

© 2024 by the author(s).

This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2024.1-2.062>

УДК: 616.314.17-008.1:616.36:612.33: 1577.112.386.5+577.164.184/161.2

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ МЕТІОНІНОВОЇ ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЇ ТА ЇЇ КОРЕКЦІЇ ХОЛІНОМ І ВІТАМІНОМ D НА СТАН ПАРОДОНТУ, ТОНКОГО КИШЕЧНИКА ТА ПЕЧІНКИ ЩУРІВ

¹ Кутельмах О.І. ORCID: 0000-0003-0838-032X

² Чумакова Ю.Г. ORCID: 0000-0002-8500-5446

¹ Ковальчук Л.О. ORCID: 0000-0002-1757-6212

³ Одноріг Ю.О. ORCID: 0009-0007-1827-9627

³ Кутельмах О.О. ORCID: 0009-0005-9123-1465

¹ Сподарук А.Л. ORCID: 0009-0004-4603-5679

¹ Вінницький Національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, Вінниця, Україна
Кафедра терапевтичної стоматології

² Міжнародний гуманітарний університет, Одеса, Україна
Кафедра загальної стоматології

³ Вінницький Національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, Вінниця, Україна
Кафедра пропедевтики внутрішньої медицини

Ключові слова: гомоцистеїн, вітамін D, холін, пародонт, печінка, тонкий кишечник

Для цитування: Кутельмах О.І., Чумакова Ю.Г., Ковальчук Л.О., Одноріг Ю.О., Кутельмах О.О., Сподарук А.Л.
Вивчення впливу метіонінової гіпергомоцистеїнемії та її корекції холіном і вітаміном D на стан пародонту,
тонкого кишечника та печінки щурів. Львівський медичний часопис. 2024. Т. 30. № 1-2. С.62-74.

DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2024.1-2.062>

Для кореспонденції: Кутельмах О.І., кандидат медичних наук, доцент кафедри терапевтичної стоматології
Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, e-mail: ahzelo1968vin@i.ua

Стаття надійшла: 1.02.2024 **Прийнята до друку:** 28.03.2024

STUDY OF THE EFFECT OF METHIONINE HYPERHOMOCYSTEINEMIA AND ITS CORRECTION WITH CHOLINE AND VITAMIN D ON THE CONDITION OF THE PERIODONTIUM, SMALL INTESTINE, AND LIVER OF RATS

¹ Oleh Kutelmakh ORCID: 0000-0003-0838-032X

² Yulia Chumakova ORCID: 0000-0002-8500-5446

¹ Lina Kovalchuk ORCID: 0000-0002-1757-6212

³ Yulia Odnorih ORCID: 0009-0007-1827-9627

³ Olexandra Kutelmakh ORCID: 0009-0005-9123-1465

¹ Anastasiya Spodaruk ORCID: 0009-0004-4603-5679

¹ National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsia, Ukraine
Department of Therapeutic Dentistry,

² International Humanitarian University, Odesa, Ukraine
Department of General Dentistry,

³ National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsia, Ukraine
Department of Propedeutics of Internal Medicine

Keywords: homocysteine, vitamin D, choline, periodontium, liver, small intestine

For citation: Kutelmakh O., Chumakova Y., Kovalchuk L., Odnorih Y., Kutelmakh O., Spodaruk A. Study of the effect of
methionine hyperhomocysteinemia and its correction with choline and vitamin D on the condition of the periodontium,
small intestine, and liver of rats. Acta Medica Leopoliensia. 2024;30(1-2):62-74.

DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2024.1-2.062>

For correspondence: Kutelmakh O.I., Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of
Therapeutic Dentistry of Vinnytsia National Medical University named after E. Pirogov, e-mail: ahzelo1968vin@i.ua

Received: February 3, 2024 **Accepted:** March 28, 2024

Реферат

В останні роки з'явилися повідомлення щодо клінічного взаємозв'язку між пародонтитом, захворюваннями кишечника і печінки людського організму, так звана "ротово-кишково-печінкова вісь", хоча причинно-наслідковий механізм такої "асоціації" поки незрозумілий.

Мета. Дослідити функціональний стан печінки, тонкого кишечника і пародонта щурів на фоні тривалої метіонін-індукованої ГГЦ і недостатності вітаміну D та її корекції холіном і вітаміном D.

Матеріал і методи. Дослідження тривалістю 8 тижнів було проведене на 36 дорослих щурах обох статей віком 5 місяців. Експериментальна гіпергомоцистеїнемія була відтворена згідно з діючими рекомендаціями, її корекції проводилися за допомогою холіну і вітаміну D. Досліджувалися і порівнювалися біохімічні показники в крові і гомогенатах, визначався ступінь атрофії альвеол.

Результати. Експериментальне дослідження підтвердило результати попередніх досліджень, що за тривалої метіонінової ГГЦ у щурів виникає помірне ураження пародонту, що віддалено нагадує клінічну картину генералізованого пародонтиту легкого ступеня важкості у людей.

Обговорення. У експериментальних тварин гіпергомоцистеїнемія викликає низку аберацій в крові, кишечнику та печінці (високий рівень гомоцистеїну, оксидативний стрес, гальмування антиоксидантного захисту, зниження рівня вітаміну D, зміну активності ензимів печінки, порушення обміну кальцієм).

Висновки. Зміни в пародонті, кишечнику і печінці експериментальних тварин, які виникають на фоні гіпергомоцистеїнемії підтверджують наявність "ротово-кишково-печінкової" асоціації. Збагачення дієти холіном та вітаміном D відчутно знижує вказані порушення, а саме: попереджує виникнення процесів резорбції в альвеолах щелеп, покращує функціональний стан тонкого кишечника і печінки. Збільшення виведення кальцію з організму щурів із сечею вказує на порушення кісткового метаболізму, що може бути наслідком дефіциту кальцію в тварин з ГГЦ. Отже, взаємозв'язок між ротовою порожниною, тонким кишечником і печінкою існує, як і підтвердило наше дослідження, проте відповіді на те, яка патологія в цій тріаді передує і викликає ланцюгову реакцію, сказати складно. Наведені наративи з проблем осі "рот-кишечник-печінка" дають надію на можливий новий практичний крок в стоматології.

Вступ

В останні роки з'явилися повідомлення щодо клінічного взаємозв'язку між пародонтитом, захворюваннями кишечника і печінки людського організму, так звана вісь "рот-кишечник-

Abstract

In recent years, there have been reports of a clinical relationship between periodontitis, intestinal and liver diseases of the human body, the so-called "oral-intestinal-hepatic axis", although the causal mechanism of such an "association" is still unclear.

Aim. The study aims to investigate the functional state of the liver, small intestine, and periodontium of rats against the background of long-term methionine-induced hyperhomocysteinemia and vitamin D deficiency and its correction with choline and vitamin D.

Materials and Methods. The study, lasting 8 weeks, was conducted on 36 adult rats of both sexes, aged 5 months. Experimental hyperhomocysteinemia was reproduced according to current recommendations, and its correction was carried out with the help of choline and vitamin D. Biochemical parameters in blood and homogenates were studied and compared, and the degree of alveolar atrophy was determined.

Results. The experimental study confirmed the data of previous studies that with long-term methionine hyperhomocysteinemia in rats, moderate periodontal damage occurs, which remotely resembles the clinical picture of generalized periodontitis of a mild degree of severity in humans.

Discussion. In experimental animals, hyperhomocysteinemia causes a number of aberrations in the blood, intestines, and liver (high level of homocysteine, oxidative stress, inhibition of antioxidant protection, decreased vitamin D levels, changes in the activity of liver enzymes, disturbances in calcium metabolism).

Conclusions. Changes in the periodontium, intestines, and liver of experimental animals that occur against the background of hyperhomocysteinemia confirm the presence of an "oral-intestinal-hepatic" association. Enriching the diet with choline and vitamin D significantly reduces the indicated disorders, namely: prevents the occurrence of resorption processes in the alveoli of the jaws, and improves the functional state of the small intestine and liver. Increased excretion of calcium from the body of rats with urine indicates a violation of bone metabolism, which may be a consequence of calcium deficiency in animals with hyperhomocysteinemia. So, there is a relationship between the oral cavity, the small intestine, and the liver; which was confirmed by our research, but it is difficult to answer what pathology in this triad precedes and causes a chain reaction. The given narratives about the problems of the "mouth-intestine-liver" axis provide hope for a possible new practical step in dentistry.

печінка", хоча причинно-наслідковий механізм такої "асоціації" поки що незрозумілий [1].

Як відомо, однією із недостатньо вивчених причин виникнення багатьох органних патологій, в тому числі кишечника та печінки,

є гіпергомоцистеїнемія (ГГц) і дефіцит вітаміну D, як у провокуючому патологічному тандемі, так і поодиноці [2]. В попередніх наших експериментальних дослідженнях на лабораторних щурах [3, 4, 5], нами висвітлено асоціативний зв'язок деяких стоматологічних патологій і підвищеними рівнями гомоцистеїну (Гц) та вмістом вітаміну D в організмі людини. Нас зацікавило, чи існує комплексний зв'язок між ГГц, вмістом вітаміну D, здоров'ям ротової порожнини, патологією тонкого кишечника і печінки у лабораторних щурів, наявність якого відкриває перспективи для подальших досліджень.

Мета дослідження - дослідити функціональний стан печінки, тонкого кишечника і пародонта щурів на фоні тривалої метіонін-індукованої ГГц і недостатності вітаміну D та її корекції холіном і вітаміном D.

Матеріал і методи

Експерименти проводили відповідно до Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 "Про захист тварин від жорстокого поводження" та діючих вимог про гуманне ставлення до експериментальних тварин [6], ухвалених "Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються з експериментальною та іншою науковою метою" (Страсбург, 1987) [7], ДФЦ МОЗ України, з дотриманням правил, запроваджених комітетом з біоетики Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова.

Дослідження тривалістю 8 тижнів було проведене на 36 дорослих щурах обох статей віком 5 місяців імбредного розведення масою 160-220 г. Докладно методика відтворення експериментальної ГГц та її корекції була описана раніше [5]. Тварини були розділені на 3 групи: 1-а група-інтактний контроль, 2-а - тварини з метіоніновою ГГц та 3-я група - тварини, в яких ГГц корегувалася холіном і вітаміном D. Відтворення експериментальної моделі відбувалося відповідно до діючих рекомендацій і тривало 4 тижні. Чотири наступних тижнів всі щурі знаходилися на стандартному раціоні віварію, впродовж яких прово-

дилося тільки спостереження за тваринами для прогресування більш вираженої патології. В кінці досліді після забору сечі, в якій визначали вміст загального кальцію, лабораторних тварин усіх груп виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом і забирали кров з серця для біохімічних досліджень. З фрагментів тонкого кишечника та ясен виготовляли гомогенати, на скелетованих альвеолярних паростках в ділянці молярів нижніх щелеп правої сторони проводили морфометричні дослідження.

У плазмі крові експериментальних тварин рівень гомоцистеїну досліджували за допомогою методу конкурентного імуноаналізу з електрохемілюмінісцентною детекцією "ECLIA" на аналізаторі Cobas 6000 з тест-системою "Roche Diagnostics" (Швейцарія). Діапазон вимірювань становив 3,0-50,0 мкмоль/л. Вітамін D (25-гідроксивітамін D (25-OH D)) визначали методом імуноферментного аналізу на твердому сорбенті "ELISA", аналізатор і тест-система "EUROIMMUN" (Німеччина), діапазон вимірювань становив 0-4800 МО/л. Біохімічні маркери, які характеризують стан печінки визначали загальновідомими методами: загальний білок, малоновий діальдегід - по реакції з тіобарбітуровою кислотою, катепсин Д - по реакції з гемоглобіном, аланін-амінотрансферазу (АлАТ) і аспартатаміно-трансферазу (АсАТ) [8, 9, 10].

Виділені фрагменти тонкого кишечника і ясен промивали та гомогенізували з використанням 50 мМ трис HCl буфера (pH 7,4), що містить 1,15% KCl. Гомогенат центрифугували при 4°C протягом 10 хвилин, а його супернатант зберігали при -8°C і використовували для оцінки біохімічних параметрів: активності еластази [11], кислої фосфатази (імуноферментним методом "ELISA" на напівавтоматичному мікропланшетному фотометрі SUNRISE (Tecan, Австрія), з використанням тест-системи IDS-Deutschland GmbH (Німеччина)), катепсину D [9], вмісту малонового діальдегіду [8], та стану антиоксидантної системи (активність СОД) - за реакцією з кверцетином [12]. Морфометричні до-

слідження проводили на нижніх щелепах після механічного видалення м'яких тканин (з попередньою одноденною витримкою в 5% розчині NaOH) за методикою, описаною в попередніх дослідженнях [4]. Статистичну обробку результатів проводили для середніх величин за t-критерієм Стюдента [13]. Результати представлені у вигляді $M \pm m$.

Результати й обговорення

Як і в попередніх експериментах [3, 5] найвищий рівень Гц реєстрували у 2-й групі тварин (метіонінова ГГц), що з високим ступенем вірогідності ($p < 0,001$) відрізнялося від показників у контрольній групі, в якій він був нижчий в 1,8 рази, що свідчить про методологічне відтворення нами моделі метіонінової гіпергомоцистеїнемії (Табл. 1). Про ефективність застосованого нами методу корекції ГГц холіном та вітаміном D свідчить і вірогідна різниця показників даного маркера між 2-ю та 3-ю групами ($p < 0,05$), який зменшився в $\sim 1,4$ рази.

У кінці досліду рівні загального білка

в крові тварин усіх груп був практично однаковим і статистичної різниці між групами не спостерігали (Табл. 2).

У сироватці крові щурів 2-ї групи "метіонінова ГГц" відзначається збільшення на 30% вмісту МДА ($p < 0,05$) порівняно з 1-ю групою здорового контролю і на 27% порівняно з 3-ю групою щурів, в яких проводилася корекція гіпергомоцистеїнемії. Деструкція й руйнування клітинних мембран унаслідок нагромадження продуктів вільнорадикального окислення в крові піддослідних тварин супроводжується підвищенням активності лізосомального ферменту катепсину D - в 1,7 і в 1,6 рази ($p < 0,001$) відповідно до контрольної та 3-ї експериментальних груп. (Табл. 2).

Підвищення активності в плазмі крові таких ензимів як аланінамінотрансфераза (АлАТ) і аспартатамінотрансфераза (АсАТ) є надійним індикатором ушкодження печінки і свідчить про деяке порушення цілісності гепатоцитів, бо відомо, що підвищення активності цих ферментів, а особливо АлАТ, відбувається значно раніше, ніж інші очевидні

Таблиця 1

Рівні гомоцистеїну (Гц), вітаміну D в сироватці крові щурів ($M \pm m$) на фоні метіонінової гіпергомоцистеїнемії і недостатності вітаміну D та її корекції

Групи тварин	Гц (мкмоль/л)	Вітамін D (нмоль/л)
1. Контроль n=12	6,23 $\pm$ 0,65	31,98 $\pm$ 1,38
2. Метіонінова модель ГГц, n=12	11,35 $\pm$ 0,75 $p_1 < 0,001$	23,55 $\pm$ 1,30 $p_1 < 0,05$
3. Метіонінова модель ГГц та її корекція холіном та вітаміном D, n=12	7,97 $\pm$ 0,83 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$	31,75 $\pm$ 2,39 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$

Примітка. У цій та наступних таблицях позначена вірогідна ($p < 0,05$) та високо вірогідна ($p < 0,001$) різниця між групами, $p_{1,2}$ -цифрами позначені групи порівняння

Таблиця 2

Біохімічні показники сироватки крові щурів, що характеризують стан печінки ($M \pm m$) на фоні метіонінової гіпергомоцистеїнемії і недостатності вітаміну D та її корекції

Групи тварин	Загальний білок (г/л)	МДА (мкмоль/л)	Катепсин D (од)
Контрольна група, n=12	72,6 $\pm$ 4,54	10,3 $\pm$ 0,45	0,044 $\pm$ 0,004
Метіонінова модель ГГц, n=12	68,8 $\pm$ 5,94	13,3 $\pm$ 0,76 $p_1 < 0,05$	0,075 $\pm$ 0,006 $p_1 < 0,001$
Метіонінова модель ГГц та її корекція холіном та вітаміном D, n=12	70,9 $\pm$ 5,65	10,6 $\pm$ 0,69 $p_2 < 0,05$ $p_1 > 0,05$	0,047 $\pm$ 0,005 $p_2 < 0,001$ $p_1 > 0,05$

Примітка: * - катепсин D виражали в одиницях оптичної щільності на 1 мг білка за 10 хв

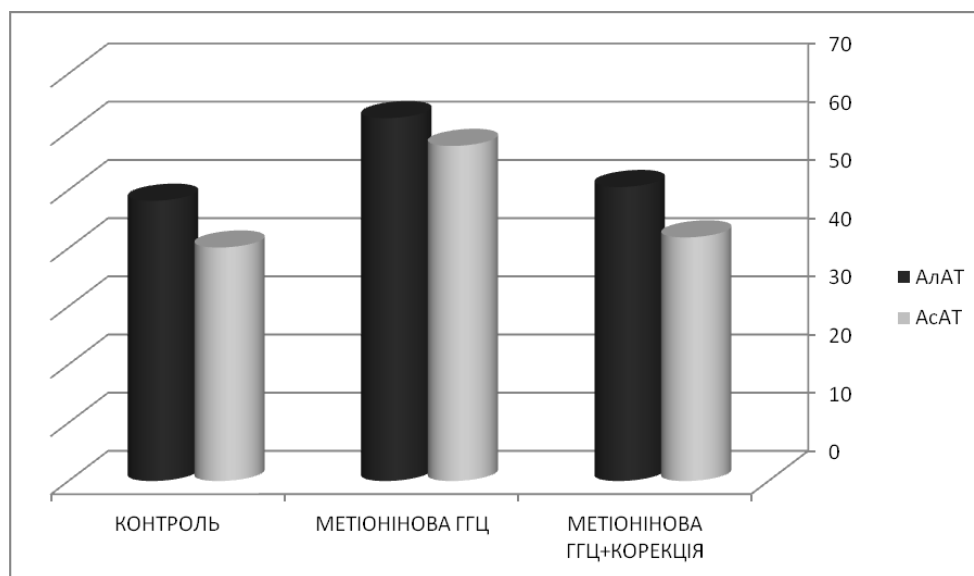


Рис. 1

Рівні АЛП і АсАТ в сироватці крові щурів (нмоль/мл/хв) на фоні метіонінової гіпергомоцистеїнемії і недостатності вітаміну D та її корекції

ознаки негативних ефектів. При експериментальній метіоніновій гіпергомоцистеїнемії, в тварин 2-ї групи рівні АЛП вірогідно вищі ($p < 0,05$) ніж у щурів 1-ї та 3-х груп, а саме в 1,28 і 1,23 рази, відповідно (Рис. 1). Стосовно активності АсАТ реєструється практично аналогічна тенденція.

Серед маркерів запалення слизової оболонки тонкої кишки щурів ми акцентували свою увагу на малоновому діальдегіді (МДА), еластазі і кислій фосфатазі. Активність еластази у слизовій оболонці тонкої кишки щурів усіх груп вірогідно не змінювалася ($p > 0,05$) (Табл. 3).

Активність кислій фосфатази (КФ) як маркера проникності мембран з високою вірогідністю ($p < 0,001$) була вища у тварин другої групи з некорегованою експерименталь-

ною гіпергомоцистеїнемією. Порівняно з групою здорового контролю, активність цього ферменту виросла на 64%, а при зрівнянні з тваринами 3 групи, в яких проводилася корекція ГГЦ холіном та вітаміном D, активність КФ була вищою на 52%. Вірогідної різниці в показниках вищезгаданого маркера у тварин 1-ї та 3-ї груп не спостерігалося.

Ріст концентрації малонового діальдегіду в кишкових гомогенатах щурів з метіоніновою ГГЦ (2-га група) свідчить про інтенсифікацію процесу перекисного окиснення ліпідів в слизовій оболонці тонкої кишки. Вміст МДА достовірно підвищувався за гіпергомоцистеїнемії (група 2), особливо в порівнянні з контрольною групою тварин ($p < 0,001$). Збагачення дієти холіном та вітаміном D (група 3) суттєво нормалізувало цей

Таблиця 3

Показники запалення в гомогенатах слизової оболонки тонкого кишечника щурів на фоні метіонінової гіпергомоцистеїнемії і недостатності вітаміну D та її корекції

Групи тварин	МДА (нмоль/мг білка)	Кисла фосфатаза (нкат/кг)	Еластаза (Од/кг)
Контрольна група n=12	1,95±0,17	2,55±0,19	14,85±0,88
2. Метіонінова модель ГГЦ, n=12	3,35±0,21 $p_1 < 0,001$	4,19±0,28 $p_1 < 0,001$	17,62±1,16 $p_1 > 0,05$
Метіонінова модель ГГЦ та її корекція холіном та вітаміном D, n=12	2,15±0,13 $p_2 < 0,05$ $p_1 > 0,05$	2,76±0,11 $p_2 < 0,05$ $p_1 > 0,05$	15,35±0,52 $p_2 > 0,05$ $p_1 > 0,05$

Примітка: 1 Од=0,0167мк-кат/кг

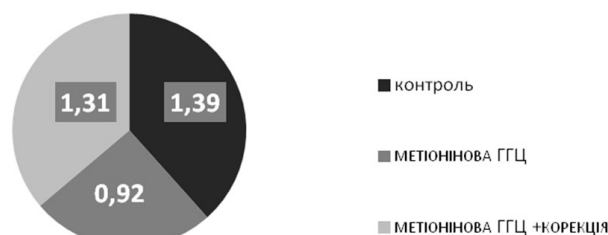


Рис.2

Стан антиоксидантного захисту тонкого кишечника щурів на фоні метіонінової гіпергомоцистеїнемії і недостатності вітаміну D та її корекції (%)

Примітка: * - активність СОД виражали як % гальмування утворення супероксидного радикалу на 1 мг білка

показник ($p < 0,05$).

Як відомо, ГГЦ та дефіцит вітаміну D в організмі впливають на виникнення оксидативного стресу. Дані цього дослідження показали вірогідне посилення ($p < 0,05$) активності супероксиддисмутази в 3-й групі тварин, де проводилася корекція гіпергомоцистеїнемії, порівняно з 2-ю групою, де корекція ГГЦ не проводилася. Різниця між показника-

ми в цих експериментальних групах склала 42% (Рис. 2).

На тлі модельованої метіонінової ГГЦ у тканинах ясен щурів 2 групи спостерігали високо достовірне підвищення вмісту МДА - в 2,3 рази ($p < 0,001$) порівняно зі здоровим контролем (1-ша група) та в 1,9 рази ($p < 0,05$) порівняно із 3-ю групою тварин (Табл. 4). Зниження активності СОД - у 2,3 рази ($p < 0,001$) та зріст активності катепсину D ($p < 0,001$) також підтверджують наявність вираженої запальної реакції у пародонті. Збагачення дієти холіном та вітаміном D (група 3) нормалізувало вищевказані показники.

Показник резорбції кістки альвеолярного паростку в щурів на тлі гіпергомоцистеїнемії (група 2), який розраховували за ступенем оголення коренів молярів, склав 36,77 1,08 %, що вірогідно вище показника атрофії кістки в інтактних щурів (група 1) - 27,59 0,58% ($p < 0,05$) та щурів 3 групи з корегованою ГГЦ ($p < 0,05$) (Рис.3).

Таблиця 4

Біохімічні показники в гомогенатах ясен щурів на фоні метіонінової ГГЦ і недостатності вітаміну D та її корекції ($M \pm m$)

Групи тварин	МДА (нмоль/мг білка)	СОД (%)	Катепсин D (од.)
Контрольна група, n=12	2,97±0,42	43,3±1,59	0,097±0,006
2. Метіонінова модель ГГЦ, n=12	6,73±0,29 $p_1 < 0,001$	17,0±1,62 $p_1 < 0,001$	0,212±0,008 $p_1 < 0,001$
Метіонінова модель ГГЦ та її корекція холіном та вітаміном D, n=12	3,57±0,37 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$	39,4±1,76 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$	0,125±0,004 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$

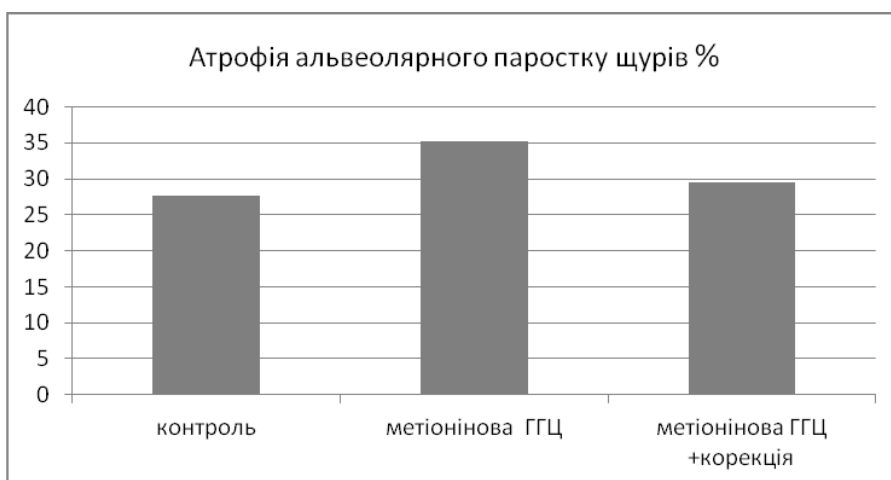


Рис 3

Атрофія пародонтальних альвеол (%) на фоні змін в печінці і тонкому кишечнику під впливом метіонінової гіпергомоцистеїнемії і недостатності вітаміну D та її корекції

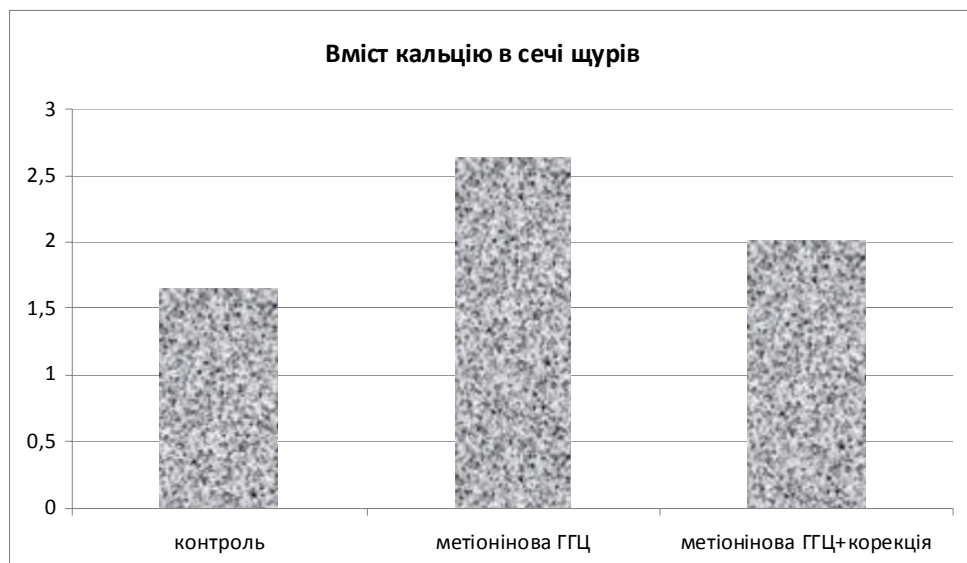


Рис 4.

Кількість виведення кальцію з організму щурів із сечею (ммоль/л) на фоні метіонінової гіпергомоцистеїнемії і недостатності вітаміну D та її корекції

У тварин 2 групи спостерігається виражене виведення кальцію зі сечею, а саме на 60% більше, ніж у тварин контрольної групи та на 23 % більше, ніж у тварин 3 групи (Рис. 4).

Висновки

Проведене нами експериментальне дослідження підтвердило результати попередніх досліджень, що за тривалої метіонінової ГГЦ у щурів виникає помірне ураження пародонту, що віддалено нагадує клінічну картину генералізованого пародонтиту легкого ступеня важкості у людей. У експериментальних тварин гіпергомоцистеїнемія викликає низку аберацій в крові, кишечнику та печінці (високий рівень гомоцистеїну, оксидативний стрес, інтенсифікація ПОЛ, зниження рівня вітаміну D, зміну активності ензимів печінки тощо). Збагачення дієти холіном та вітаміном D відчутно зни-

жує вказані порушення, а саме: попереджує виникнення процесів резорбції в альвеолах щелеп, покращує стан тонкого кишечника і печінки. Збільшення виведення кальцію з організму щурів із сечею вказує на порушення кісткового метаболізму, що може бути наслідком дефіциту кальцію в тварин з ГГЦ.

Перспективи подальших досліджень.

Взаємозв'язок між ротовою порожниною, тонким кишечником й печінкою існує, що і підтвердило наше дослідження, проте, відповіді на те, яка патологія у цій тріаді передує і викликає ланцюгову реакцію, сказати складно.

Наведені наративи з проблем осі "рот-кишечник-печінка" дають надію на можливий новий практичний крок в стоматології.

Конфлікт інтересів: немає.

Інформація про фінансування: немає.

STUDY OF THE EFFECT OF METHIONINE HYPERHOMOCYSTEINEMIA AND ITS CORRECTION WITH CHOLINE AND VITAMIN D ON THE CONDITION OF THE PERIODONTIUM, SMALL INTESTINE, AND LIVER OF RATS

Introduction

In recent years, there have been reports of a clinical relationship between periodontitis, intestinal and liver diseases of the human body, the so-called "oral-intestinal-hepatic axis",

although the causal mechanism of such an "association" is still unclear [1].

As it is known, one of the insufficiently studied causes of the occurrence of many organ pathologies, including intestines and liver, is

hyperhomocysteinemia (HHcy) and vitamin D deficiency, both in a provoking pathological tandem and individually [2]. In our previous experimental studies on laboratory rats [3,4,5], we highlighted the association between some dental pathologies and elevated levels of homocysteine (Hcy) and vitamin D content in the human body. We were interested in whether there is a complex relationship between HHcy, vitamin D content, oral health, and pathology of the small intestine and liver in laboratory rats, the presence of which opens perspectives for further research. The study aims to investigate the functional state of the liver, small intestine, and periodontium of rats against the background of long-term methionine-induced HHcy and vitamin D deficiency and its correction with choline and vitamin D.

Material and Methods

The experiments were conducted in accordance with Law of Ukraine No. 3447-IV dated 21.02.2006 "On the Protection of Animals from Cruelty" and the current requirements for the humane treatment of experimental animals [6] adopted by the "European Convention on the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other for a scientific purpose" (Strasbourg, 1987) [7], DPC of the Ministry of Health of Ukraine, in compliance with the rules introduced by the Bioethics Committee of Vinnytsia National Medical University named after M. I. Pirogov.

The study, lasting 8 weeks, was conducted on 36 adult rats of both sexes, 5 months old, inbred breeding, weighing 160-220 g. The method of reproducing the experimental HHcy and its correction was described in detail earlier [5]. Animals were divided into 3 groups: 1st group - intact control, 2nd - animals with methionine HHcy, and 3rd group - animals in which HHcy was corrected with choline and vitamin D. Reproduction of the experimental model took place by current recommendations, and lasted 4 weeks. For the next four weeks, all rats were on a standard vivarium diet, during which only the animals were observed for the

progression of more pronounced pathology. At the end of the experiment, after taking urine, in which the content of total calcium was determined, laboratory animals of all groups were removed from the experiment under thiopental anesthesia, and blood was taken from the heart for biochemical studies. Homogenates were made from fragments of the small intestine and gums, and morphometric studies were performed on skeletonized alveolar sprouts in the area of the molars of the lower jaws of the right side.

In the blood plasma of experimental animals, the level of homocysteine was studied using the competitive immunoassay method with ECLIA electrochemiluminescence detection on the Cobas 6000 analyzer with the Roche Diagnostics (Switzerland) test system. The measurement range was 3.0-50.0 $\mu\text{mol/l}$. Vitamin D (25-hydroxyvitamin D (25-OH D)) was determined by the enzyme-linked immunosorbent assay method on solid sorbent "ELISA", analyzer and test system "EUROIMMUN" (Germany), the measurement range was 0-4800 IU/l. Biochemical markers that characterize the state of the liver were determined by well-known methods: total protein, malondialdehyde - by reaction with thiobarbituric acid, cathepsin D - by reaction with hemoglobin, alanine aminotransferase (AlAT) and aspartate aminotransferase (AST) [8,9,10].

Isolated fragments of the small intestine and gums were washed and homogenized using 50 mM Tris HCl buffer (pH 7.4) containing 1.15% KCl. The homogenate was centrifuged at 4°C for 10 minutes, and its supernatant was stored at -8°C and used to evaluate biochemical parameters: elastase activity [11], acid phosphatase - for the formation of inorganic phosphate, the content of malondialdehyde [8], cathepsin D [9] and the state of the antioxidant system (SOD activity) - by reaction with quercetin [12]. Morphometric studies were performed on the lower jaws after mechanical removal of soft tissues (with previous one-day exposure in 5% NaOH solution) according to the method described in previous studies [4]. Statistical processing of the results was

performed for average values according to Student's t-test [13]. Results are presented as $M \pm m$.

Results and Discussion

As in previous experiments [3, 5], according to the data given in the Table. 1, the highest level of Hc was registered in the 2nd group of animals (methionine HHcy), which differed with a high degree of probability ($p < 0.001$) from the indicators in the control group, in which it was 1.8 times lower, which indicates methodological reproduction models of methionine hyperhomocysteinemia. The effectiveness of our method of HHcy correction with choline and vitamin D is evidenced by the probable difference in the indicators of this marker between the 2nd and 3rd groups ($p < 0.05$), which decreased by ~ 1.4 times.

The Table. 2 shows that at the end of the experiment, the level of total protein in the blood of animals of all groups was practically the same, and no statistical difference was observed between the groups.

In the blood serum of rats of the 2nd group of "methionine HHcy" there was a 30% increase

in the content of MDA ($p < 0.05$) in comparison with the 1st group of healthy controls and by 27% in comparison with the 3rd group of rats in which hyperhomocysteinemia was corrected. The destruction and destruction of cell membranes due to the accumulation of free radical oxidation products in the blood of experimental animals is accompanied by an increase in the activity of the lysosomal enzyme cathepsin D - by 1.7 and 1.6 times ($p < 0.001$), respectively, with the control and 3rd experimental groups (Table 2).

An increase in the activity of such enzymes as alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in the blood plasma is a reliable indicator of liver damage and indicates some violation of the integrity of hepatocytes, as it is known that an increase in the activity of these enzymes, and especially ALT, occurs much earlier than other obvious signs of negative effects. As shown in Fig. 1, with experimental methionine hyperhomocysteinemia, the levels of ALT in animals of the 2nd group are probably higher ($p < 0.05$) than in rats of the 1st

Table 1
Levels of homocysteine (Hz), vitamin D in blood serum of rats ($M \pm m$) against the background of methionine hyperhomocysteinemia and vitamin D deficiency and its correction

Groups of animals	Hcy ($\mu\text{mol/l}$)	Vitamin D (nmol/l)
1. The control n=12	6.23 ± 0.65	31.98 ± 1.38
2. Methionine model HHcy, n=12	11.35 ± 0.75 $p_1 < 0.001$	23.55 ± 1.30 $p_1 < 0.05$
3. Methionine model HHcy and its correction with choline and vitamin D, n=12	7.97 ± 0.83 $p_1 > 0.05$ $p_2 < 0.05$	31.75 ± 2.39 $p_1 > 0.05$ $p_2 < 0.05$

Note: in this and the following tables, a probable ($p < 0.05$) and highly probable ($p < 0.001$) difference between groups is marked, $p_{1,2}$ - numbers indicate comparison groups

Table 2
Biochemical indicators of blood serum of rats characterizing the state of the liver ($M \pm m$) against the background of methionine hyperhomocysteinemia and vitamin D deficiency and its correction

Groups of animals	Total protein (g/l)	MDA ($\mu\text{mol/l}$)	Cathepsin D (units)
1. The control n=12	72.6 ± 4.54	10.3 ± 0.45	0.044 ± 0.004
2. Methionine model HHcy, n=12	68.8 ± 5.94	13.3 ± 0.76 $p_1 < 0.05$	0.075 ± 0.006 $p_1 < 0.001$
3. Methionine model HHcy and its correction with choline and vitamin D, n=12	70.9 ± 5.65	10.6 ± 0.69 $p_2 < 0.05$ $p_1 > 0.05$	0.047 ± 0.005 $p_2 < 0.001$ $p_1 > 0.05$

Note: * - cathepsin D was expressed in units of optical density per 1 mg of protein in 10 min

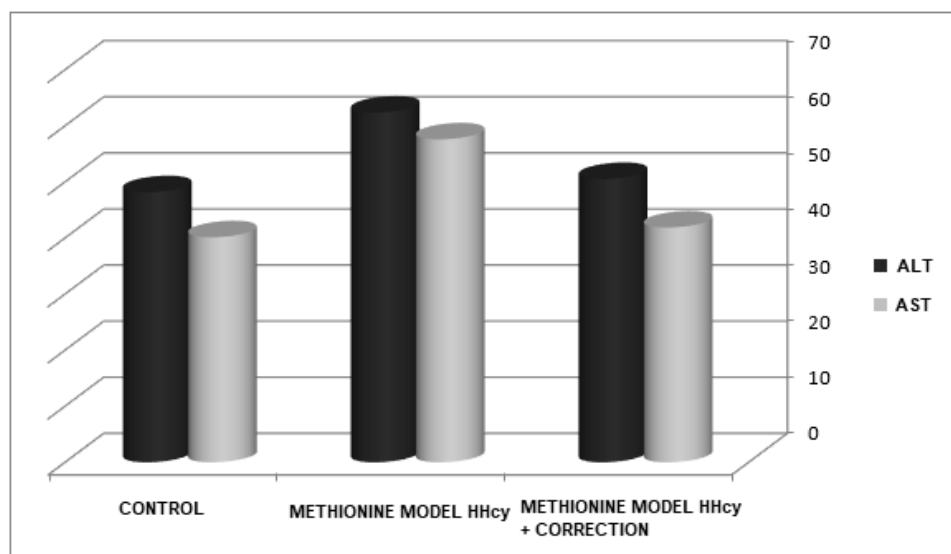


Figure 1

Levels of ALT and AST in blood serum of rats (nmol/ml/min) against the background of methionine hyperhomocysteinemia and vitamin D deficiency and its correction

and 3rd groups, namely in 1.28 and 1, 23 times respectively. About the activity of AsAT, an almost similar trend is registered.

Among the markers of inflammation of the mucous membrane of the small intestine of rats, we focused our attention on malondialdehyde (MDA), elastase and acid phosphatase. Table 3 shows that the activity of elastase in the mucous membrane of the small intestine of rats of all groups probably did not change ($p < 0.05$).

The activity of acid phosphatase (AC), as a marker of membrane permeability, with high probability ($p < 0.001$) was higher in animals of the second group with uncorrected experimental hyperhomocysteinemia. In comparison with the healthy control group, the activity of this enzyme increased by 64%, and in comparison with the animals of the 3 groups, in which the correction of HHcy with choline and vitamin D was carried

out, the activity of CF was higher by 52%. A probable difference in the indicators of the above-mentioned marker was not observed in the animals of the 1st and 3rd groups.

An increase in the concentration of malondialdehyde in the intestinal homogenates of rats with methionine HHcy (2nd group) indicates the intensification of the process of lipid peroxidation in the mucous membrane of the small intestine. The content of MDA significantly increased in hyperhomocysteinemia (group 2), especially in comparison with the control group of animals ($p < 0.001$). Enrichment of the diet with choline and vitamin D (group 3) significantly normalized this indicator ($p < 0.05$).

As is well known, HHcy and vitamin D deficiency in the body affect the occurrence of oxidative stress. The data of this study showed a probable increase ($p < 0.05$) of superoxide

Table 3

Indicators of inflammation in homogenates of the mucous membrane of the small intestine of rats against the background of methionine hyperhomocysteinemia and vitamin D deficiency and its correction

Groups of animals	MDA (nmol/mg protein)	Acid phosphatase (ncat h/kg)	Elastase (Unit/kg)
1. The control n=12	1.95±0.17	2.55±0.19	14.85±0.88
2. Methionine model HHcy, n=12	3.35±0.21 $p_1 < 0.001$	4.19±0.28 $p_1 < 0.001$	17.62±1.16 $p_1 > 0.05$
3. Methionine model HHcy and its correction with choline and vitamin D, n=12	2.15±0.13 $p_2 < 0.05$ $p_1 > 0.05$	2.76±0.11 $p_2 < 0.05$ $p_1 > 0.05$	15.35±0.52 $p_2 > 0.05$ $p_1 > 0.05$

Note: 1 unit=0.0167 μ -cat/kg

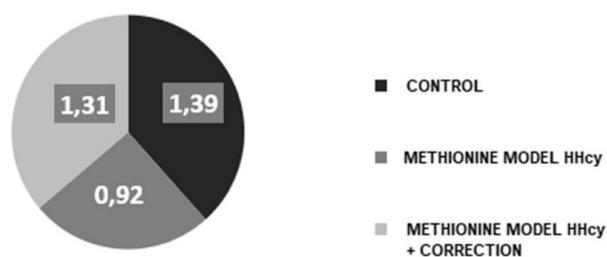


Figure 2

The state of antioxidant protection of the small intestine of rats against the background of methionine hyperhomocysteinemia and vitamin D deficiency and its correction (%)

Note: * - SOD activity was expressed as % inhibition of superoxide radical formation per 1 mg of protein

dismutase activity in the 3rd group of animals, where hyperhomocysteinemia was corrected, compared to the 2nd group, where the GHZ correction was not carried out. The difference between the indicators in these experimental groups was 42% (Fig. 2).

The Table 4 presents that on the background of simulated methionine HHcy in

the gingival tissues of rats of group 2, a highly reliable increase in MDA content is observed - by 2.3 times ($p < 0.001$) compared to the healthy control (group 1) and by 1.9 times ($p < 0.05$) in comparison with the 3rd group of animals. A decrease in the activity of SOD - by 2.3 times ($p < 0.001$) and an increase in the activity of cathepsin D ($p < 0.001$) also confirm the presence of a pronounced inflammatory reaction in the periodontium. Enrichment of the diet with choline and vitamin D (group 3) normalized the above indicators.

The rate of bone resorption of the alveolar sprout in rats on the background of hyperhomocysteinemia (group 2), which was calculated by the degree of molar root exposure, was 36.77 $\pm$ 1.08%, which is probably higher than the rate of bone atrophy in intact rats (group 1) - 27.59 $\pm$ 0.58% ($p < 0.05$) and rats of 3 groups with corrected GHZ ($p < 0.05$) (Fig. 3).

As can be seen from Figure 4, the animals

Table 4
Biochemical parameters in rat gingival homogenates against the background of methionine GHZ and vitamin D deficiency and its correction ($M \pm m$)

Groups of animals	MDA (nmol/mg protein)	SOD (%)	Cathepsin D (units)
1. The control n=12	2.97 $\pm$ 0.42	43.3 $\pm$ 1.59	0.097 $\pm$ 0.006
2. Methionine model HHcy, n=12	6.73 $\pm$ 0.29 $p_1 < 0.001$	17.0 $\pm$ 1.62 $p_1 < 0.001$	0.212 $\pm$ 0.008 $p_1 < 0.001$
3. Methionine model HHcy and its correction with choline and vitamin D, n=12	3.57 $\pm$ 0.37 $p_1 > 0.05$ $p_2 < 0.05$	39.4 $\pm$ 1.76 $p_1 > 0.05$ $p_2 < 0.05$	0.125 $\pm$ 0.004 $p_1 > 0.05$ $p_2 < 0.05$

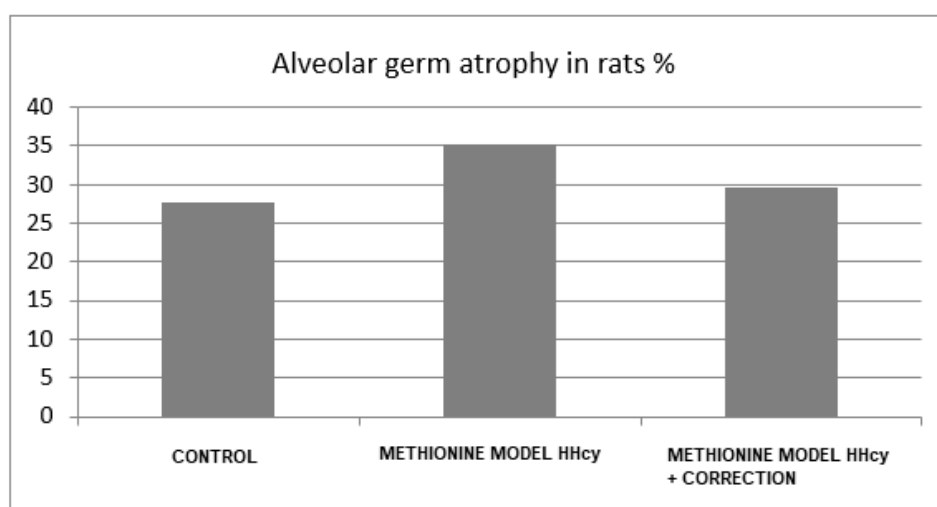


Figure 3

Atrophy of periodontal alveoli (%) against the background of changes in the liver and small intestine under the influence of methionine hyperhomocysteinemia and vitamin D deficiency and its correction

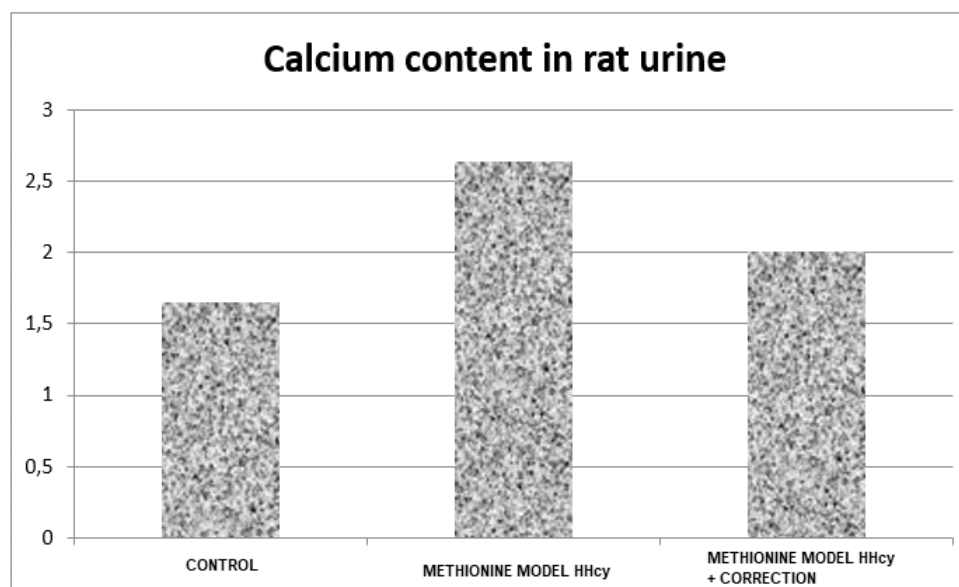


Figure 4

The amount of calcium excretion from the body of rats with urine (mmol/l) against the background of methionine hyperhomocysteinemia and vitamin D deficiency and its correction

of group 2 have a marked excretion of calcium with urine, namely 60% more than the animals of the control group and 23% more than the animals of the 3rd group.

Conclusions

The experimental study confirms the data of our previous studies that long-term methionine HHcy in rats is accompanied with moderate periodontal damage, which remotely resembles the clinical picture of generalized periodontitis of a mild degree of severity in humans. In experimental animals, hyperhomocysteinemia causes several aberrations in the blood, intestines, and liver (high level of homocysteine, oxidative stress, intensification of Lipid peroxidation (LPO), decreased vitamin D levels, changes in the activity of liver enzymes, etc.). Enrichment of the diet with choline and vitamin D significantly reduces the indicated disorders, namely: prevents the occurrence of resorption processes in the alveoli of the jaws, and improves the condition of the small intestine and liver. Increased excretion of calcium from the body of rats with urine indicates a violation of bone metabolism, which may be a consequence of calcium deficiency in animals with HHcy.

Prospects for further research.

Thus, there is a relationship between the oral cavity, the small intestine, and the liver, which was confirmed by our research. However, it is difficult to answer which pathology in this triad precedes and causes a chain reaction.

The given narratives about the problems of the "mouth-intestine-liver" axis give hope for a possible new practical step in dentistry.

Conflict of interest. There is none.

Funding information. There is none.

References

1. Albuquerque Souza E, Sahingur SE. Periodontitis, chronic liver diseases, and the emerging oral gut liver axis. *Periodontology* 2000. 2022;89(1):125-141.
2. Kutelmakh OI. Relationship between vitamin D, homocysteine and dental diseases (literature review). *Current issues of pharmaceutical and medical science and practice*. 2019;12(1):104-112. (In Ukrainian).
3. Kutelmakh OI, Lutsyuk MB, Lesyk RB, Kutelmakh YuO. Biochemical indicators of blood and alveolar bone homogenate of female rats under the influence of long-term methionine hyperhomocysteinemia and its correction with choline and vitamin D. *ECPB* 2019;4(88):22-28. (In Ukrainian).
4. Kutelmakh OI. Assessment of Dental Status in Rats with Experimental Hyperhomocysteinemia and its Correction with Choline and Vitamin D. *ECPB*. 2019;2(86): 66-71. (In Ukrainian).

5. Kutelmakh OI, Lutsyuk MB, Lesik RB, Popova OI., Kutelmakh YuO. Effect of Experimental Hyperhomocysteinemia and its Correction by Choline and Vitamin D on the Biochemical Indicators of the Female rats. ECPB. 2019; 1(85): 72-77. (In Ukrainian).
6. Kozhemyakin YM, Khromov OS, Filonenko MA, Sayretdinova GA. Scientific and practical recommendation sfor the maintenance of laboratory animals and work with them. Kyiv; 2002. (In Ukrainian)
7. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose. Strasburg, France: Council of Europe: Publication and Documents Division; 1987.
8. Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. Free Radical Biology and Medicine. 1993;15(4):353-63.
9. Krizek T, Kubickova A. Microscale separation methods for enzyme kinetics assays. Analytical and bioanalytical chemistry. 2012;403:2185-95.
10. Friedman RB, Young DS. Effects of disease on clinical laboratory tests. 3th ed. USA: Columbia University Press; 1989.
11. Visser L, Blout ER. The use of p-nitrophenyl N-tert-butyloxycarbonyl-L-alaninate as substrate for elastase. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology. 1972;268(1):257-60.
12. Mirsa H.P. The role of super oxide anion in the antioxidation of epinefrine and simple assay for superoxide dismutase / H.P. Mirsa, Y Fredovich // IAMA. - 1972. - Vol. 247 (10): 3170-75.
13. Armitage P, Berry G, Matthews JN. Statistical methods in medical research. USA: New Jersey, John Wiley & Sons; 2008.