact of activation of apoptosis and proliferation among the cells of the Gasserian node was established with a preliminary 30-day interaction of the Foredent or AH-Plus pastes with the mandibular nerve. Such destructive-degenerative changes were verified by the growth of a pool of cells whose nuclear DNA was in the period of Sub-G0G1 (apoptosis) and the synthetic phase S (proliferation). The most described phenomena were noted when inserting a Foredent filling solution into the trepanation hole, $p < 0.05$. The absence of neuronal compression and toxic effects, of each of the pastes undergoing bone-plastic trepanation of the mandibular nerve, in no way changed the ratio of cells in different phases of the cell

cycle in the cytometric suspension from the Gasser node, $p < 0.05$. Therapeutic intragastric daily, during 30 days of iatrogenic compression-toxic affection of the lower alveolar nerve of rabbits using the drug amantadine sulfate at a dose of 10 mg/kg exhibits neurocytoprotective effect on the cells of the trigeminal node.

Key words: amantadine hydrochloride, apoptosis, neuroprotection, iatrogenic compression-toxic lesion of the lower alveolar nerve.

Рецензент - д.мед.н, проф. Волощук Н.І.

Стаття надійшла до редакції 22.06.2017 р.

Погоріла Анна Василівна - магістр медицини, асистент кафедри терапевтичної стоматології ВНМУ ім. М.І. Пирогова; +38(098)3263626; pogorelajaanna@mail.ru

Шінкарук-Диковицька Марія Михайлівна - д.мед.н., завідувач кафедри терапевтичної стоматології ВНМУ ім. М.І. Пирогова; +38(098)3263626; pogorelajaanna@mail.ru

Ходаківський Олексій Анатолійович - д.мед.н., завідувач Науково-дослідної лабораторії з доклінічної оцінки нових лікарських засобів та біологічно-активних сполук "Фармадар", Радник Генерального директора по науці фармацевтичної фірми "Дарниця", професор кафедри фармакології ВНМУ ім. М.І. Пирогова; +38(098)7910533; aleksey.hodakovskiy@bk.ru

Черешнюк Ігор Леонідович - к. мед.н., асистент кафедри очних хвороб, с.н.с. Науково-дослідного центру ВНМУ ім. М.І. Пирогова; +38(063)1970028
