

УДК [57.084.1+611.018.4]:616-08-039.71
DOI <https://doi.org/10.35220/2523-420X/2025.3.8>

С.В. Шпак,

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

О.В. Дєньга,

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

В.Я. Скиба,

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

В.В. Вальда,

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

Й.М. Репужинський,

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

Д.Д. Жук,

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

В.П. Мазур,

асистент,
Одеський національний медичний університет,
Валіховський провулок, 2, м. Одеса, Україна,
індекс 65082

АНАЛІЗ ЗМІН АКТИВНОСТІ ЕЛАСТАЗИ ТА КОНЦЕНТРАЦІЇ КАЛЬЦІЮ У КІСТКОВІЙ ТКАНИНІ ЩУРІВ ВИКЛИКАНИХ МОДЕЛЮВАННЯМ ХРОНІЧНОГО СТРЕСУ НА ТЛІ ЛІКУВАЛЬНО-ПРОФІЛАКТИЧНОГО КОМПЛЕКСУ З МЕТОЮ ЗАСТОСУВАННЯ ЙОГО В ДИТЯЧІЙ СТОМАТОЛОГІЇ

Хронічний психоемоційний стрес є вагомим фактором ризику порушень ремоделювання кісткової тканини та розвитку пародонтальної патології у дітей.

Корекція оксидативно-запальних змін за допомогою багатокомпонентних препаратів може запобігти демінералізації та підтримати гомеостаз кістки. **Метою дослідження було** оцінити вплив лікувально-профілактичного комплексу (ЛПК) на активність еластази та концентрацію кальцію у кістковій тканині щурів за умов моделювання хронічного звукового стресу для обґрунтування можливості використання комплексу в дитячій стоматології. **Матеріали та методи.** У дослідженні використано 34 щури-самці 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. У гомогенатах щелеп визначали активність еластази та вміст кальцію. Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою програми STATISTICA 6.1 з використанням t -критерію Стьюдента ($p < 0,01$ вважали достовірним). **Результати дослідження.** У групі стрес-контроль активність еластази зросла до $14,48 \pm 0,92$ мкАкт/кг, а кальцій знизився до $4,92 \pm 0,19$ ммоль/г ($p < 0,05$ та $p < 0,02$ відповідно). Додавання ЛПК зумовило зниження еластазної активності до $9,72 \pm 0,75$ мкАкт/кг та підвищення кальцію до $5,76 \pm 0,22$ ммоль/г ($p < 0,02$). **Висновки.** ЛПК ефективно послаблює резорбцію та сприяє відновленню мінералізації кісткової тканини за умов хронічного стресу, що підтверджує доцільність його подальшого впровадження у профілактичні програми дитячої стоматології.

Ключові слова: стрес, кісткова тканина, лікувально-профілактичний комплекс, дитяча стоматологія, щури, експеримент.

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 Rishelievskaya street, Odesa, Ukraine, postal code 65026

V.Ya. Skyba,

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

V.V. Valda,

Candidate of Medical Sciences, associate professor,
Odesa National Medical University,
2 Valikhovsky lane, Odesa, Ukraine, postal code 65082

Y.M. Repuzhynskyy,

Candidate of Medical Sciences, associate professor,
Odesa National Medical University,
2 Valikhovsky lane, Odesa, Ukraine, postal code 65082

D.D. Zhuk,

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

V.P. Mazur,

Assistant, Odesa National Medical University,
2 Valikhovsky lane, Odesa, Ukraine, postal code 65082

ANALYSIS OF CHANGES IN ELASTASE ACTIVITY AND CALCIUM CONCENTRATION IN THE BONE TISSUE OF RATS INDUCED BY MODELLING CHRONIC STRESS AGAINST THE BACKGROUND OF A THERAPEUTIC- PREVENTIVE COMPLEX FOR THE PURPOSE OF ITS APPLICATION IN PAEDIATRIC DENTISTRY

*Chronic psycho-emotional stress is a significant risk factor for impaired bone remodelling and the development of periodontal pathology in children. Pharmacological correction of oxidative-inflammatory alterations with multicomponent preparations may prevent demineralisation and maintain bone homeostasis. Aim of the study. To evaluate the efficacy of a therapeutic-prophylactic complex (TPC) on elastase activity and calcium concentration in rat bone tissue under an experimental model of chronic acoustic stress, with a view to justifying its use in paediatric dentistry. Materials and methods. The study included 34 male Wistar rats (2 months old, body weight 140 ± 8 g), which were divided into three groups: an intact group ($n=10$), a group with induced chronic sound stress ($n=12$), and a group with induced stress followed by administration of a therapeutic-prophylactic complex (TPC) ($n=12$). Over 50 days, the rats in the second and third groups were exposed to chronic sound stress using an ultrasonic pest repellent. In the "stress + TPC" group, the rats additionally received the therapeutic-prophylactic complex. Elastase activity and calcium content were analysed in jaw homogenates. Statistical processing was performed using STATISTICA 6.1 with Student's *t*-test ($p < 0.01$ was considered significant). Results. In the stress-control group, elastase activity increased to $14.48 \pm 0.92 \mu\text{kat kg}^{-1}$ and calcium decreased to $4.92 \pm 0.19 \text{ mmol g}^{-1}$ ($p < 0.05$ and $p < 0.02$, respectively). Administration of the TPC reduced elastase to $9.72 \pm 0.75 \mu\text{kat kg}^{-1}$ and raised calcium to $5.76 \pm 0.22 \text{ mmol g}^{-1}$ ($p_i < 0.02$). Conclusions. The TPC effectively attenuates bone resorption and promotes re-mineralisation under chronic stress, supporting its prospective incorporation into preventive programmes in paediatric dentistry.*

Key words: stress; bone tissue; therapeutic-prophylactic complex; paediatric dentistry; rats; experimental study.

Хронічне психоемоційне навантаження активує гіпоталамо-гіпофізарно-надниркову вісь, зумовлюючи надлишкове вивільнення катаболічних глюкокортикоїдів і формування системної стрес-реакції [1]. Одночасно підвищується генерація реактивних форм кисню, яка в поєднанні з низькорівневим запаленням порушує рівновагу ремоделювання кісткової тканини в бік резорбції [2].

Надмірне й тривале підвищення рівня ендогенних глюкокортикоїдів пригнічує експресію остеопротегерину та підсилює синтез RANKL, активуючи остеокластогенез і прискорюючи втрату кісткової маси [3]. Інтенсивність кісткової деструкції при цьому тісно корелює з оксидативним стресом і системним запальним фоном.

Баланс між кісткоутворенням та резорбцією оцінюють за біохімічними маркерами: лужна фосфатаза (ЛФ) відображає активність остеобластів і процеси мінералізації матриксу, тоді як тартрат-резистентна кисла фосфатаза (TRAP) є інтегральним індикатором остеокластичної резорбції [4]. Зменшення співвідношення показників ЛФ/TRAP свідчить про перевагу катаболічних процесів у кістці.

Оксидативно-запальні механізми стрес-індукованого ушкодження кісткової тканини підтримуються дисбалансом антиоксидантної системи. Сучасні дослідження демонструють, що природні й синтетичні антиоксиданти, особливо у складі багатокомпонентних композицій, здатні гальмувати кісткову резорбцію, посилювати остеогенез і відновлювати мінералізацію [5]. Модельні експерименти на тваринах підтверджують зв'язок між підвищеним оксидативним навантаженням, викликаним хронічним стресом, і прогресуючою втратою альвеолярної кістки; водночас фармакологічна корекція антиоксидантами та мембраностабілізуючими засобами достовірно знижує активність резорбтивних ферментів і покращує мінералізаційний індекс [6].

Дослідження впливу лікувально-профілактичного комплексу препаратів на біохімічні маркери ремоделювання кісткової тканини за умов хронічного стресу є актуальним з огляду на зростання поширеності стрес-асоційованих метаболічних уражень скелета та обмеженість даних щодо ефективності комплексних терапевтичних підходів. До складу такого комплексу входять засоби, що регулюють ліпідний обмін, проявляють антиоксидантну активність, стимулюють імунітет, а також забезпечують пародонтопротекторний, протизапальний, антисептичний і ремінералізуючий ефекти.

Метою даного дослідження була оцінка впливу лікувального комплексу препаратів, призначеного для майбутнього впровадження в практику дитячої стоматології, на маркер запалення – активність еластази та концентрацію кальцію у кістковій тканині щурів на тлі моделювання хронічного стресу.

Матеріал та методи дослідження. Були проведені експериментальні дослідження, в процесі яких було використано 34 щурах-самцях лінії Wistar стадного розведення, 2-х місячного віку із середньою масою тіла 140 ± 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 [7, 8].

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 м².

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 звуку. 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.

До лікувально профілактичного комплексу входили препарати, що регулюють ліпідний обмін, проявляють антиоксидантну активність, стимулюють імунітет, а також забезпечують пародонтопротекторний, протизапальний, антисептичний і ремінералізуючий ефекти.

Тривалість експерименту склала 50 днів. Дослідних тварин виводили із експерименту етаназією під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг) шляхом кровопускання з серця. У гомогенатах щелеп із розрахунку визначали активність еластази – маркера запалення та концентрацію кальцію [9, с. 50].

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 $p < 0,01$ [10].

Результати та їх обговорення. У таблиці наведені результати визначення в кістковій тканині дослідних щурів маркера руйнування колагену – активності еластази та концентрацію кальцію.

Кальцій є основною складовою частиною кісток та зубів, має високу біологічну активність, приймає активну участь у мінералізації зубів, формуванні кісткової тканини, м'язових скорочень та регулюванні процесів нервової провідності.

Із узагальнених даних таблиці свідчить, що у дослідних тварин 2-ої групи за умов моделювання звукового хронічного стресу активність еластази – ферменту що характеризує гідроліз колагену кісткової тканини вірогідно підвищився на 27,6 % ($p < 0,05$; табл. 6). Водночас, рівень кальцію зменшився на 18,0 % ($p < 0,02$), відносно показників інтактної групи. Отже, збільшення активності еластази та зниження рівня кальцію у кістковій тканині щелеп тварин на тлі стресу говорить про наявність резорбційних процесів в кістковій тканині та зменшення основного мінералу кісткової тканини – гідроксиапатиту.

Під дією композиції препаратів у дослідних тварин 3-ої групи за умов хронічного звукового стресу значно знижується активність еластази на 32,8 % ($p_1 < 0,02$), та вірогідно підвищується концентрації кальцію на 17,0 % ($p_1 < 0,02$), що говорить про інтенсивність процесу мінералізації та про активацію резорбційних процесів у кістковій тканині дослідних щурів.

Таблиця

Активність еластази та вміст кальцію в кістковій тканині щурів при хронічному стресі та під впливом лікувального-профілактичного комплексу препаратів, $M \pm m$

Показники Групи щурів	Активність еластази, мкакт/кг	Концентрація кальцію ммоль/г
Інтактна група, n=10	11,34±0,81	6,0±0,32
Хронічний стрес, n=12	14,48±0,92 p<0,05	4,92±0,19 p<0,02
Хронічний стрес+ЛПК, n=12	9,72±0,75 p>0,25 p ₁ <0,02	5,76±0,22 p>0,4 p ₁ <0,05

Примітка: p – достовірність відмінностей від показників в інтактній групі; p₁ – достовірність відмінностей від показників у групі «хронічний стрес».

Висновки:

1. Хронічний звуковий стрес достовірно підвищує активність еластази у кістковій тканині щурів на 27,6 % та знижує концентрацію кальцію на 18,0 % порівняно з інтактними тваринами, що свідчить про активацію резорбційних процесів і демінералізацію кістки.

2. Лікувально-профілактичний комплекс (ЛПК), який поєднує антиоксидантні, протизапальні, імуномодулювальні та ремінералізуючі компоненти, зумовлює зниження активності еластази на 32,8 % і підвищення рівня кальцію на 17,0 % порівняно з групою стресу ($p < 0,02$), що вказує на гальмування кісткової резорбції й відновлення мінералізації.

3. Отримані результати демонструють виразний пародонтопротекторний та остеотропний потенціал ЛПК, що дає підстави рекомендувати його як перспективний засіб профілактики та лікування стрес-індукованих уражень кісткової й пародонтальної тканини.

4. З огляду на зростання психоемоційних навантажень у дитячому віці, застосування досліджуваного комплексу в дитячій стоматології може стати ефективною стратегією попередження порушень мінералізації та підтримання структурно-функціональної цілісності кісткової тканини щелеп.

Література:

1. Lu H., Xu M., Wang F., Liu S., Gu J., Lin S., et al. Chronic stress accelerates ligature-induced periodontitis by suppressing glucocorticoid receptor- α signaling. *Exp Mol Med*. 2016. № 48(3). P. e223.
2. Luo J., Li L., Shi W., Xu K., Shen Y., Dai B. Oxidative stress and inflammation: roles in osteoporosis. *Front Immunol*. 2025. № 16. P. 1611932. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1611932.

3. von Gunten S., Simon H-U. Linking glucocorticoid-induced osteoporosis to osteoimmunology. *Cell Death Dis*. 2020. № 11(12). P. 1026.

4. Liu M.M., Dong R., Hua Z., Huang Y., Xu H.Y. Therapeutic potential of Liuwei Dihuang Pill against KDM7A and Wnt/ β -catenin signaling pathway in diabetic nephropathy-related osteoporosis. *Biosci Rep*. 2020. № 40(9). P. BSR20201778. DOI: 10.1042/BSR20201778

5. Marcucci G., Domazetovic V., Nediani C., Ruzzolini J., Favre C., Brandi M.L. Oxidative stress and natural antioxidants in osteoporosis: novel preventive and therapeutic approaches. *Antioxidants (Basel)*. 2023. № 12(2). P. 373. DOI: 10.3390/antiox12020373

6. Frazão D.R., Ferreira R.O., Mendes P.F.S., Baia-da-Silva D.C., Souza-Monteiro D., Bittencourt L.O., et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) attenuates oxidative stress and alveolar bone damage in experimental periodontitis in rats. *Antioxidants (Basel)*. 2022. № 11(10). P. 1902. DOI: 10.3390/antiox11101902

7. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Strasbourg, Council of Europe, 1986. № 123. 51 с.

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

9. Методи дослідження стану кишечника та кісток у лабораторних щурів. Довідник / О.А. Макаренко. Одеса: видавець С.Л. Назарчук, 2022. 81.

10. 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. Lu, H., Xu, M., Wang, F., Liu, S., Gu, J., Lin, S., et al. (2016). Chronic stress accelerates ligature-induced periodontitis by suppressing glucocorticoid receptor- α

- signaling. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(3), e223.
2. Luo, J., Li, L., Shi, W., Xu, K., Shen, Y., & Dai, B. (2025). Oxidative stress and inflammation: roles in osteoporosis. *Frontiers in Immunology*, 16, 1611932. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1611932
3. von Gunten, S., & Simon, H.-U. (2020). Linking glucocorticoid-induced osteoporosis to osteoimmunology. *Cell Death & Disease*, 11(12), 1026.
4. Liu, M. M., Dong, R., Hua, Z., Huang, Y., & Xu, H. Y. (2020). Therapeutic potential of Liuwei Dihuang Pill against KDM7A and Wnt/ β -catenin signaling pathway in diabetic nephropathy-related osteoporosis. *Bioscience Reports*, 40(9), BSR20201778. DOI: 10.1042/BSR20201778
5. Marcucci, G., Domazetovic, V., Nediani, C., Ruzzolini, J., Favre, C., & Brandi, M. L. (2023). Oxidative stress and natural antioxidants in osteoporosis: novel preventive and therapeutic approaches. *Antioxidants*, 12(2), 373. DOI: 10.3390/antiox12020373
6. Frazão, D. R., Ferreira, R. O., Mendes, P. F. S., Baia-da-Silva, D. C., Souza-Monteiro, D., Bittencourt, L. O., & et al. (2022). Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) attenuates oxidative stress and alveolar bone damage in experimental periodontitis in rats. *Antioxidants*, 11(10), 1902. DOI: 10.3390/antiox11101902
7. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (1986). Strasbourg. Council of Europe.
8. Nakaz Ukrainy «Pro zatverdzhennya Poryadku provedennya naukovykh ustanovamy doslidiv, eksperimentiv 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. [in Ukrainian].
9. Makarenko O.A., Khromahina L.M., Khodakov I.V., Maikova H.V., Mudryk L.M., Kika V.V., & Mohilevska T.V. (2022). *Metody doslidzhennia stanu kyshchnyku ta kistok u laboratornykh shchuriv. Dovidnyk [Methods for studying the state of the intestine and bones in laboratory rats. Handbook]*. Odesa : vydavets S.L. Nazarchuk. [in Ukrainian].
10. Rohach, I.M., Keretsman, A.O., & Sitkar, A.D. (2017). Pravylny vybranny metod statystychnoho analizu – shlyakh do yakisnoyi interpretatsiyi danykh medychnykh doslidzhen [Correct choice of statistical analysis method is the key way to high-quality interpretation of data of medical research]. *Naukovy visnyk Uzhhorodskoho universytetu – Scientific Bulletin of Uzhgorod University*, 2(56), 124-28 [in Ukrainian].