

TESTAREA BIOCOMPATIBILITĂȚII, ÎN CULTURI DE CELULE, A UNOR SOLUȚII IRIGANTE ANTISEPTICE, UTILIZATE ÎN TRATAMENTUL ANTIINFEȚIOS AL GANGRENEI PULPARE

Ioana Suci^{*}, Ecaterina Ionescu^{**}, Elena Preoteasa^{***},
Cristina Claudia Tosa^{****}, Doina Petrasincu^{*****}

REZUMAT

Întrucât studiul "in vitro" se impune printre metodele importante, atât în utilizarea clinică, cât și în standardizarea biologică a substanțelor medicamentoase folosite în stomatologie, am testat toleranța tisulară comparativă, în culturi de celule, a trei soluții irigante antiseptice, utilizate în tratamentul antiinfecțios al gangrenei pulpare.

Pentru testarea și evaluarea acestor soluții medicamentoase (soluție clorhexidina 1%, Ca(OH)₂ 0.1%, NaOCl 2% și 5%) s-au folosit două tipuri de experimente, urmărindu-se efectul soluțiilor medicamentoase asupra celulelor staționare, pe de o parte, cât și asupra creșterii celulare, pe de altă parte.

Cuvinte cheie: soluții antiseptice, toleranță tisulară.

ABSTRACT

Biocompatibility testing, in cell culture, of some antiseptic irrigant solutions used in the antiinfectious treatment of the endodontic system

Because "in vitro" study is an important method for clinical use as well as for biological standardisation of medicaments used in dentistry, we tested the comparative tissular tolerance in culture cells of three irrigant solutions used in the antiinfectious treatment of the endodontic system.

The evaluation of this medicaments (clorhexidin solution 1%, Ca(OH)₂ sol. 0.1%, NaOCl sol. 2% and 5%) has been executed on two types of experiments following the effect of this antiseptic solutions on stationary culture cells as on cellular growth, on the other side.

Key words: antiseptic solutions, tissular tolerance.

Material și metodă de lucru

Ca substrat celular de testare, am optat pentru o populație celulară umană normală și anume linia celulară diploidă umană, ICP-23, obținută și caracterizată în Institutul Cantacuzino, după o metodologie originală (5); este o populație de celule de tip fibroblastic, normală citogenetic, derivată din embrion uman total.

Am testat, pe cultura menționată, efectul a trei soluții antiseptice, pe care ne-am propus să le folosim în tratamentul gangrenei pulpare, în spălături endodontice. Cele trei soluții investigate sunt: **clorhexidina** (soluție terapeutică propusă 1%), **soluția de Ca(OH)₂** (soluție 0,1%) și **NaOCl** (soluție 2% și soluție 5%).

Testarea și evaluarea acestor substanțe am realizat-o prin două tipuri de experimente, urmărind:

1. efectul soluțiilor medicamentoase asupra culturilor celulare staționare, utilizându-le în cantități extrem de mici din concentrația lor de lucru;
2. efectul soluțiilor medicamentoase asupra creșterii celulare "in vitro" utilizând concentrații mult reduse;

1. În ceea ce privește primul aspect, am investigat efectul soluțiilor medicamentoase folosind cantități extrem de mici în concentrația lor de lucru, și anume câte 0,05 ml din soluția de **clorhexidină**, **Ca(OH)₂**, **NaOCl 2%** și respectiv **5%** - per tub de 2 ml cultura celulară staționară din linia celulară menționată. Urmărirea dinamicii celulare confluente s-a

realizat la intervale de 24 de ore timp de 4 zile.

Prin acest sistem de testare am încercat să suprindem timp de 96 de ore eventualul efect al soluțiilor medicamentoase, manifestat prin: reducerea treptată a concentrației celulare în stratul celular confluent, precum și prin efecte vizibile microscopic pe celulele vii din cultură.

2. Referitor la cel de-al doilea aspect, am studiat efectul celor trei soluții antiseptice asupra creșterii celulare "in vitro", utilizând de această dată concentrații din soluțiile medicamentoase antiseptice mult reduse și anume de 1/25 dintr-o soluție 10 x pentru **clorhexidină**, **Ca(OH)₂** și **NaOCl 2%** și 1/50 dintr-o soluție 10 x pentru **NaOCl 5%**.

Tabel I: Soluțiile, cantitățile și concentrațiile utilizate

	Cantități/ pe cultura staționar	Concentrații de lucru utilizate în cultura în creștere
Clorhexidină 1%	0,05 ml per tub a 2 ml	1/25 din soluția 10 x = 4 mg/ml
Ca(OH)₂ 0,1%	0,05 ml per tub a 2 ml (10 min)	1/25 din soluția 10 x = 40 mg/ml
NaOCl 2%	0,05 ml per tub a 2 ml (10 min.)	1/25 din soluția 10 x = 0,8 mg/ml

* Dr. Ioana Suci - asistent universitar, Disciplina Odontologie, Fac. Stomatologie, U.M.F. "Carol Davila" București

** Dr. Ecaterina Ionescu - șef de lucrări Disciplina Ortodontie, Fac. Stomatologie U.M.F. "Carol Davila" București

*** Dr. Elena Preoteasa - asistent universitar Disciplina Protetica, Fac. Stomatologie U.M.F. "Carol Davila" București

**** Dr. Cristina Claudia Tosa - Policlinica Grozovici

***** Dr. Doina Petrasincu - Cercetător științific principal, Institutul Cantacuzino

NaOCl 5%	0,05 ml per tub a 2 ml (10 min.)	1/50 din soluția de 10 x = 0,1 mg/ml
-------------	--	---

Ținând seama și de rezultatele obținute anterior, de această dată am urmărit efectul soluțiilor irigante testate, exprimate prin dinamica creșterii celulare, prin mortalitatea celulară (în procente), ca și prin eventuale aspecte morfologice vizibile pe celulele vii în cultură.

Testarea celor trei soluții irigante în cadrul celor două sisteme alese, ni se pare justificată în condițiile în care medicamentele propuse rămân în contact atât cu țesutul sănătos, cât și cu resturile celulare prin procesul infecțios pentru un scurt timp, la concentrația de lucru indicată, influențând într-o primă etapă alături de bacterii și resturi tisulare și structuri normale (mai ales la suprafața lor). Într-o etapă ulterioară este de presupus diluarea prin fluide biologice a acestor soluții care vor rămâne pe perioade mai lungi în contact cu structurile celulare normale, dar în concentrații mult și progresiv reduse: astfel pot influența creșterea populațională a celulelor mucoasei bucale sau a țesutului periodontal.

În cadrul experimentului am realizat și aprecierea numerică a concentrației celulare la intervale de 24 de ore, iar în cazul testării pe cultura în creștere am studiat și mortalitatea celulară exprimată procentual, cu ajutorul testului de excludere cu albastru de tripan.

Considerarea densității celulare la intervale de 24 de ore în cazul celui de-al doilea sistem de testare, a permis elaborarea curbei dinamicii celulare în cursul creșterii celulare.

Rezultate și discuții

1. Rezultatele studierii efectului celor trei soluții irigante pe celule în cultura staționară sunt prezentate în **tabelul II**, în care se observă o reducere treptată de-a lungul celor 96 de ore de urmărire a concentrației celulelor aflate în faza staționară (exprimată în nr. cel./cm² suprafața de creștere, în cazul celor trei soluții irigante testate.

Tabel II: Dinamica concentrației celulare staționare (linia celulară ICP - 23) după tratarea cu trei droguri

	24 ore (*10 ⁴ cel/cm ²)	48 ore (*10 ⁴ cel/cm ²)	72 ore (*10 ⁴ cel/cm ²)	96 ore (*10 ⁴ cel/cm ²)
Martor	16,88	16,53	14,83,	14,51
Ca(OH) ₂ 0,1%	15,00	15,00	13,3	13,00
Clorhexidină 1%	14,00	13,00	12,55	12,00
NaOCl 2%	14,20	13,35	12,00	11,60
NaOCl 5%	7,37	5,13	3,63	2,30

Curbele concentrației celulare se plasează la niveluri mai coborâte față de martor și diferite între ele astfel: la intervale paralele, apropiate între ele și ușor inferioare martorului, pentru clorhexidină 0,1%, Ca(OH)₂ 0,1% și NaOCl 2%; la un nivel mult și abrupt coborât față de martor pentru NaOCl 5%. În paralel, se constată la examinarea microscopică - **fig. 3** - rotunjirea și desprinderea de celule

din stratul celular, progresivă pentru toate cele trei droguri, dar mai brutală și cu o rată superioară pentru NaOCl 5%.

Observațiile experimentale ne sugerează că drogurile testate au, în paralel cu efectul scontat asupra bacteriilor și țesuturilor afectate de procesul infecțios și un grad de citotoxicitate pentru celulele normale aflate în faza staționară, relativ redus și diminuat în timp pentru clorhexidină, Ca(OH)₂ și NaOCl 2%, dar important și progresiv crescător pentru NaOCl 5%, ceea ce indică prudența în utilizarea terapeutică a acestei din urmă concentrații.

2. Efectul drogurilor testate asupra celulelor în curs de multiplicare este ilustrat în **tabelul III**.

Reducerea ratei de creștere a celulelor normale cultivate față de martor se observă în **tabelul II**, aceasta este mai mică pentru clorhexidină, moderată pentru Ca(OH)₂ și NaOCl 2%.

Tabel III: Dinamica creșterii celulare, sub influența a trei droguri, de-a lungul a 96 de ore

Inocul celular 5,88x10 ⁴ cel/cm ²	24 ore	48 ore	72 ore	96 ore
Martor	4,18x10 ⁴ celule/cm ² M=0	6,93x10 ⁴ celule/cm ² M=0	10,56x10 ⁴ celule/cm ² M=0	12,54x10 ⁴ celule/cm ² M=0,86%
Clorhexidină 1%	4,07x10 ⁴ celule/cm ² M=0	5,28x10 ⁴ celule/cm ² M=4%	9,68x10 ⁴ celule/cm ² M=7,36%	10,56x10 ⁴ celule/cm ² M=5,88%
Ca(OH) ₂ 0,1%	3,74x10 ⁴ celule/cm ² M=5,5%	4,93x10 ⁴ celule/cm ² M=6,25%	6,6x10 ⁴ celule/cm ² M=6,25%	5,28x10 ⁴ celule/cm ² M=27,24%
NaOCl 2%	2,97x10 ⁴ celule/cm ² M=12,9%	4,4x10 ⁴ celule/cm ² M=10%	5,81x10 ⁴ celule/cm ² M=8,95%	4,95x10 ⁴ celule/cm ² M=16,66%
NaOCl 5%	/	/	/	/

Celulele nu au putut fi cultivate în prezența NaOCl 5%, deși concentrația de lucru a drogului în cultura celulară în creștere a fost de 1/50 dintr-o soluție de 10x; faptul indică o dată în plus, atenție la utilizarea NaOCl 5%, folosirea ei în această concentrație fiind mai curând contraindicată, reprezentând cel mai mare grad de citotoxicitate al soluțiilor testate.



Fig 1 - Prezența de celule rotunjite, neviabile, desprinse din stratul celular și aflate în suspensie, în măsură diferită pentru cele trei droguri testate, mai mică pentru clorhexidină și moderată pentru Ca(OH)₂ și NaOCl 2%.



Fig. 2 - Dezintegrarea membranei celulare, prezența pseudopodelor patologice, modificări ale nucleilor și nucleolilor.

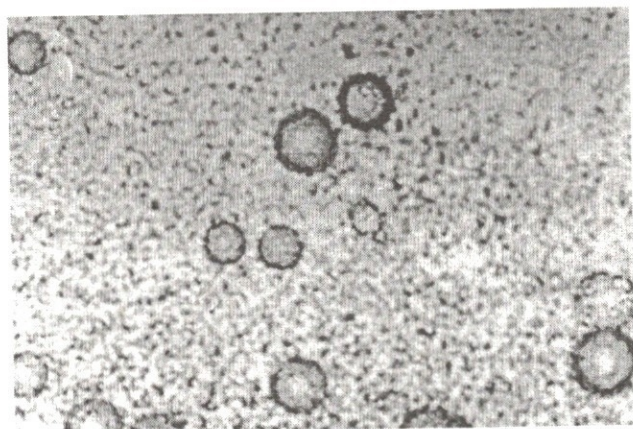


Fig. 3 - Toate aceste modificări celulare patologice conduc în scurt timp la moartea celulară cu formarea unei demarcații nete între celulele afectate și cele intacte.

Testarea unor concentrații extrem de reduse ale acestor substanțe, pentru efectul lor asupra creșterii celulare, se justifică prin diluarea locală progresivă, până la concentrații mult inferioare celei inițiale folosite, a drogurilor de către fluidele biologice, pe de o parte, și de sensibilitatea crescută la influențe citotoxice adverse a celulelor normale în curs de multiplicare față de aceleași celule în stare staționară, pe de altă parte.

Mortalitatea celulară prezintă valori foarte mici și abia după 48 h de cultivare în cazul **clorhexidinei 1%**, valori ușor mai mari și relativ apropiate, dar fără a depăși 10% la 24, 48 și 72 ore pentru **Ca(OH)₂** și **NaOCl 2%**, în timp ce la 96h, **Ca(OH)₂** generează o mortalitate înaltă de până la 27, 24% din cauza sensibilității deosebite a celulelor de pH-ul alcalin, lent corectat chiar în decursul a 96 ore, în cazul celulelor în curs de multiplicare.

Concluzii

1. Privitor la studiul biocompatibilității "in vitro" care reprezintă o metodă utilă de standardizare biologică a

soluțiilor irigante, în legătură cu dinamica concentrației celulare staționare (linia celulară ICP-23), se constată o reducere treptată a concentrației celulare, aflată în faza staționară, însă cu rate diferite: ușor inferioare față de martor în cazul clorhexidinei 1% și a **Ca(OH)₂** 0,1% și mult mai coborâte față de martor pentru **NaOCl 5%**. Deci, **NaOCl 5%** este puternic toxic, ceea ce indică prudență în utilizarea terapeutică a acestei concentrații, având un indice de biocompatibilitate redus.

2. Sub aspectul dinamicii creșterii celulare (linia celulară ICP-23), sub influența celor trei soluții antiseptice, se observă o reducere a ratei de creștere a celulelor cultivate față de martor, în măsură mai mică pentru clorhexidină 1% și moderată pentru **Ca(OH)₂** și **NaOCl 2%**. Pentru soluția **NaOCl 5%**, celulele nu au putut fi cultivate, deși concentrația de lucru a fost 1/50 dintr-o soluție 10x, indicând o dată în plus prudența în utilizarea **NaOCl 5%**, sugerând mai degrabă contraindicația acestei concentrații.

3. Mortalitatea celulară prezintă valori foarte mici și abia după 48h de cultivare, în cazul clorhexidinei 1%, valori ușor mai mari și relativ apropiate, dar fără a depăși 10% la 24, 48 și 72 ore pentru **Ca(OH)₂** și **NaOCl 2%**, în timp ce la 56h **Ca(OH)₂** generează o mortalitate de până la 27, 24%, din cauza sensibilității deosebite a celulelor la pH-alcalin; prin urmare, **NaOCl** și **Ca(OH)₂** au efect distructiv asupra culturilor de celule în comparație cu efectul lor benefic, antibacterian.

4. Testarea celor trei soluții irigante în cadrul celor două sisteme de testare ni se pare justificată în condițiile în care substanțele medicamentoase rămân în contact un timp scurt cu țesutul sănătos, ca și cu resturile celulare din procesul infecțios. În ceea ce privește soluția **NaOCl**, este de evitat contactul cu țesutul periapical.

5. Acest studiu relevă o toleranță tisulară bună pentru soluțiile de clorhexidină 1%, o toleranță tisulară medie, comparativă pentru **NaOCl 2%** și **Ca(OH)₂ 0,1%**, iar **NaOCl 5%** și-a demonstrat cel mai mare grad de citotoxicitate, nefiind valabilă biocompatibilitatea, știut fiind faptul că soluția **NaOCl** este cea mai uzitată soluție de lavaj endodontic folosită în tratamentul sistemului canalului radicular, astfel trebuie avut în vedere că are efecte toxice asupra celulelor vii, deci se impune prudență în utilizarea concentrațiilor mai mari de 3%.

BIBLIOGRAFIE

1. **Caliskan M.K., Turkun M., Alper S.:** Allergy to sodium hydrochlorite during root canal therapy: A case report Internat. Endod. Journal. 1994 27 3, 167-7
2. **Harold M.:** Rappaport: Toxicity of endodontic filling material, Oral. Surg, 1964, 785-88
3. **Heimrath S.:** Biokompatibilitätsuntersuchungen an Edelmetall und Vergleichslegierungen, ZWR, 1995/1, 20-23
4. **Kappert H.:** Untersuchungsbericht zur Prufung der Zytotoxizität von Dentallegierungen mit dem MTT Test, Freiburg, 1994, 13-14
5. **Petrasincu Doina, Gaicu N:** Methodological model of handling and surveillance for a newly human diploid cell strain, Arch. Roum. Path. Microbiol., 1977, 36, 1, 49-54
6. **Suciu Ioana:** Contribuții la îmbunătățirea procedurilor de tratament antiinfecțios al gangrenei pulpare simple, Teza de doctorat, 1998