

## ПОКАЗНИКИ ЕНДОГЕННОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ У ЩУРІВ З ГОСТРИМ ПАРОДОНТИТОМ НА ТЛІ МЕРКАЗОЛІЛІНДУКОВАНОГО ГІПОТИРЕОЗУ

*Для вивчення впливу експериментального гіпотиреозу на стан ендогенної інтоксикації у щурів з гострою травмою м'яких тканин ясен було проведено визначення маркерів ендогенної інтоксикації, а також досліджено активність лізосомальних протеаз. Гіпотиреоз у тварин викликали введенням мерказолілу в дозі 25 мг/кг протягом 21-ї доби. Запальний процес у пародонті моделювали шляхом однократного направлено впливу коливаннями ультразвукової частоти 50 кГц при експозиції впливу 60 с. Запалення в щурів з гострою травмою ясен на тлі гіпотиреозу призводило до пригнічення активності лізосомальних ферментів – катепсину D і кислій фосфатази у гомогенаті ясен та підвищення вмісту маркерів ендогенної інтоксикації – молекул середньої маси й еритроцитарного індексу інтоксикації.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** запалення пародонта, гіпотиреоз, ендогенна інтоксикація.

**ВСТУП.** Останнім часом порушення функціонального стану щитоподібної залози набули значного розповсюдження. Дані літератури свідчать про часте ураження тканин організму, в тому числі пародонта, при дисфункції щитоподібної залози, а ступінь і вираження патологічного процесу залежать від тяжкості та тривалості гіпотиреозу [5, 15, 17, 19, 20]. Недостатньо вивчена роль гормонів щитоподібної залози в реалізації функціональної активності клітин імунної системи визначила актуальність вивчення особливостей перебігу запалення на фоні гіпотиреозу [11, 18]. Запальний процес, що триває на тлі гіпотиреозу як системна відповідь організму, має певні особливості формування і перебігу. Ці зміни зумовлені зниженням функціональної активності клітин, що беруть участь у формуванні запальної відповіді [9, 11, 14, 16–19]. З метою вивчення стану ендогенної інтоксикації ми використали модель запального процесу пародонта на тлі експериментального гіпотиреозу.

Оскільки стан і динаміка ендогенної інтоксикації залежать від інтенсивності катаболічних процесів в ураженій тканині й швидкості елімінації утворених продуктів [3, 13, 20], метою цієї роботи стало дослідження впливу зниженої продукції тиреоїдних гормонів на стан ендогенної інтоксикації та активність лізосомальних ферментів в організмі тварин з гострим експериментальним пародонтитом.

© Т. І. Дзецюх, 2013.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Дослідження проводили на білих безпородних щурах-самцях масою 180–200 г, отриманих з віварію Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського, відповідно до вимог Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин [6]. Тварини перебували на повноцінному раціоні віварію з вільним доступом до води. Гіпотиреоз моделювали щоденним введенням *per os* за допомогою спеціального зонда фармакопейного тиреостатика мерказолілу ("Акрихин", Росія) у дозі 25 мг/кг протягом 21-ї доби [15]. Контроль здійснювали за рівнем тироксину, трийодтироніну і тиреотропного гормону, а також за масою тварин і їх руховою активністю. До групи порівняння входили тварини, яким мерказоліл не вводили. Вплив гіпотиреозу на перебіг запального процесу при пародонтиті вивчали на моделі запалення, викликаного гострою травмою м'яких тканин ясен [7]. Тваринам під тіопенталовим наркозом (30 мг/кг) з губної сторони до тканин пародонта нижнього різця підводили робочу головку ультразвукового генератора – випромінювач від ультразвукового скейлера ART (Великобританія), і впродовж 60 с здійснювали однократний направлений вплив коливаннями ультразвукової частоти при таких параметрах впливу, як: частота коливань – 50 кГц, потужність випромінювання – 1,2 Вт·см<sup>2</sup> при експозиції впливу 60 с. Операцію виконували на 14-ту

добу після першого введення мерказолілу. Через 1 і 8 діб після операції щурів декапітували під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг). Групами порівняння слугували тварини з експериментальним гіпотиреозом і щури з гострою механічною травмою м'яких тканин ясен. Контролем був матеріал від інтактних тварин.

Ступінь вираження ендотоксемії оцінювали за вмістом молекул середньої маси (МСМ) у сироватці крові, де МСМ<sub>1</sub> – це вміст молекул середньої маси, визначений при довжині хвилі 254 нм, а МСМ<sub>2</sub> – при довжині хвилі 280 нм [1], за вираженням пошкодження еритроцитарної мембрани розраховували еритроцитарний індекс інтоксикації (EII) [4].

Для приготування гомогенату зразки тканини ясен розтирали за допомогою гомогенізатора при 4 °С і суспендували в 9 об'ємах 0,25 М розчину цукрози з 0,001 М етилендіамінтетраоцтовою кислотою, рН 7,4. Сполучно-тканинні елементи, які залишились у середовищі, видаляли шляхом центрифугування (1000 об./хв протягом 3 хв) при охолодженні. Надосадову частину гомогенату ясен використовували для визначення. Активність катепсину D у гомогенаті тканини ясен визначали за методом Дингла [2] у модифікації [20] по гідролізу гемоглобіну при рН 3,2. Інкубацію проводили при 37 °С протягом 60 хв, часто струшуючи. Реакцію зупиняли, додаючи 5 % ТХУ, потім проби центрифугували протягом 15 хв. До 1 мл супернатанту додавали 0,5 N NaOH для нейтралізації ТХУ і 0,5 мл реактиву Фоліна. Активність ферменту виражали в мкМ тирозину/(мг білка·год). Концентрацію білка визначали методом Лоурі.

Активність кислій фосфатази визначали за методом Bodansky [10] з використанням набору реагентів фірми "Hospitex Diagnostix". Кисла фосфатаза каталізує гідроліз 1-нафтилфосфату до 1-нафтолу і фосфату. 1-Нафтол дає в реакції з 2-амінотолуолом комплексну сполуку – діазобарвник. Зміна забарвлення при довжині хвилі  $\lambda=405$  нм пропорційна активності кислій фосфатази у зразку. Результати виражали у мкМ/(мг білка·год).

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** З метою оцінки функціонального стану щитоподібної залози при моделюванні гіпотиреозу було визначено концентрацію тиреоїдних гормонів у крові. Рівень тироксину в здорових щурів склав (18,39±0,61) пмоль/л, а у тварин, яким протягом 14-ти діб вводили мерказоліл, був нижчим у 2,2 раза і становив (8,51±0,35) пмоль/л. Вміст T<sub>3</sub> в інтактних щурів становив (6,27±0,23) пмоль/л, а через 14 днів з моменту

початку експерименту був в 1,9 раза меншим від показників у інтактних щурів і склав (3,2±0,086) пмоль/л. Показник ТТГ у нормі становив (1,77±0,06) мМО/л, після введення мерказолілу – (3,2±0,09) мМО/л. Це вказує на розвиток у тварин вираженого гіпотиреозу за введення мерказолілу в дозі 25 мг/кг.

Вважають, що основним токсичним субстратом, відповідальним за виникнення стадії автоагресії ендотоксикозу, можуть стати продукти клітинної дезорганізації, неповного розпаду і неферментного перетворення білків крові й тканин. Вони представлені в основному класом середньомолекулярних продуктів протеолізу й оксидативних процесів або молекул середньої маси. Підвищення рівня МСМ у крові зумовлене порушенням їх елімінації з організму, посиленням утворення в тканинах або поєднанням обох механізмів. Середньомолекулярні олігопептиди, будучи продуктами розпаду білків, діють як вторинні ендотоксини, викликаючи розлад різних фізіологічних процесів [1].

Як показали наші дослідження (табл. 1), у тварин з гіпотиреозом вміст МСМ у крові збільшувався, а також не на однаковому рівні у цих тварин перебували показники МСМ<sub>1</sub> і МСМ<sub>2</sub>, що відображали, відповідно, вміст ланцюгових амінокислот (МСМ<sub>1</sub>) і ароматичних амінокислот у середньомолекулярних пептидах і продуктах їх розпаду. Це можна пояснити особливостями метаболізму, які проявляються ймовірною активацією деградації окисномодифікованих білків, припиненням активності гідролаз, які їх розщеплюють, а також порушенням елімінації за умов дефіциту гормонів щитоподібної залози [9, 16].

Травма пародонта призводила до зростання МСМ у всі дні експерименту, при цьому спостерігали більш виражене підвищення МСМ<sub>1</sub>, ніж МСМ<sub>2</sub>. Так, через добу після нанесення травми ясен еутиреоїдним тваринам вміст МСМ<sub>1</sub> в крові щурів підвищився на 93,9 %, а вміст МСМ<sub>2</sub> – на 136,3 % порівняно з інтактними тваринами. Вміст МСМ<sub>1</sub> і МСМ<sub>2</sub> на 8-му добу експерименту дещо зменшувався і становив 166,9 та 160,8 % від норми.

Зростання кількості МСМ в організмі тварин після травми ясен вказувало на посилення катаболічних процесів. Підвищення вмісту МСМ<sub>1</sub>, до складу яких можуть входити олігопептиди, фрагменти нуклеїнових кислот, вищих жирних кислот, тригліцеролів, холестеролу, свідчило про порушення структури мембран, а МСМ<sub>2</sub>, компонентами яких можуть бути пуринові основи, сечова кислота й ароматичні амінокислоти, – про пригнічення процесів їх елімінації [10].

Доступною для досліджень клітинних (плазматичних) мембран є еритроцитарна мембрана. Тест проникності еритроцитарних мембран, на думку багатьох авторів [4], є одним із критеріїв впливу токсичних агентів на плазматичну мембрану, оскільки всередині еритроцита відсутні органели. Порушення цілісності еритроцитарної мембрани, а також зміни властивостей поверхні ліпідного бішару та конформації білків під впливом токсичних речовин змінюють функціональну здатність еритроцитів зв'язувати різні сполуки, яка лежить в основі визначення EII.

Результати досліджень, наведені в таблиці 1, показують, що дія механічної травми порізного впливала на зазначений показник у тварин зі збереженою і зниженою функцією щитоподібної залози. На 1-шу добу експерименту EII в еутиреоїдних щурів зріс в 1,5 раза з поступовим зниженням до 8-ї доби, коли він становив 136 % від норми.

Гіпотиреоїдний стан спричинив більш суттєве зростання EII після нанесення травми ясен. Зокрема, на 1-шу добу показник становив 221 % від рівня здорових щурів, що достовірно вище як від інтактних, так і від еутиреоїдних тварин з гострим пародонтитом.

Таким чином, зниження продукування тиреоїдних гормонів призводило до посилення ендогенної інтоксикації. Причинами цього можуть бути надмірний розпад окисномодифікованих білків, а також порушення їх метаболізму, зокрема з участю лізосомальних гідролаз, і виведення даних продуктів.

Ми вивчали активність лізосомальних ферментів – катепсину D і кислій фосфатази у гомогенаті ясен, щоб перевірити одне з цих при-

пущень. Отримані результати дозволяють констатувати, що на тлі зниженого продукування тиреоїдних гормонів катаболічні процеси суттєво пригнічувалися (табл. 2). Навіть у тварин групи порівняння, в яких викликали гіпотиреоз без моделювання пародонтиту, ми зафіксували зменшення активності катепсину D на 18 % від рівня здорових щурів. Нанесення механічної травми ясен еутиреоїдним тваринам призвело до вірогідного зростання показника в 1,8 раза через добу, що можна пояснити більш масивною міграцією нейтрофілів у вогнище ураження. До 8-ї доби протеазна активність знижувалась і склала 139 % від рівня інтактних тварин. На 1-шу добу після нанесення травми щурам з гіпотиреозом активність катепсину D у гомогенаті ясен також зростала, однак була меншою на 30 % від аналогічного рівня у тварин з нормальною функцією щитоподібної залози, перевищуючи в 1,4 раза показник інтактних тварин. Звертає на себе увагу той факт, що до 8-ї доби протеазна активність знизилась на 8 % від 1-ї доби, тоді як у групі еутиреоїдних тварин ми відмітили суттєве зменшення активності катепсину D – на 29 %.

Аналогічні зміни ми відмітили у динаміці лужної фосфатази (табл. 2). В еутиреоїдних тварин з гострим пародонтитом ензимна активність складала 168 і 138 % у досліджувані терміни відносно інтактних тварин. У щурів з гіпотиреозом нанесення травми супроводжувалось значно меншими змінами активності ферменту. Зокрема, через добу вона складала 121 % від норми, що на 39 % менше, ніж в еутиреоїдних тварин, а до 8-ї доби активність лужної фосфатази становила 111 %

Таблиця 1 – Показники ендогенної інтоксикації у щурів з гострим пародонтитом на тлі мерказолілдукованого гіпотиреозу ( $M \pm m$ )

Показник/ група тварин	Інтактні тварини (n=10)	Гіпотиреоз (n=10)	Гострий пародонтит		Гострий пародонтит+ гіпотиреоз	
			1-ша доба (n=7)	8-ма доба (n=7)	1-ша доба (n=7)	8-ма доба (n=7)
MCM <sub>1</sub> , ум. од.	351,3±14,6	401,5±10,1 p<0,05	681,1±13,7 p <sub>1</sub> <0,001	586,3±14,1 p <sub>1</sub> <0,001	832,2±17,7 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,002	827,3±11,1 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001
MCM <sub>2</sub> , ум. од.	204,3±11,2	251,2±8,3 p<0,05	482,8±10,1 p <sub>1</sub> <0,001	323,8±17,4 p <sub>1</sub> <0,001	641,5±12,6 p <sub>1</sub> <0,02 p <sub>2</sub> <0,001	668,3±5,8 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,002
EII, %	29,9±1,2	37,7±0,8 p<0,05	46,3±0,6 p <sub>1</sub> <0,001	40,7±1,5 p <sub>1</sub> <0,002	54,1±1,3 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001	51,9±1,4 p <sub>1</sub> <0,02 p <sub>2</sub> <0,001

Примітки. Тут і в таблиці 2:

- 1) p – достовірність різниці щурів з гіпотиреозом відносно інтактних тварин;
- 2) p<sub>1</sub> – достовірність різниці еутиреоїдних і гіпотиреоїдних щурів з гострим пародонтитом відносно інтактних тварин;
- 3) p<sub>2</sub> – достовірність різниці щурів з гострим пародонтитом на тлі гіпотиреозу відносно еутиреоїдних тварин з гострим пародонтитом у відповідні терміни дослідження.

Таблиця 2 – Показники активності лізосомальних ферментів у гомогенаті ясен щурів з гострим пародонтитом на тлі мерказоліліндукованого гіпотиреозу ( $M \pm m$ )

Показник / група тварин	Інтактні тварини (n=10)	Гіпотиреоз (n=10)	Гострий пародонтит		Гострий пародонтит+гіпотиреоз	
			1-ша доба (n=7)	8-ма доба (n=7)	1-ша доба (n=7)	8-ма доба (n=7)
Катепсин D, мкМ/(мг білка·год)	0,209±0,015	0,177±0,009 p>0,05	0,372±0,009 p <sub>1</sub> <0,001	0,293±0,006 p <sub>1</sub> <0,001	0,287±0,011 p <sub>1</sub> <0,01 p <sub>2</sub> <0,01	0,264±0,014 p <sub>1</sub> <0,02 p <sub>2</sub> >0,05
Лужна фосфатаза, мкМ/(мг білка·год)	27,03±1,63	24,92±1,28 p>0,05	45,49±1,67 p <sub>1</sub> <0,001	37,23±0,92 p <sub>1</sub> <0,02	32,61±1,62 p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,001	30,05±1,60 p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> >0,05

від рівня здорових щурів (на 24 % менше від показника тварин з нормальною функцією щитоподібної залози).

**ВИСНОВОК.** Зниження рівня тиреоїдних гормонів супроводжується пригніченням лізо-

сомального апарату клітин, впливає на синтез і деградацію лізосомальних ферментів як в інтактній тканині, так і в пошкодженій, що може бути причиною накопичення молекул середньої маси внаслідок порушення їх подальшої деградації і виведення.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Габриэлян Н. И. Опыт использования показателя средних молекул в крови для диагностики нефрологических заболеваний у детей / Н. И. Габриэлян, В. И. Липатова // Лаб. дело. – 1984. – № 3. – С. 138–140.
2. Дингл Дж. Методы исследования / Дингл Дж. – М.: Мир, 1980. – 344 с.
3. Леонтьева Е. А. Влияние лизосомальных соединений на функциональную активность лизосомального аппарата клетки: автореф. дисс. на соискание учен. степени канд. биол. наук / Е. А. Леонтьева. – СПб., 2003. – 26 с.
4. Метод определения эндогенной интоксикации / [Тогайбаев А. А., Кургузкин А. В., Рикун И. В., Карибжанова Р. М.] // Лаб. дело. – 1988. – № 9. – С. 22–24.
5. Москвина Т. С. Эффективность лечения пародонтита у больных с нарушением функции щитовидной железы / Т. С. Москвина // Стоматология. – 2001. – № 1. – С. 47–50.
6. 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.
7. Пат. на корисну модель 65771. Спосіб моделювання пародонтиту / Мачоган В. Р., Авдеев О. В. – 2011. – Бюл. № 23.
8. Подунай Ю. А. Возрастная динамика активности катепсинов и содержания среднемолекулярных пептидов в мышцах морского ерша / Ю. А. Подунай, И. Н. Залевская, И. И. Руднева // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия "Биология, химия". – 2009. – 22 (61), № 4. – С. 128–134.
9. Титов В. Н. Роль макрофагов в становлении воспаления, действие интерлейкина-1, интерлейкина-6 и активность гипоталамо-гипофизарной системы // Клин. лаб. диагн. – 2003. – № 12. – С. 3–10.
10. Bodansky O. Acid phosphatase / O. Bodansky // Adv. Clin. Chem. – 1972. – 15. – P. 143–147.
11. Cellular metabolism as a basis for immune privilege / M. K. Newell, E. Villalobos-Menuet, S. C. Schweitzer [et al.] // J. Immune Based Ther. Vaccines. – 2006. – № 4. – P. 1.
12. 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.
13. Influence of membrane physical state on the lysosomal proton permeability / G. J. Zhang, H. W. Liu, L. Yang [et al.] // J. Membr. Biol. – 2000. – 175 (1). – P. 53–62.
14. Interleukin-18, a proinflammatory cytokine, contributes to the pathogenesis of non-thyroidal illness mainly via the central part of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis / A. Boelen, J. Kwakkel, M. Platvoet-ter Schiphorst [et al.] // Eur. J. Endocrinol. – 2004. – 151, № 4. – P. 497–502.
15. 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. – 177, № 3. – P. 471–476.
16. Lipid peroxidation and free radical scavengers in thyroid dysfunction in the rat: a possible mechanism of injury to heart and skeletal muscle in hyperthyroidism / K. Asayama, K. Dobashi, H. Hayashibe [et al.] // Endocrinology. – 1987. – 121, № 2. – P. 112–118.

17. 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. – **185**, № 1. – P. 121–129.

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

19. 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. – **78**, № 10. – P. 1071–1077.

20. Wiederanders B. Accumulation of inactive cathepsin D in old rats / B. Wiederanders, B. Oelke // Mech. Ageing Dev. – 1982. – **24**, № 3. – P. 265–271.

**Т. И. Дзецюх**

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

## ПОКАЗАТЕЛИ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ У КРЫС С ОСТРЫМ ПАРОДОНТИТОМ НА ФОНЕ МЕРКАЗОЛИЛИНДУЦИРОВАННОГО ГИПОТИРЕОЗА

### Резюме

С целью изучения влияния экспериментального гипотиреоза на состояние эндогенной интоксикации у крыс с острой травмой мягких тканей десен было проведено определение маркеров эндогенной интоксикации, а также исследовано активность лизосомальных ферментов. Гипотиреоз у животных вызывали введением мерказолила в дозе 25 мг/кг в течение 21-х суток. Воспалительный процесс в пародонте моделировали путем однократного направленного воздействия колебаниями ультразвуковой частоты 50 кГц при экспозиции воздействия 60 с. Воспаление у крыс с острой травмой десен на фоне гипотиреоза приводило к угнетению активности лизосомальных ферментов – катепсина D и кислой фосфатазы в гомогенате десен и повышению содержания маркеров эндогенной интоксикации – молекул средней массы и эритроцитарного индекса интоксикации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: воспаление пародонта, гипотиреоз, эндогенная интоксикация.

**T. I. Dzetsiukh**

I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

## THE INDICES OF ENDOGENOUS INTOXICATION IN RATS WITH AN ACUTE PARODONTITIS AGAINST THE BACKGROUND OF MERCAZOLIL-INDUCED HYPOTHYROIDISM

### Summary

In order to study the effects of experimental hypothyroidism on the endogenous intoxication condition in rats with an acute injury of the soft gum tissues, the determination of endogenous intoxication markers was conducted and the activity of lysosomal enzymes was analyzed. Hypothyroidism in rats was caused by the injection of Mercazolil in dose of 25 mg/kg over a 21-day period. Inflammation in parodontium was modelled by a single directed influence with the vibrations of ultrasonic frequency of 50 kHz at the exposure of influence of 60 sec. Inflammation in rats with an acute injury of the gum tissues against the background of hypothyroidism resulted in the decreased activity of lysosomal enzymes – Cathepsin D and acid phosphatase in gum homogenate and increased content of endogenous intoxication markers – molecules of average weight and erythrocytic index of intoxication.

KEY WORDS: parodontal inflammation, hypothyroidism, endogenous intoxication.

Отримано 04.01.13

Адреса для листування: Т. І. Дзецюх, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна.