

УДК 616.311.2-002+616.314.17-008.616.12

DOI: <https://doi.org/10.22141/2224-0721.20.4.2024.1413>Регада М.С.¹ , Олекшій П.В.² , Регада-Фурдичко М.М.² , Регада С.М.¹ ¹ Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, м. Львів, Україна² ВПНЗ «Львівський медичний університет», м. Львів, Україна

Профілактика іммобілізаційних стрес-індукованих процесів ліпопероксидації та порушень антиоксидантного захисту при розвитку експериментального пародонтиту

For citation: *Mižnarodnij endokrinologičnij žurnal*. 2024;20(4):328-335. doi: 10.22141/2224-0721.20.4.2024.1413

Резюме. Актуальність. Пародонтит є однією з найбільш поширених патологій серед стоматологічних захворювань. Загально визнаним є факт, що супутні захворювання та синдроми суттєво змінюють фізіологічні процеси в організмі, знижують його адаптаційні можливості й ефективність лікування, здатні ініціювати або активізувати патологічний процес у пародонті. Не менш поширеними є психосоматичні захворювання і стрес. Надмірна і тривала дія стрес-факторів, стрес-реакція може стати основою для розвитку хвороб. Невивченими залишаються питання щодо патофізіологічних особливостей змін процесів ліпопероксидації і антиоксидантного захисту в патогенезі пародонтиту, поєданого зі стресом. **Мета:** з'ясувати патофізіологічні особливості порушень процесів ліпопероксидації і антиоксидантного захисту в тканинах пародонта при розвитку експериментального пародонтиту (ЕП), асоційованого з іммобілізаційним стресом (ІС), та встановити можливість їх фармакологічної корекції за допомогою тіоцетаму. **Матеріали та методи.** Були проведені біохімічні дослідження на 88 морських свинках (самцях) масою тіла 0,18–0,21 кг, яких утримували на стандартному раціоні, розподілених на п'ять груп. Перша — інтактні тварини (контроль); друга — тварини з ЕП, що містила 3 підгрупи (відповідно на 3-тю, 5-ту і 15-ту добу); третя — тварини з ІС з 3 підгрупами; четверта — тварини з поєднаним ЕП і ІС з 3 підгрупами до лікування; п'ята група — тварини з ЕП і ІС після лікування тіоцетамом, який вводили в/м у дозі 250 мг/кг 1 раз на добу з 6-ї до 15-ї доби. **Результати.** ЕП асоційований з ІС на усіх етапах свого розвитку (3-тя, 5-та, 15-та доба), супроводжується поступовим зростанням рівня дієнових кон'югат (ДК), малонового діальдегіду (МДА) і компенсаторним підвищенням активності супероксиддисмутази (СОД) і каталази (КТ) на 3-тю добу експерименту, а надалі їх суттєвим зниженням на 5-ту і 15-ту добу, що свідчило про розвиток оксидантного стресу. Застосування тіоцетаму призводило до зниження продуктів перекисного окиснення ліпідів і підвищення активності зазначених ферментів у тканинах пародонта, що свідчило про його антиоксидантний вплив при ЕП і ІС. **Висновки.** ЕП, асоційований з ІС, зумовлював посилення процесів ліпопероксидації на тлі депресії антиоксидантного захисту в тканинах пародонта, особливо на 5-ту і 15-ту добу експерименту проти контролю, що свідчило про наявність оксидантного стресу. Застосування тіоцетаму призводило до антиоксидантної дії (знижується вміст ДК, МДА і зростає активність СОД і КТ у тканинах пародонта) за умов формування ЕП, асоційованого з ІС, проти групи тварин без корекції.

Ключові слова: іммобілізаційний стрес; перекисне окиснення ліпідів; антиоксидантна система; експериментальний пародонтит



© 2024. The Authors. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License, CC BY, which allows others to freely distribute the published article, with the obligatory reference to the authors of original works and original publication in this journal.

Для кореспонденції: Олекшій Петро Васильович, кандидат медичних наук, доцент, кафедра ортопедичної стоматології, ВПНЗ «Львівський медичний університет», вул. Валер'яна Поліщука, 76, м. Львів, 79018, Україна; e-mail: lvivmedinst@gmail.com, lvivmeduniver@gmail.com

For correspondence: Petro Olekshiy, PhD in Medicine, Associate Professor, Department of Orthopedic Dentistry, Private Higher Education Institution "Lviv Medical University", Valerian Polishchuk st., 76, Lviv, 79018, Ukraine; e-mail: lvivmedinst@gmail.com, lvivmeduniver@gmail.com

Full list of authors information is available at the end of the article.

Вступ

Сьогодні запальні захворювання пародонта є однією з найважливіших проблем стоматології, оскільки пародонтит є найбільш поширеною патологією, що уражає осіб молодого віку [1, 2]. При цьому захворюванні спостерігається схильність до прогресування, виникають значні труднощі в досягненні ремісії, втрата зубів у 5 разів більша, ніж за розвитку ускладненого карієсу, знижується якість життя; воно впливає на загальний стан організму; при цьому наявна недостатня кількість ефективних методів діагностики, лікування і профілактики, тому проблема має медико-соціальне значення [3, 4]. Поширеність пародонтиту в різних країнах світу становить від 50 до 90 % [5, 6], а в Україні виявляють близько 80–98 % [7].

Зараз в уявленні про етіологію запальних захворювань пародонта з'явилося поняття про фактори ризику, наявність яких чітко підтверджується епідеміологічними дослідженнями [8, 9]. Фактори ризику, що підвищують імовірність розвитку та ускладнюють перебіг патології пародонта запального характеру, поділяють на дві групи: на наявність яких ми можемо вплинути; на які ми не можемо вплинути [10, 11].

До першої групи належать: гігієна та характер мікрофлори ротової порожнини, стрес, куріння, мікроеlementози, ішемічна хвороба серця (ІХС), ожиріння, соматична патологія, соціальний статус. Провідна роль серед них належить курінню, наявності певних мікроорганізмів ротової порожнини та ураженню серцево-судинної системи. Є дані про підвищений ризик ранньої появи пародонтиту у хворих на ІХС [12].

До іншої групи факторів ризику, на які ми не можемо подіяти, належить поліморфізм гена інтерлейкіну-1, чоловіча стать, старечий вік, негроїдна та латиноамериканська раси. Останні два фактори можуть бути пов'язані з більшою поширеністю серед цих груп населення недостатньої уваги до гігієни ротової порожнини, куріння [13].

Відомо, що серед провідних факторів розвитку запальних і дистрофічних процесів у тканинах пародонта виділяють мікробний фактор — бактеріальну колонізацію пришийкової поверхні зубів у вигляді «бактеріальних бляшок» та інвазію мікроорганізмів у тканини пародонта з виділенням різноманітних медіаторів запалення і факторів протеолізу [14, 15].

Загальноприйнятим вважається, що супутні захворювання та синдроми суттєво змінюють фізіологічні процеси в організмі, знижують його адаптаційні можливості і ефективність лікування, посилюють перебіг запалення та розвиток ускладнень, а також у 85 % випадків здатні ініціювати або активізувати патологічний процес у пародонті [16].

За оцінками фахівців, від різних нервово-психічних розладів страждає кожний третій українець [17]. Стрес розглядається як неспецифічна реакція організму, що виникає на дію зовнішніх і внутрішніх подразників, реалізується як необхідна ланка індивідуальної адаптації організму до середовища. Відомо, що розвиток іммобілізаційного стресу (ІС) супроводжується активацією систем протеолізу, перекисного окиснення

ліпідів (ПОЛ), зниженням активності антипротеїназного й антиокиснювального потенціалу та залученням центральних і периферичних регуляторних механізмів [18, 19].

Останніми роками поряд з відомими концепціями патогенезу запальних захворювань пародонта значну увагу приділяють активізації процесів ліпопероксидації, що спричиняє деструкцію клітинних мембран і загибель клітин пародонта. Неконтрольовані реакції ПОЛ пригнічують захисні механізми організму. Це також сприяє активізації мікроорганізмів, що колонізують ясна та пародонтальні кишені [20]. Надмірно накопичені продукти ПОЛ пошкоджують мембрани клітин та внутрішньоклітинні органели. Це супроводжується деструктивними змінами тканин, гіперензімією та накопиченням токсичних речовин [21].

Процеси ПОЛ відіграють важливу роль не лише за фізіологічних умов, але й при патології. Зокрема, запалення, стрес, гіпоксія, алергія зумовлюють порушення рівноваги між ПОЛ і антиоксидантною системою (АОС), що є однією з ключових ланок патогенезу багатьох захворювань [22].

З'ясовано, що тварини, які піддавалися дії стресу, більш чутливі до різних інфекцій, особливо до вірусу *Herpes simplex*, полімієліту, Коксакі В та інших. Найшвидше реагують на стресові ушкодження тимус та інші лімфоїдні органи. При хронічному стресі зменшується резистентність тварин до протипухлинного росту, спостерігається спад протимікробного імунітету, зниження цитотоксичної та кілерної функції Т-лімфоцитів, активності НК-клітин. Ступінь імунодепресії залежить від сили і тривалості дії стресора, а також пов'язаний зі збільшенням концентрації глюкокортикоїдних гормонів у сироватці крові, перерозподілом лімфоцитів [23].

Загальновизнаним є факт, що гострий стрес зумовлює зниження протиінфекційного та протипухлинного імунітету, а хронічний стрес веде до розвитку вторинного імунодефіциту, який може дати поштовх до формування інфекційних, онкологічних, аутоімунних захворювань або загострення хронічної патології [24].

Водночас недостатньо наукової інформації щодо патофізіологічних особливостей змін процесів ліпопероксидації і антиоксидантного захисту за умов розвитку експериментального пародонтиту (ЕП), асоційованого з ІС, у динаміці їх формування та не з'ясована участь цих процесів у патогенезі запального ураження тканин пародонта та стресу.

До кінця не з'ясовані питання стосовно участі одного з молекулярних механізмів пошкодження клітин, що охоплюють оксидантні й антиоксидантні процеси, в патогенезі формування ЕП, поєданого з ІС, до та після їх лікування.

Тому **мета** нашого дослідження — з'ясувати патофізіологічні особливості змін процесів ліпопероксидації й антиоксидантного захисту в тканинах пародонта в патогенезі експериментального пародонтиту, асоційованого з іммобілізаційним стресом, та встановити можливість їх фармакологічної корекції за допомогою тіоцетаму.

Матеріали та методи

Для реалізації цієї мети роботи були проведені експериментальні дослідження на 88 морських свинках (самцях) масою тіла 0,18–0,21 кг, яких утримували на стандартному раціоні. Морські свинки були обрані через те, що слугують класичним об'єктом для відтворення і вивчення запальних, алергічних процесів, стресу. Вони були розподілені на п'ять груп, що містили по 3 підгрупи (по 8 у кожній): перша — контроль (інтактні тварини); друга — тварини з ЕП з поділом на 3 підгрупи (відповідно на 3-тю, 5-ту і 15-ту добу експерименту); третя — тварини з ІС із 3 підгрупами (на 3-тю, 5-ту і 15-ту добу експерименту); четверта — тварини з ЕП і ІС із 3 підгрупами (відповідно на 3-тю, 5-ту і 15-ту добу експерименту до лікування); п'ята — тварини з ЕП і ІС на 15-ту добу експерименту після лікування тіоцетамом, який вводили впродовж 10 днів (з 6-ї по 15-ту добу) внутрішньом'язово у дозі 250 мг/кг 1 раз на добу. Саме в цей період (5-та, 15-та доба) експерименту було встановлено суттєві зміни показників ПОЛ і АОС за умов їх поєднаного перебігу з розвитком оксидантного стресу. Ми використали таку дозу препарату при ЕП і ІС на підставі даних про його застосування у тварин за механічної травми з масивною кровотечею, при якій наявний реактивний запальний процес та стрес [25].

З метою корекції змін прооксидантної і антиоксидантної системи при ЕП і ІС ми застосували препарат тіоцетам, який має антиоксидантні, протизапальні, протинабрякові, антигіпоксичні, імуномодулюючі, дезінтоксикаційні властивості [26].

З'ясовано, що введення тіоцетаму шурам з масивною крововтратою, поєднаною з механічною травмою та ішемією-реперфузією кінцівки, порівняно з тваринами без корекції вже в ранньому післятравматичному періоді сприяє збільшенню стійкості антиоксидантної ланки захисту і мінімізує порушення показників глутатіонової антипероксидазної системи, зменшує прояви пероксидації ліпідів та оксидної модифікації білків, так само, як і стабілізує вміст креатиніну, сечовини та прояви цитолізу [27].

Були обрані фіксовані строки — 3-тя, 5-та і 15-та доба для експерименту за умов розвитку ЕП і ІС як окремо, так і в їх поєднанні до та після лікування тіоцетамом, що відповідали стадіям гострої запальної відповіді, які охоплювали розвиток хвороби, розпал і зменшення клінічних проявів, реконвалесценцію і репарацію, та стадіям стресу: 3-тя доба відповідала стадії тривоги, 5-та доба — стадії резистентності і 15-та доба — стадії виснаження. Інтактних тварин декапітували під тіопенталовим наркозом, який вводили у дозі 40 мг/кг маси тіла, а також декапітували експериментальних тварин на 3-тю, 5-ту і 15-ту добу розвитку ЕП і ІС до та після застосування препарату тіоцетам і забирали тканини пародонта для проведення біохімічних досліджень.

Моделювання ЕП полягає у тому, що тварини перебували на дієті, яка містила 1 г сухої ліофілізованої печінки великої рогатої худоби, 10 г сухого знежиреного молока і 20 г сухарів. Дієта була розрахована на одну добу для однієї морської свинки. Модель ІС відтворювали шляхом нетравматичної фіксації тварин на спинці впродовж трьох годин.

Процеси ліпопероксидації і АОЗ вивчали за вмістом дієнових кон'югат (ДК), малонового діальдегіду (МДА), активністю супероксиддисмутази (СОД), каталази (КТ) у тканинах пародонта при ЕП і ІС окремо та в їх поєднанні до та після корекції тіоцетамом.

Визначення МДА проводили шляхом внесення у пробірку 0,5 мл сироватки крові (0,5 мл гомогенату тканини) та додавали 5,0 мл 20% розчину фосфорно-вольфрамової кислоти, попередньо перемішували та залишали в холодильнику на 15 хв. Згодом центрифугували за температури 4 °С 15 хв при 2500 об/хв. Потім зливали надосадну рідину, а до осаду додавали 2,0 мл дистильованої води, 1,0 мл 0,8% розчину тіобарбітурової кислоти. Ретельно перемішували, стежачи за рН суміші, герметично закривали корками та інкубували проби 60 хв на водяній бані за 100 °С. Потім пробірки охолоджували та центрифугували при 6000 об/хв протягом 10 хв. Оптичну густина реєстрували в центрифугаті на спектрофотометрі за умов довжини хвилі 535 та 580 нм для виключення оптичного поглинання забарвлених комплексів тіобарбітурової кислоти речовинами неліпідної природи.

Визначення ДК полягало у тому, що до 0,2 мл плазми крові (0,2 мл гомогенату тканини) додавали суміш 2,0 мл ізопропілового спирту та 2,0 мл гептану. Потім струшували впродовж 15 хв. Далі додавали 1,0 мл розчину хлористоводневої кислоти (рН 2,0) та 2,0 мл гептану. Знову струшували. Через 30 хв після відстоювання та розшарування фаз відбирали верхній гептановий шар і в ньому визначали оптичну густина при довжині хвилі 233 нм проти контролю. Як контроль застосовували зразок, у якому замість плазми крові є 0,2 мл води.

Активність СОД визначали за методом R. Fried. Попередньо підготовляли реакційну суміш, змішуючи 1,2 мл 0,15 М фосфатного буфера (рН 7,8), 0,1 мл 0,16 мМ феназинметасульфату, 0,3 мл 0,61 мМ нітросинього тетразолію. Згодом вносили 0,3 мл досліджуваної сироватки крові (0,3 мл гомогенату тканини) до цієї суміші. Через 1 хв реакцію зупиняли 1,0 мл концентрованої оцтової кислоти. Оптичну густина визначали на спектрофотометрі при довжині хвилі 540 нм. Активність СОД була виражена в у.о/мл (г).

Активність КТ визначали за методом R. Holmes, C. Masters. Спочатку підготовляли реакційну суміш: 1,9 мл 0,05 М фосфатного буфера (рН 8,0), 1,0 мл 30 мМ розчину пероксиду водню. До цієї суміші додавали 0,1 сироватки крові (0,1 мл гомогенату тканини), струшували та через 15 хв визначали оптичну густина на спектрофотометрі в кюветі з довжиною оптичного шляху 10 мм проти води з інтервалом 60 с. Визначали активність каталази в м.о/мл (г).

Для отримання гомогенатів тканин пародонта у морських свинок забирали шматочки тканин пародонта шляхом висічення через 1–2 хв після забою тварин. Їх зберігали впродовж 5–6 хв на льоді, а потім знекровлювали багаторазовою перфузією охолодженим фізіологічним розчином за допомогою голки і шприца й подрібнювали ножицями. Зважували подрібнену тканину і поміщали у скляний гомогенізатор з тефлоновим пестиком (МРТУ-42 1505-63). Поміщали склянку гомогенізатора у мішечок зі шматочками льоду під час

гомогенізації для запобігання нагріванню. Проводили гомогенізацію тканини впродовж 30–50 с, роблячи кілька рухів склянкою вгору і вниз; швидкість обертання пестика 800–900 об/хв. Для гомогенізації середовищем був охолоджений 5 мМ трис-НСL буфер рН 7,4, і кінцеве розведення гомогенату становило 1 : 9.

Одержаний тканинний гомогенат фільтрували через 2 шари марлі в пробірки для центрифугування. З метою отримання щільної фракції і видалення не повністю зруйнованих клітин і ядер гомогенат центрифугували 10 хв при 3000 g ($t = 0 \pm 2$). Під час досліджень застосовували надосадову рідину.

Статистичне опрацювання отриманих результатів. Усі числові результати піддавали статистичному опрацюванню з використанням середньої арифметичної (M), похибки середньої арифметичної (m), критерію Стюдента t. Розрахунки виконані з використанням засобів статистичного та графічного аналізу електронних таблиць Microsoft Excel пакета програм Microsoft Office.

Результати

Для з'ясування особливостей змін ПОЛ і АОС у тканинах пародонта визначали вміст ДК, МДА і активність СОД і КТ при ЕП. За умов розвитку ЕП (на 3-тю, 5-ту і 15-ту добу) відбувається підвищення вмісту ДК у тканинах пародонта відповідно на 51,6 % ($P < 0,05$), 75,8 % ($P < 0,05$) і 58,2 % порівняно з контролем. Це свідчить про стабільне зростання одного з первинних продуктів ПОЛ, що було найбільше виражено на 5-ту добу експерименту і відповідало стадії розпалу гострої запальної відповіді (табл. 1).

Визначення кінцевого метаболіту ПОЛ, а саме МДА, дало змогу виявити його зростання при ЕП (на 3-тю, 5-ту і 15-ту добу) відповідно на 33,8 % ($P < 0,05$), 64,4 %

($P < 0,05$) і 37,2 % ($P < 0,05$) порівняно з першою групою тварин. Це вказує на надмірне накопичення продуктів ПОЛ, що переважало на 5-ту добу експерименту (табл. 1).

Гіперпродукція метаболітів ліпопероксидації зумовила суттєві зміни стану ферментативної ланки антиоксидантної системи при ЕП.

Нами констатовано компенсаторне підвищення активності СОД і КТ у тканинах пародонта на 3-тю і 5-ту добу запального процесу відповідно на 30,5 % ($P < 0,05$), 29,6 % ($P < 0,05$) та 24,2 % ($P < 0,05$), 21,3 % ($P < 0,05$) з подальшим (на 15-ту добу) помітним зниженням активності СОД на 22,0 % ($P < 0,05$) і КТ — на 25,8 % ($P < 0,05$) порівняно з групою інтактних тварин (табл. 1).

Дослідження зазначених вище показників ПОЛ у тканинах пародонта при ІС виявило помітне зростання їх на усіх етапах експерименту (3-тя, 5-та, 15-та доба), зокрема ДК відповідно на 76,9 % ($P < 0,05$), 67,0 % ($P < 0,05$), 60,4 % ($P < 0,05$) та МДА на 38,9, 30,5, 26,5 % ($P < 0,05$) проти контрольної групи тварин з домінуванням на першій стадії (тривоги) стресу (табл. 2). Це можна пояснити тим, що реакція тривоги розглядається як негативна мобілізація захисних сил організму. Цей процес складається з фази шоку і протишоку, яка супроводжується стійким підвищенням секреції кортикотропіну і кортикостероїдів, впливом стресорних гормонів на показники ПОЛ.

Надмірне накопичення токсичних метаболітів ліпопероксидації зумовлювало компенсаторне підвищення активності СОД і КТ на 3-тю і 5-ту добу ІС відповідно на 31,1, 27,3 % ($P < 0,05$) і 23,7, 21,6 % ($P < 0,05$) (табл. 2). Це відповідало першій і другій стадії (тривоги і резистентності) стресу з подальшим зниженням (15-та

Таблиця 1. Уміст продуктів ПОЛ та активність ферментів АОС у тканинах пародонта при ЕП

Вид дослідження	Тривалість, доба	Кількість тварин	ДК, нмоль/мл (г)	МДА, нмоль/мл (г)	СОД, у.о/мл (г)	КТ, м.о/мл (г)
Інтактна група тварин	Контроль	8	9,1 ± 0,2	17,7 ± 0,7	91,2 ± 2,2	37,9 ± 1,2
ЕП	3-тя доба	8	13,8 ± 0,4 $P < 0,05$	23,7 ± 1,3 $P < 0,05$	119,1 ± 2,3 $P < 0,05$	47,1 ± 1,3 $P < 0,05$
	5-та доба	8	16,0 ± 0,5 $P < 0,05$	29,1 ± 1,4 $P < 0,05$	118,2 ± 2,3 $P < 0,05$	46,0 ± 1,2 $P < 0,05$
	15-та доба	8	14,4 ± 0,5 $P < 0,05$	24,3 ± 1,3 $P < 0,05$	71,1 ± 2,2 $P < 0,05$	28,1 ± 1,1 $P < 0,05$

Примітка: P — вірогідність різниці показників при порівнянні ЕП з результатами у контрольній групі.

Таблиця 2. Уміст продуктів ПОЛ та активність ферментів АОС у тканинах пародонта при ІС

Вид дослідження	Тривалість, доба	Кількість тварин	ДК, нмоль/мл (г)	МДА, нмоль/мл (г)	СОД, у.о/мл (г)	КТ, м.о/мл (г)
Інтактна група тварин	Контроль	8	9,1 ± 0,2	17,7 ± 0,7	91,2 ± 2,2	37,9 ± 1,2
ІС	3-тя доба	8	16,1 ± 0,5 $P < 0,05$	24,6 ± 1,3 $P < 0,05$	119,6 ± 2,3 $P < 0,05$	46,9 ± 1,2 $P < 0,05$
	5-та доба	8	15,2 ± 0,5 $P < 0,05$	23,1 ± 1,3 $P < 0,05$	116,1 ± 2,2 $P < 0,05$	46,1 ± 1,2 $P < 0,05$
	15-та доба	8	14,6 ± 0,5 $P < 0,05$	22,4 ± 1,2 $P < 0,05$	73,9 ± 2,1 $P < 0,05$	28,2 ± 1,1 $P < 0,05$

Примітка: P — вірогідність різниці показників при порівнянні ІС з результатами у контрольній групі.

доба) їх активності відповідно на 18,9 і 25,5 % порівняно з інтактною групою тварин. Спостерігали суттєве зниження антиоксидантної системи і нездатність її повністю нейтралізувати велику кількість продуктів ПОЛ з розвитком оксидантного стресу та його патогенний вплив на тканини пародонта.

Важливе значення для більшого розуміння окремих механізмів розвитку хвороби має дослідження, яке стосувалося з'ясування особливостей змін показників оксидантної й антиоксидантної систем при ЕП, асоційованому з ІС.

Ми з'ясували, що маніфестація поєданого ЕП і ІС (3-тя, 5-та, 15-та доба) супроводжується послідовним зростанням вмісту ДК у тканинах пародонта відповідно на 79,1, 85,7, 95,6 % ($P < 0,05$) і МДА на 40,6, 70,6, 74,5 % ($P < 0,05$) проти першої групи тварин, що свідчило про інтенсифікацію процесів ліпопероксидації в усіх періодах розвитку цієї моделі хвороби і стресу з перевагою на 15-ту добу експерименту (табл. 3).

Ця гіперпродукція метаболітів ПОЛ спричинила суттєвий вплив на ферментативну систему антиоксидантного захисту. На перших етапах (3-тя доба) формування ЕП і ІС відбувалося зростання активності СОД на 28,9 % ($P < 0,05$) і КТ — на 26,1 % ($P < 0,05$), а надалі (на 5-ту і 15-ту добу) був виявлений оксидантний стрес, який проявлявся помітним зниженням активності СОД відповідно на 28,6, 49,6 % ($P < 0,05$) і КТ — на 36,1, 53,5 % ($P < 0,05$) порівняно з першою групою тварин на тлі надмірного підвищення первинних і кінцевих продуктів ПОЛ. Це свідчить про наявність молекулярного (ліпідного) механізму пошкодження клітин та його патогенний вплив на перебіг пародонтиту і стресу (табл. 3).

Застосування тіоцетаму з лікувальною метою приводило до зниження вмісту ДК і МДА в тканинах пародонта відповідно на 35,9, 35,5 % ($P < 0,05$) та підвищення активності СОД на 77,3 % ($P < 0,05$) і КТ на 78,9 % ($P < 0,05$) щодо групи тварин з ЕП і ІС на 15-ту добу експерименту, які не піддавалися впливу цього препарату. Це підтверджує його антиоксидантну дію на порушені метаболічні процеси за умов формування цієї експериментальної моделі хвороби та стресу (табл. 3).

Отже, проведені нами біохімічні дослідження показників ПОЛ і АОС у тканинах пародонта в динаміці розвитку ЕП і ІС окремо та в їх асоціації підтвердили формування оксидантного стресу, який виникав пізніше в умовах їх ізольованого перебігу, ніж у поєднанні, проти контрольної групи тварин, що свідчить про важливу роль порушених процесів ліпопероксидації і антиоксидантного захисту в патогенезі цієї моделі хвороби і стресу до лікування. Застосування тіоцетаму призводило до зниження рівня продуктів ПОЛ та підвищення активності СОД і КТ, що свідчить про його антиоксидантну дію на змінені метаболічні процеси за умов розвитку ЕП, асоційованого з ІС.

Обговорення

Отримані нами результати досліджень тканин пародонта за умов розвитку ЕП виявили постійне зростання продуктів ПОЛ на усіх етапах його розвитку (3-тя, 5-та та 15-та доба) та компенсаторне підвищення ферментів антиоксидантної системи на 3-тню, 5-ту добу запального процесу в пародонті з наступним (15-та доба) помітним зниженням активності СОД і КТ проти інтактної групи тварин. Це свідчить про розвиток оксидантного стресу, ознаки якого були найбільше виражені при запальному процесі у тканинах пародонта на 15-ту добу експерименту, і може вказувати на участь одного з молекулярних механізмів пошкодження клітин у патогенезі цієї моделі хвороби та переважання механізмів пошкодження над механізмами захисту, посилення запалення.

У цьому контексті доцільно зауважити, що окремі автори вважають, що активізація процесів ПОЛ викликає деструкцію клітинних мембран і загибель клітин пародонта. Це призводить до зниження місцевих захисних механізмів та активізації мікроорганізмів, які наявні в пародонтальній кишені, до активізації запалення [28].

Ми з'ясували, що стабільне зростання метаболітів ліпопероксидації, які переважали на 3-тню добу експерименту, та компенсаторне підвищення активності СОД і КТ у першій та другій стадії стресу (тривоги і резистентності) з наступним їх зниженням на 15-ту добу (стадія виснаження) вказує на розвиток оксидантного стресу та його патогенний вплив на тканини пародон-

Таблиця 3. Уміст продуктів ПОЛ та активність ферментів АОС у тканинах пародонта при ЕП і ІС до та після застосування тіоцетаму

Вид дослідження	Тривалість, доба	Кількість тварин	ДК, нмоль/мл (г)	МДА, нмоль/мл (г)	СОД, у.о/мл (г)	КТ, м.о/мл (г)
Інтактна група тварин	Контроль	8	9,1 ± 0,2	17,7 ± 0,7	91,2 ± 2,2	37,9 ± 1,2
ІС і ЕП до лікування	3-тя доба	8	16,3 ± 0,4 $P < 0,05$	24,9 ± 1,4 $P < 0,05$	117,6 ± 2,3 $P < 0,05$	47,8 ± 1,4 $P < 0,05$
	5-та доба	8	16,9 ± 0,5 $P < 0,05$	30,2 ± 1,5 $P < 0,05$	65,1 ± 2,1 $P < 0,05$	24,2 ± 0,8 $P < 0,05$
	15-та доба	8	17,8 ± 0,6 $P < 0,05$	30,9 ± 1,5 $P < 0,05$	45,9 ± 1,7 $P < 0,05$	17,6 ± 0,7 $P < 0,05$
ІС і ЕП після лікування тіоцетамом	15-та доба	8	11,4 ± 0,4 $P < 0,05$ $P_1 < 0,05$	19,9 ± 1,2 $P < 0,05$ $P_1 < 0,05$	81,4 ± 2,3 $P < 0,05$ $P_1 < 0,05$	31,5 ± 1,3 $P < 0,05$ $P_1 < 0,005$

Примітки: P — вірогідність різниці показників при поєднанні ЕП і ІС з результатами у контрольній групі; P_1 — вірогідність різниці показників при поєднанні ЕП і ІС до та після лікування тіоцетамом на 15-ту добу експерименту.

та. Тривалий і інтенсивний вплив ІС порушує адаптаційні можливості організму, що, очевидно, спричиняє помітне зниження функціональних резервів, можливу атрофію коркової речовини надниркових залоз, розпад білкових речовин, що призводить до переходу стадії резистентності (5-та доба) в стадію виснаження (15-та доба) [29].

Відомо, що розвиток ІС супроводжується активізацією ПОЛ, процесів протеолізу та зниженням антиокиснювального потенціалу, пригніченням захисних механізмів організму та розвитком вторинного імунodefіциту і запальних процесів [30].

Ми виявили, що в умовах формування ЕП, асоційованого з ІС, відбувалося поступове накопичення продуктів ПОЛ та зниження активності ферментів антиоксидантного захисту, які переважали на 15-ту добу експерименту проти контролю і засвідчували наявність одного з молекулярних (ліпідних) механізмів пошкодження клітин, що стосувалися процесів ПОЛ і АОС.

Застосування з лікувальною метою тіоцетаму спричиняло антиоксидантну дію на процеси ПОЛ і АОС, а саме зниження вмісту ДК і МДА та підвищення активності СОД та КТ у тканинах пародонта за умов розвитку ЕП і ІС. Фармакологічний ефект цього препарату зумовлений взаємопотенціюючою дією тіазотної кислоти та пірацетаму, а саме гальмуванням шляхів утворення активних форм кисню, реактивацією антиоксидантної системи, особливо СОД і КТ, пригніченням вільнорадикальних процесів у тканинах пародонта, а отже, стабілізацією та зменшенням зони некрозу, ішемії та запалення [26]. Відомо, що застосований препарат тіоцетам містить два компоненти: пірацетам і тіотриазолін. Перший компонент цього лікарського засобу пірацетам стимулює активність ферментів антиоксидантного захисту, стабілізує клітинні мембрани, стимулює альтернативні шляхи метаболізму при гіпоксії, сприяє поліпшенню мікроциркуляції. Другий компонент тіотриазолін проявляє протизапальні, протинабрякові, антигіпоксичні, імуномодуючі, дезінтоксикаційні, антиоксидантні властивості й попри активацію ферментативної ланки має самостійну здатність бути акцептором вільних радикалів, зменшує утворення активних форм кисню в мітохондріях, сприяє репаративній регенерації печінки [31].

Отже, проведені нами комплексні дослідження маркерів ПОЛ і активності ферментів АОС виявили формування оксидантного стресу, який посилює запальний процес у тканинах пародонта. Застосування тіоцетаму засвідчило антиоксидантний вплив на порушені процеси ПОЛ і АОС за умов розвитку ЕП і ІС.

Висновки

1. Експериментальний пародонтит на усіх етапах розвитку (3-тя, 5-та, 15-та доба) супроводжується надмірним зростанням вмісту ДК і МДА в тканинах пародонта переважно на стадії розпаду хвороби з компенсаторним підвищенням активності СОД і КТ на 3-тій і 5-ту добу експерименту, а далі (15-та доба) з їх помітним зниженням проти контролю та розвитком оксидантного стресу, який виявляв патогенний вплив.

2. На усіх етапах (3-тя, 5-та, 15-та доба) маніфестації ІС відбувалося стабільне зростання продуктів ліпопероксидації з домінуванням на 3-тій добу, що відповідало першій стадії (тривоги) стресу. Активність ферментів (СОД і КТ) зростала на стадії тривоги і резистентності проти контролю та була суттєво зниженою у стадії виснаження, що свідчило про наявність оксидантного стресу.

3. Поєднаний ЕП з ІС викликав послідовне зростання процесів ліпопероксидації з компенсаторним підвищенням активності ферментів антиоксидантного захисту на 3-тій добу і наступним (5-та, 15-та доба) їх суттєвим зниженням, що свідчило про розвиток оксидантного стресу швидше, ніж за умов ізольованого перебігу цієї моделі хвороби і стресу, проти інтактної групи тварин та про його патогенний вплив на запальний процес у тканинах пародонта.

4. Застосування тіоцетаму зумовлювало антиоксидантний вплив на порушені показники ліпопероксидації і АОС: знижувався вміст ДК, МДА та зростала активність СОД і КТ на 15-ту добу ЕП і ІС щодо групи тварин з цією моделлю хвороби і стресу без впливу лікарського середника, що підтверджувало доцільність його подальшого вивчення в експерименті та в клініці.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів та власної фінансової зацікавленості при підготовці даної статті.

Внесок авторів. Регада М.С., Регада-Фурдичко М.М. — створення концепції, редагування та затвердження остаточного варіанта; Олексій П.В. — результати дослідження, написання; Регада С.М. — редагування та затвердження остаточного варіанта.

References

1. Romandini M, Shin HS, Romandini P, Lafori A, Cordaro M. Hormone-related events and periodontitis in women. *J Clin Periodontol.* 2020 Apr;47(4):429-441. doi: 10.1111/jcpe.13248.
2. Su X, Jin K, Zhou X, et al. The association between sex hormones and periodontitis among American adults: A cross-sectional study. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023 Feb 14;14:1125819. doi: 10.3389/fendo.2023.1125819.
3. Stutz C, Batool F, Petit C, et al. Influence of parathyroid hormone on periodontal healing in animal models: A systematic review. *Arch Oral Biol.* 2020 Dec;120:104932. doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104932.
4. Man Y, Zhang C, Cheng C, Yan L, Zong M, Niu F. Hormone replacement therapy and periodontitis progression in postmenopausal women: A prospective cohort study. *J Periodontol Res.* 2024 Mar 24. doi: 10.1111/jre.13258.
5. Trindade D, Carvalho R, Machado V, Chambrone L, Mendes JJ, Botelho J. Prevalence of periodontitis in dentate people between 2011 and 2020: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *J Clin Periodontol.* 2023 May;50(5):604-626. doi: 10.1111/jcpe.13769.
6. Nazir M, Al-Ansari A, Al-Khalifa K, Alhareky M, Gaffar B, Almas K. Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *ScientificWorldJournal.* 2020 May 28;2020:2146160. doi: 10.1155/2020/2146160.
7. Hlushchenko TA, Batig VM, Borysenko AV, et al. Prevalence

- and Intensity of Periodontal Disease in Individuals with Metabolic Syndrome. *J Med Life*. 2020 Jul-Sep;13(3):289-292. doi: 10.25122/jml-2020-0073.
8. Eke PI, Dye BA, Wei L, et al. Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol*. 2015 May;86(5):611-622. doi: 10.1902/jop.2015.140520.
9. Lorenzo-Erro SM, Andrade E, Massa F, Colistro V, Asquino N, Moliterno P. Periodontitis prevalence and associated factors: a comparison of two examination protocols. *Acta Odontol Latinoam*. 2022 Dec 31;35(3):178-187. doi: 10.54589/aol.35/3/178.
10. Tibúrcio-Machado CS, Michelin C, Zanatta FB, Gomes MS, Marin JA, Bier CA. The global prevalence of apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J*. 2021 May;54(5):712-735. doi: 10.1111/iej.13467.
11. Stødle IH, Verket A, Høvik H, Sen A, Koldsland OC. Prevalence of periodontitis based on the 2017 classification in a Norwegian population: The HUNT study. *J Clin Periodontol*. 2021 Sep;48(9):1189-1199. doi: 10.1111/jcpe.13507.
12. Rahimi A, Afshari Z. Periodontitis and cardiovascular disease: A literature review. *ARYA Atheroscler*. 2021 Sep;17(5):1-8. doi: 10.22122/arya.v17i0.2362.
13. Wang BY, Burgardt G, Parthasarathy K, et al. Influences of race/ethnicity in periodontal treatment response and bacterial distribution, a cohort pilot study. *Front Oral Health*. 2023 Jun 12;4:1212728. doi: 10.3389/froh.2023.1212728.
14. Bandrivsky YL, Bandrivska OO, Shkrebnuk RY, Dyrk VT. Prevalence of the generalized periodontitis in patients with different groups blood in depending on age and periodontal biotype. *Wiad Lek*. 2020;73(1):119-122.
15. Curtis MA, Diaz PI, Van Dyke TE. The role of the microbiota in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2020 Jun;83(1):14-25. doi: 10.1111/prd.12296.
16. Athanasiou N, Bogdanis GC, Mastorakos G. Endocrine responses of the stress system to different types of exercise. *Rev Endocr Metab Disord*. 2023 Apr;24(2):251-266. doi: 10.1007/s11154-022-09758-1.
17. Kordel P, Rządęczka M, Studenna-Skrukwa M, Kwiatkowska-Moskalewicz K, Goncharenko O, Moskalewicz M. Acute Stress Disorder among 2022 Ukrainian war refugees: a cross-sectional study. *Front Public Health*. 2024 Mar 14;12:1280236. doi: 10.3389/fpubh.2024.1280236.
18. Sahin Z, Ozkurkculer A, Kalkan OF, et al. Chronic immobilization stress induces anxiety-related behaviors and affects brain essential minerals in male rats. *Int J Vitam Nutr Res*. 2022 Oct;92(5-6):349-356. doi: 10.1024/0300-9831/a000682.
19. Son H, Yang JH, Kim HJ, Lee DK. A Chronic Immobilization Stress Protocol for Inducing Depression-Like Behavior in Mice. *J Vis Exp*. 2019 May 15;(147). doi: 10.3791/59546.
20. Yarov YY, Tkachenko II. Dynamics of anti-antioxidant system indicators in the postoperative period in patients with periodontitis accompanied by different reactivity of the organism. *Wiad Lek*. 2021;74(9 cz 1):2187-2191.
21. Veljovic T, Djuric M, Mirnic J, et al. Lipid Peroxidation Levels in Saliva and Plasma of Patients Suffering from Periodontitis. *J Clin Med*. 2022 Jun 23;11(13):3617. doi: 10.3390/jcm11133617.
22. Vo TTT, Chu PM, Tuan VP, Te JS, Lee IT. The Promising Role of Antioxidant Phytochemicals in the Prevention and Treatment of Periodontal Disease via the Inhibition of Oxidative Stress Pathways: Updated Insights. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Dec 1;9(12):1211. doi: 10.3390/antiox9121211.
23. Gervasi SS, Burgan SC, Hofmeister E, Unnasch TR, Martin LB. Stress hormones predict a host superspreader phenotype in the West Nile virus system. *Proc Biol Sci*. 2017 Jul 26;284(1859):20171090. doi: 10.1098/rspb.2017.1090.
24. Yeager MP, Guyre CA, Sites BD, Collins JE, Pioli PA, Guyre PM. The Stress Hormone Cortisol Enhances Interferon- α Mediated Proinflammatory Responses of Human Immune Cells. *Anesth Analg*. 2018 Aug;127(2):556-563. doi: 10.1213/ANE.0000000000003481.
25. Sikiryńska DO, Hudyma AA, Shulhai AH, Pokhodun KA. The effect of cranioskeletal trauma complicated by blood loss on the functional state of the liver in the early period of traumatic disease in rats with different resistance to hypoxia and their correction. *Journal of Education, Health and Sport*. 2021;11(2):256-269. doi: 10.12775/JEHS.2021.11.02.025.
26. Demchenko A, Horbachova S, Revenko A. Antioxidative efficacy of neuroprotective therapy in patients with chronic cerebral ischemia. *Georgian Med News*. 2019 Nov;(296):62-66.
27. Sawires H, Botrous O. Double-blind, placebo-controlled trial on the effect of piracetam on breath-holding spells. *Eur J Pediatr*. 2012 Jul;171(7):1063-1067. doi: 10.1007/s00431-012-1680-1.
28. Abdulkareem AA, Al-Taweel FB, Al-Sharqi AJB, Gul SS, Sha A, Chapple ILC. Current concepts in the pathogenesis of periodontitis: from symbiosis to dysbiosis. *J Oral Microbiol*. 2023 Apr 2;15(1):2197779. doi: 10.1080/20002297.2023.2197779.
29. Shilpa BM, Bhagya V, Harish G, Srinivas Bharath MM, Shankaranarayana Rao BS. Environmental enrichment ameliorates chronic immobilisation stress-induced spatial learning deficits and restores the expression of BDNF, VEGF, GFAP and glucocorticoid receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017 Jun 2;76:88-100. doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.02.025.
30. Meejuru GF, Somavarapu A, Danduga RCSR, Nissankara Roa LS, Kola PK. Protective effects of duloxetine against chronic immobilisation stress-induced anxiety, depression, cognitive impairment and neurodegeneration in mice. *J Pharm Pharmacol*. 2021 Mar 8;73(4):522-534. doi: 10.1093/jpp/rgaa003.
31. Malykh AG, Sadaie MR. Piracetam and piracetam-like drugs: from basic science to novel clinical applications to CNS disorders. *Drugs*. 2010 Feb 12;70(3):287-312. doi: 10.2165/11319230-000000000-00000.

Отримано/Received 18.04.2024

Рецензовано/Revised 11.06.2024

Прийнято до друку/Accepted 19.06.2024 ■

Information about authors

Mykhailo Regeda, MD, DSc, PhD, Professor, Head of the Department of Pathological Physiology, Danylo Halatsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine; e-mail: lvivmedinst@gmail.com, kaf_pathophysiology@meduniv.lviv.ua; <https://orcid.org/0000-0002-1238-393X>

Petro Olekshiy, PhD in Medicine, Associate Professor, Department of Orthopedic Dentistry, Private Higher Education Institution "Lviv Medical University", Lviv, Ukraine; e-mail: lvivmedinst@gmail.com, lvivmeduniver@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-7619-2286>

Maryana Regeda-Furdychko, MD, DSc, PhD, Associate Professor, Department of Anatomy, Physiology and Pathology, Private Higher Education Institution "Lviv Medical University", Lviv, Ukraine; e-mail: f-30@i.ua; <https://orcid.org/0000-0001-5519-5907>

Stepan Reheda, PhD in Medicine, Associate Professor, Department of Surgical and Orthopedic Stomatology, Faculty of Postgraduate Education, Danylo Halatsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine; e-mail: ms-estetic2016@ukr.net; <https://orcid.org/0000-0001-9142-7357>

Conflicts of interests. Authors declare the absence of any conflicts of interests and own financial interest that might be construed to influence the results or interpretation of the manuscript.

Authors' contribution. M.S. Regeda, M.M. Regeda-Furdychko — conceptualization, editing and final approval; P.V. Olekshiy — results of study, writing; S.M. Reheda — editing and final approval.

M.S. Regeda¹, P.V. Olekshiy², M.M. Regeda-Furdychko², S.M. Reheda¹

¹ Danylo Halatsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

² Private Higher Education Institution "Lviv Medical University", Lviv, Ukraine

Prevention of immobilization stress-induced lipid peroxidation processes and antioxidant protection disorders in the development of experimental periodontitis

Abstract. Background. Periodontitis is one of the most common dental diseases. It is generally accepted that concomitant diseases and syndromes significantly change physiological processes in the body, reduce its adaptive capabilities and treatment effectiveness, and can initiate or activate the pathological process in the periodontium. Psychosomatic disorders and stress are no less common. The excessive and prolonged action of stress factors can contribute to developing diseases. Currently, questions concerning the pathophysiological characteristics of changes in the processes of lipid peroxidation and antioxidant protection in the pathogenesis of periodontitis associated with stress remain unexplored. The purpose was to investigate the pathophysiological features of lipid peroxidation and antioxidant protection disorders in periodontal tissues with experimental periodontitis (EP) associated with immobilization stress (IS) and to evaluate the possibility of their pharmacological correction using thiocetam. **Materials and methods.** Biochemical studies were conducted on 88 male guinea pigs (males) with a body weight of 0.18–0.21 kg, who were fed a standard diet and were divided into five groups. The first group comprised intact animals (controls); the second group included animals with EP and was divided into three subgroups on the 3rd, 5th, and 15th days, respectively; the third group consisted of animals with IS in three subgroups; the fourth group comprised animals with combined EP and IS in three subgroups

before treatment; and the fifth group included animals with EP and IS after the therapy with thiocetam, which was administered intramuscularly at a dose of 250 mg/kg once a day between the 6th and 15th days. **Results.** EP associated with IS at all stages of its development (3rd, 5th, 15th days) is accompanied by a gradual increase in the level of diene conjugates, malondialdehyde, a compensatory increase in superoxide dismutase and catalase activity on the 3rd day of the experiment, and subsequently by their significant decline on the 5th and 15th days, which indicated the development of oxidative stress. Thiocetam decreased lipid peroxidation products and increased the activity of these enzymes in periodontal tissues, which showed its antioxidant effect in EP and IS. **Conclusions.** The association between EP and IS resulted in the enhancement of lipid peroxidation processes against the backdrop of a decreased antioxidant protection in periodontal tissues, particularly on the 5th and 15th days of the experiment, compared to the control group, indicating the presence of oxidative stress. The administration of thiocetam had the antioxidant effect (a reduction in the concentration of diene conjugates, malondialdehyde, an increase in superoxide dismutase, and catalase activity in periodontal tissues) under the conditions of EP associated with IS compared to a group of animals without any treatment.

Keywords: immobilization stress; lipid peroxidation; antioxidant system; experimental periodontitis