

## СТАН КЛІТИННОЇ ЛАНКИ ІМУННОЇ СИСТЕМИ У КРОЛІВ З ХІМІЧНИМ ОПІКОМ РОГІВКИ НА ТЛІ МЕРКАЗОЛІЛ-ІНДУКОВАНОГО ГІПОТИРЕОЗУ

©З. Л. Савчук, І. М. Кліщ, Ю. І. Пістун

*ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України»*

**РЕЗЮМЕ.** У статті проаналізовано результати дослідження клітинного імунітету у крові і внутрішньоочній рідині передньої камери ока кролів з хімічним опіком рогівки, викликаним накладанням фільтрувального паперу, змоченого 1 N NaOH на тлі попередньо змодельованого мерказоліл-індукованого гіпотиреозу. Встановлено, що у тварин з хімічним опіком рогівки на тлі гіпотиреозу, порівняно з еутиреоїдними тваринами, виявляється суттєве зниження CD-4-лімфоцитів, порушення співвідношення основних субпопуляцій лімфоцитів (CD-4 і CD-8), що супроводжується достовірним зниженням імунорегуляторного індексу (CD-4/CD-8). Більш виражені зміни у бік зниження показників мали місце і стосовно В-клітинної ланки імунної системи. Зроблено висновок, що виявлена недостатність клітинної ланки імунної відповіді відображає посилення взаємного негативного впливу опікової травми рогівки і системних порушень імунного захисту за умов супутнього дефіциту гормонів щитоподібної залози.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** хімічний опік рогівки, гіпотиреоз, клітинний імунітет.

**Вступ.** Травматичні ушкодження ока та їх наслідки протягом тривалого часу як в Україні, так і в усьому світі продовжують посідати провідні позиції за такими важливими показниками, як звернення у відділи невідкладної допомоги, причина зниження зору та односторонньої сліпоти, втрата працездатності та інвалідність. В усьому світі в 50 % випадків причиною звернення у відділи невідкладної офтальмологічної допомоги є травматичні пошкодження ока [13].

Як причина зниження зору травма ока в усьому світі посідає друге, після катаракти, місце і є основною причиною односторонньої сліпоти [10], втрати працездатності та інвалідності [5]. Серед госпіталізованих в очних стаціонарах 25–42 % становлять хворі з травматичними пошкодженнями ока та їх наслідками [1]. Кожна друга або третя енуклеація виконується з приводу травми або її наслідків [4, 11, 15].

На перебіг опікової травми впливають численні фактори, які сприяють зниженню реактивності організму і призводять до розвитку вторинної імунної недостатності. Вирішальне значення в сучасній концепції опікової травми ока відводиться стану імунної системи і неспецифічній резистентності тканин ока до бактерійної інвазії. Травми очей зазвичай супроводжуються порушеннями в імунній системі на рівні як пошкодженого органа, так і всього організму. Ці порушення в більшості випадків позначаються на перебігу посттравматичного періоду і спричиняють формування ускладнень. Не дивлячись на застосування сучасних хірургічних і консервативних методів лікування, нерідко у хворих спостерігається розвиток ускладнень у вигляді кератитів, рецидивуючої ерозії, помутніння і виразки рогівки, що вимагає подальшого вдосконалення медикаментозної терапії [3, 4]. Значний вплив на імунну відповідь здійснює ендокринна система, яка входить в комплекс нейроендокринної регуля-

ції організму. В структурі ендокринної патології одне із перших місць припадає на захворювання щитоподібної залози, а саме на гіпотиреоз [12].

**Методи і об'єкт дослідження.** Досліди проведені на статевозрілих кролях породи «Білий велетень» масою тіла 2,5–3 кг, у відповідності з Женевською конвенцією "International Guiding principles for Biochemical research involving animals" (Geneva, 1990) та згідно із Загальними принципами експериментів на тваринах, схваленими на Національному конгресі з біоетики (Київ, Україна, 2001). Тварини утримувались на стандартному раціоні віварію [6]. В процесі роботи використано 60 кролів.

Гіпотиреоз моделювали згідно з рекомендаціями [2, 9]. Кролям внутрішньошлунково через металевий зонд вводили мерказоліл (Здоров'я, Україна) у дозі 10 мг/кг у 2 %-му розчині крохмалю протягом 60-ти днів. Тварини знаходились в умовах, аналогічних усім експериментальним групам, та отримували той же самий харчовий раціон. Масу кролів контролювали щотижня, корекцію доз мерказолілу проводили відповідно до зміни маси тіла. Повноту досягнення гіпотиреозу контролювали вимірюванням концентрації трийодтироніну і тироксину в сироватці крові.

Опікову травму викликали шляхом аплікації на рогівку експериментальних тварин фільтрувального паперу діаметром 5 мм, змоченого у 1 N розчині натрій гідроксиду (NaOH) протягом 30 секунд. Маніпуляції проводили під місцевою епібульбарною анестезією 0,5 % розчином алкаїну та ретробульбарною анестезією 2 % розчином лідокаїну [8].

Водянисту вологу (humor aquosus) передньої камери отримували за асептичних умов шляхом проколу лімбальної частини рогівки стерильною туберкуліновою голкою, приєднаною до інсулінового шприца у кількості 0,25–0,3 мл з одного ока [14].

Дослідження клітинного імунітету здійснювали за методом, що ґрунтується на взаємодії монокло-

нальних антитіл (МКАт), мічених флуоресцеїн-ізотіоціанатом, з поверхневими антигенами лімфоцитів. В кожну пробірку вносили 20 мкл антитіл (CD-4, CD-8, CD-22) і ЕДТА, не торкаючись наконечником стінок пробірки. Зразки перемішували на вортексі та інкубували в темному місці 15–30 хв при кімнатній температурі. Рекомендована кількість лейкоцитів – 3,5–9,4 Г/л. Для лізису еритроцитів в кожну пробірку вносили по 500 мкл лізуючого розчину, струшували на вортексі й інкубували 10–15 хв при кімнатній температурі. Додавали до пробірок по 500 мкл буферного розчину. Зразки аналізували на проточному цитофлюориметрі Epics-XL виробництва Beckman Coulter (США).

Всі піддослідні кролі були поділені на 4 групи: 1 – контрольна група (інтактні тварини); 2 – тварини із мерказоліл-індукованим гіпотиреозом; 3 – тварини з хімічним опіком рогівки (термін спостереження 24 год, 7, 14 і 21 доба після травми); 4 – тварини з хімічним опіком рогівки на тлі попередньо змодельованого гіпотиреозу у ці ж терміни спостереження.

Статистичний аналіз даних проводили за допомогою статистичних пакетів «EXCELL FOR WINDOWS» та «STATISTICA». Перевірка розподілу на відповідність закону Гауса виконувалася за допомогою одного з критеріїв Шапіро-Вілка або  $\chi^2$  Пірсона. Для порівняння двох середніх арифметичних використовували двобічний критерій Стьюдента (t), двох вибірок – непараметричний U-критерій Манна-Вітні (MW). Різницю параметрів, що порівнювали за двома точками, вважали статистично значущою при  $p \leq 0,05$ . Статистична обробка результатів дослідження проводилась у відділі системних статистичних досліджень ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України».

**Результати і обговорення.** Аналіз показників клітинного імунітету у досліджуваних групах вказує на суттєві відмінності між досліджуваними групами тварин. У тварин з гіпотиреозом показник CD-4 лімфоцитів був на 21 % нижчим, ніж у здорових тварин. Дещо менше зниження нами відмічено стосовно CD-8 лімфоцитів – на 12 % від норми, що призвело до зниження імунорегуляторного індексу з (1,51±0,04) до (1,35±0,05). Моделювання нами хімічного опіку рогівки супроводжувалося різнонаправленими змінами показників клітинного імунітету. Зокрема, на 1-шу добу у еутиреоїдних тварин показник CD-4 склав 126 % від рівня здорових, а CD-8 – 110 %, що спричинило зростання імунорегуляторного індексу в 1,15 раза. Достовірні зміни ми відмітили і на 7-му добу – CD-4 склав 132 % від норми, CD-8 – 106 %. Такі зміни виражалися у ще більшому зростанні співвідношення CD-4/CD-8, яке становило (1,89±0,04). На 14-у добу ми відмітили деяке зниження показника CD-4 (122 %

від норми) на тлі зростання CD-8 (112 %). Це спричинилося до зниження імунорегуляторного індекса до 1,64. До 21-ї доби нами зафіксовано фактично нормалізацію досліджуваних показників, а також співвідношення CD-4/CD-8. Отже, у еутиреоїдних кролів спостерігається нормальний перебіг запального процесу із переважанням зростання Т-хелперів над рівнем цитотоксичних Т-лімфоцитів і, відповідно, зростанням імунорегуляторного індексу. На сьогодні рівень імунорегуляторного індексу оцінюють у зіставленні з фазою імунної відповіді. У період найвищої активності запального процесу імунорегуляторний індекс сягає високих значень за рахунок великого відсоткового вмісту Т-хелперів (CD-4 Т-клітин). У період реконвалесценції значення показника зменшується у зв'язку з наростанням рівня CD-8 Т-клітин (кілерів). Порушення цієї закономірності свідчить про неадекватність імунної реакції та про можливість хронізації процесу через неповну ерадикацію збудника.

У тварин, яким опікову травму рогівки моделювали на тлі гіпотиреозу, зміни мали протилежний напрямок. Вміст CD-4 лімфоцитів на 1-шу добу у порівнянні зі здоровими тваринами вірогідно знизився і склав 80 % від їх рівня, що спричинилося до значного зниження імунорегуляторного індексу – відповідно до (1,32±0,03), що склало 87 % від показника здорових тварин. На 7-му добу експерименту показник CD-4-клітин був ще меншим, становлячи 73 % від норми, а CD-8 – 88 %. Імунорегуляторний індекс знизився ще більше і дорівнював (1,26±0,02), що склало 83 % від рівня інтактних тварин. У подальші терміни спостереження (14-та і 21-а доби) ми зафіксували незначне зростання досліджуваних показників стосовно попередніх термінів, проте вони і надалі були достовірно нижчими від рівня інтактних тварин і тих, яким хімічний опік рогівки моделювали на тлі нормального рівня гормонів щитоподібної залози.

Таким чином, у тварин з хімічним опіком рогівки на тлі гіпотиреозу виявляється суттєве зниження CD-4-лімфоцитів, порушення співвідношення основних субпопуляцій лімфоцитів (CD-4 і CD-8), що супроводжується достовірним зниженням імунорегуляторного індексу. Виявлена недостатність клітинної ланки імунної відповіді відображає посилення взаємного негативного впливу опікової травми рогівки і системних порушень імунного захисту за умов супутнього дефіциту гормонів щитоподібної залози.

Стосовно вмісту В-лімфоцитів (CD-22), нами встановлене їх зниження у кролів зі змодельованим гіпотиреозом. Показник складав 80 % відносно інтактних тварин. Моделювання хімічного опіку рогівки в еутиреоїдних тварин спричинилося до зростання показника з максимумом на 14-у добу (112 % від норми), а до 21-ї доби рівень CD-22

нормалізувався. У гіпотиреоїдних кролів опікова травма навпаки, спричинилася до пригнічення В-клітинної ланки імунної системи протягом усього періоду спостереження. Максимальне зниження (88 % від рівня здорових тварин) нами зафіксовано на 7-му добу спостереження, причому навіть

до 21-ї доби показник був на 10 % нижчим від норми.

Таким чином, зниження продукції В-лімфоцитів на тлі гіпотиреозу може спричинитися до депресії гуморальної ланки імунної системи у тварин з опіковою травмою рогівки.

Таблиця 1. Показники клітинної ланки імунітету у тварин з хімічним опіком рогівки на тлі гіпотиреозу, M±m

Група тварин/показник		CD4, %	CD8, %	CD4/CD8	CD22, %
Інтактні (n=10)		39,23±0,66	25,96±0,81	1,51±0,06	12,26±0,18
Гіпотиреоз (n=10)		30,82±0,76 p<0,001	22,85±0,85 p<0,001	1,35±0,04 p<0,05	9,78±0,26 p<0,001
Хімічний опік рогівки (n=10)	24 год.	49,56±0,52 p <sub>1</sub> <0,001	1,74± 0,05 p <sub>1</sub> <0,01	13,44±0,34 p <sub>1</sub> <0,001	28,59±0,67 p <sub>1</sub> <0,001
	7-а доба	51,63±0,98 p <sub>1</sub> <0,001	1,89± 0,06 p <sub>1</sub> <0,001	14,21±0,42 p <sub>1</sub> <0,001	27,47±0,47 p <sub>1</sub> <0,001
	14-а доба	47,73±1,09 p <sub>1</sub> <0,001	1,64± 0,05 p <sub>1</sub> >0,05	10,23±0,38 p <sub>1</sub> <0,001	29,03±0,55 p <sub>1</sub> <0,001
	21-а доба	37,64±0,76 p <sub>1</sub> <0,001	1,49± 0,06 p <sub>1</sub> >0,05	10,34±0,32 p <sub>1</sub> <0,001	25,31±0,61 p <sub>1</sub> <0,001
Хімічний опік рогівки + гіпотиреоз (n=10)	24 год	31,19±0,59 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001	1,32±0,03 p <sub>1</sub> <0,01 p <sub>2</sub> <0,001	11,45±0,26 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001	23,59±0,39 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001
	7-а доба	28,82±0,53 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001	1,25±0,02 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001	9,76±0,26 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001	22,91±0,34 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001
	14-а доба	30,89±0,89 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001	1,29±0,05 p <sub>1</sub> <0,01 p <sub>2</sub> <0,001	8,78±0,18 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001	24,06±0,37 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001
	21-а доба	30,61±0,57 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001	1,32± 0,04 p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,001	8,52±0,22 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001	23,32±0,67 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001

Примітки: тут і у таблиці 2

– p<sub>1</sub> – достовірність різниці відносно інтактних тварин;

– p<sub>2</sub> – достовірність різниці тварин з опіком рогівки на тлі гіпотиреозу відносно еутиреоїдних тварин у відповідні терміни спостереження.

Нами проведено також дослідження клітинної ланки імунітету у водянистій волозі передньої камери ока. Ми зафіксували такі тенденції (табл. 2). У тварин з гіпотиреозом на 7-му добу спостереження рівень CD-4 клітин склав лише 150 % від рівня інтактних тварин і був на 57 % меншим, ніж у еутиреоїдних тварин з опіковою травмою. До 21-ї доби показник був на 28 % вищим від норми і на 59 % нижчим від рівня еутиреоїдних тварин.

Показник CD-8 клітин у тварин, яким опікову травму моделювали на тлі гіпотиреозу, порівняно з еутиреоїдними тваринами, знижувався значно менше ніж CD-4, складаючи відповідно 83 і 89 % у відповідні терміни спостереження. Це призвело до значного зменшення співвідношення CD-4/CD-8. Імунорегуляторний індекс склав 88 % і 99 % від норми у відповідні терміни дослідження, що значно менше, ніж у еутиреоїдних тварин (115 % і 140 % відповідно).

Як відомо [16, 17], існує так званий «імунний привілей ока» – комплекс регіонарних імунних клітинно-опосередкованих і гуморальних реакцій, спрямованих на запобігання розвитку запальних і дистрофічних процесів в оболонках і рідких середовищах ока. Цей синдром отримав назву «синдром імунного відхилення, асоційованого з передньою камерою ока – ACAID (anterior chamber associated immune deviatijn). У тканинах ока, на відміну від крові, має місце спрямована активація Т-кілерів за рахунок продукування TGF-β клітинами фібробластичного ряду, перш за все локалізованими у рогівці. За умов опікової травми причиною індукції цього синдрому є «оголення» антигенних детермінант тканини рогівки, що й сприяє надмірному продукуванню CD-8-клітин і зниженню регуляторного індексу.

Отже, у водянистій волозі передньої камери ока тварин з хімічним опіком рогівки на тлі гіпотиреозу

Таблиця 2. Показники клітинної ланки імунітету у внутрішньоочній рідині передньої камери ока тварин з хімічним опіком рогівки та на тлі мерказоліл-індукованого гіпотиреозу,  $M \pm m$

Група тварин/показник		CD-4, %	CD-8, %	CD-4/CD-8
Інтактні (n=10)		25,14±0,24	32,80±0,22	0,765±0,007
Гіпотиреоз (n=10)		23,70±0,36 p<0,01	27,16±0,25 p<0,001	0,875±0,002 p<0,01
Хімічний опік рогівки (n=10)	7-а доба	59,23±0,30 p <sub>1</sub> <0,001	67,34±0,21 p <sub>1</sub> <0,001	0,880±0,005 p <sub>1</sub> <0,01
	21-а доба	51,17±0,26 p <sub>1</sub> <0,001	47,60±0,24 p <sub>1</sub> <0,001	1,075±0,007 p <sub>1</sub> <0,01
Хімічний опік рогівки + гіпотиреоз (n=10)	7-а доба	37,83±0,24 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001	56,13±0,24 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001	0,675±0,007 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001
	21-а доба	32,26±0,16 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001	42,53±0,22 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001	0,761±0,007 p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> <0,001

виявляється більш суттєве зниження CD-4-лімфоцитів на тлі менш вираженого зниження CD-8-клітин. Це супроводжується значним зниженням імунорегуляторного індексу, що вказує на значні порушення імунного захисту і більш важкий перебіг патологічного процесу.

**Висновок.** Перебіг опікової травми рогівки на тлі гіпотиреозу супроводжується пригніченням Т-клітинної ланки імунної системи з порушенням співвідношення CD-4/CD-8 клітин і зниженням регуляторного індексу у крові і внутрішньоочній рідині передньої камери ока, а також зниженням продукції В-лімфоцитів у крові.

#### ЛІТЕРАТУРА

- Гундорова Р. А., Малаев А. А., Южаков А. М. Травмы глаза. – М., 1986. – 364 с.
- Доклінічне вивчення тиростатичних та тироїд-стимулюючих засобів // Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації. – Київ, 2001. – С. 409–420.
- Каспарова Е. А. Лечение рецидивизирующей эрозии роговицы / Е. А. Каспарова, Пур Акбарян Ниаз // Вестник офтальмологии. – 2009. – № 2. – С. 54–56.
- Красновид Т. А., Тичина Н. П., Яни В. В., Наровченко Т. В. Об основных причинах удаления глазного яблока // Мат-ли II Міжнародної наук. конференції офтальмологів Причорномор'я. – Одеса, 2004. – С. 146–147.
- Логай І. М., Сергиенко Н. М., Крыжановская Т. В. Актуальные вопросы профилактики инвалидности больных и инвалидов с патологией глаз в Украине и научное обоснование механизмов повышения ее эффективности // Мат-ли наукової конференції офтальмологів, присвяченої 125-річчю з дня народження В. П. Філатова. – 2000. – С. 438–440.
- Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / [Кожем'якін Ю. М., Хромов О. С., Філоненко М. А., Сайфетдінова Г. А.]. – К.: Авіцена, 2002. – 156 с.
- Сравнительная оценка иммунологической реактивности при сочетанной травме глаза / Э. М. Касимов, И. А. Заргарли, И. К. Намазова, С. Р. Меджидова // Офтальмология. – 2011. – № 3 (7). – С. 50–55.
- Camelo S. Anteriorchamber-associated immune deviation: are view of the anatomical evidence for the afferent arm of this unusual experimental model of ocular immune responses / S. Camelo, J. Kezic, P. McMenamin // Clin. Exper. Ophthalmol. – 2005. – Vol. 33(4). – P. 426–432.
- Isman C. A. Methimazole-induced hypothyroidism in rats ameliorates oxidative injury in experimental colitis / C. A. Isman, B. C. Yegen, I. Alican // J. Endocrinol. – 2003. – Vol. 177, №3. – P. 471–476.
- Leonard R. Statistics on Vision Impairment: A Resource Manual. – New York: NY Lightouse International, 2000.
- Analysis of corneal surface evolution after moderate alkaline burns by using impression cytology / J. S. Lypez-Garcna, L. Rivas, I. Garcna-Lozano, J. Murube // Cornea. – 2006. – Vol. 25(8). – P. 908–913.
- Thyroid hormone regulation of cell migration and oxidative metabolism in polymorphonuclear leukocytes: clinical evidence in thyroidectomized subjects on thyroxine replacement therapy / F. Marino, L. Guasti, M. Cosentino [et al.] // Life Sci. – 2006. – Vol. 78, №10. – P. 1071–1077.
- Nash E. Patterns of emergency department visits for disorders of the eye and ocular adnexa / E. Nash, C. Margo // Arch. Ophthalmol. – 1998. – Vol. 116. – P. 1222–1226.
- Proteomics of the aqueous humor in healthy New Zealand rabbits / M. Stastna, A. Behrens, G. Noguera [et al.] // Proteomics. – 2007. – Vol. 7(23). – P. 4358–4375.
- Smith D. The Epidemiology and Diagnosis of Penetrating Eye Injuries / D. Smith, W. Keith, L. Stack // Acad. Emerg. Med. – 2002. – Vol. 9, № 3. – P. 209–213.
- Streilein J. Immune regulation and the eye: adangerous compromise. FASEB J. – 1987. – Vol. 1(3). – P. 199–208.
- Wang Z. Relative quantitative analysis of corneal immunogenicity / Z. Wang, J. Ge, J. Xu // Zhonghua Yan Ke Za Zhi. – 2002. – Vol. 38. – P. 535–538.

## **STATE OF THE IMMUNE SYSTEM CELLULAR LINK IN RABBITS WITH CHEMICAL BURNS OF THE CORNEA IN CASE OF MERKAZOLIL-INDUCED HYPOTHYROIDISM**

©**Z. L. Savchuk, I. M. Klishch, Y. I. Pistun**

*SHEI «Ternopil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky of MPH of Ukraine»*

**SUMMARY.** The results of the study of cellular immunity in blood and aqueous humor of rabbits with chemical burns of the cornea, caused by the imposition of filter paper moistened with 1 N NaOH, in case of merkazolil-induced hypothyroidism had been analyzed in the article. It was found that in animals with chemical burns of the cornea in case of hypothyroidism, compared with euthyroid animals, a significant reduction in CD-4 lymphocyte, violation of the ratio of major lymphocytes subpopulations (CD-4 and CD-8), accompanied by a significant decrease in immunoregulatory index (CD-4/CD-8). More pronounced changes in the direction of decrease of B-cellular link of the immune system also were observed. It was concluded that cellular link failure of immune response reflects the intensification of the negative impact of burn injuries of the cornea and systematic violations of the immune system in case of associated deficiency of thyroid hormones.

**KEY WORDS:** chemical burn of the cornea, hypothyroidism, cellular immunity.

Отримано 06.01.2015