

ПОКАЗНИКИ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ОРГАНІЗМУ В КРОЛІВ ІЗ ХІМІЧНИМ ОПІКОМ РОГІВКИ НА ТЛІ МЕРКАЗОЛІЛІНДУКОВАНОГО ГІПОТИРОЗУ

ПОКАЗНИКИ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ОРГАНІЗМУ В КРОЛІВ ІЗ ХІМІЧНИМ ОПІКОМ РОГІВКИ НА ТЛІ МЕРКАЗОЛІЛІНДУКОВАНОГО ГІПОТИРОЗУ – У статті проведено аналіз неспецифічної резистентності організму кролів із хімічним опіком рогівки на тлі мерказоліліндукованого гіпотирозу за показниками НСТ-тесту та концентрації лізоциму. Гіпотироз у кролів викликали введенням мерказолілу в дозі 10 мг/кг протягом 60 днів. Хімічний опік рогівки моделювали шляхом аплікації на рогівку експериментальних тварин фільтрувального паперу діаметром 5 мм, змоченого у 1 N розчині натрій гідроксиду (NaOH) протягом 30 с. Встановлено, що опікова травма рогівки у кролів із гіпотирозом перебігала на тлі пригнічення неспецифічних факторів захисту, на що вказує зниження показників спонтанного та індукованого НСТ-тесту та зменшення концентрації лізоциму порівняно з евтироїдними тваринами, яким моделювали хімічний опік рогівки. Зроблено висновок про те, що наявність гіпотирозу в експериментальних тварин супроводжується пригніченням біоцидності нейтрофілів і активності у них оксигензалежних процесів та зменшенням рівня лізоциму в крові, що пояснюється його використанням у вогнищі запалення з метою активації захисних механізмів гранулоцитів та макрофагів у ділянці опікової травми.

ПОКАЗАТЕЛИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОРГАНИЗМА У КРОЛИКОВ С ХИМИЧЕСКИМ ОЖОГОМ РОГОВИЦЫ НА ФОНЕ МЕРКАЗОЛИЛИНДУЦИРОВАННОГО ГИПОТИРЕОЗА – В статье проведен анализ неспецифической резистентности организма кроликов с химическим ожогом роговицы на фоне мерказолилиндуцированного гипотиреоза по показателям НСТ-теста и концентрации лизоцима. Гипотиреоз у кроликов вызывали введением мерказолила в дозе 10 мг / кг в течение 60 суток. Химический ожог роговицы моделировали путем аппликации на роговицу экспериментальных животных фильтровальной бумаги диаметром 5 мм, смоченной в 1 N растворе гидроксида натрия (NaOH) в течение 30 с. Ожоговая травма роговицы у кроликов с гипотиреозом протекала на фоне угнетения неспецифических факторов защиты, на что указывает снижение показателей спонтанного и индуцированного НСТ-теста и уменьшение концентрации лизоцима по сравнению с эутиреоидными животными, которым моделировали химический ожог роговицы. Сделан вывод о том, что наличие гипотиреоза в экспериментальных животных сопровождается угнетением бицидности нейтрофилов и активности в них кислородзависимых процессов, а также снижением уровня лизоцима в крови, что объясняется его использованием в очаге воспаления с целью активации защитных механизмов гранулоцитов и макрофагов в области ожоговой травмы.

INDICATORS OF NONSPECIFIC RESISTANCE IN RABBITS WITH CHEMICAL BURNS OF THE CORNEA ON THE BACKGROUND OF MERCAZOLILUM-INDUCED HYPOTHYROIDISM – The article analyzes the nonspecific resistance of rabbits with a chemical burn of the cornea on the background of merkazolilum-induced hypothyroidism according to the NBT-test and the concentration of lysozyme. Hypothyroidism in rabbits was induced by the introduction of merkazolilum at a dose of 10 mg / kg during 60 days. Chemical burn of cornea was simulated by an application to the cornea of the experimental animals of filter paper 5 mm in diameter, soaked in 1 N sodium hydroxide (NaOH) solution for 30 seconds. Thermal injury of the cornea in rabbits with hypothyroidism proceeded against the oppression of non-specific protective factors, as indicated by the decline in spontaneous and induced NBT-test and a reduction of the concentration of lysozyme compared to euthyroid animals at

which a chemical burn of the cornea was simulated. It was concluded, that the presence of hypothyroidism at the experimental animals affects the functional state of neutrophils and the activity of oxygen-reducing processes at them and reduction of the level of lysozyme in the blood due to its use in the inflammatory tissue to activate the defense mechanisms of granulocytes and macrophages in burn injury area.

Ключові слова: опік рогівки, неспецифічна резистентність, гіпотиреоз.

Ключевые слова: ожог роговицы, неспецифическая резистентность, гипотиреоз.

Key words: burn of the cornea, nonspecific resistance, hypothyroidism.

ВСТУП Опіки очей є важким пошкодженням органа зору, а проблема їх лікування залишається на сьогодні гострою і актуальною. Найчастіше має місце опікова травма, спричинена хімічними чинниками – 60–85 %, далі ідуть термічні й променеві ураження. З хімічних опіків преважують опіки лугами. За даними R. Kuckelcorn et al. [12], у структурі опіків очей переважають хімічні (89,2 %), а серед них лужні склали 79,8 % [18].

Провідну роль у патогенезі опіків очей і їх наслідків більшість авторів відводить рогівці, що пов'язано з особливістю її будови й оптичної функції [2, 5]. Численні дослідження механізмів розвитку опікової хвороби проведені на гістоморфологічному, біохімічному, імунологічному, електронно-мікроскопічному рівнях як в тканинах ока, так і в організмі, сформулювали уявлення про патогенез опіків очей, як про багатофакторний, багатокомпонентний і взаємопов'язаний процес, який не обмежується тільки ділянкою ока, а викликає різноманітні патологічні зміни в різних системах організму людини: наростають явища аутоінтоксикації і аутосенсibiliзації, виникають порушення реактивності організму, в процес втягуються імунокомпетентні органи, порушуються ферментні та обмінні процеси тощо [5, 8].

Одним з найпоширеніших захворювань ендокринної системи є гіпотироз [14]. Велика кількість органів і систем, що реагують на тироїдні гормони, включає проблеми тироїдології в сферу інтересів різних медичних спеціальностей, а зростаюча частота захворювань щитоподібної залози серед населення виводить ці проблеми на передній план сучасної ендокринології [17]. На сьогодні більш пильну увагу привертають до себе захворювання щитоподібної залози, пов'язані з ендемічними вогнищами недостатності йоду в ґрунті й воді. Погана екологічна обстановка може істотно понизити функціональні можливості щитоподібної залози, і, як наслідок, посилити тяжкість зобної ендемії. Захід України, в тому числі Тернопільщина, обґрунтовано відноситься до географічної зони з дефіцитом йоду, у зв'язку з чим відзначається висока поширеність порушень тироїдного статусу в жителів цього регіону.

Недостатня продукція гормонів щитоподібної залози призводить до зниження оксидативних процесів і термогенезу, накопичення продуктів обміну і, як наслідок, до розвитку дистрофічних процесів у тканинах з формуванням своєрідного гіпотироїдного набряку за рахунок просочування тканин глікозамінгліканами. Порушення продукції тироїдних гормонів істотно впливає на метаболізм сполучної тканини [9, 10].

В умовах стресу тироїдні гормони мають антистресорну дію. Їх дефіцит сприяє порушенню стрес-чутливості. При дефіциті тироїдних гормонів розвиваються порушення в енергетичному обміні й стані вегетативної нервової системи, формується синдром вторинної імунної недостатності [11, 13, 15]. Гормони щитоподібної залози зумовлюють резистентність до інфекцій.

При пригніченні функції ЩЗ показано пригнічення неспецифічних факторів захисту, таких, як бактеріцидна, комплементарна і лізосомальна активність. Згодом підтверджено зниження функціональної активності нейтрофілів периферійної крові у хворих на гіпотироз [13]. Однак у доступній літературі недостатньо даних, що дозволяють комплексно оцінити вплив зниженої продукції гормонів щитоподібної залози на перебіг опікової травми рогівки, а також на функціональну активність імунної системи, що і спонукало нас до проведення цього дослідження

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Досліди проведені на статевозрілих кролях породи Білий велетень масою тіла 2,5–3 кг відповідно до Женевської конвенції “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). Тварин утримували на стандартному раціоні віварію [6]. У процесі роботи використано 60 кролів.

Гіпотироз моделювали згідно з рекомендаціями [4, 11]. Кролям внутрішньошлунково через металевий зонд вводили мерказоліл (“Здоров’я”, Україна) у дозі 10 мг/кг у 2 % розчині крохмалю протягом 60 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 гіпотирозу контролювали вимірюванням концентрації трийодтироніну і тироксину в сироватці крові.

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

Усіх піддослідних кролів було поділено на 2 групи: контрольна група – інтактні тварини; дослідна група – хімічний опік рогівки, термін спостереження 24 год, 72 год, 7 та 14 діб після травми.

Функціональну активність нейтрофілів оцінювали за допомогою спонтанного НСТ-тесту (сНСТ-тест) [3]. Результат виражали у відсотках диформазаанпозитивних нейтрофілів від загального числа підрахованих клітин. Для визначення функціонального резерву нейтрофілів використовували індукований НСТ-тест (іНСТ-тест), для цього в середовище інкубації додатково додавали 0,05 мл пірогеналу. Результат виражали у відсотках диформазаанпозитивних нейтрофілів на 100 підрахованих клітин. Розраховували також показник резерву (ПР) за формулою іНСТ/сНСТ, а також коефіцієнт метаболічної активації нейтрофілів ($K_{акт.}$) за формулою: іНСТ – сНСТ/іНСТ [1]. Статистичну обробку результатів виконано у відділі системних статистичних досліджень університету в програмному пакеті Statsoft STATISTICA.

Метод визначення лізоциму базується на його здатності розчиняти індикаторний мікрокок. Вміст лізоциму в сироватці крові визначали спектрофотометричним методом із застосуванням ацетонового порошку *Micrococcus Lysodeikticus* [1].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ Порівняльне дослідження функціональної активності нейтрофілів (табл. 1) не виявило суттєвих відмінностей у показниках сНСТ-тесту в кролів з експериментальним гіпотирозом й інтактних тварин, однак за стимуляції пірогеналом кількість диформазаанпозитивних нейтрофілів підвищилась меншою мірою у кролів зі зниженою продукцією тироїдних гормонів.

Показник резерву в кролів із гіпотирозом був на 14 % нижчим порівняно з контролем. Більш суттєвих змін зазнав коефіцієнт активації нейтрофілів – зниження на 25 % ($p < 0,05$).

Розвиток запалення в рогівці характеризувався збільшенням вмісту активних нейтрофілів у периферійній крові. На 1 добу від початку експерименту

Таблиця 1. Показники НСТ-тесту крові тварин з хімічним опіком рогівки та на тлі мерказоліліндукованого гіпотирозу ($M \pm m$)

Група тварин/показник	сНСТ-тест, %	іНСТ-тест, %	ПР	$K_{акт.}$	
Інтактні (n=10)	15,53±0,91	25,96±0,79	1,70±0,07	0,40±0,02	
Гіпотироз (n=10)	18,15±0,56*	27,04±0,85	1,49±0,06*	0,32±0,04	
Хімічний опік рогівки (n=10)	24 год	27,59±0,87*	38,67±0,58*	1,41±0,06	0,28±0,03*
	7 доба	21,61±0,70*	29,62±0,74*	1,54±0,09*	0,24±0,03*
	14 доба	22,91±0,33*	27,95±0,53*	1,22±0,03*	0,18±0,02*
	21 доба	20,73±0,33*	32,72±0,77*	1,55±0,05*	0,36±0,02*
Хімічний опік рогівки + гіпотироз (n=10)	24 год	19,01±0,54*#	25,46±0,45#	1,34±0,04*#	0,25±0,02*
	7 доба	14,82±0,33#	22,34±0,52*#	1,51±0,05*	0,33±0,02*#
	14 доба	13,91±0,34#	22,26±0,49*#	1,60±0,06*	0,34±0,02*#
	21 доба	14,74±0,55#	21,92±0,48*#	1,50±0,07*	0,33±0,03*

Примітки: тут і у наступних таблицях розділу:

1) * – достовірність різниці еутироїдних і гіпотироїдних тварин з опіком рогівки відносно інтактних;

2) # – достовірність різниці гіпотироїдних тварин з опіком рогівки відносно еутироїдних у відповідні терміни спостереження.

показники сНСТ-тесту були вищі на 78 % ($p < 0,001$) порівняно з контролем. Дещо менше, на 49 % ($p < 0,001$), змінилися показники індукованого НСТ-тесту, показник резерву склав $1,41 \pm 0,06$, що на 21 % менше, ніж у контролі. Зменшення показника резерву вказує на зниження функціональних резервів нейтрофілів, характерне для запалення. На це ж вказує і суттєве зниження коефіцієнта метаболічної активації нейтрофілів (70 % від рівня здорових тварин). На 7 добу з моменту нанесення опікової травми показники сНСТ-тесту та іНСТ-тесту дещо знизились, порівняно з 1 добою, і склали відповідно 139 і 114 % від рівня інтактних кролів. ПР на 7 добу з моменту нанесення пошкодження залишався нижчим від контрольних значень ($1,54 \pm 0,09$, $p > 0,05$), що на 10 % менше, ніж у контролі, а коефіцієнт резерву також дещо зменшився, порівняно з 1 добою, і був достовірно нижчим, ніж у контрольних тварин (60 % від норми). До 14 доби показник спонтанного НСТ-тесту зазнав подальшого зростання і склав 148 % від норми, а на тлі зниження індукованого НСТ-тесту спостерігалось подальше зниження показника резерву і коефіцієнта стимуляції. До 21 доби показник сНСТ-тесту фактично залишався на рівні 7 доби, а іНСТ-тесту дещо зріс і склав 126 % від рівня здорових тварин. Це позначилось на функціональних показниках нейтрофілів – ПР зріс, порівняно з попередніми термінами дослідження, і склав 91 % від норми, а коефіцієнт активації – 90 %.

Показники функціональної активності нейтрофілів периферійної крові у кролів з опіковою травмою, що триває на тлі гіпотирозу, вказують на зниження інтенсивності дихального вибуху в поліморфноядерних лейкоцитах. В усі терміни спостереження значення як спонтанного, так і індукованого НСТ-тесту (табл. 1) були нижчими, порівняно з тваринами, у яких запаль-

ний процес перебігав без зміни гормонального фону. На 1 добу експерименту в кролів із гіпотирозом показники сНСТ-тесту та іНСТ-тесту були достовірно нижчими і становили відповідно 69 і 66 % від рівня евтироїдних тварин із контрольною патологією. Показник резерву також знижувався, а коефіцієнт активації нейтрофілів через добу від моменту нанесення опікової травми суттєво не відрізнявся у порівнюваних групах. Через 7 діб з моменту нанесення пошкодження рогики у кролів із гіпотирозом показники НСТ-тесту надалі знижувалися і становили відповідно 95 і 86 % від рівня здорових тварин, що супроводжувалося зменшенням показника резерву до ($1,51 \pm 0,05$) і $K_{\text{акт}}$ до ($0,33 \pm 0,02$). Найбільш значне зниження показників НСТ-тесту мало місце на 14 добу від моменту нанесення опікової травми, коли показники склали 89 і 85 % від норми, що на 65 % і 26 % менше, ніж у тварин з нормальним вмістом гормонів щитоподібної залози. До 21 доби показники залишалися практично на тому ж рівні, що вказує на вичерпування захисних резервів у тварин із гіпотирозом.

Одним із показників неспецифічної резистентності організму є лізоцим. Аналізуючи дані таблиці 2, можна констатувати, що рівень лізоциму в сироватці крові кролів після опікової травми рогики поступово зменшувався, досягнувши мінімуму в період 14 доби. Через 24 доби від моменту нанесення опікової травми вміст лізоциму в крові, порівняно з контролем, зменшився незначно – на 18 % ($p < 0,05$). На 7 добу ця тенденція продовжувалась і показник був меншим за контроль на 35 % ($p < 0,001$) та продовжував знижуватись до 14 доби, коли склав 55 % від норми ($p < 0,001$). На 21 добу спостерігалось зростання рівня лізоциму, однак показник все ж достовірно відрізнявся від контрольних значень.

Таблиця 2. Вміст лізоциму в крові тварин із хімічним опіком рогики на тлі мерказоліліндукованого гіпотирозу, $M \pm m$

Група тварин/ показник	Інтактні (n=10)	Гіпотироз (n=10)	Хімічний опік рогики (n=10)				Хімічний опік рогики + гіпотироз (n=10)			
			24 год	7 доба	14 доба	21 доба	24 год	7 доба	14 доба	21 доба
Лізоцим, мкмоль/л	$2,11 \pm 0,02$	$1,39 \pm 0,04^*$	$1,78 \pm 0,06^*$	$1,56 \pm 0,05^*$	$1,17 \pm 0,04^*$	$1,80 \pm 0,06^*$	$1,56 \pm 0,05^{**}$	$1,27 \pm 0,04^{**}$	$1,03 \pm 0,03^{**}$	$1,37 \pm 0,04^{**}$

У кролів із гіпотирозом ми спостерігали аналогічну тенденцію, однак показники були ще нижчими – на 1 добу – 74 %, 7 – 60, 14 – 49 %, а до 21 доби показник зріс до 65 % від норми.

Зменшення рівня лізоциму в крові можна пояснити його використанням у вогнищі запалення з метою активації захисних механізмів гранулоцитів та макрофагів у місці нанесення опікової травми.

ВИСНОВОК Перебіг опікової травми рогики на тлі гіпотирозу супроводжується пригніченням біоцидності нейтрофілів і зниженням їх фагоцитарної активності, а також зменшенням, порівняно з евтироїдними тваринами, концентрації лізоциму в сироватці крові.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Влізла В. В. Лабораторні методи дослідження у біології, тваринництві і ветеринарній медицині : довідник / В. В. Влізла, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич [та ін.]. – Львів : СПОЛОМ, 2012. – 764 с.

2. Дадашева З. Р. Хирургическая тактика при лечении тяжелой и очень тяжелой ожоговой травмы глаз : дисс. д. мед. наук. : 14.00.08 / З. Р. Дадашева. – М., 2004. – 304 с.

3. Диагностическая ценность лейкоцитарных тестов. II. Определение биоцидности лейкоцитов : метод. рекоменд. / под ред. Д. Н. Маянского. – Новосибирск, 1996. – 32 с.

4. Доклінічне вивчення тиростатичних та тироїд-стимулюючих засобів. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рекоменд. – Київ, 2001. – С. 409–420.

5. Макаров П. В. Осложнения тяжелой ожоговой травмы глаз: патогенез, анализ причин, профилактика и возможные пути оптимизации результатов лечения. : дисс. д. мед. наук // П. В. Макаров. – Москва, 2003. – 335 с.

6. Научно-практические рекомендации к удержанию лабораторных тварин та роботи з ними / [Кожем'якін Ю. М., Хромов О. С., Філоненко М. А., Сайфетдінова Г. А.]. – К. : Авіцена, 2002. – 156 с.

7. Титов В. Н. Роль макрофагов в становлении воспаления, действие интерлейкина-1, интерлейкина-6 и активность гипоталамо-гипофизарной системы / В. Н. Титов // Клини. лаб. диагн. – 2003. – № 12. – С. 3–10.

8. Ченцова Е. В. Система патогенетически обоснованного

лечения ожоговой травмы глаз : Дис. д. мед. наук. 14.01.03 / Е. В. Ченцова. – М., 1998. – 304 с.

9. Allen T. Oxidative stress by inorganic arsenic: modulation by thyroid hormones in rat / T. Allen, S. V. Rana // *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* – 2003. – №135. – P. 157–162.

10. Simultaneous changes in central and peripheral components of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in lipopolysaccharide-induced acute illness in mice / A. Boelen, J. Kwakkel, D. C. Thijssen-Timmer [et al.] // *J. Endocrinol.* – 2004. – Vol. 182, № 2. – P. 315–323.

11. 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.

12. Kuckelkorn R. Treatment of severe eye burns by Tenoplasty / R. Kuckelkorn, N. Schrage, M. Reim // *Lancet.* – 1995. – Vol. 345(8950). – P. 657–658.

13. 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.

14. Nongenomic effect of thyroid hormone on free-radical production in human polymorphonuclear leukocytes / E. Mezosi, J. Szabo, E. V. Nagy [et al.] // *J. Endocrinol.* – 2005. – Vol. 185, № 1. – P. 121–129.

15. Evaluation of oxidative phosphorylation in hearts from euthyroid, hypothyroid and hyperthyroid rats / K. Nishiki, M. Ericinska, D. F. Wilson [et al.] // *Am. J. Physiol.* – 1978. – Vol. 235, № 5. – P. 212–219.

16. Extracellular metabolism of thyroid hormones by stimulated granulocytes / M. K. Rao, A. L. Sagone // *Infect. Immun.* – 1984. – Vol. 43, № 3. – P. 846–849.

17. Hypothyroidism attenuates protein tyrosine nitration, oxidative stress and renal damage induced by ischemia and reperfusion: effect unrelated to antioxidant enzymes activities / V. M. Tenorio-Velazquez, D. Barrera, M. Franco [et al.] // *BMC Nephrol.* – 2005. – № 6. – P. 12.

18. Wagoner M. D. Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy / M. D. Wagoner // *Survey of Ophthalmology.* – 1997. – Vol. 41(4). – P. 275–313.

Отримано 26.11.14