

## ВПЛИВ ГІПОТИРЕОЗУ НА РІВЕНЬ ГЛЮТАТІОНУ В ТКАНИНАХ ПЕРЕДНЬОГО ВІДДІЛУ ОКА В ЕКСПЕРИМЕНТІ

**М.І. Павловський**

ДУ "Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова" НАМН України, м. Одеса

### Реферат

**Мета.** Вивчити вплив гіпотиреозу на рівень глутатіону в тканинах переднього відділу ока в експерименті.

**Матеріал методи.** Дослідження проводили на щурах, яких поділили на 3 групи: I група - контрольна (7 щурів), II група - дослідна (7 щурів) - тварини із початковою стадією (отримували тіамазол протягом 4 тижнів) гіпотиреозу, III група - дослідна (7 щурів) - тварини із розвинутою стадією (отримували тіамазол протягом 10 тижнів) гіпотиреозу. У тканинах рогівки і кон'юнктиви визначали вміст окисненого і відновленого глутатіону.

**Результати й обговорення.** При моделюванні початкової і розвинутої форми гіпотиреозу на експериментальних тваринах відзначали порушення глутатіонового статусу в тканинах переднього відділу ока, які особливо виражені у сльозовій рідині та рогівці.

**Висновки.** У тварин із модельованим гіпотиреозом виявлено зниження рівня відновленого глутатіону в рогівці і сльозовій рідині, яке найбільше виражене при розвиненій стадії гіпотиреозу (на 30,2% - у рогівці, на 39,7% - у сльозовій рідині). У тканині кон'юнктиви рівень відновленої форми глутатіону підвищувався у початковому періоді на 35,2%, а у кінцевій стадії - на 51,7%. Механізм порушення глутатіонового статусу кон'юнктиви зумовлений, передовсім, порушенням процесу транспорту глутатіону із келихоподібних клітин кон'юнктиви у сльозову рідину.

**Ключові слова:** гіпотиреоз, рогівка, кон'юнктива, глутатіон, експеримент

### Abstract

#### INFLUENCE OF EXPERIMENTAL HYPOTHYROIDISM ON GLUTATHIONE LEVELS IN THE TISSUES OF THE ANTERIOR EYE

M.I. PAVLOVSKY

SI "Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy of the NAMS of Ukraine", Odessa

**Aim.** To study the influence of experimental hypothyroidism on glutathione levels in the tissues of the anterior eye.

**Material and Methods.** The studies were conducted on rats, divided into 3 groups: I group - control (7 rats), II group - experimental (7 rats), included animals with mild (primary) form of hypothyroidism, III group - experimental (7 rats), included animals with severe form of hypothyroidism. In the tissues of the cornea and conjunctiva and lacrimal fluid the content of oxidized and reduced glutathione was determined.

**Results and Discussion.** In the simulation of the initial and advanced form of hypothyroidism in the experimental

animals there was a disturbance of the glutathione status in the tissues of the anterior eye, which is especially pronounced in the tear fluid and the cornea.

**Conclusions.** The animals with simulated hypothyroidism showed decreased levels of reduced glutathione in the cornea and lacrimal fluid, which was the most pronounced at a considerably advanced stage of hypothyroidism (30.2% - in the cornea, 39.7% - in the tear fluid). The conjunctival tissue levels of reduced glutathione increased in the initial period by 35.2% and in the final step - by 51.7%. The mechanism of disturbance of the glutathione status of the conjunctiva is set off, primarily, by a disturbance of transport of glutathione from conjunctival goblet cells to the tear fluid.

**Key words:** hypothyroidism, cornea, conjunctiva, glutathione, experiment

### Вступ

Захворювання щитоподібної залози (ЩЗ) займає друге місце після цукрового діабету за частотою поширення серед усіх ендокринних захворювань [9]. Зміни у тканинах орбіти при ускладнених формах гіпотиреозу достатньо висвітлені у літературі. Натомість, порушення в інших тканинах ока, зокрема, у рогівці і кон'юнктиві, при субклінічному гіпотиреозі, вивчені недостатньо [1, 3]. Проте, у низці досліджень виявлено порушення структури і функцій тканин ока при субклінічному гіпотиреозі [9].

Доведено, що захворювання ЩЗ істотно пов'язані із ризиком розвитку синдрому "сухого ока" (ССО). У поодиноких наукових працях є свідчення про певну частоту ССО у хворих на гіпотиреоз [2, 14]. Проте, залишається нез'ясованою розповсюдженість ССО при різних формах гіпотиреозу та механізми, які лежать в основі структурно-функціональних порушень у рогівці, кон'юнктиві і сльозових залозах при гіпотиреозі. Отож, доцільним є проведення досліджень у цьому напрямку [7, 8, 11].

Зараз інтенсивно вивчають вплив тиреоїдних гормонів на морфологію тканин поверхні ока і експресію рецепторів до цих гормонів у тканинах сльозової залози. Особливо акцентують увагу на змінах рівня нейромедіаторів (ацетилхоліну та ін.) у тканинах сльозової залози, про-

цесах пероксидації, стані тіолової відновної системи, у якій найважливішу роль відіграє глутатіон [6, 10, 12].

Глутатіон є важливою ланкою захисно-приспосувального механізму рогівки у нормі і при патологічних станах. Детоксикаційний та відновний потенціал глутатіонової системи забезпечує знешкодження екзо- та ендогенних токсикантів (токсичних речовин) (глутатіонтрансферазна реакція), здійснює процеси регенерації оксидативно пошкоджених білків та ліпідів (глутатіонредуктаз і глутатіонпероксидаз), а також підвищує стійкість до патологічного впливу вірусів і бактерій, стимулюючи імунну систему та пригнічуючи процес реплікації вірусів.

Зниження рівня тиреоїдних гормонів (ТГ) призводить до розвитку гіпотиреозу і супроводжується метаболічними, функціональними та структурними змінами у різних органах і тканинах, у тому числі в оці і, зокрема, у слъзовій залозі й у тканинах поверхні ока - кон'юнктиві і рогиці. Проте, механізми цього впливу на тканини поверхні ока вивчені недостатньо [13].

Недостатнє вивчення цих патогенетичних механізмів є перешкодою на шляху до вдосконалення засобів діагностики і лікування ССО при гіпотиреозі. Особливо це стосується субклінічного гіпотиреозу, оскільки своєчасна діагностика ССО може бути підставою для профілактики і раннього лікування ускладнень з боку органа зору.

Слід зауважити, що дослідження впливу глутатіону при гіпотиреозі дозволить окреслити напрям пошуку нових фармакологічних середників, які регулюють рівень відновленого глутатіону і таким чином підвищують захисно-приспосувальні властивості тканин переднього відділу ока.

Мета роботи: вивчити вплив гіпотиреозу на рівень глутатіону в тканинах переднього відділу ока в експерименті.

### Матеріал і методи

Дослідження проводили на білих щурах лінії Вістар, вагою 190-210 г. із урахуванням Міжнародних керівних принципів для біомедичних досліджень за участю тварин, запропонованих на Раді міжнародних медичних наукових організацій (2012 р.).

Усього досліджували 21 тварину, яких поділено рандомізовано на 3 групи: I група - конт-

рольна (7 щурів), II група - дослідна (7 щурів), тварини із легкою (початковою) формою гіпотиреозу, III група - дослідна (7 щурів), тварини з вираженою формою гіпотиреозу.

Гіпотиреоз у щурів викликали за допомогою антитиреоїдного препарату "Тіамазол", який піддослідні тварини отримували із питною водою (500 мг/л). При моделюванні початкової стадії гіпотиреозу, тварини отримували тіамазол протягом чотирьох тижнів [5, 6]. Моделювання розвиненої стадії гіпотиреозу проводили так само, але тварини отримували препарат протягом 10 тижнів [6].

Обидві групи тварин після закінчення періоду моделювання гіпотиреозу були виведені з експерименту за допомогою надлишкової інгаляційної анестезії етиловим спиртом.

Для дослідження брали тканини рогової оболонки і кон'юнктиви шляхом секції, а слъзову рідину збирали перед виведенням тварин із експерименту за допомогою модифікованого тесту Ширмера [6]. Вміст окисленого і відновленого глутатіону в досліджуваних тканинах визначали за допомогою спектрофотометрії. Отримані результати про стан рогики, кон'юнктиви і слъзової рідини були статистично опрацьовані за допомогою пакету SPSS 11.0. [4] параметричним методом Стьюдента.

### Результати й обговорення

Результати дослідження концентрації глутатіону і співвідношення його окисленої (GSSG) та відновленої (GSH) форми в тканинах переднього відділу ока при гіпотиреозі в експерименті подано у табл. 1.

При визначенні рівня відновленої форми глутатіону в рогиці ока тварин в умовах початкової стадії гіпотиреозу встановлено, що його показники знизилися до  $14,98 \pm 0,98$  мкмоль/г, що становило - 86,5%, у порівнянні із нормою -  $17,32 \pm 1,12$  мкмоль/г. При вираженій стадії гіпотиреозу концентрація відновленого глутатіону зменшилася до  $12,09 \pm 0,80$  мкмоль/г, що склало 69,8% від нормального значення ( $p < 0,05$ ).

Слід зауважити, що рівень окисленої форми глутатіону в рогиці ока тварин на початковій стадії гіпотиреозу був підвищений до  $1,69 \pm 0,12$  мкмоль/г, що склало - 120,7%, у відношенні до нормальних показників ( $1,40 \pm 0,10$  мкмоль/г). В

умовах вираженої стадії гіпотиреозу, концентрація окисленого глутатіону зросла до  $2,03 \pm 0,15$  мкмоль/г, що склало 145,0% від рівня нормальних показників ( $p < 0,01$ ).

За результатами проведених досліджень рівень відновленої форми глутатіону в кон'юнктиві ока тварин із початковою стадією гіпотиреозу був підвищений на 135,2%, і становив  $17,04 \pm 1,37$  мкмоль/г (при нормі  $12,60 \pm 1,05$  мкмоль/г,  $p < 0,05$ ). В умовах вираженої стадії гіпотиреозу концентрація відновленого глутатіону збільшилася до  $19,12 \pm 1,52$  мкмоль/г, що становило 151,7% від нормального рівня ( $p < 0,01$ ).

Рівень окисленої форми глутатіону в кон'юнктиві ока тварин із початковою стадією гіпотиреозу знизився до 78,3%, або до  $2,46 \pm 0,20$

мкмоль/г, у порівнянні з нормою ( $3,14 \pm 0,22$  мкмоль/г,  $p < 0,05$ ). При вираженій стадії гіпотиреозу концентрація окисленого глутатіону зменшилася до  $2,06 \pm 0,16$  мкмоль/г, що склало 65,6% від норми ( $p < 0,01$ ).

У сльозовій рідині піддослідних тварин, рівень відновленого глутатіону в умовах початкової стадії гіпотиреозу знизився до  $111,50 \pm 7,28$  мкмоль/г, що склало - 79,5%, від нормальних показників ( $140,25 \pm 10,34$  мкмоль/г,  $p < 0,05$ ). При вираженій стадії гіпотиреозу концентрація відновленого глутатіону зменшилася до  $84,57 \pm 6,68$  мкмоль/г, що становило 60,3% від норми ( $p < 0,01$ ).

За результатами проведених досліджень встановлено, що рівень окисленої форми глутатіону

Таблиця 1

Концентрація глутатіону і співвідношення його окисленої (GSSG) та відновленої (GSH) форми в тканинах переднього відділу ока при експериментальному гіпотиреозі (n=7)

| Біохімічні показники     | Стат. показники | Умови експерименту |                              |                             |
|--------------------------|-----------------|--------------------|------------------------------|-----------------------------|
|                          |                 | Норма              | Початкова стадія гіпотиреозу | Виражена стадія гіпотиреозу |
| Рогівка, мкмоль/г        |                 |                    |                              |                             |
| GSH                      | M               | 17,32              | 14,98                        | 12,09                       |
|                          | m               | 1,12               | 0,98                         | 0,80                        |
|                          | p               | -                  | >0,05                        | <0,05                       |
|                          | %               | 100,0              | 86,5                         | 69,8                        |
| GSSG                     | M               | 1,40               | 1,69                         | 2,03                        |
|                          | m               | 0,10               | 0,12                         | 0,15                        |
|                          | p               | -                  | >0,05                        | <0,01                       |
|                          | %               | 100,0              | 120,7                        | 145,0                       |
| GSH/GSSG                 |                 | 12,37              | 8,86                         | 5,96                        |
| Кон'юнктива, мкмоль/г    |                 |                    |                              |                             |
| GSH                      | M               | 12,60              | 17,04                        | 19,12                       |
|                          | m               | 1,05               | 1,37                         | 1,52                        |
|                          | p               | -                  | <0,05                        | <0,01                       |
|                          | %               | 100,0              | 135,2                        | 151,7                       |
| GSSG                     | M               | 3,14               | 2,46                         | 2,06                        |
|                          | m               | 0,22               | 0,20                         | 0,16                        |
|                          | p               | -                  | <0,05                        | <0,01                       |
|                          | %               | 100,0              | 78,3                         | 65,6                        |
| GSH/GSSG                 |                 | 4,01               | 6,93                         | 9,28                        |
| Сльозна рідина, мкмоль/л |                 |                    |                              |                             |
| GSH                      | M               | 140,25             | 111,50                       | 84,57                       |
|                          | m               | 10,34              | 7,28                         | 6,68                        |
|                          | p               | -                  | <0,05                        | <0,01                       |
|                          | %               | 100,0              | 79,5                         | 60,3                        |
| GSSG                     | M               | 45,26              | 56,06                        | 69,20                       |
|                          | m               | 3,25               | 3,02                         | 3,98                        |
|                          | p               | -                  | <0,05                        | <0,05                       |
|                          | %               | 100,0              | 122,6                        | 153,8                       |
| GSH/GSSG                 |                 | 3,10               | 1,95                         | 1,43                        |

p - рівень значимості відмінності даних по відношенню до норми

татіону в сльозовій рідині ока тварин із початковою стадією гіпотиреозу був підвищений до  $56,06 \pm 3,02$  мкмоль/г, що становило 122,6%, у порівнянні з нормою ( $45,26 \pm 3,25$ ) мкмоль/г ( $p < 0,05$ ). В умовах вираженої стадії гіпотиреозу концентрація окисленого глутатіону збільшилася до  $69,20 \pm 3,98$  мкмоль/г, що становило 153,8% від нормальних показників ( $p < 0,05$ ).

Загальний аналіз результатів біохімічних досліджень, проведених на тваринах при моделюванні початкової і розвиненої форми гіпотиреозу, свідчить про порушення глутатіонового статусу в тканинах переднього відділу ока, який особливо виражений в сльозовій рідині і роговій оболонці. У цих тканинах різко зменшувався рівень відновленої форми глутатіону і підвищувався рівень його окисленої форми. Натомість, у слизовій кон'юнктиви рівень відновленого глутатіону підвищувався на тлі зниження його окисленої форми. У механізмі цього парадоксального явища має значення стан процесів транспортування відновленого глутатіону з одного боку, а з іншого - зниження рівня окисленого глутатіону в кон'юнктиві, що, цілком ймовірно, відбувається внаслідок різкого зниження активності пероксидази в сльозовій залозі кон'юнктиви при вираженій формі гіпотиреозу [6] і глутатіонпероксидази в тканинах ока тварин при початковій формі гіпотиреозу [5].

Епітелій слизової оболонки кон'юнктиви здійснює транспортування глутатіону в сльозову рідину, що відіграє важливу роль у забезпеченні функціонального стану рогової оболонки. Завдяки цій функціональній особливості клітин кон'юнктиви у сльозу надходить значна кількість глутатіону і його концентрація у цій біологічній рідині перевищує його рівень у плазмі крові. Настільки високий рівень глутатіону в сльозі з урахуванням його функціональних параметрів дозволяє сльозі створювати потужний бар'єр для тканин ока і, особливо для рогівки.

Протягом усього періоду розвитку гіпотиреозу найбільше знижується концентрація відновленого глутатіону в сльозовій рідині. У механізмі порушень глутатіонового статусу в сльозовій рідині при гіпотиреозі поряд з порушенням процесу транспортування глутатіону, без сумніву, має значення окисдаційний стрес, про що свідчить підвищена концентрація окисленого

глутатіону в сльозовій рідині на 53,8% при вираженій формі гіпотиреозу.

Подібні експериментальні дослідження виявили підвищення рівня відновленого глутатіону, тенденцію до збільшення малонового диальдегіду і пероксидази в тканинах сльозної залози [6, 10], що співпадає із нашими дослідженнями щодо підвищення відновленого глутатіону в кон'юнктиві (додаткових сльозових залозах), що свідчить про роль окисного стресу у виникненні ССО при гіпотиреозі. Окрім цього, ми досліджували глутатіон в рогівці, кон'юнктиві та сльозовій рідині, моделювали початкову та розвинену стадію гіпотиреозу.

## Висновки

1. У тварин із модельованим гіпотиреозом виявлено зниження рівня відновленого глутатіону в рогівці і сльозовій рідині, яке найбільше виражене при розвиненій стадії гіпотиреозу (на 30,2% - у рогівці, на 39,7% - у сльозовій рідині).
2. У тканині кон'юнктиви ока рівень відновленої форми глутатіону підвищувався в початковому періоді на 35,2%, а в кінцевій стадії - на 51,7%. Механізм порушення глутатіонового статусу кон'юнктиви зумовлений, передовсім, порушенням процесу транспортування глутатіону із келихоподібних клітин кон'юнктиви у сльозову рідину.

## Література

1. Drozhzhina G.I.: Conjunctivitis. Odessa, Astroprint, 2011. - 86 p. Ukrainian: (Дрожжина Г.І.: Кон'юнктивіти. Одеса, Астропринт, 2011. - 86 с).
2. Pavlovska G.Y., Pavliv O.B., Pavlovsky M.I., Pater S.Y.: Keratoconjunctivitis sicca in patients with hypothyroidism. Abstracts XIII Ukrainian congress of ophthalmologists, 21-23 may, 2014, Odessa, 37-38. Ukrainian: (Павловська Г.Я., Павлів О.Б., Павловський М.І., Патер С.Я.: Сухий кератокон'юнктивіт у хворих з гіпотиреозом. Матеріали XIII з'їзду офтальмологів України, 21-23 травня 2014, Одеса, С. 37-38).
3. Petrunya A.M., Mohamed Abdulrahman Kutayni: The impact of thiol drugs (acetylcysteine and vitayodurool) on system of glutathione in the cornea at keratitis combined with conjunctivitis. Ukrainian med Almanach. 2012, 15, 133-137. Ukrainian: (Петруня А.М., Мухамед Абдульрахман Кутайні: Вплив тіолових препаратів (ацетилцистеїна та вітайодурола) на систему глутатіона в рогівці при кератиті в поєднанні з кон'юнктивітом. Український медичний альманах. 2012, 15, 133-137).
4. Nasledov A. SPSS computer data analysis in psychology and social sciences. St. Petersburg.: Piter, 2005 - 416. Ukrainian: Наследов А. SPSS комп'ютерний аналіз даних

- в психології і соціальних наук. Спб.: Питер, 2005. - 416 с.
5. Cano-Europa E., Blas-Valdivia V., Lopez-Galindo G.E.: Methimazole-induced hypothyroidism causes alteration of the REDOX environment, oxidative stress, and hepatic damage; events not caused by hypothyroidism itself. *Ann Hepatol.* 2010, 9(1), 80-88.
  6. Dias A.C., Modulo C.M., Jorge A.G., Braz A.M.: Influence of thyroid hormone on thyroid hormone receptor beta-1 expression and lacrimal gland and ocular surface morphology. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012, 52(7), 3038-3042.
  7. Gatziofias Z., Panos G.D., Brugnolli E., Hafezi F.: Corneal topographical and biomechanical variations associated with hypothyroidism. *J Refract Surg.* 2014, 30(2), 78-79.
  8. Micali A., Pisani A., Puzzolo D., Spinella R.: Effect of hypothyroidism on postnatal conjunctival development in rats. *Ophthalmic Res.* 2011, 45(2), 102-112.
  9. Mohanty S., Amruthlal W., Reddy G. C.: Diagnostic strategies for subclinical hypothyroidism. *Indian J Clin Biochem.* 2010, 25(3), 279-282.
  10. Ortiz-Butron R., Pacheco-Rosado J., Hernandez-Garcia A.: Mild thyroid hormones deficiency modifies benzodiazepine and mu-opioid receptor binding in rats. *Neuropharmacology.* 2013, 54(1), 111-116.
  11. Ozturk B.T., Kerimoglu H., Dikbas O.: Ocular changes in primary hyperthyroidism. *BMC Reseach Notes.* 2010, 3, 266-271.
  12. Petruela M., Muresan A., Duncea I.: Oxidative Stress and Antioxidant Status in Hypo- and Hyperthyroidism. *Antioxidant Enzymes. licensee InTech.* 2012, 8, 197-236.
  13. Plummer C.E., Specht A., Gelatt K.N.: Ocular manifestations of endocrine disease. *Compend Contin Educ Vet.* 2013, 31(12), 733-743.
  14. Shashikala P.: Prevalence of dry eye in hypothyroidism. *Int J Clin Cases Investigations,* 2013, 5 (1), 46-51.
  15. Tietze F.: Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analyt Biochem.* 2012, 73, 502-522.