

Стан тканин пародонта у щурів на тлі їх тривалої алкоголізації

А.А. Котвицька¹, К.В. Тихонович¹, Т.Д. Криворучко¹,
С.М. Береговий², К.С. Непорада¹

¹Полтавський державний медичний університет;

²Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка; e-mail: neporadaks@gmail.com

Вивчали стан тканин пародонта щурів на тлі тривалої алкоголізації. Дослідження проводили на 19 білих нелінійних щурах масою 180–220 г, які рандомізовано були розділені на 2 групи. Тваринам упродовж 72 днів інтрагастрально вводили фізіологічний розчин (контрольна група) або етанол зростаючої концентрації (дослідна група) за наступною схемою: 1–24 дні – 11,8%; 25–48 – 23,6%; 49–72 дні – 37%. У м'яких тканинах пародонта щурів визначали вміст вільної фукози (мономер фукопротеїнів), глікозаміногліканів (гетерополісахари протеогліканів), загальну протеолітичну активність, загальну антириптичну активність, вміст ТБК-активних продуктів, вміст окисно-модифікованих білків та активність каталази. Встановлено, що алкоголізація щурів спричиняла зростання у тканинах пародонта вмісту ТБК-активних продуктів на 74,7%, вмісту окисно-модифікованих білків на 28,9% та активності каталази на 33,3%, що свідчить про активацію вільнорадикальних процесів. Водночас загальна протеолітична активність зменшувалась на 20,6% на тлі зниження активності інгібіторів протеїназу на 9,6%. Також за умов довготривалого введення етилового спирту тваринам спостерігалася підвищена деполімеризація фукопротеїдів та протеогліканів сполучної тканини пародонта, доказом чого було зростання вмісту вільної фукози на 37,5% та глікозаміногліканів 175,4%. Отже, за умов довготривалого введення етилового спирту щурам підвищувалася деполімеризація фукопротеїдів та протеогліканів сполучної тканини пародонта, що має провідне значення для фіксації та стабільності зубів.

Ключові слова: алкоголь; тканини пародонта; оксидативний стрес; протеази; інгібітори протеаз.

ВСТУП

За даними соціологічної групи Рейтинг, 66% опитаних українців вживають алкогольні напої: 33% вживають його рідше, ніж раз на місяць, 26% – кілька разів на місяць, 7% – кілька разів на тиждень, 1% – кожного дня. Щороку через алкоголізм в Україні помирає понад 40 тисяч людей. Станом на 01.01.2019 р. під наглядом за звітний період у диспансерній групі перебувало 460717 осіб із розладами психіки та поведінки через вживання алкоголю.

Звичне вживання алкогольних напоїв збільшує ризик розвитку серцево-судинних захворювань, цереброваскулярних захво-

рувань, злоякісних новоутворень та алкогольної хвороби печінки. Щодо зв'язку між стоматологічними захворюваннями та впливом етанолу, за оцінками ВООЗ, вживання алкоголю вважається причиною раку ротової порожнини та глотки.

Global Burden of Disease показало, що кількість людей з не лікованими хворобами ротової порожнини зросла з 2,5 мільярдів у 1990 р. до 3,5 мільярдів у 2015 р. Захворюваннями тканин пародонта страждає близько половини дорослого населення у всьому світі, провідним етіологічним фактором яких є пародонтопатогени, які викликають запальну реакцію з поступовим руйнуванням тканин пародонта і, нарешті,

© А.А. Котвицька, К.В. Тихонович, Т.Д. Криворучко, С.М. Береговий, К.С. Непорада

втратою зубів. Fi і Wo [1] вважають куріння тютюну, вживання алкоголю та системні захворювання додатковими чинниками ризику захворювань тканин пародонта. Етанол посилює експресію запальних маркерів (індуцибельної NO-синтази – iNOS та інтерлейкінів 1β – IL- 1β) у ясенній тканині щурів [2] та сприяє втраті альвеолярної кістки [3], а також доведений зв'язок між вживанням алкоголю та жувальними розладами [4].

Отже, за умов алкоголізації виникають зміни в органах порожнини рота, механізм яких з'ясований не до кінця. Проте виникає питання про тривалість алкоголізації, на тлі якої розвиваються наведені зміни. У різних роботах були використані різні терміни спостереження на людях або неоднакова тривалість введення експериментальним тваринам алкоголю. Ми вирішили уніфікувати тривалість введення етанолу щурам і зупинились на тій тривалості, за якої розвивається алкогольна полінейропатія з ураженням периферичних нервів. У літературі мова йде про нерви, що іннервують ноги та руки у людини та кінцівки у тварин. Оскільки трійчастий нерв та його гілки є також периферичними нервами, ми припустили, що за умов розвитку алкогольної полінейропатії страждають як верхньо- так і нижньощелепні гілки трійчастого нерва, внаслідок чого порушується іннервація тканин пародонта. На наше припущення вплинули останні дослідження діабетичної полінейропатії. Відомо, що при діабеті страждають периферичні нерви рук і ніг, проте накопичилася достатня доказова база того, що страждають і інші периферичні нерви [5].

Алкогольна полінейропатія розвивається, за даними різних авторів, у 13–30% осіб, що страждають від алкогольної залежності, приводячи до стійкої інвалідизації. Водночас латентні безсимптомні форми алкогольної полінейропатії при проведенні комплексного дослідження виявляються у 97–100% хворих, що хронічно зловживають алкоголем. Алко-

гольна нейропатія в США зустрічається приблизно у 65% пацієнтів, у яких діагностовано алкогольну хворобу, спричинену надмірним вживанням і частіше серед жінок, ніж чоловіків. Патогенез алкогольної полінейропатії нині до кінця не з'ясований. Обговорюються провідні механізми розвитку алкогольної полінейропатії: дефіцит вітамінів групи В, пов'язаний з недостатнім харчуванням і/або синдромом мальабсорбції; пряма токсична дія етанолу та його метаболітів. За результатами великої кількості досліджень доходять висновку, що в розвитку алкогольної полінейропатії беруть участь обидва механізми [6].

Мета нашого дослідження – вивчення стану тканин пародонта щурів на тлі тривалої алкоголізації, яка призводила до розвитку алкогольної полінейропатії.

МЕТОДИКА

Дослідження виконані на 19 білих нелінійних щурах обох статей масою 180–220 г. При проведенні експериментів були дотримані нормативи Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 р., Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей, загальним етичним принципам експериментів на тваринах, які ухвалені Першим національним конгресом України з біоетики.

Алкоголізацію щурів здійснювали за схемою: тваринам протягом 72 днів вводили ендogaстрально етанол різної концентрації за допомогою зонду 1–24 дні – 11,8%; 25–48 – 23,6%; 49–72 дні – 37% [7]. Такий термін алкоголізації був вибраний тому, що за даними літератури, через 72 дні алкоголізації у щурів розвивається алкогольна полінейропатія [8]. Контрольній групі щурів інтрагастрально вводили фізіологічний розчин.

Для підтвердження розвитку етаноліндукованої полінейропатії вимірювали поріг больової чутливості (ПБЧ) за рефлексом висмикування щуром лапи, яка подразнюється механічним впливом (початковий

тиск 210 г/мм²) за допомогою анальгезиметра (тензоалгометричний тест Randall-Selitto). Тензоалгометричний тест широко використовують у клінічній практиці та експериментальних дослідженнях [9, 10]. Діагностична чутливість методу становить 92,7%[11]. ПБЧ у щурів вимірювали перед початком моделювання алкогольної нейропатії та після 24, 48, 72 днів вживання алкоголю. Середнє значення ПБЧ, визначене перед початком моделювання нейропатії, брали за 100%.

Об'єктами дослідження були м'які тканини пародонта щурів у гомогенаті яких визначали загальну протеолітичну активність [12], загальну антитриптичну активність [13], вміст ТБК-активних продуктів [14], вміст окисно-модифікованих білків [15] та активність каталази [16], вміст вільної фукози [17] та глікозаміногліканів (ГАГ) [18]. Виведення тварин з експерименту проводилося шляхом кровопускання під тіопенталовим наркозом.

Отримані результати експериментальних досліджень проаналізували з використанням методів варіаційної статистики. Для перевірки розподілу на нормальність було застосовано розрахунок критерію Шапіро-Уїлка. Якщо він відповідав нормальному розподілу, то достовірність їх різниці при порівнянні середньоарифметичних величин визначали за допомогою критерію t Стьюдента для

незалежних вибірок; достовірними даними вважали ті, що відповідають $P < 0,05$. Коли ряди результатів не підлягали нормальному розподілу, статистичну обробку здійснювали, використовуючи непараметричний метод – тест Мана-Уїтні. Статистичний аналіз одержаних результатів було зроблено за допомогою програми Excel 2016.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Перед початком експерименту у щурів контрольної і дослідної груп визначали ПБЧ за допомогою тензоалгометричного тесту Randall-Selitto, який становив $100 \pm 10,8\%$. Упродовж експерименту у щурів контрольної групи він не зазнавав статистично достовірних змін. У щурів дослідної групи, яким упродовж 72 днів вводили етанол, ПБЧ на 24 день експерименту не зазнавав змін, на 48 день зростав на 45,4% ($P < 0,05$), на 72 день – на 62,9% ($P < 0,05$) відносно початкового значення та такого у тварин контрольної групи, що за даними літератури, свідчить про розвиток алкогольної нейропатії [9, 10].

Нами встановлено, що 72-денне введення етилового спирту зростаючої концентрації у щурів зменшувало у тканинах пародонта загальну протеолітичну активність на 20,6% ($P < 0,05$) на тлі зменшення активності інгібіторів протеїназ на 9,6% (табл. 1).

Таблиця 1. Біохімічні показники тканин пародонта щурів за умов 72-денної алкоголізації

Групи тварин	Загальна антитриптична активність, г/кг	Загальна протеолітична активність, мкг/г·хв	Активність каталази, мккат/г·хв	Вміст окисно-модифікованих білків, ум.од.	Вміст ТБК-реактивних, мкмоль/г
Контрольні тварини (n = 10)	$33,2 \pm 1,65$	$3,45 \pm 0,04$	$0,27 \pm 0,04$	$1,35 \pm 0,01$	$2,41 \pm 0,13$
Тварини з алкогольною нейропатією (n = 9)	$30,0 \pm 0,63$	$2,74^* \pm 0,08$	$0,36^* \pm 0,03$	$1,74^* \pm 0,03$	$4,21^* \pm 0,13$

* $P < 0,05$ порівняно з контролем

Отже, тривале вживання етилового спирту зростаючої концентрації призводить до зменшення протеїназно-інгібіторного балансу та порушення ремоделювання у тканинах пародонта.

Важливими компонентами тканин пародонта є сімейство ферментів матричних металопротеїназ, які руйнують колаген та інші протеїни міжклітинного матриксу, та їх антагоністи – тканинні інгібітори металопротеїназ. Баланс між продукцією колагену, інших протеїнів і активністю матричних металопротеїназ визначає цілісність тканин пародонта і, відповідно, стабільність зубів. Також відомо, що етанол знижує протеолітичну активність (катепсинів В і L) у печінці та пригнічує протеасомну деградацію білків у гепатоцитах [19] на тлі підвищення активності тканинних інгібіторів металопротеїназ [20].

У гомеостатичних умовах в організмі генерація та елімінація активних форм кисню (АФК) добре збалансована, завдяки чому їх вміст у стаціонарному стані підтримується на низькому рівні [21]. Існує багато різних маркерів модифікації клітинних складових, індукованих АФК, але ми досліджували індикаторні показники перекисного окиснення ліпідів – ТБК-активні продукти та вимірювали вміст окисно-модифікованих білків методом, оснований на утворенні додаткових карбонільних груп з їх візуалізацією за рахунок взаємодії з 2,4-динітрофенілгідразином.

У результаті етаноліндукованої полінейропатії, на 72 день експерименту нами встановлено розвиток оксидативного стресу у м'яких тканинах пародонта тварин, про що свідчить достовірне зростання в 1,7 раза вмісту вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів ТБК-активних сполук

порівняно з контролем. Також підвищувався вміст окисно-модифікованих білків на тлі зростання активності каталази. Зміни антиоксидантного потенціалу тканин пародонта у щурів також доведені іншими дослідниками при моделюванні експериментального пародонтиту [22]. Отже, етаноліндукована полінейропатія викликає розвиток оксидативного стресу у м'яких тканинах пародонта тварин, що підтверджується іншими дослідниками, які вивчали вплив етанолу на окисно-відновлювальні процеси в органах порожнини рота тварин [23].

Пародонт – це комплекс тканин навколо зубів, що відіграють провідну роль для фіксації та стабільності зуба, і включає фібробласти, які оточені позаклітинним матриксом з протегліканами, глікопротеїдами та іншими позаклітинними білками у вигляді колагену, здебільшого I типу. Тому, аналізуючи вміст вільної фукози, як мономера фукопротеїнів та глікозаміногліканів (ГАГ), як гетерополісахаридів протеогліканів, у тканинах пародонта щурів за умов довготривалого введення етилового спирту зростаючої концентрації, нами отримано збільшення на 37,5 та на 175,4% ($P < 0,05$) відповідно порівняно з контрольними тваринами (табл. 2). Отже, за умов довготривалого введення етилового спирту тваринам спостерігається підвищена деполімеризація фукопротеїдів та протеогліканів сполучної тканини пародонта.

Відомо, що гіалуронова кислота (ГК) є класичним і поширеним компонентом сполучної тканини, зокрема пародонта, відноситься до ендогенних лігандів для Toll-подібних рецепторів-4 (TLR4), які сприяють захисним протизапальним реакціям. Хоча протизапальні властивості ГК

Таблиця 2. Вміст (мкмоль/г) вільної фукози та глікозаміногліканів у тканинах пародонта щурів за умов алкогольної полінейропатії

Групи тварин	Вільна фукоза	Глікозаміноглікани
Контрольна (n = 10)	7,93 ± 0,19	0,61 ± 0,04
Тварини з алкогольною нейропатією (n = 9)	10,90* ± 0,15	1,68** ± 0,17

* $P < 0,05$; ** $P < 0,001$ порівняно з контролем

та її механізми недостатньо вивчені, показано, що вона зменшує продукцію фактора некрозу пухлин α та інтерферонів γ [24]. Chen і співавтор. [25] обґрунтували, що взаємодія TLR4-ГК пов'язана з продукцією циклооксигенази-2 і простагландинів E_2 (PGE_2) для захисту слизової оболонки товстої кишки від експериментального коліту, спричиненого тринітробензолсульфоною кислотою. Потрібні додаткові дослідження, щоб пояснити конкретну роль і механізм взаємодії ГК-TLR4, що може бути корисним для пародонтологічної клінічної допомоги [26].

ВИСНОВОК

Таким чином, за умов довготривалого введення етилового спирту щурам спостерігається підвищена деполімеризація фукопротеїдів та протеогліканів сполучної тканини пародонта, що відіграють провідну роль для фіксації та стабільності зубів.

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

**A.A. Kotvytska¹, K.V. Tykhonovych¹,
T.D. Kryvoruchko¹, S.M. Berehovi²,
K.S. Neporada¹**

THE STATE OF PERIODONTAL TISSUES IN RATS AGAINST THE BACKGROUND OF THEIR LONG-TERM ALCOHOLIZATION

¹ Poltava State Medical University;

² Taras Shevchenko National University of Kyiv, ECS "Institute of Biology and Medicine";

e-mail: neporadaks@gmail.com

The aim of our research is to study the condition of periodontal tissues of rats against the background of prolonged alcoholism. The studies were performed on 19 white nonlinear rats weighing 180-220 g, which were randomly divided into 2 groups. Rats of the first group served as controls. They were injected intragastrally with saline for 72 days. The rats of

the second group for 72 days were intragastrically injected with increasing concentrations of ethanol according to the following scheme: 1-24 days - 11.8%; 25-48 - 23.6%; 49-72 days - 37%. In rat soft periodontal tissues, free fucose content as a monomer of fucoproteins, glycosaminoglycans as proteoglycan heteropolysaccharides, total proteolytic activity, total antitryptic activity, TBA-active products, oxidatively modified proteins and catalase activity was determined. 72-day alcoholization of rats caused an increase in periodontal tissue content of TBA-active products by 74.7%, the content of oxidatively modified proteins by 28.9% and catalase activity by 33.3%, indicating the activation of free radical processes. At the same time, the total proteolytic activity in periodontal tissues decreased by 20.6% against the background of a decrease in the activity of proteinase inhibitors by 9.6%. Also, under conditions of long-term administration of ethyl alcohol to animals an increased depolymerization of fucoproteins and proteoglycans of periodontal connective tissue was observed, as evidenced by an increase in free fucose content by 37.5% and glycosaminoglycans 175.4%. Under conditions of long-term administration of ethyl alcohol to rats, an increased depolymerization of fucoproteins and proteoglycans of periodontal connective tissue is observed, which plays a leading role in the fixation and stability of teeth.

Key words: alcohol; periodontal tissues; oxidative stress; proteases; protease inhibitors.

REFERENCES

1. Fi C, Wo W. Periodontal disease and systemic diseases: an overview on recent progresses. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2021 Jan-Feb;35(Suppl. 1):1-9.
2. Dantas AM, Mohn CE, Burdet B, Zubilete MZ, Mandalunis PM, Elverdin JC, Fernández-Solari J. Ethanol consumption enhances periodontal inflammatory markers in rats. *Arch Oral Biol*. 2012 Sep; 57(9):1211-7.
3. Frazão DR, Maia CD, Chemelo VD, Monteiro D, Ferreira RD, Bittencourt LO, Balbinot GD, Collares FM, Rösing CK, Martins MD, Lima RR. Ethanol binge drinking exposure affects alveolar bone quality and aggravates bone loss in experimentally-induced periodontitis. *PLoS One*. 2020 Jul 30;15(7):e0236161.
4. Kamoda T, Komatsuzaki A, Ono S, Tanaka S, Yokoi Y. Association between drinking habits and oral symptoms: a cross-sectional study based on Japanese national statistical data. *Int J Dent*. 2020 Dec 8; 2020:1-8.
5. Mankovsky BM. Diabetic neuropathy: from head to toe. K.: Vira Project, 2021. [Ukrainian].
6. Hammoud N, Jimenez-Shahed J. Chronic neurologic effects of alcohol. *Clin Liver Dis*. 2019 Feb;23(1):141-55.
7. Nguyen VA, Le T, Tong M, Mellion M, Gilchrist J, de la Monte SM. Experimental alcohol-related peripheral neuropathy: role of insulin/IGF resistance. *Nutrients*. 2012 Aug; 4(8):1042-57.
8. Dina OA, Barletta J, Chen X, Mutero A, Martin A, Messing RO, Levine JD. Key role for the epsilon isoform of protein kinase c in painful alcoholic neuropathy in the

- rat. *J Neurosci.* 2000 Nov 15;20(22):8614-9.
9. Santiago S, Ferrer T, Espinosa ML. Neurophysiological studies of thin myelinated (A delta) and unmyelinated (C) fibers: application to peripheral neuropathies. *Neurophysiol Clin.* 2000 Feb; 30(1):27-42.
 10. Olukman M, Onal A, Gul Celenk F, Uyanikgil Y, Cavusoglu T, Duzenli N, Ulker S. Treatment with NADPH oxidase inhibitor apocynin alleviates diabetic neuropathic pain in rats. *Neural Regen Res.* 2018 Sep;13(9):1657-64.
 11. Mokrik OYa. Optimization of anesthesiological support of surgical interventions in dental patients with different individual-typological features (experimental-clinical study). *Dis Doct Med Sci, specialty 14.01.22 - dentistry.* Lviv: 2020. [Ukrainian].
 12. Ugolev AM. Study of the digestive apparatus in humans. L.: Nauka, 1969. [Russian].
 13. Veremeenko KN. Proteolysis in health and disease. K.: Health, 1988. [Russian].
 14. Stalnaya ID, Garishvili TG. Method for the determination of malonic dialdehyde using thiobarbituric acid. *Modern methods in biochemistry.* M.: Medicine, 1977. [Russian].
 15. Dubinina EE. Oxidative modification of human serum proteins. Method of its determination. *Quest Med Chem.* 1995;1:24-6. [Russian].
 16. Korolyuk MA, Ivanova LI, Mayorova IG. Method for determining the activity of catalase. *Laboratory.* 1988;1:16-9. [Russian].
 17. Sharaev PN. Method for determination of fucose unbound with proteins. *Clin Lab Diagnost.* 1997;4:17-8. [Russian].
 18. Sharaev PN. Method for the determination of glycosaminoglycans in biological fluids. *Lab Work.* 1987;5:530-2. [Russian].
 19. Donohue, Jr TM, Thomes PG. Ethanol-induced oxidant stress modulates hepatic autophagy and proteasome activity. *Redox Biol.* 2014;3:29-39.
 20. Rukkumani R, Priyanka A, Sankar P, Menon VP. Ferulic acid influences hepatic expression pattern of matrix metalloproteinases during alcohol and PUFA induced toxicity. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012 Dec;16(15):2147-53.
 21. Sies H. Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress. *J Biol Chem.* 2014 Mar 28;289(13):8735-41.
 22. Demkovych AYe, Bondarenko YuI. Changes of antioxidant potential under the experimental periodontitis development. *Fiziol Zh.* 2018; 64(3): 43-51.
 23. Araujo CM, Rocha AC, Araujo BM, Johann AC, Pereira LF, Tanaka OM, Guariza Filho O, Camargo ES. Effect of acute administration of nicotine and ethanol on tooth movement in rats. *Braz Oral Res.* 2018 Oct 11;32.
 24. Wang MJ, Kuo JS, Lee WW, Huang HY, Chen WF, Lin SZ. Translational event mediates differential production of tumor necrosis factor- α in hyaluronan-stimulated microglia and macrophages. *J Neurochem.* 2006 Mar 29;97(3):857-71.
 25. Chen H, Mahaseth M, Zhang Y. Hyaluronic acid as a rescue therapy for trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis through Cox-2 and PGE2 in a Toll-like receptor 4-dependent way. *J Zhejiang Univ.* 2011 Sep;12(9):712-9.
 26. Barcia JM, Portolés S, Portolés L, Urdaneta AC, Ausina V, Pérez-Pastor GM, Romero FJ, Villar VM. Does oxidative stress induced by alcohol consumption affect orthodontic treatment outcome? *Front Physiol.* 2017 Jan 25;8.

*Матеріал надійшов
до редакції 01.11.2021*