

ASSESSMENT OF THE DEVELOPMENT OF OXIDATIVE STRESS IN GINGIVAL TISSUES UNDER NITRITE INTOXICATION DURING EXPOSURE TO A COMPLEX OF CHEMICAL FOOD ADDITIVES

Poltava State Medical University (Poltava, Ukraine)

vladoleksienko20@gmail.com

Today, given the constant growth in demand for food products, manufacturers are increasingly using various methods to speed up production processes and increase product shelf life. One of the most common approaches to achieving these goals is the use of chemicals, in particular food additives. At the same time, there is a proven negative impact of additives on the body. The experiment was conducted to study morphological changes in the gums under the influence of a complex of food additives and to identify changes in the development of compensatory reactions depending on the concentration of nitrites. The concentration of malondialdehyde (MDA) was determined as a marker of lipid peroxidation and, accordingly, oxidative stress. It was found that the MDA concentration increased in waves during the experiment, with compensatory-adaptive reactions occurring in the early stages of the study (4-8 weeks) and a significant increase in MDA at 12-16 weeks of the experiment after the compensatory reactions disappeared. In the later stages of the study, increased nitrite levels indicated impaired compensatory and adaptive responses and increased toxic stress on gum tissue. A similar dynamic was observed in nitrite concentration, which initially showed a sharp increase, followed by a short-term decrease during the period of adaptation of the body to the effects of harmful substances, and subsequently showed the development of persistent nitrite intoxication. High nitrite levels in the later stages of the experiment indicate a disruption in the mechanisms of their elimination and excretion from the body, which only increases the toxic load on the gum tissue.

Key words: rats, gingiva, food additives, morphology, regenerative processes, lamina propria, morphometry, oxidative stress, nitrosative stress, antioxidant enzymes, sodium nitrite.

Connection of the publication with planned research work.

This article was written as part of the research project: "Patterns of morphogenesis of organs, tissues and neurovascular structures in normal conditions, pathology and under the influence of exogenous factors" (state registration number 0118U004457).

Introduction.

Nowadays, given the constant growth in demand for food products, manufacturers are actively implementing various methods aimed at speeding up production processes and extending product shelf life. Many products on store shelves contain artificial sweeteners, flavour enhancers and flavourings that encourage consumers to buy these products again and again [1]. One of the most common ways to achieve these goals is through the use of chemicals, particularly food additives. It is especially important for consumers to be aware of the effects of such substances in order to make informed decisions about their food choices. Every day, people consume food containing food additives and preservatives, but are in no hurry to give them up, despite the well-known fact that they are harmful [2]. The amount of these components in products is strictly controlled in accordance with national and international requirements.

Sodium nitrite, also known as nitrous acid salt, is one of the most common food additives. In its pure form, sodium nitrite or E250 is a white crystalline powder with a slight yellowish tint [3]. It is widely used by sausage manufacturers. It gives meat products an appetising 'meaty' appearance and prevents the growth of *Clostridium botulinum* bacteria, which cause botulism [4].

At the same time, sodium nitrite is associated with the problem of carcinogenicity of food additives. One study found that consumption of nitrites as a food additive (e.g., in meat products) was associated with an in-

creased risk of prostate cancer (HR=1.58). The likelihood of certain other types of cancer also increased with high consumption of additives [5].

Another of the most common food additives in Ukraine is monosodium glutamate or E621. It is added to food products to enhance taste sensations by increasing the sensitivity of the taste buds on the tongue [6]. However, frequent consumption of monosodium glutamate is potentially harmful to all people, as it can cause side effects such as headaches, migraines, asthma, nausea, vomiting, fatigue, disorientation and depression [7].

Today, scientific literature provides information on the effects of individual food additives, but very few studies have been conducted on changes in the body when they are used simultaneously. This topic remains understudied. One of the available studies, in which two preservatives were tested together, showed that their combined action has a significantly stronger effect than the separate use of each of them.

That is why the study of morphological and functional changes in the body caused by the daily consumption of numerous food additives, even within the maximum permissible limits, is extremely important and relevant for the health of both the population of our country and humanity as a whole.

The aim of the study.

To assess the dynamics of oxidative stress development in the tissues of the attached part of the gums of rats against the background of nitrite intoxication and to determine the interrelated morphological changes in the structural components of the gums when a complex of chemical food additives is administered to laboratory animals.

Object and research methods.

For the experimental study, we used white laboratory rats kept in the vivarium of Poltava State Medical Uni-

versity under standard feeding and lighting conditions. The animals selected for the control group (14 individuals in total) received oral saline solution throughout the experiment at the same time that the animals in the experimental group consumed the complex of food additives. The control animals had free access to drinking water and food. Biological material was collected from the animals in the control group after the experimental study was completed. The experimental animals were administered a complex of dietary supplements for 1-16 weeks, while being provided with free access to drinking water and a standard vivarium diet. The solution was prepared immediately before administration. Each animal was given 0.5 ml of a solution containing 0.6 mg/kg of sodium nitrite, 20 mg/kg of sodium glutamate and 5 mg/kg of Ponceau 4R orally in the morning before the main feeding.

Upon completion of the experimental study, in accordance with the specified terms, the animals were removed from the experiment by overdosing sodium thiopental under ether anaesthesia, after which the attached part of the gums was removed for histological and biochemical studies.

Histological studies were performed on biopsies of the attached part of the gums of rats, which were embedded in paraffin and epoxy resin. Thin sections 4-5 µm thick were made from paraffin blocks and stained with haematoxylin and eosin, using the van Gieson and Hart methods. Semi-thin histological sections were made from epoxy blocks and stained with polychromatic dye, methylene blue and toluidine blue. The embedding and staining of histological preparations were performed according to generally accepted histological techniques [8].

The preparations were subsequently studied and morphometric studies were conducted using an Olympus C 3040-ADU light microscope with a digital microphotographic attachment and software adapted for such studies (Olympus DP – Soft, licence No. VJ285302, VT310403, 1AV4U13B26802).

Biochemical studies were performed on 10% homogenate of rat gums. The tissues were homogenised in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, for 30-40 seconds. After filtration, the homogenate was centrifuged for 10 min at 1000 g. The supernatant was used for biochemical studies.

The concentration of malondialdehyde was determined by a method based on the ability of free MDA to specifically interact with 1-methyl-2-phenylindole in a mixture of methanol and acetonitrile, forming an orange-coloured chromogen (carbocyanine dye). 10% gum homogenate is added to test tubes in a volume of 0.2 ml, and 0.2 ml of a mixture of methanol and acetonitrile is added to the control test tube. Then, 0.65 ml of a 1 mM solution of 1-methyl-2-phenylindole in a mixture of acetonitrile and methanol is added to each test tube. For the purpose of To start the reaction, add 0.15 ml of concentrated hydrochloric acid. The next step is incubation at 45 °C for 40 minutes, followed by centrifugation at 3000 rpm for 10 minutes. Add 2.5 ml of a mixture of acetonitrile and methanol to the supernatant. Next, the absorbance is measured in a cuvette with an optical path length of 10 mm at a wavelength of $\lambda=586$ nm against a control sample. For this purpose, a Ulab 101 spectrophotometer, Germaine Laboratories, Inc. is used. Calcula-

late the concentration of free malondialdehyde using the formula: $C(MDA) = A \cdot 113.75 \mu\text{mol/g}$ of tissue.

The concentration of nitrites was determined by measuring the diazo compounds formed in the reaction with sulfanilic acid, followed by a reaction with α -naphthylamine (Griss-Ilosway reagent). This resulted in the formation of red-coloured derivatives (azo dyes). The intensity of the colour was proportional to the concentration of nitrites. The first step was to prepare the incubation medium: add 0.3 ml of an aqueous solution of arginine and 0.1 ml of a 1 mM aqueous solution of NADPH2 to 2.5 ml of Tris buffer. The reaction is started by adding 0.2 ml of gum homogenate to the incubation medium – formation of aliquot 1 (A1), which is then added to 1.8 ml of distilled water and 0.2 ml of 1% sulfanilic acid solution. Leave for 1 minute in a dark place at room temperature, then add 0.2 ml of a 1% solution of α -naphthylamine. Leave for 10 minutes in a dark place at room temperature. Perform photometry in a 5 mm cuvette against distilled water at a wavelength of 530 nm (E1) using a Ulab 101 spectrophotometer, Germaine Laboratories, Inc. Calculation: $C = A1 \cdot 0.30104$; $\mu\text{mol/L}$. Biochemical studies were performed in accordance with the recommendations [9].

Statistical research and analysis of the results obtained were carried out using the InStat software package for medical, biological and epidemiological research, which provided statistical data processing and enabled the prediction values necessary for further interpretation of the results to be obtained: M – mean value; σ – standard deviation; m – standard error of the mean. A comparative analysis was performed using the t-test (Student's criterion), assessing the feasibility of applying the method and the statistical reliability of the results obtained in comparison with related indicators.

The experimental studies were conducted in compliance with the requirements for humane treatment of laboratory animals, as regulated by the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals from Cruel Treatment' (No. 3447-IV of 21 February 2006) and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Strasbourg, 18 March 1986).

Research results and their discussion.

As a result of our research, we found that when a complex of chemical food additives was administered to laboratory animals, oxidative stress developed, which manifested itself in changes in the concentration of in the homogenate of the attached part of the gums, the concentration of malondialdehyde (MDA) as a marker of lipid peroxidation and oxidative stress, in accordance with the term of administration of a complex of chemical food additives to laboratory animals.

We determined that the MDA level in the homogenate of the attached part of the gums of white laboratory rats in the control group was $(4.05 \pm 0.07) \mu\text{mol/g}$. After 1 week of experimental research, the above indicator increased by 1.53 times compared to the control indicators, which was statistically significant at $p < 0.05$. After 4 weeks of the experiment, the MDA level continued to increase and, compared to the control group, was statistically significant at $p < 0.05$, 1.29 times higher than in the control group. Compared to the previous stage of the experiment, it decreased and was statistically significant at $p < 0.05$, 1.21 times lower, which indicates the de-

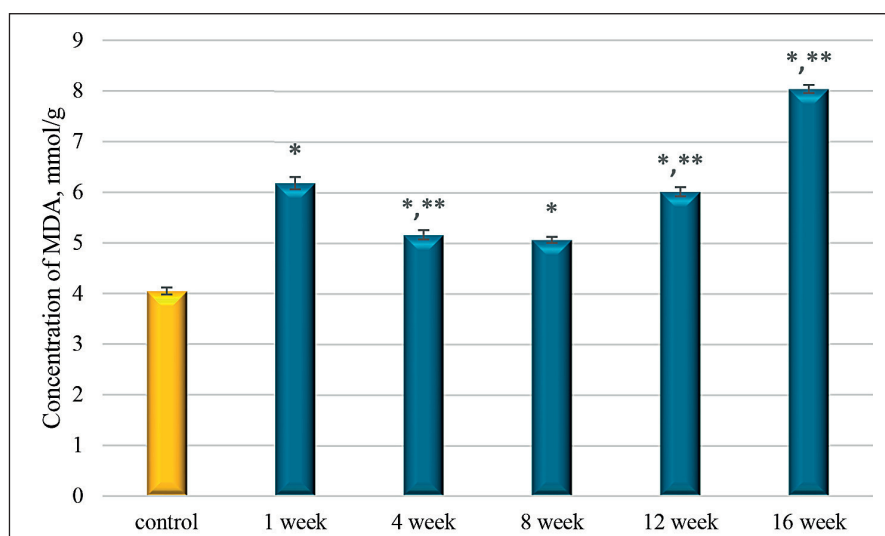


Figure 1 – Changes in MDA concentration in the homogenate of the attached part of the gums of white laboratory rats in the dynamics of the experimental study.

Notes: * – statistically significant difference at $p < 0.05$ compared to control values; ** – statistically significant difference at $p < 0.05$ compared to the previous observation period.

development of compensatory and adaptive reactions of the laboratory animals' organisms in response to the introduction of a toxic complex of chemical food additives.

After 8 weeks of the experiment, the changes in MDA concentration were similar to those observed in the 4th week of the experiment. Thus, compared to the control group, this indicator was statistically significant at $p < 0.05$, 1.27 times higher, and compared to the previous period of the experiment, it decreased, but no statistically significant difference at $p < 0.05$ was determined, and the MDA indicator was within the statistical error.

After 12 weeks of experimental research, the MDA level in the gum homogenate continued to increase and, compared to the control group, was statistically significant at $p < 0.05$, 1.51 times higher, and compared to the previous stage of the experiment, it also increased and was statistically significant at $p < 0.05$, 1.19 times higher, which indicates the steady development of oxidative stress and the reaction of laboratory animals in response to the introduction of a toxic agent in the form

of a complex of chemical food additives.

After 16 weeks of the experiment, the MDA level in the homogenate of the attached part of the gums also continued to increase and, compared to the control group, was statistically significant at $p < 0.05$, significantly higher by 1.99 times, and compared to the previous stage of the experiment, it also increased and was statistically significant at $p < 0.05$, 1.34 times higher, indicating a significant development of oxidative stress (fig. 1).

In parallel with changes in MDA concentration, we determined changes in nitrite levels in the homogenate of the attached part of the gums of white laboratory rats. It was

found that the concentration of nitrites in the homogenate of the gums of white laboratory rats in the control group was (0.008 ± 0.001) nmol/g. After 1 week of experimental research, the above indicator increased 2.12 times compared to the control indicators, which was statistically significant at $p < 0.05$.

After 4 weeks of the experiment, the nitrite level continued to increase and, compared to the control group, was statistically significant at $p < 0.05$, 1.51 times higher, and compared to the previous period of the experiment, it decreased and was statistically significant at $p < 0.05$, 1.42 times lower, which indicates the development of compensatory and adaptive reactions of the laboratory animals' bodies in response to the introduction of a toxic complex of chemical food additives, which in turn reduced the toxic load on the body.

After 8 weeks of the experiment, the changes in MDA concentration were similar to those observed after 4 weeks of the experiment. Thus, compared to the control

group, this indicator was statistically significant at $p < 0.05$, 1.38 times higher, and compared to the previous period of the experiment, it decreased, but no statistically significant difference at $p < 0.05$ was determined, and the nitrite concentration indicator was within the statistical error.

After 12 weeks of experimental research, the concentration of nitrites in the gum homogenate continued to increase and, compared to the control group, was statistically significant at $p < 0.05$, significantly higher by 3.25 times, and compared to the previous stage of the experiment, it also increased and was statistically significant at $p < 0.05$, 2.36 times higher, indicating a

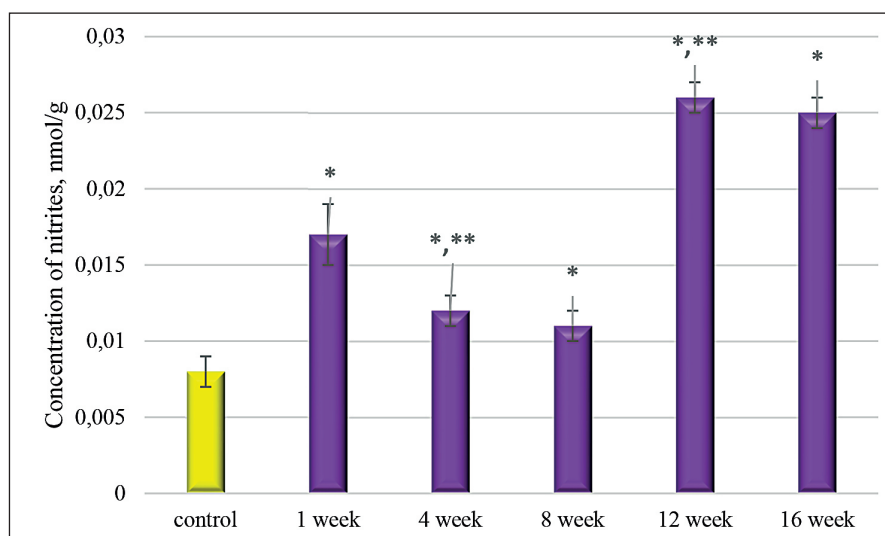


Figure 2 – Changes in nitrite concentration in the homogenate of the attached part of the gums of white laboratory rats in the dynamics of the experimental study.

Notes: * – statistically significant difference at $p < 0.05$ compared to control values; ** – statistically significant difference at $p < 0.05$ compared to the previous observation period.

steady increase in nitrate load and the response of laboratory animals to the introduction of a toxic agent in the form of a complex of chemical food additives and the inability of the body to eliminate nitrites.

After 16 weeks of the experiment, the MDA level in the homogenate of the attached part of the gums also continued to increase and, compared to the control group, was statistically significant at $p < 0.05$, significantly higher by 3.13 times, and compared to the previous stage of the experiment, it decreased slightly, but no statistically significant difference at $p < 0.05$ was determined, and the nitrite concentration index was within the statistical error, indicating the development of persistent nitrite intoxication (fig. 2).

Thus, the experimental study established that prolonged administration of a complex of chemical food additives to laboratory animals against the background of nitrite intoxication is accompanied by the development of pronounced oxidative and nitrosative stress in the tissues of the attached part of the gums, which is confirmed by reliable changes in the biochemical markers of malondialdehyde and nitrites in the gum homogenate of white laboratory rats. Therefore, this work is consistent with the results of other studies [10, 11], despite the fact that the experiment was conducted on the ileum.

Conclusions.

1. It was established that the concentration of MDA increased in waves during the experiment, with the formation of temporary compensatory and adaptive reac-

tions in the early stages of the study (4-8 weeks), which manifested itself in a relative stabilisation of the indicator. At the same time, further prolonged intake of the toxic complex led to the depletion of adaptive mechanisms and progressive accumulation of lipid peroxidation products, as evidenced by a significant increase in MDA levels at 12-16 weeks of the experiment.

2. Similar dynamics were observed in changes in nitrite concentration, which was characterised by an initial sharp increase, a short-term decrease during the period of adaptation of the organism, and subsequently the development of persistent nitrite intoxication. A significant increase in nitrite levels in the later stages of the study indicates a disruption in the mechanisms of their elimination and an increase in the toxic load on the gum tissue.

3. The results obtained indicate a close relationship between nitrite intoxication and the activation of free radical processes in the tissues of the attached part of the gums, which creates the pathogenetic prerequisites for the development of morphofunctional disorders in the periodontal tissues.

Prospects for further research.

The experimental study fully justifies the feasibility of work aimed at studying the mechanisms of damage and searching for effective means of correcting oxidative stress under conditions of prolonged exposure to chemical food additives.

DOI 10.29254/2077-4214-2025-4-179-334-342

УДК 616.311.2: 641:612.3-071

Олексієнко В. В., Білаш С. М.

ОЦІНКА РОЗВИТКУ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ В ТКАНИНАХ ЯСЕН НА ТЛІ НІТРИТНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ ПРИ ДІЇ КОМПЛЕКСУ ХІМІЧНИХ ХАРЧОВИХ ДОБАВОК

Полтавський державний медичний університет (м. Полтава, Україна)

vladoleksienko20@gmail.com

Сьогодні, зважаючи на постійне зростання попиту на продукти харчування, виробники все частіше використовують різноманітні методи для пришвидшення виробничих процесів і збільшення строку зберігання продукції. Одним із найпоширеніших підходів для досягнення цих цілей є застосування хімічних речовин, зокрема харчових добавок. У той же час існує доведений негативний вплив добавок на організм. Експеримент проводився для дослідження морфологічних змін, що виникають у яснах під впливом комплексу харчових добавок і виявити зміни в розвитку компенсаторних реакцій в залежності від концентрації нітритів. Маркером стресу визначили концентрацію малонового діальдегіду (МДА), як маркеру перекисного окислення ліпідів і, відповідно, оксидативного стресу. Встановлено, що концентрація МДА впродовж експерименту зростала хвилюподібно, з проявом компенсаторно-приспосувальних реакцій на ранніх етапах дослідження (4-8 тижнів) і значним підвищенням МДА на 12-16 тижнях експерименту після зникнення компенсаторних реакцій. На пізніх етапах дослідження підвищення рівня нітритів вказувало на порушення компенсаторно-приспосувальних реакцій і посилення токсичного навантаження на тканини ясен. Схожу динаміку виявлено і в концентрації нітритів, в якій спочатку визначався різкий ріст, за яким спостерігалось короткочасне зниження у період адаптації організму до впливу шкідливих речовин, а в подальшому виявлений розвиток стійкої нітритної інтоксикації. Високий показник нітритів на пізніх термінах експерименту свідчить про порушення механізмів їх елімінації та виведення з організму, що лише посилює токсичного навантаження на тканини ясен.

Ключові слова: щури, ясна, харчові добавки, морфологія, відновні процеси, власна пластинка, морфометрія, оксидативний стрес, нітрозативний стрес, антиоксидантні ферменти, нітрит натрію.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Ця стаття виконана в рамках наукової роботи: «Закономірності морфогенезу органів, тканин і нервово-судинних утворень у нормі, патології та під

впливом екзогенних факторів» (номер державної реєстрації 0118U004457).

Вступ.

Нині, враховуючи постійне зростання попиту на продукти харчування, виробники активно впрова-

джують різні методи, спрямовані на прискорення процесів виробництва та продовження терміну зберігання продукції. Багато товарів на полицях магазинів містять штучні підсолоджувачі, підсилювачі смаку та ароматизатори, які стимулюють споживача купувати такі продукти знову і знову [1]. Одним із поширених способів досягнення цих цілей є застосування хімічних речовин, зокрема харчових добавок. Для споживачів особливо важливо усвідомлювати вплив таких речовин, аби приймати обдумані рішення щодо вибору продуктів. Щодня людина споживає їжу, що містить харчові добавки та консерванти, однак не поспішає від неї відмовлятися, попри загальновідомий факт про її шкоду [2]. Кількість цих компонентів у продуктах суворо контролюється відповідно до національних і міжнародних вимог.

Нітрит натрію, відомий також як сіль азотистої кислоти, – це одна з поширеніших харчових добавок. У чистому вигляді нітрит натрію або E250 являє собою кристалічний порошок білого кольору з легким жовтуватим відтінком [3]. Його активно використовують виробники ковбасних виробів. Він надає м'ясній продукції апетитний «м'ясний» вигляд і запобігає розвитку бактерій *Clostridium botulinum*, збудників ботулізму [4].

У той же час нітрит натрію пов'язують проблемою канцерогенності харчових добавок. Одне з досліджень виявило, що споживання нітритів як харчової добавки (наприклад, у м'ясних продуктах) було пов'язане зі збільшеним ризиком раку простати (HR=1.58). Також зростала ймовірність деяких інших видів раку при високому споживанні добавок [5].

Ще однією з найбільш поширених харчових добавок в Україні є глутамат натрію або E621. Його додають до продуктів харчування з метою підсилення смакових відчуттів шляхом підвищення чутливості смакових сосочків язика [6]. Втім, часте вживання глутамату натрію є потенційно шкідливим для всіх людей, адже він може викликає такі побічні ефекти, як головний біль, мігрень, астма, нудота, блювота, втома, дезорієнтація та депресія [7].

На сьогодні, в науковій літературі можна знайти інформацію про вплив окремих харчових добавок, проте досліджень, які стосуються змін в організмі при їх одночасному застосуванні, проведено вкрай мало. Ця тема все ще залишається недостатньо вивченою. Одне з наявних досліджень, де тестувалися дві консерванти разом, продемонструвало, що їхня комбінована дія має значно потужніший ефект порівняно з окремим використанням кожного з них.

Саме тому проблема дослідження морфологічних і функціональних змін в організмі, що виникають через щоденне споживання численних харчових добавок, навіть у межах максимально допустимих норм, є надзвичайно важливою і актуальною для збереження здоров'я як населення нашої країни, так і людства загалом.

Мета дослідження.

Оцінити динаміку розвитку оксидативного стресу в тканинах прикріпленої частини ясен щурів на тлі нітритної інтоксикації та визначити взаємопов'язані морфологічні зміни структурних компонентів ясен при введенні лабораторним тваринам комплексу хімічних харчових добавок.

Об'єкт і методи дослідження.

Для проведення експериментального дослідження ми використовували білих лабораторних щурів, яких утримували у віварії Полтавського державного медичного університету із забезпеченням стандартних умов харчування та освітлення. Тварини, відібрані до контрольної групи (всього 14 особин), протягом усього експерименту отримували перорально фізіологічний розчин у той самий час, коли тварини з експериментальної групи споживали комплекс харчових добавок. Контрольні особини мали вільний доступ до питної води та їжі. Відбір біологічного матеріалу у тварин контрольної групи проводився після завершення експериментального дослідження. Експериментальним тваринам протягом 1-16 тижнів вводили комплекс харчових добавок, забезпечуючи при цьому вільний доступ до питної води та стандартного раціону віварію. Розчин готували безпосередньо перед введенням. Кожній тварині вранці перед основним годуванням перорально давали 0,5 мл розчину, що містив 0,6 мг/кг нітриту натрію, 20 мг/кг глутамату натрію та 5 мг/кг Понсо 4R.

По завершенню експериментального дослідження, відповідно до вказаних термінів, тварин виводили з експерименту шляхом передозування тіопенталу натрію під ефірним наркозом, після чого вилучалась прикріплена частина ясен для гістологічного і біохімічного досліджень.

Гістологічні дослідження проводились на біоптатах прикріпленої частини ясен щурів, які ущільнювали в парафін і епоксидну смолу. З парафінових блоків виготовляли тонкі зрізи завтовшки 4-5 мкм і забарвлювали гематоксиліном і еозином, за методами ван Гізон і по Харту. З епоксидних блоків виготовляли напівтонкі гістологічні зрізи, які забарвлювали поліхромним барвником, метиленовим і толуїдиновим синім. Ущільнення і забарвлення гістологічних препаратів проводились за загально прийнятими в гістологічній техніці методиками [8].

Препарати згодом вивчали та проводили морфометричні дослідження за допомогою світлового мікроскопа із цифровою мікрофотонасадкою фірми Olympus C 3040-ADU з адаптованими для таких досліджень програмами (Olympus DP - Soft, ліцензія № VJ285302, VT310403, 1AV4U13B26802).

Біохімічні дослідження проводились на 10% гомогенаті ясен щурів. Тканини гомогенізували у 10 мМ трис-HCl буфері, pH 7,4 протягом 30-40 с. Після фільтрації гомогенат центрифугували протягом 10 хв при 1000 g. Супернатант було використано для біохімічних досліджень.

Концентрацію малонового діальдегіду визначали методом, що базується на здатності вільного МДА специфічно взаємодіяти з 1-метил-2-феніл-індолом у суміші метанолу та ацетонітрилу, утворюючи хромоген (карбоціаніновий барвник) помаранчевого кольору. 10% гомогенат ясен додають до пробірок у об'ємі 0,2 мл, у контрольну пробірку – 0,2 мл суміш метанолу з ацетонітрилом. Потім до кожної з пробірок вносять 0,65 мл 1 мМ розчину 1-метил-2-феніл-індолу у суміші ацетонітрилу та метанолу. З метою запуску реакції додається 0,15 мл концентрованої соляної кислоти. Наступним етапом проводиться інкубація при температурі 45–40 хв з подальшим

центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 10 хв. У надосадову рідину додають 2,5 мл суміші ацетонітрилу та метанолу. Надалі вимірюється величина абсорбції у кюветі із довжиною оптичного шляху 10 мм на довжині хвилі $\lambda=586$ нм проти контрольної проби. З цією метою використовується спектрофотометр Ulab 101, Germaine Laboratories, Inc. Розраховують концентрацію вільного малонового діальдегіду за формулою: $C(\text{МДА}) = A \cdot 113,75$ мкмоль/г тканини.

Концентрацію нітритів визначали шляхом визначення діазосполук, що утворилися у реакції з сульфаніловою кислотою, а потім проводили реакцію з α -нафтиламіном (реактив Грісса-Ілосвая). У результаті якої утворюються похідні червоного кольору (азобарвники). Інтенсивність забарвлення була пропорційна концентрації нітритів. Першим етапом була підготовка інкубаційного середовища: до 2,5 мл трис-буферу додати 0,3 мл водного розчину аргініну та 0,1 мл 1ММ водного розчину НАДФН₂. Реакцію запускають внесенням до інкубаційного середовища 0,2 мл гомогенату ясен – утворення аліквоти 1 (A_{11}), яку потім вносять у 1,8 мл дистильованої води та 0,2 мл 1% розчину сульфанілової кислоти. Залишити на 1 хв в темному місці при кімнатній температурі, після чого внести 0,2 мл 1% розчину α -нафтиламіну. Залишити на 10 хв в темному місці при кімнатній температурі. Фотометрування проводили в кюветі 5 мм проти дистильованої води при довжині хвилі 530 нм (E_1), за допомогою спектрофотометра Ulab 101, Germaine Laboratories, Inc. Розрахунок: $C = A_{11} \cdot 0,30104$; мкмоль/л. Біохімічні дослідження виконувались відповідно до рекомендацій [9].

Статистичні дослідження та аналіз отриманих результатів здійснювали з використанням пакета прикладних програм для медико-біологічних та епідеміологічних досліджень InStat, який забезпечував проведення статистичної обробки даних і надавав можливість отримати прогнозовані значення, необхідні для подальшої інтерпретації результатів: M – середнє значення; σ – стандартне відхилення; m – стандартна похибка середнього значення. Порівняльний аналіз проводили за допомогою t -тесту (критерію Стюдента), оцінюючи доцільність застосування методу та статистичну вірогідність отриманих результатів у зіставленні з суміжними показниками.

Експериментальні дослідження було проведено з дотриманням вимог гуманного ставлення до піддослідних тварин, регламентованих Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) та Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 18.03.1986 р.).

Результати дослідження та їх обговорення.

В результаті проведеного дослідження нами встановлено, що при введенні лабораторним тваринам комплексу хімічних харчових добавок розвивається оксидативний стрес, який проявлявся змінами рівня, в гомогенаті прикріпленої частини ясен, концентрації малонового діальдегіду (МДА), як маркеру перикисного окислення ліпідів та оксидативного стресу, у відповідності до терміну введення лабораторним тваринам комплексу хімічних харчових добавок.

Нами визначено, що рівень МДА в гомогенаті прикріпленої частини ясен білих лабораторних щурів контрольної групи становив $(4,05 \pm 0,07)$ мкмоль/г. Після 1 тижня експериментального дослідження вищезначений показник статистично достовірно при $p < 0,05$, збільшувався у 1,53 рази у порівнянні з контрольними показниками. Після 4 тижня експерименту рівень МДА продовжував зростати і у порівнянні з групою контролю був статистично достовірно при $p < 0,05$, більшим у 1,29 рази а у порівнянні з попереднім терміном експерименту він знижувався і був статистично достовірно при $p < 0,05$ меншим у 1,21 рази, що свідчить про розвиток компенсаторно-приспосувальних реакцій організму лабораторних тварин у відповідь на введення токсичного комплексу хімічних харчових добавок.

Після 8 тижня експерименту зміни концентрації МДА були аналогічними у порівнянні з 4 тижнем дослідження. Так у порівнянні з групою контролю цей показник був статистично достовірно при $p < 0,05$, більшим у 1,27 рази а у порівнянні з попереднім терміном експерименту він знижувався, але статистично достовірної різниці при $p < 0,05$ не визначено, а показник МДА знаходився у межах статистичної похибки.

Після 12 тижня експериментального дослідження рівень МДА в гомогенаті ясен продовжував зростати і у порівнянні з групою контролю був статистично достовірно при $p < 0,05$, більшим у 1,51 рази, і у порівнянні з попереднім терміном експерименту він теж збільшувався і був статистично достовірно при $p < 0,05$ більшим у 1,19 рази, що свідчить про стійкий розвиток оксидативного стресу і реакції організму лабораторних тварин у відповідь на введення токсичного агента у вигляді комплексу хімічних харчових добавок.

Після 16 тижня експерименту рівень МДА в гомогенаті прикріпленої частини ясен також продовжував зростати і у порівнянні з групою контролю був статистично достовірно при $p < 0,05$, значно більшим у 1,99 рази, і у порівнянні з попереднім терміном експерименту він теж збільшувався і був статистично достовірно при $p < 0,05$ більшим у 1,34 рази, що свідчить про значний розвиток оксидативного стресу (рис. 1).

Паралельно зі змінами концентрації МДА, нами визначені і зміни рівня нітритів у гомогенаті прикріпленої частини ясен білих лабораторних щурів. Встановлено що концентрація нітритів в гомогенаті ясен білих лабораторних щурів контрольної групи становив $(0,008 \pm 0,001)$ нмоль/г. Після 1 тижня експериментального дослідження вищезначений показник статистично достовірно при $p < 0,05$, збільшувався у 2,12 рази у порівнянні з контрольними показниками.

Після 4 тижня експерименту рівень нітритів продовжував зростати і у порівнянні з групою контролю був статистично достовірно при $p < 0,05$, більшим у 1,51 рази а у порівнянні з попереднім терміном експерименту він знижувався і був статистично достовірно при $p < 0,05$ меншим у 1,42 рази, що свідчить про розвиток компенсаторно-приспосувальних реакцій організму лабораторних тварин у відповідь на введення токсичного комплексу хімічних харчових добавок, що у свою чергу зменшувало токсичне навантаження на організм.

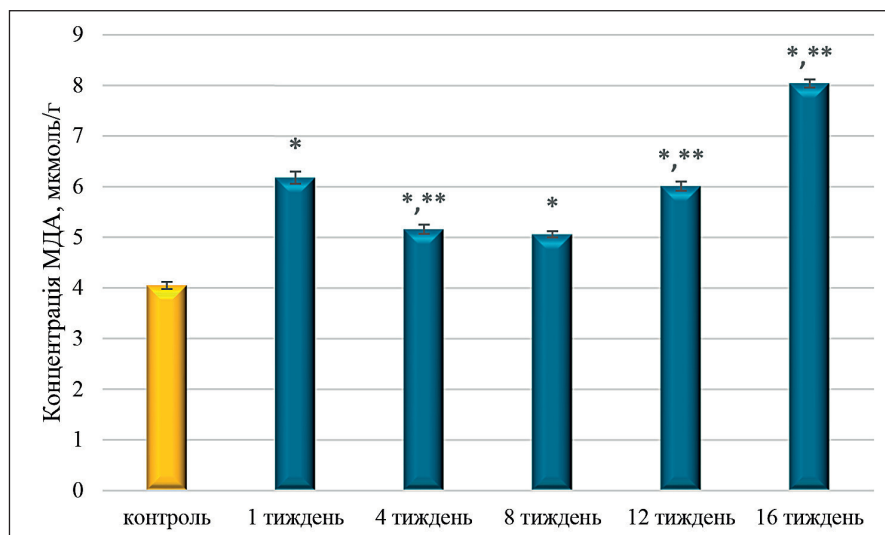


Рисунок 1 – Зміни концентрації МДА у гомогенаті прикріпленої частини ясен білих лабораторних щурів в динаміці експериментального дослідження.

Примітка: * – статистично значуща різниця при $p < 0,05$ у порівнянні з контрольними показниками; ** – статистично значуща різниця при $p < 0,05$ у порівнянні з попереднім терміном спостереження.

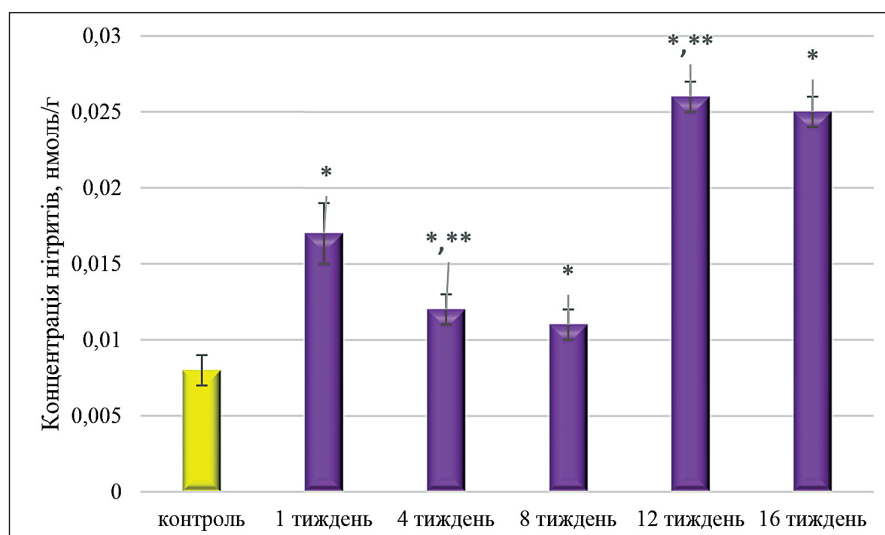


Рисунок 2 – Зміни концентрації нітритів у гомогенаті прикріпленої частини ясен білих лабораторних щурів в динаміці експериментального дослідження.

Примітка: * – статистично значуща різниця при $p < 0,05$ у порівнянні з контрольними показниками; ** – статистично значуща різниця при $p < 0,05$ у порівнянні з попереднім терміном спостереження.

Після 8 тижня експерименту зміни концентрації МДА були аналогічними у порівнянні з 4 тижнем дослідження. Так у порівнянні з групою контролю цей показник був статистично достовірно при $p < 0,05$, більшим у 1,38 рази, а у порівнянні з попереднім терміном експерименту він знижувався, але статистично достовірної різниці при $p < 0,05$ не визначено, а показник концентрації нітритів знаходився у межах статистичної похибки.

Після 12 тижня експериментального дослідження концентрація нітритів в гомогенаті ясен продовжувала зростати і у порівнянні з групою контролю була статистично достовірно при $p < 0,05$, значно більшою у 3,25 рази, і у порівнянні з попереднім терміном експерименту вона теж збільшувалась і була статистично достовірно при $p < 0,05$ більшою у 2,36 рази, що свідчить про стійкий розвиток нітратного навантаження і реакції організму лабораторних тварин у відповідь на введення токсичного агенту у вигляді комплексу хімічних харчових добавок та

нездатності організму ілюмінувати нітрити.

Після 16 тижня експерименту рівень МДА в гомогенаті прикріпленої частини ясен також продовжував зростати і у порівнянні з групою контролю був статистично достовірно при $p < 0,05$, значно більшим у 3,13 рази, і у порівнянні з попереднім терміном експерименту він незначно зменшувався але статистично достовірної різниці при $p < 0,05$ не визначено, а показник концентрації нітритів знаходився у межах статистичної похибки, що свідчить про розвиток стійкої нітритної інтоксикації (рис. 2).

Таким чином, у ході проведеного експериментального дослідження встановлено, що тривале введення лабораторним тваринам комплексу хімічних харчових добавок на тлі нітритної інтоксикації супроводжується розвитком вираженого оксидативного та нітрозативного стресу в тканинах прикріпленої частини ясен, що підтверджується достовірними змінами біохімічних маркерів малонового діальдегіду та нітритів у гомогенаті ясен білих лабораторних щурів. Тому дана робота поєднується з результатами іншої роботи [10, 11], незважаючи на те, що в ній експеримент проводився на клубовій кишці.

Висновки.

1. Встановлено, що концентрація МДА впродовж експерименту зростала хвилюподібно, з формуванням тимчасових компенсаторно-приспосувальних реакцій на ранніх етапах дослідження (4-8 тижнів), що проявлялося відносно стабілізацією показника. Водночас подальше пролонговане надходження токсичного комплексу призводило до виснаження адаптаційних механізмів та прогресуючого накопичення продуктів перикисного окислення ліпідів, про що свідчило значне підвищення рівня МДА на 12-16 тижнях експерименту.

2. Аналогічну динаміку виявлено і щодо змін концентрації нітритів, яка характеризувалася початковим різким зростанням, короточасним зниженням у період адаптації організму, а надалі розвитком стійкої нітритної інтоксикації. Значне підвищення рівня нітритів у пізні терміни дослідження свідчить про порушення механізмів їх елімінації та посилення токсичного навантаження на тканини ясен.

3. Отримані результати вказують на тісний взаємозв'язок між нітритною інтоксикацією та активністю вільнорадикальних процесів у тканинах прикріпленої частини ясен, що створює патогенетичні передумови для розвитку морфофункціональних порушень у тканинах пародонту.

Перспективи подальших досліджень.

Проведене експериментальне дослідження цілком обґрунтовує доцільність роботи, спрямованої на вивчення механізмів ушкодження та пошук ефективних засобів корекції оксидативного стресу за умов тривалого впливу хімічних харчових добавок.

References / Література

1. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), Mortensen A, Aguilar F, Crebelli R, Di Domenico A, Dusemund B, et al. Re-evaluation of glutamic acid (E620), sodium glutamate (E621), potassium glutamate (E622), calcium glutamate (E623), ammonium glutamate (E624) and magnesium glutamate (E625) as food additives. EFSA J. 2017;15(7):e04910. DOI: [10.2903/j.efsa.2017.4910](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4910).
2. Sarma S, Sockalingam S, Dash S. Obesity as a multisystem disease: Trends in obesity rates and obesity-related complications. Diabetes Obes Metab. 2021;23(1):3-16. DOI: [10.1111/dom.14290](https://doi.org/10.1111/dom.14290).
3. Donets IM, Yeroshenko HA, Hryhorenko AS, Shevchenko KV, Kinash OV. Osoblyvosti teoretychnoho obhruntuvannya ta znachennya vplyvu nityru natriyu ta ponso 4R na orhany dykhalnoyi systemy. Aktualni problemy suchasnoyi medytsyny. 2021;21.4(76):173-177. DOI: [10.31718/2077-1096.21.4.173](https://doi.org/10.31718/2077-1096.21.4.173). [in Ukrainian].
4. Yachmin AI, Yeroshenko HA, Bilash SM, Shevchenko KV, Lysachenko OD, Vatsenko AV, et al. Vplyv konservantiv ta azobarvnykiv na orhany shlunkovo-kyshekovoho traktu. Visnyk problem biolohiyi i medytsyny. 2022;1(163):75-80. DOI: [10.29254/2077-4214-2022-1-163-75-80](https://doi.org/10.29254/2077-4214-2022-1-163-75-80). [in Ukrainian].
5. Chazelas E, Pierre F, Druessne-Pecollo N, Esseddik Y, Szabo de Edelenyi F, Agaesse C, et al. Nitrites and nitrates from food additives and natural sources and cancer risk: results from the NutriNet-Santé cohort. Int J Epidemiol. 2022;51(4):1106-1119. DOI: [10.1093/ije/dyab046](https://doi.org/10.1093/ije/dyab046).
6. Tanaka S, Yoneoka A, Ishizuka A, Adachi M, Hayabuchi H, Nishimura T, et al. Modelling of salt intake reduction by incorporation of umami substances into Japanese foods: a cross-sectional study. BMC Public Health. 2023;23(1):516. DOI: [10.1186/s12889-023-15322-6](https://doi.org/10.1186/s12889-023-15322-6).
7. Donchenko SV, Bilash SM, Oliinichenko YAO, Oleksiyenko VV, Mamay OV. Imunohistokhimichna kharakterystyka nadnyrkovykh zaloz bilykh shchuriv kontrolnoyi hrupy tvaryn. Materialy Vosmoyi Vseukrayinskoyi naukovy-praktychnoyi konferentsiyi z mizhnarodnoyu uchastyu Teoriya ta praktyka suchasnoyi morfolohiyi; 2024 Lyst 6-8; Dnipro. Dnipro: DDMU; 2024. s. 46-47. [in Ukrainian].
8. Bahriy MM, Dibrova VA, Popadynets OH, Hryshchuk MI. Metodyka morfolohichnykh doslidzen: monohrafiya. Vinnytsya: Nova knyha; 2016. 328 s. [in Ukrainian].
9. Akimov OO, Kostenko VO. Okyslyuvanno-nitrozatyvnyy stres ta metody yoho doslidzhennya. Lviv: Mahnoliya; 2021. 152 s. [in Ukrainian].
10. Oliinichenko YaO, Bilash SM, Pronina OM, Koptev MM, Pirog-Zakaznikova AV, Donchenko SV, et al. Morphological and functional changes in the exchange vessels of the rat ileal mucosa under nitrite accumulation induced by combined administration of monosodium glutamate, sodium nitrite, and Ponceau 4R. World of Medicine and Biology. 2025;3(93):188-192. DOI: [10.26724/2079-8334-2025-3-93-188-192](https://doi.org/10.26724/2079-8334-2025-3-93-188-192).
11. Bilash SM, Oliinichenko YaO, Pronina OM, Koptev MM, Pirog-Zakaznikova AV, Donchenko SV, et al. Reaction of the capacitive link of the hemomicrocirculatory bed of the ileum under oxidative stress caused by the introduction of a complex of chemical food additives. World of Medicine and Biology. 2025;1(91):145-149. DOI: [10.26724/2079-8334-2025-1-91-145-149](https://doi.org/10.26724/2079-8334-2025-1-91-145-149).

ОЦІНКА РОЗВИТКУ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ В ТКАНИНАХ ЯСЕН НА ТЛІ НІТРИТНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ ПРИ ДІЇ КОМПЛЕКСУ ХІМІЧНИХ ХАРЧОВИХ ДОБАВОК

Олексієнко В. В., Білаш С. М.

Резюме. Дана робота досліджує вплив комплексу харчових добавок, до яких входять глутамат натрію, нітрит натрію та Понсо 4R на розвиток оксидативного стресу в тканинах прикріпленої частини ясен щурів.

Дослідження проводилось на матеріалі з ясен щурів. Підготовлені зрізи забарвлювали гематоксиліном і еозинном, за методами ван Гізон і по Харту. Основними методами дослідження були морфологічний, гістологічний і статичний.

Ясна щурів у контрольній групі відзначалися наявністю слизової оболонки без підслизової основи, будучи зрощеною з власною пластинкою. Перший шар утворювали вузькі й високі сосочки, що ніби вросли в епітеліальний шар слизової оболонки. Наступний шар, епітеліальний, вистелений багат шаровим плоским незроговілим епітелієм.

Досліджувалися відновно-компенсаторні реакції в прикріпленій частині ясен щурів та їхня зміна при збільшенні концентрації нітритів. Особлива увага приділялась морфологічним змінам, що виникала у тканинах з часом експерименту.

По завершенню експерименту нами було встановлено, що при введенні комплексу хімічних харчових добавок у лабораторних тварин розвивається оксидативний стрес, який проявлявся змінами рівня концентрації малонового діальдегіду в гомогенаті прикріпленої частини ясен. До 4 тижня досліду рівень концентрації зростав повільно, що свідчило про сильні компенсаторні реакції в яснах. З 8 по 12 тиждень відбувається послаблення компенсаторно-відновних реакцій і це яскраво проявляється після 16 тижня експерименту, коли рівень малонового діальдегіду в яснах стрімко зростає, що свідчить про стійкий оксидативний стрес.

Цим дослідженням ми демонструємо, що вплив комплексу харчових добавок є значно потужнішим, ніж дії окремих добавки. Згадуючи, що всі продукти містять в собі саме комплекс добавок, цей експеримент буде цікавим працівникам харчової промисловості, а також лікарям і науковцям, що будуть вести дослідження у цьому напрямі.

Ключові слова: щури, ясна, харчові добавки, морфологія, відновні процеси, власна пластинка, морфометрія, оксидативний стрес, нітрозативний стрес, антиоксидантні ферменти, нітрит натрію.

ASSESSMENT OF THE DEVELOPMENT OF OXIDATIVE STRESS IN GINGIVAL TISSUES UNDER NITRITE INTOXICATION DURING EXPOSURE TO A COMPLEX OF CHEMICAL FOOD ADDITIVES

Oleksiienko V. V. Bilash S. M.

Abstract. This study investigates the effect of a complex of food additives, including monosodium glutamate, sodium nitrite, and Ponceau 4R, on the development of oxidative stress in the tissues of the attached part of the gums of rats.

The study was conducted on rat gingival tissue. The prepared sections were stained with hematoxylin and eosin, using the van Gieson and Hart methods. The main research methods were morphological, histological, and statistical.

The gums of rats in the control group were characterized by the presence of a mucous membrane without a submucosal base, being fused with its own plate. The first layer was formed by narrow and high papillae that seemed to grow into the epithelial layer of the mucous membrane. The next layer, the epithelial layer, was lined with a multilayered flat non-keratinized epithelium.

The regenerative and compensatory reactions in the attached part of the rat gums and their changes with an increase in nitrite concentration were studied. Particular attention was paid to morphological changes that occurred in the tissues over the course of the experiment.

At the end of the experiment, we found that the administration of a complex of chemical food additives to laboratory animals caused oxidative stress, which manifested itself in changes in the concentration of malondialdehyde in the homogenate of the attached part of the gums. Up to week 4 of the experiment, the concentration level increased slowly, indicating strong compensatory reactions in the gums. From weeks 8 to 12, compensatory and restorative reactions weakened, which was clearly evident after week 16 of the experiment, when the level of malondialdehyde in the gums rose sharply, indicating persistent oxidative stress.

With this study, we demonstrate that the effect of a complex of food additives is significantly more powerful than the effects of individual additives. Considering that all products contain a complex of additives, this experiment will be of interest to food industry workers, as well as doctors and scientists who will conduct research in this area.

Key words: rats, gingiva, food additives, morphology, regenerative processes, lamina propria, morphometry, oxidative stress, nitrosative stress, antioxidant enzymes, sodium nitrite.

ORCID and contributionship / ORCID кожного автора та його внесок до статті:

Oleksienko V. V.: <https://orcid.org/0000-0003-1616-8724> ^{ABCDEF}

Bilash S. M.: <https://orcid.org/0000-0002-8351-6090> ^{ABCEF}

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors declare no conflict of interest / Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Oleksienko Vladyslav Vitaliyovych / Олексієнко Владислав Віталійович

Poltava State Medical University / Полтавський державний медичний університет

Ukraine, 36024, Poltava, 23 Shevchenko str. / Адреса: Україна, 36024, м. Полтава, вул. Шевченка 23

Tel.: +380678940485 / Тел.: +380678940485

E-mail: vladoleksienko20@gmail.com

A – Work concept and design, **B** – Data collection and analysis, **C** – Responsibility for statistical analysis, **D** – Writing the article, **E** – Critical review, **F** – Final approval of the article / **A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статистичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

Received 17.07.2025 / Стаття надійшла 17.07.2025 року

Accepted 10.11.2025 / Стаття прийнята до друку 10.11.2025 року

DOI 10.29254/2077-4214-2025-4-179-342-349

UDC 616.345-006.6:616.34-091:616-092.9:599.323.4

Senko S. V., Nebesna Z. M.

FEATURES OF THE ILEUM STRUCTURAL REMODELING IN WHITE RATS UNDER CONDITIONS OF DMH-INDUCED *IN SITU* COLON ADENOCARCINOMA

**I. Horbachevsky Ternopil National Medical University,
Ministry of Health of Ukraine (Ternopil, Ukraine)**

nebesna_zm@tdmu.edu.ua

Diseases of the digestive system are among the leading causes of chronic morbidity and reduced quality of life, which determines their high medical and social significance. Pathology of the small intestine occupies a special place, since structural and functional disorders of this segment underlie disturbances of digestion, absorption, and immune homeostasis. Investigation of the pathomorphological changes of the small intestine is essential for deepening the understanding of the pathogenesis of digestive system diseases, as well as improving their early diagnosis and treatment. The aim of the study was to investigate microscopic changes in the wall of the ileum in white rats under conditions of DMH-induced carcinogenesis. The experimental study was performed on 85 outbred mature male white rats. Microscopic examination of the ileum in animals with modeled colon oncogenesis revealed pronounced alterative-degenerative changes in all tunics of the intestinal wall, with predominant involvement of the mucosa. These included destruction and desquamation of the epithelium, deformation and reduction of villi and crypts, foci of acute necrosis, marked edema, impaired microcirculation, and massive histoleukocytic infiltration with lymphoid tissue hyperplasia. Involvement of the muscular and serous tunics accompanied by disorganization of smooth myocytes indicates a severe and widespread lesion of the ileum under conditions of experimental carcinogenesis.