

УДК [57.084.1+616-08-039.71]:616.314-002-08  
DOI <https://doi.org/10.35220/2078-8916-2024-54-4.9>

**С.В. Шпак,**

кандидат медичних наук, доцент,  
Одеський національний медичний університет,  
Валіховський провулок, 2, м. Одеса, Україна,  
індекс 65082

**О.В. Деньга,**

доктор медичних наук, професор,  
Державна установа «Інститут стоматології  
та щелепно-лицевої хірургії  
Національної академії медичних наук України»,  
вул. Рішельєвська, 11, м. Одеса, Україна, індекс 65026

**С.А. Шнайдер,**

доктор медичних наук, професор,  
Державна установа «Інститут стоматології  
та щелепно-лицевої хірургії  
Національної академії медичних наук України»,  
вул. Рішельєвська, 11, м. Одеса, Україна, індекс 65026

**М. Страка,**

доктор філософії,  
ВПНЗ «Львівський медичний університет»,  
вул. В. Поліщука, 76, м. Львів, Україна, індекс 79018

**А. Єнча,**

доктор філософії,  
ВПНЗ «Львівський медичний університет»,  
вул. В. Поліщука, 76, м. Львів, Україна, індекс 79018

**Я. Єнчова,**

доктор філософії,  
ВПНЗ «Львівський медичний університет»,  
вул. В. Поліщука, 76, м. Львів, Україна, індекс 79018

**А. Петрашова,**

доктор філософії,  
ВПНЗ «Львівський медичний університет»,  
вул. В. Поліщука, 76, м. Львів, Україна, індекс 79018

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ОЦІНКА ПОКАЗНИКІВ МІНЕРАЛІЗАЦІЇ У РОТОВІЙ РІДИНІ ЩУРІВ НА ТЛІ МОДЕЛЮВАННЯ ХРОНІЧНОГО СТРЕСУ ТА ЛІКУВАЛЬНО- ПРОФІЛАКТИЧНИХ ЗАХОДІВ

Хронічний стрес є одним із провідних чинників, що негативно впливають на гомеостаз ротової порожнини та можуть призводити до демінералізації твердих тканин зубів. Така дія обумовлена зниженням концентрації іонів кальцію й фосфору у ротовій рідині, а також пригніченням активності лужної фосфатази, важливого ферменту ремінералізації. Це підкреслює необхідність пошуку ефективних лікувально-профілактичних комплексів, здатних

коригувати біохімічні порушення, зумовлені стресом. **Метою дослідження було** оцінити вплив лікувального комплексу препаратів (ЛПК) на показники мінералізації ротової рідини щурів (концентрацію іонів кальцію, неорганічного фосфору та активність лужної фосфатази) за умов моделювання хронічного звукового стресу. **Матеріали та методи.** У дослідженні використано 34 щурів-самця лінії Wistar (2-місячного віку, маса тіла 140±8 г), яких розподілили на три групи: інтактну (n=10), зі змодельованим хронічним звуковим стресом (n=12) та зі змодельованим стресом із подальшим застосуванням ЛПК (n=12). Упродовж 50 діб тваринам 2-ї та 3-ї груп моделювали хронічний звуковий стрес за допомогою ультразвукового відлякувача шкідників. У групі «стрес + ЛПК» тварини додатково отримували лікувальний комплекс препаратів. Після закінчення експерименту проводили збір ротової рідини та визначали в ній концентрацію кальцію, неорганічного фосфору й активність лужної фосфатази за стандартними методами біохімічного аналізу. **Результати дослідження.** У групі тварин зі змодельованим хронічним звуковим стресом встановлено статистично значуще зменшення концентрації кальцію, неорганічного фосфору та активності лужної фосфатази в ротовій рідині порівняно з інтактною групою, що свідчить про пригнічення мінералізаційних процесів у твердих тканинах зубів. Водночас застосування ЛПК упродовж 50 діб сприяло нормалізації зазначених показників і навіть перевищувало деякі показники інтактної групи. **Висновки.** Отримані дані підтверджують ефективність застосування лікувально-профілактичного комплексу препаратів для корекції біохімічних змін у ротовій рідині, що виникають в умовах хронічного звукового стресу. Це може бути основою для подальших досліджень у напрямку профілактики та лікування стоматологічних захворювань, зокрема карієсу, обумовлених стресовими факторами.

**Ключові слова:** стрес, ротова рідина, щури, експеримент, біохімічні маркери.

**S.V. Shpak,**

Candidate of Medical Sciences, Associate Professor,  
Odesa National Medical University,  
2 Valikhovsky lane, Odesa, Ukraine, postal code 65082

**O.V. Dienha,**

Doctor of Medical Sciences, Professor,  
State Establishment "The Institute of Stomatology  
and Maxillo-facial Surgery National Academy  
of Medical Sciences of Ukraine",  
11 Risheliyevska street, Odesa, Ukraine, postal code 65026

**S.A. Shneider,**

Doctor of Medical Sciences, Professor,  
State Establishment "The Institute of Stomatology  
and Maxillo-facial Surgery National Academy  
of Medical Sciences of Ukraine",  
11 Risheliyevska street, Odesa, Ukraine, postal code 65026

**M. Straka,**

PhD, Higher Private Educational Institution  
"Lviv Medical University",  
76 V.Polishchuk street, Lviv, Ukraine, postal code 79018

**A. Jenca,**

PhD, Higher Private Educational Institution  
"Lviv Medical University",  
76 V.Polishchuk street, Lviv, Ukraine, postal code 79018

**J. Jencova,**

PhD, Higher Private Educational Institution  
"Lviv Medical University",  
76 V.Polishchuk street, Lviv, Ukraine, postal code 79018

**A. Petrasova,**

PhD, Higher Private Educational Institution  
"Lviv Medical University",  
76 V.Polishchuk street, Lviv, Ukraine, postal code 79018

## EXPERIMENTAL EVALUATION OF MINERALIZATION INDICATORS IN RAT ORAL FLUID UNDER CHRONIC STRESS MODELING AND THERAPEUTIC AND PREVENTIVE MEASURES

*Chronic stress is one of the key factors that adversely affect the homeostasis of the oral cavity and can lead to the demineralization of tooth hard tissues. This effect is driven by a decrease in the concentration of calcium and phosphate ions in the oral fluid, as well as by the suppression of alkaline phosphatase activity – an important enzyme involved in remineralization. Such findings highlight the need for effective therapeutic and prophylactic complexes capable of correcting stress-induced biochemical disorders. Aim of the study. To evaluate the effect of a therapeutic complex of drugs (TCD) on the mineralization parameters of rat oral fluid (the concentration of calcium ions, inorganic phosphorus, and alkaline phosphatase activity) under conditions of chronic acoustic stress modeling. Materials and methods. The study involved 34 male Wistar rats (2 months of age, body weight  $140 \pm 8$  g), which were divided into three groups: an intact group ( $n=10$ ), a group with experimentally induced chronic acoustic stress ( $n=12$ ), and a group with chronic acoustic stress plus TCD ( $n=12$ ). Over a 50-day period, rats in the second and third groups were exposed to chronic acoustic stress using an ultrasonic rodent repeller. In the "stress + TCD" group, the rats additionally received a therapeutic complex of drugs. After completion of the experiment, oral fluid samples were collected to measure calcium, inorganic phosphorus concentrations, and alkaline phosphatase activity by standard biochemical methods. Results. In the group subjected to chronic acoustic stress, there was a statistically significant reduction in calcium concentration, inorganic phosphorus, and alkaline phosphatase activity in the oral fluid compared with the intact group, indicating suppression of mineralization processes in tooth hard tissues. At the same time, a 50-day administration of TCD contributed to the normalization of these parameters, and in some cases even exceeded the indices of the intact group. Conclusions. The obtained data confirm the effectiveness of the therapeutic-prophylactic drug complex in correcting biochemical alterations in the oral fluid under conditions of chronic acoustic stress. These findings may serve as a basis for further research into the prevention and treatment of stress-related dental diseases, particularly caries.*

**Key words:** stress, oral fluid, rats, experiment, biochemical markers.

Хронічний стрес розглядається як один із провідних чинників, що порушує гомеостаз порожнини рота й може призводити до розвитку та прогресування стоматологічних захворювань [1, 3]. Тривалий вплив стресогенних факторів асоціюється зі змінами в метаболічній і гормональній регуляції, які, зокрема, відбиваються на складі ротової рідини та на процесах мінералізації твердих тканин зубів [2, 4]. Зниження рівня іонів кальцію й фосфору, а також активності ферментів, що беруть участь у ремінералізації (лужна фосфатаза), може провокувати демінералізацію емалі й підвищувати ризик виникнення карієсу та інших стоматологічних ускладнень [7].

Для запобігання негативному впливу хронічного стресу на стоматологічне здоров'я пропонують застосовувати різні лікувально-профілактичні підходи. Експериментальні дані свідчать про те, що окремі фармакологічні засоби, зокрема комплекси, спрямовані на корекцію метаболічних порушень, можуть поліпшувати мінералізуючі властивості ротової рідини, підсилювати процеси остеогенезу й запобігати розвитку деструктивних змін у тканинах зубів [2, 4]. Однак механізми дії таких лікувально-профілактичних комплексів у разі впливу хронічного звукового стресу та їх вплив на біохімічні показники ротової рідини залишаються недостатньо висвітленими.

З огляду на актуальність проблеми, метою даного дослідження була експериментальна оцінка впливу лікувального комплексу препаратів на показники мінералізації ротової рідини (концентрацію іонів кальцію, неорганічного фосфору та активність лужної фосфатази) у шурів на тлі моделювання хронічного стресу ультразвуком у поєднанні з чутним звуком. Отримані результати можуть бути корисними для розробки нових або вдосконалення існуючих стратегій профілактики та лікування стоматологічних захворювань, що пов'язані зі стресогенними факторами.

**Метою** даного дослідження була оцінка впливу лікувального комплексу препаратів на маркери показників мінералізації у ротовій рідині шурів на тлі моделювання хронічного стресу.

**Матеріал та методи дослідження.** Були проведені експериментальні дослідження, в процесі яких було використано 34 шурах-самцях лінії Wistar стадного розведення, 2-місячного віку із середньою масою тіла  $140 \pm 8$  г. Тварин утримували у звичайних умовах віварію при природному освітленні та з вільним доступом до води та їжі. На протязі всього періоду проведення експерименту були дотримані чітко мікрокліматичні умови

навколишнього середовища віварію: температура – (19-23°C) та вологість – (50-75 %). Експериментальні дослідження проводили в лабораторії біохімії та віварію ДУ «Інститут стоматології та щелепно-лицьової хірургії Національної академії медичних наук України» (ДУ «ІСЦЛХ НАМН»). Усі експерименти на щурах проводилися за затвердженими в ДУ «ІСЦЛХ НАМН» стандартними операційними процедурами, розробленими відповідно до Методичних вказівок Фармакологічного Комітету МОЗ України та Міжнародних правил роботи з лабораторними тваринами [5, 6].

Тварин розподілили на 3 групи наступним чином:

- 1 – інтактна (стандартний раціон віварію), n=10;
- 2 – модель хронічного звукового стресу, n=12;
- 3 – модель хронічного звукового стресу + комплекс препаратів, n=12.

Стрес моделювали за допомогою ультразвукового відлякувача шкідників LS-912 (виробник «Leaven Enterprise», Тайвань), що діє у чутному та ультразвуковому діапазонах та має частоту від 30 до 65 кГц. Звуковий тиск 130 дБ, потужність 1,5 Вт на площі до 232 м<sup>2</sup>.

Моделювання звукового стресу ультразвуком у щурів 2 та 3 групи здійснювали протягом 5 діб, по 6 годин на день за наступною схемою: на протязі 2-х днів – застосовували ультразвук із частотою 30 кГц, наступні 2 дні – по 40 кГц, наступні 2 дні – по 50 кГц, наступні 2 дні – по 60 кГц. Далі схему повторювали за допомогою ультра звука. До ультра звуку кожного дня додавали чутний звук по 1 годині за допомогою фіксації кнопки контролю звуку на відлякувачі. На одному рівні з клітками тварин встановлювали відлякувач на відстані 3 м від них.

Тривалість експерименту склала 50 днів. По закінченню експерименту, проводили збір ротової рідини у експериментальних тварин. Для отримання ротової рідини у щурів використовували центрифужні пробірки та лійки. Кожну пробірку поміщали в окрему склянку із льодом. Збір ротової рідини здійснювали вранці, натще під тіопенталовим наркозом (20 мг/ кг) при пілокарпіновій стимуляції (5 мг/кг).

На першому етапі щурам вводили внутрішньочеревно відповідну дозу водного розчину тіопенталу натрію. Через 7-10 хвилин підшкірно вводили 0,1%-ний розчин пілокарпіну. Щурів поміщали в спеціальні коробки із отворами для голови на таку висоту, щоб голови тварин потрапляли в лійки, вставлені в склянки із пробірками щоб ротова рідина довільно із порожнини рота

витікала в пробірки. Пробірки та відсіки в коробці для щурів обов'язково нумерували. Процес збору ротової зазвичай займав 20–30 хвилин. Для проведення біохімічного дослідження зібрану ротову рідину центрифугували (2500 об/хв, 10 хвилин, + 40°C), відбирали супернатант в чисті сухі пеніцилінові флакони і використовували для визначення маркерів, або закривали герметично пробками і заморожували при -200°C до початку дослідження. У ротовій рідині визначали концентрацію кальцію, неорганічного фосфору та активність лужної фосфатази [7, с. 50].

Дослідних тварин виводили із експерименту етаназією під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг) шляхом кровопускання з серця.

При статистичній обробці отриманих результатів використовувалася комп'ютерна програма STATISTICA 6.1. для оцінки їхньої достовірності та похибок вимірювань. Статистично значущу відмінність між альтернативними кількісними ознаками з розподілом, відповідним нормальному закону, оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента. Різницю вважали статистично значущою при  $p < 0,01$  [8, с. 124].

**Результати та їх обговорення.** Нами було проведено визначення біохімічних показників в ротовій рідині щурів та тлі хронічного звукового стресу модельованим ультразвуком змінної частоти у комбінації із звуком чутного діапазону та корекції його комплексом препаратів, дані цих досліджень наведені у таблиці 1.

Відомо, що у твердих тканинах зубів іонообмінні процеси залежать від концентрації іонів кальцію та фосфору в середовищі, що оточує емаль і інших локальних чинників. Недостатність мінеральних компонентів в ротовій рідині призводить до порушення мінералізації твердих тканин і виникненню карієсу зубів. Біохімічні дослідження концентрації кальцію, неорганічного фосфору та активності лужної фосфатази у ротовій рідині щурів, у першу чергу, дають нам можливість оцінити процеси мінералізації зубів. При проведенні біохімічного аналізу ротової рідини дослідних тварин на тлі хронічного стресу було виявлено зменшення концентрації кальцію на 34,5 % ( $p < 0,001$ ), неорганічного фосфору на 31,9 % ( $p < 0,001$ ) та активності маркера остеогенезу лужної фосфатази на 29,83 % ( $p < 0,001$ ) порівнюючи з показниками інтактної групи.

Тривале застосування ЛПК препаратів приводить до нормалізації досліджуваних показників. Так, реєстрували вірогідне збільшення рівня кальцію на 37,5 % ( $p < 0,002$ ), неорганічного фосфору



Таблиця 1

**Показник мінералізації у ротовій рідині щурів при хронічному стресі та під впливом лікувального-профілактичного комплексу препаратів, M±m**

Групи щурів	Показники	Концентрація кальцію, ммоль/л	Концентрація неорганічного фосфору, ммоль/л	Активність лужної фосфатази, ммоль/л
Інтактна група, n=10		1,10±0,09	5,10±0,24	1,24±0,01
Хронічний стрес, n=12		0,72±0,05 p<0,001	3,47±0,18 p<0,001	0,87±0,05 p<0,001
Хронічний стрес+ЛПК, n=12		0,99±0,07 p>0,4 p <sub>1</sub> <0,002	5,02±0,21 p>0,8 p <sub>1</sub> <0,001	1,34±0,08 p>0,2 p <sub>1</sub> <0,001

Примітка: p – достовірність відмінностей від показників в інтактній групі; p<sub>1</sub> – достовірність відмінностей від показників у групі «хронічний стрес».

на 44,6 % (p<sub>1</sub><0,002), відносно показників 2 групи стрес-контроль. Також, підвищилась активність лужної фосфатази на 54,0 % (p<sub>1</sub> < 0,001; табл. 1), та перевищувала показники інтактної групи. Отже, застосований протягом 50 днів ЛПК препаратів за умов звукового стресу приводить до мінералізації ротової рідини дослідних щурів 3-ої групи.

**Висновки:**

1. У щурів, підданих моделюванню хронічного звукового стресу, виявлено достовірне зменшення концентрації кальцію, неорганічного фосфору та активності лужної фосфатази в ротовій рідині, що свідчить про пригнічення мінералізаційних процесів у твердих тканинах зубів.

2. Застосування протягом 50 днів лікувально-профілактичного комплексу препаратів сприяє нормалізації досліджуваних показників мінералізації (підвищення рівня кальцію, неорганічного фосфору та лужної фосфатази) в ротовій рідині щурів на тлі хронічного звукового стресу.

3. Отримані дані підтверджують доцільність використання комплексних засобів корекції порушень мінералізації за умов впливу хронічного стресу та можуть бути покладені в основу подальших досліджень щодо профілактики й лікування стоматологічних захворювань, зокрема карієсу, обумовлених стресовим фактором.

**Література:**

1. Koplík E.V., Vlasova M.A., Moshkovsky S.A., Archakov A.I., Sudakov K.V. Mass spectrometric profile of the serum as a marker of experimental psychoemotional stress in rats. *Bull Exp Biol Med.* 2008. №145(5). P. 552-5. DOI: 10.1007/s10517-008-0148-9.

2. Jamel M.J., Pereira Lde P., Mello N.B., Eleuthério E.C., Schanaider A. Blood carbonyl protein measurement as a specific oxidative stress biomarker after intestinal reperfusion in rats. *Acta Cir Bras.* 2010. №25(1). P. 59-62. DOI: 10.1590/s0102-86502010000100014.

3. Gokul M., Arun Kumar N., Durgadas Kini R., Blossom V., Kodavanji B., Noojibail A., Murali N., Vishwanath Rai S.P. Evaluation of biomarkers of stress in chronic stress-exposed comorbid depression model Wistar rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2019. №30(5). DOI: 10.1515/jbcp-2018-0215.

4. Pal R., Gulati K., Banerjee B., Ray A. Pharmacological and biochemical studies on the role of free radicals during stress-induced immunomodulation in rats. *Int Immunopharmacol.* 2011. №11(11). P. 1680-4. DOI: 10.1016/j.intimp.2011.05.026.

5. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Strasbourg, Council of Europe, 1986. №123. P. 51. Retrieved from <https://rm.coe.int/168007a67b>.

6. Наказ України «Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах». Міністерство освіти і науки України. 2012. №249.

7. Експериментальні методи дослідження стимуляторів остеогенезу / А.П. Левицький та ін. : методичні рекомендації. Київ : ГФЦ, 2005. 50 с.

8. Рогач І. М., Керецман А. О., Сіткар А. Д. Правильно вибраний метод статистичного аналізу – шлях до якісної інтерпретації даних медичних досліджень. *Науковий вісник Ужгородського університету.* 2017. Вип. 2. С. 124-28.

**References:**

1. Koplík, E. V., Vlasova, M. A., Moshkovsky, S. A., Archakov, A. I., & Sudakov, K. V. (2008). Mass spectrometric profile of the serum as a marker of experimental psychoemotional stress in rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 145(5), 552-555. DOI: 10.1007/s10517-008-0148-9.

2. Jamel, M. J., Pereira, L. de P., Mello, N. B., Eleuthério, E. C., & Schanaider, A. (2010). Blood carbonyl protein measurement as a specific oxidative stress biomarker after intestinal reperfusion in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 25(1), 59-62. DOI: 10.1590/s0102-86502010000100014

3. Gokul, M., Arun Kumar, N., Durgadas Kini, R., Blossom, V., Kodavanji, B., Noojibail, A., Murali, N., & Vishwanath Rai, S. P. (2019). Evaluation of biomarkers of stress in chronic stress-exposed comorbid depression model Wistar rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 30(5). DOI: 10.1515/jbcpp-2018-0215.
4. Pal, R., Gulati, K., Banerjee, B., & Ray, A. (2011). Pharmacological and biochemical studies on the role of free radicals during stress-induced immunomodulation in rats. *International Immunopharmacology*, 11(11), 1680-1684. DOI: 10.1016/j.intimp.2011.05.026.
5. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (1986). Strasbourg. Council of Europe. Retrieved from <https://rm.coe.int/168007a67b>.
6. Nakaz Ukrainy «Pro zatverdzhennya Poryadku provedennya naukovykh ustanovamy doslidiv, eksperymentiv na tvarynakh» [Order of Ukraine «On Approval of the Procedure for Conducting Experiments and Experiments on Animals by Scientific Institutions»]. *Ministerstvo osvity i nauky Ukrainy – Ministry of Education and Science of Ukraine*. [zakon.rada.gov.ua](http://zakon.rada.gov.ua). Retrieved from <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0416-12#Text> [in Ukrainian].
7. Levyč'kyj, A.P., Makarenko, O.A., Den'ga, O.V. & ta in. (2005). *Eksperymental'ni metody doslidzhennja stymuljatoriv osteogenezu : Metodychni rekomendacii' [Experimental methods for studying osteogenesis stimulators : methodological recommendations]*. Kyiv : GFC.
8. Rohach, I.M., Keretsman, A.O., Sitkar, A.D. (2017). Pravylny vybranyy metod statystychnoho analizu – shlyakh do yakisnoyi interpretatsiyi danykh medychnykh doslidzen [Correct choice of statistical analysis method is the key way to high-quality interpretation of data of medical research]. *Naukovyy visnyk Uzhhorodskoho universytetu – Scientific Bulletin of Uzhgorod University*, 2(56), 124-28 [in Ukrainian].