

© ¹Павловський М. І., ¹Дрожжина Г. І., ²Павловська Г. Я.

УДК 617.13-002: 577.175.4

¹Павловський М. І., ¹Дрожжина Г. І., ²Павловська Г. Я.

ЛАБІЛІЗАЦІЯ ЛІЗОСОМАЛЬНИХ МЕМБРАН У ТКАНИНАХ ПЕРЕДНЬОГО ВІДДІЛУ ОКА ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГІПОТИРЕОЗІ

¹ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії
ім. В. П. Філатова НАМН України» (м. Одеса)

²Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького (м. Львів)

lvivmic87@gmail.com

Дана робота є фрагментом НДР ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України» «Розробити оптимальний метод використання трансплантації криоконсервованої амніотичної оболонки і алогенних лімбальних стовбурових клітин рогівки на підставі вивчення механізмів їх впливу на особливості перебігу запального процесу і регенерації рогівки в лікуванні патології рогівки і визначення їх ефективності», термін виконання 2014-2016 рр., № державної реєстрації 0114U002512.

Вступ. Гіпотиреоз належить до найчастіших симптомів захворювань щитоподібної залози. За результатами популяційних досліджень, його розповсюдженість у різних регіонах сягає 4-21% [8].

Розповсюдженість **гіпотиреозу підвищує актуальність цієї проблеми** не лише для ендокринологів, а й для лікарів інших спеціальностей, зокрема, для офтальмологів [13].

Відомо, що зниження рівня тиреоїдних гормонів призводить до розвитку гіпотиреозу і супроводжується метаболічними, функціональними і структурними змінами в різних органах і тканинах, у тому числі в оці, особливо в слюзній залозі і тканинах поверхні ока – кон'юнктиві і рогівці. Останнім часом доведена залежність біомеханічних властивостей рогівки від рівня тиреоїдних гормонів.

Останнім часом проводяться поглиблені дослідження впливу рівня тиреоїдних гормонів на структурно-функціональний стан тканин поверхні ока, процеси пероксидації та антиоксидації [4,9,12,15,17].

Безумовно, вивчення патогенетичних механізмів буде сприяти вдосконаленню способів діагностики та лікування патологічних станів ока при гіпотиреозі, особливо по відношенню до латентної форми гіпотиреозу, коли їх діагностика сприятиме своєчасній профілактиці і ранньому лікуванню ускладнень з боку органа зору.

У попередніх дослідженнях ми встановили, що у тварин з модельованим гіпотиреозом знижувався рівень відновленого глутатіону в рогівці і слюзній рідині, при тому, що в слизовій оболонці кон'юнктиви рівень відновленої форми глутатіону підвищувався [3].

Також виявлено, що при експериментальному гіпотиреозі суттєво зростає рівень продуктів пере-

кисного окислення ліпідів у тканинах кон'юнктиви і рогівки, при цьому істотно збільшення малонового діальдегіду спостерігали в кон'юнктиві [2].

Проте, до цього часу не з'ясовані механізми, що становлять основу структурно-функціональних порушень у рогівці, кон'юнктиві і слюзних залозах при гіпотиреозі. Усе вищенаведене вказує на доцільність проведення досліджень у цьому напрямку [10,14,16].

Мета дослідження. Вивчити стан мембран лізосом у тканинах переднього відділу ока при експериментальному гіпотиреозі.

Об'єкт і методи дослідження. Для проведення експериментів використали самців білих щурів лінії Вістар, масою тіла 190-210 г.

Робота з тваринами проводилася з урахуванням Міжнародних вимог для біомедичних досліджень на тваринах, затверджених Радою міжнародних медичних наукових організацій (2012 р.).

Усього було використано 42 тварини, яких рандомізовано розділили на 3 групи: I група – контрольна (14 щурів), II група – дослідна (14 щурів), тварини з легким ступенем гіпотиреозу, III група – дослідна (14 щурів), тварини з вираженим ступенем гіпотиреозу.

Гіпотиреоз викликали за допомогою антитиреоїдного препарату «Тіамазол», який дослідні тварини отримували з питтєвою водою (500 мг/л). При моделюванні легкого ступеня гіпотиреозу, тварини отримували тіамазол протягом чотирьох тижнів [6,11]. При моделюванні вираженого ступеня гіпотиреозу, тварини отримували тіамазол протягом 10 тижнів [7]. Обидві групи тварин, після закінчення періоду моделювання гіпотиреозу, були виведені з експерименту за допомогою надлишкової анестезії етиловим ефіром.

Для дослідження брали тканини рогівки і кон'юнктиви, а слюзну рідину збирали перед виведенням тварин з експерименту, за допомогою модифікованого тесту Ширмера [7]. У досліджуваних тканинах визначали активність різних форм кислоти фосфатази (седиментованої, неседиментованої).

Принцип методу визначення активності кислоти фосфатази заснований на СФ-метричному вимірюванні концентрації паранітрофенілу, який утворюється в результаті ферментативного гідролізу

Показники активності маркерного лізосомального ферменту (кислої фосфатази) в тканинах рогівки, кон'юнктиви і сльозній рідині щурів при експериментальному гіпотиреозі (n=14).

Досліджувана тканина	Статистичні показники	Норма	Гіпотиреоз легкого ступеня	Гіпотиреоз вираженого ступеня
Рогівка, нкат/г тканини	Неседиментована активність			
	M	57,32	69,07	73,40
	m	3,56	3,76	4,89
	p	-	< 0,05	< 0,05
	%	100	120,5	128,1
	Седиментована активність			
M	31,48	25,59	23,45	
m	2,18	1,48	1,64	
p	-	< 0,05	< 0,01	
%	100	81,3	74,5	
Кон'юнктива, нкат/г тканини	Неседиментована активність			
	M	72,50	93,24	105,63
	m	5,47	6,08	7,82
	p	-	< 0,05	< 0,01
	%	100	128,6	145,7
	Седиментована активність			
M	40,18	30,22	25,63	
m	2,73	1,74	1,28	
p	-	< 0,01	< 0,001	
%	100	75,2	63,8	
Сльозна рідина, нкат/мл	M	5,65	7,08	7,90
	m	0,30	0,45	0,54
	p	-	< 0,05	< 0,01
	%	100	125,3	139,8

Примітка: p – рівень значимості різних показників по відношенню до норми.

паранітрофенілфосфату. У супернатанті визначали неседиментовану активність (вільну форму) кислої фосфатази, а в осаді – активність седиментованої (зв'язаної форми) кислої фосфатази, яка є маркером цілості лізосомальних структур.

За співвідношенням показників активності седиментованої та неседиментованої кислої фосфатази робили висновок про ступінь лабілізації лізосом.

Шлях визначення. Гомогенати рогівки і кон'юнктиви центрифугували диференційовано. Активність кислої фосфатази розраховували з використанням молярного коефіцієнту екстинкції, знайденого шляхом екстраполяції, за попередньо побудованим калібрувальним графіком. Коефіцієнт варіації методу – 3,6%.

Активність кислої фосфатази виражали в нкат/г тканини або нкат/мл рідини [5].

Отримані результати опрацювали за допомогою пакету статистичної обробки SPSS 11.0 [1].

Результати досліджень та їх обговорення. Показники активності різних форм маркерного лізосомального ферменту (кислої фосфатази) в тканинах рогівки, кон'юнктиви і сльозній рідині щурів при експериментальному гіпотиреозі наведені в **таблиці**.

Активність неседиментованої форми кислої фосфатази в рогівці тварин в умовах легкого ступеня гіпотиреозу підвищувалася до $69,07 \pm 3,76$ нкат/г, що склало 120,5%, у порівнянні з нормою ($57,32 \pm 3,56$ нкат/г) ($p < 0,05$). При вираженому ступені гіпотиреозу, активність ферменту зросла до $73,40 \pm 4,89$ нкат/г, що склало 128,1% по відношенню до норми ($p < 0,05$).

Активність седиментованої форми кислої фосфатази в рогівці тварин при легкому ступені гіпотиреозу знижувалася до $25,59 \pm 1,48$ нкат/г, що склало 81,3%, у порівнянні з нормою ($31,48 \pm 2,18$ нкат/г) ($p < 0,05$), а при вираженому ступені гіпотиреозу – зменшилася до $23,45 \pm 1,64$ нкат/г, що склало 74,5% по відношенню до норми ($p < 0,01$).

Відповідно до результатів, наведених у **таблиці**, активність неседиментованої форми кислої фосфатази в кон'юнктиві тварин з легким ступенем гіпотиреозу зростала до $93,24 \pm 6,08$ нкат/г, що склало 128,6%, у порівнянні з нормою ($72,50 \pm 5,47$ нкат/г) ($p < 0,05$). При вираженому ступені гіпотиреозу, активність цієї форми ферменту збільшилася до $105,63 \pm 7,82$ нкат/г, що склало 145,7% по відношенню до норми ($p < 0,01$).

Активність седиментованої форми кислої фосфатази в кон'юнктиві тварин з легким ступенем гіпотиреозу була знижена до $30,22 \pm 1,74$ нкат/г, тобто

75,2%, у порівнянні з нормою ($40,18 \pm 2,73$ нкат/г) ($p < 0,01$), а при вираженому ступені гіпотиреозу зменшувалася до $25,63 \pm 1,28$ нкат/г, що склало 63,8%, по відношенню до норми ($p < 0,001$).

Слід зазначити, що активність седиментованої форми кислої фосфатази в кон'юнктиві ока при вираженому ступені гіпотиреозу була на 15,2% нижчою, ніж у групі тварин з легким ступенем захворювання ($p < 0,05$).

У сльозній рідині активність вільної форми кислої фосфатази в умовах легкого ступеня гіпотиреозу підвищувалася до $7,08 \pm 0,45$ нкат/мл, що склало 125,3%, по відношенню до норми ($5,65 \pm 0,30$ нкат/мл) ($p < 0,05$). При вираженому ступені гіпотиреозу, активність кислої фосфатази збільшилася до $7,90 \pm 0,54$ нкат/мл, що склало 139,8%, по відношенню до норми ($p < 0,01$).

Загальний аналіз результатів наших досліджень відносно змін показників каталітичної активності різних форм кислої фосфатази, яка є маркерним лізосомальним ферментом, свідчить про те, що при моделюванні різних ступенів гіпотиреозу (легкого і вираженого), в тканинах переднього відділу ока проходить лабілізація лізосом. Саме цей процес призводить до збільшення деструкції лізосомальних гранул в тканинах рогівки й кон'юнктиви,

внаслідок чого внутрішньолізосомальний фермент (кисла фосфатаза) частково переходить в цитозоль. Ми робили відповідні висновки за співвідношенням зв'язаної (внутрішньолізосомальної) і вільної (та, що переходить у клітинний цитозоль) активності кислоти фосфатази.

Стосовно механізму лабілізації лізосомальних структур рогівки і кон'юнктиви при гіпотиреозі, на нашу думку, вирішальну роль у цьому, відіграє стан оксидативного стресу і, як наслідок, підсилення процесів пероксидації ліпідного компоненту мембран лізосом. Це, до певної міри, також підтверджується підвищенням рівня продуктів перекисного окислення ліпідів у тканинах переднього відділу ока при гіпотиреозі (суттєве збільшення концентрації малонного діальдегіду відзначається в кон'юнктиві на 70,5% – при легкому ступені, і на 85,6% – при вираженому ступені гіпотиреозу).

Висновки

1. Встановлено, що при експериментальному гіпотиреозі в тканинах переднього відділу ока (рогівці

та кон'юнктиві) проходить лабілізація лізосомальних мембран, що призводить до часткової деструкції цих внутрішньоклітинних органел. Це підтверджено істотним підвищенням активності вільної форми і зниженням активності зв'язаної форми кислоти фосфатази – маркерного лізосомального ферменту.

2. У тварин з експериментальним гіпотиреозом у сльозній рідині виявлено зростання показників активності кислоти фосфатази лізосомального походження. Ці результати можуть бути використані для розпрацювання лабораторно-діагностичного тесту при офтальмопатології у пацієнтів з гіпотиреозом.

Перспективи подальших досліджень. Представлені результати цієї роботи можна розглядати як підґрунтя для використання визначення активності кислоти фосфатази в сльозній рідині з діагностичною метою, а також як експериментальні передумови для застосування мембраностабілізуючих препаратів у лікуванні офтальмопатології у хворих на гіпотиреоз.

Література

1. Наследов А. SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках / А. Наследов // Спб.: Питер, 2005. – 416 с.
2. Павловська Г. Я. Сухий кератокон'юнктивіт у хворих з гіпотиреозом / Г. Я. Павловська, О. Б. Павлів, М. І. Павловський, С. Я. Пастер // Матеріали XIII з'їзду офтальмологів України, 21-23 травня 2014, Одеса, С. 37-38.
3. Павловський М. І. Вплив експериментального гіпотиреозу на рівень глутатіону в тканинах переднього відділу ока / М. І. Павловський, Я. І. Павловський // Acta Medica Leopoliensia. – 2015. – Vol. 21, № 3. – С. 84-88.
4. Babu K. Effect of Abnormal thyroid hormone changes in lipid peroxidation and Antioxidant imbalance in Hypothyroid and Hyperthyroid patients / K. Babu, I. A. Jayaraaj, J. Prabhaka // Int. J Biol. Med. Res. 2011. – Vol. 2(4). – P. 1122-1126.
5. Bergmeyer H. U. Methoden der enzymatischen Analyse. – Herausgegeben von / H. U. Bergmeyer. Berlin. – 1986, 2220 p.
6. Cano-Europa E. Methimazole-induced hypothyroidism causes alteration of the REDOX environment, oxidative stress, and hepatic damage; events not caused by hypothyroidism itself / E. Cano-Europa, V. Blas-Valdivia, G. E. Lopez-Galindo // Ann. Hepatol. – 2010. – Vol. 9(1). – P. 80-88.
7. Dias A. C. Influence of thyroid hormone on thyroid hormone receptor beta-1 expression and lacrimal gland and ocular surface morphology / A. C. Dias, C. M. Mydulio, A. G. Jorge, A. M. Braz // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2012. – Vol. 52(7). – P. 3038-3042.
8. Gatziofufas Z. Corneal topographical and biomechanical variations associated with hypothyroidism / Z. Gatziofufas, G. D. Panos, E. Brugnolli, F. Hafezi // J. Refract. Surg. – 2014. – Vol. 30(2). – P. 78-79.
9. Kumari S. N. Oxidative Stress in Hypo and Hyperthyroidism / S. N. Kumari, N. Sandhya, K. M. Damodara Gowda // Al. Ame en J Med. Sci. – 2011. – Vol. 4 (1). – P. 49-53.
10. Mohanty S. Diagnostic strategies for subclinical hypothyroidism / S. Mohanty, W. Amruthlal, G. C. Reddy // Indian J Clin. Biochem. – 2010. – Vol. 25(3). – P. 279-282.
11. Ortiz-Butron R. Mild thyroid hormones deficiency modifies benzodiazepine and mu-opioid receptor binding in rats / R. Ortiz-Butron, J. Pacheco-Rosado, A. Hernandez-Garcia // Neuropharmacology. – 2013. – Vol. 54(1). – P. 111-116.
12. Petruela M. Oxidative Stress and Antioxidant Status in Hypo- and Hyperthyroidism / M. Petruela, A. Muresan, I. Duncea // Antioxidant Enzymes Licensee InTech. – 2012. – Vol. 8. – P. 197-236.
13. Plummer C. E. Ocular manifestations of endocrine disease / C. E. Plummer, A. Specht, K. N. Gelatt // Compend Contin Educ. Vet. – 2013. – Vol. 31(12). – P. 733-743.
14. Shashikala P. Prevalence of dry eye in hypothyroidism / P. Shashikala // Int. J Clin. Cases Investigations. – 2013. – Vol. 5 (1). – P. 46-51.
15. Venditti P. Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues / P. Venditti, M. Balestrieri, S. Di Meo, T. De Leo // J Endocrinol. – 1997. – Vol. 155(1). – P. 151-157.
16. Villanueva I. The Role of Thyroid Hormones as Inductors of Oxidative Stress and Neurodegeneration / I. Villanueva, C. Alva-Sánchez, J. Pacheco-Rosado // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2013. – Vol. 13. – P. 1-15.
17. Yilmaz S. Oxidative damage and antioxidant enzyme activities in experimental hypothyroidism / S. Yilmaz, S. Ozan, F. Benzer, H. Canatan // Cell Biochem Funct. – 2003. – Vol. 21(4). – P. 325-330.

УДК 617.13-002: 577.175.4

ЛАБІЛІЗАЦІЯ ЛІЗОСОМАЛЬНИХ МЕМБРАН У ТКАНИНАХ ПЕРЕДНЬОГО ВІДДІЛУ ОКА ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГІПОТИРЕОЗІ

Павловський М. І., Дрожжина Г. І., Павловська Г. Я.

Резюме. Розповсюдженість гіпотиреозу підвищує актуальність цієї проблеми не лише для ендокринологів, а й для лікарів інших спеціальностей, зокрема для офтальмологів. У різних умовах експерименту на щурах були проведені дослідження з вивчення активності різних форм кислоти фосфатази. Встановлено,

що при експериментальному гіпотиреозі в тканинах переднього відділу ока (рогівці і кон'юнктиві) відбувається лабілізація лізосомальних мембран, що призводить до часткової деструкції цих внутрішньоклітинних органел. Це підтверджено істотним підвищенням активності вільної форми і зниженням активності зв'язаної форми кислоти фосфатази – маркерного лізосомального ферменту.

Ключові слова: гіпотиреоз, сльоза, рогівка, кон'юнктива, кисла фосфатаза.

УДК 617.13-002: 577.175.4

ЛАБИЛИЗАЦИЯ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ МЕМБРАН В ТКАНЯХ ПЕРЕДНЕГО ОТДЕЛА ГЛАЗА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГИПОТЕРИОЗЕ

Павловский М. И., Дрожжина Г. И., Павловская Г. Я.

Резюме. Распространенность **гипотиреоза** делает актуальной эту проблему не только для эндокринологов, но и для врачей других специальностей, в частности, офтальмологов. В различных условиях эксперимента на крысах были проведены исследования по изучению активности различных форм кислой фосфатазы. Установлено, что при экспериментальном гипотиреозе в тканях переднего отдела глаза (роговице и конъюнктиве) происходит лабилизация лизосомальных мембран, приводящая к частичной деструкции этих внутриклеточных органелл. Это подтверждено существенным повышением активности свободной формы и снижением активности связанной формы кислой фосфатазы – маркерного лизосомального фермента.

Ключевые слова: гипотиреоз, слеза, роговица, конъюнктива, кислая фосфатаза.

UDC 617.13-002: 577.175.4

LABILIZATION LYSOSOMAL MEMBRANES IN TISSUES OF THE ANTERIOR EYE IN EXPERIMENTAL HYPOTHYROIDISM

Pavlovskyy M., Drozhzhyna G., Pavlovskaya H.

Abstract. The problem of ocular manifestations of primary is relevant for ophthalmology in both practical and scientific standpoint. Elucidation of pathogenic mechanisms will contribute to the improvement of methods of diagnosis and treatment of pathological conditions of hypothyroidism of the eye, especially with regard to the so-called latent forms of hypothyroidism, when their diagnosis will be timely applied for preventive measures and early treatment of complications in the organ of vision. However, until now the mechanisms, underlying structural and functional disorders of the cornea, conjunctiva and lachrymal glands in hypothyroidism are unclear. All this makes it necessary to research in this area.

Examine the state of the membranes of lysosomes in the tissues of the angle of the anterior eye during experimental hypothyroidism.

There were used 42 animals, which were randomly divided into 3 groups: I group – control (14 rats), II group – experimental (14 rats), animals with mild (initial) stage of hypothyroidism, III group – experimental (14 rats) animals with severe stage of hypothyroidism. Hypothyroidism was caused by antithyroid drug Tiamazol, which experimental groups of animals received with drinking water (500 mg/l). In the simulation, the initial (mild) hypothyroidism animals received tiamazol for four weeks. Hypothyroidism expression modeling was performed for 10 weeks of treatment. Both groups of animals after the end of the simulation of hypothyroidism were withdrawn from the experiment using excess anesthesia with ethyl ether. To investigate the tissue taken from cornea and conjunctiva and tear fluid, which was collected from the animals prior to breeding experiment using a modified Schirmer test. The study measured the activity of tissues of different forms of acid phosphatase.

An overall analysis of our results of changes in performance of the catalytic activity of various forms of acid phosphatase, a marker of which is a lysosomal enzyme, shows that the simulation of different stages of hypothyroidism (initial and advanced) in the tissues of the eye occurs front labilization lysosomal membranes. This process leads to increased degradation of lysosomal granules in the tissues of the conjunctiva and cornea, where lysosomal enzyme (acid phosphatase) partially passes into the cytosol. This was judged by the ratio of bound (lysosomal) and free (passing into the cell cytosol) acid phosphatase activity. With regard to the mechanisms for identifying labilization lysosomal structures of the cornea and conjunctiva in hypothyroidism, in our opinion, the leading role played by the state of oxidative stress and, as a consequence, strengthening the processes of peroxidation of lipid components of membranes of lysosomes. To a certain extent also confirmed increased levels of lipid peroxidation products in the tissues of the anterior eye with hypothyroidism, as evidenced by the most significant increase in the concentration of malondialdehyde in the conjunctiva 70.5% is in the initial stages, 85.6% is in the severe stage of hypothyroidism.

It was found that in experimental hypothyroidism in the tissues of the anterior eye (cornea and conjunctiva) occurs labilization of lysosomal membranes, leading to the partial destruction of intracellular organelles. This was supported by a significant increase in the activity of free form and the bound form of reduced activity of acid phosphatase, what is a marker of lysosomal enzyme. In animals with experimental hypothyroidism was detected increase in tear fluid indicators of acid phosphatase activity of lysosomal origin. These data can be used to develop laboratory diagnostic tests at ophthalmopathology in patients with hypothyroidism.

Keywords: hypothyroidism, tears, cornea, conjunctiva, acid phosphatase.

Рецензент – проф. Безкоровайна І. М.

Стаття надійшла 06.11.2015 року