

КИСЛОРОДЗАВИСИМАЯ БИОЦИДНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ У КРЫС С ВОСПАЛЕНИЕМ В ПАРОДОНТЕ, ПРОТЕКАЮЩИМ НА ФОНЕ ГИПОТИРЕОЗА**Л. В. Вохминцева, С. С. Рымарь***Новосибирский государственный медицинский университет*

Для изучения влияния экспериментального гипотиреозидизма на кислородзависимую бицидность нейтрофилов у крыс с острой механической травмой мягких тканей десны был проведен спонтанный и индуцированный нитросиний тетразолиевый тест (НСТ-тест). Гипотиреозидизм у крыс достигался назначением 25 мг/кг мерказолила в течение 21 дня. Воспаление у крыс с острой травмой десны и гипотиреозидизмом приводило к снижению показателей спонтанного и индуцированного НСТ-теста, снижению уровней малонового диальдегида и глутатиона десны и повышению малонового диальдегида в сыворотке и глутатиона в гемолизате.

Ключевые слова: воспаление пародонта, гипотиреоз, нитросиний тетразолиевый тест.

OXYGEN-RELATED BIOCIDITY OF NEUTROPHILS IN RATS WITH PARODONTAL INFLAMMATION IN HYPOTHYROIDISM**L. V. Vokhmintseva, S. S. Rymar**

To study the effect of experimental hypothyroidism on oxygen-related neutrophils biocidity in a rat model of acute gingival trauma we investigated the spontaneous and stimulated nitroblue tetrazolium test. Hypothyroid state in rat was induced by administration of 25 mg/kg mercazolyl for 21 days. Inflammation in rats with acute gingival trauma and hypothyroidism leads to a reduction in spontaneous and stimulated nitroblue tetrazolium test, diminished levels of malondialdehyde and glutathione in gingival tissue, a decrease in serum malondialdehyde level and in hemolysate glutathione level.

Key words: parodontal inflammation, hypothyroidism, nitroblue tetrazolium test.

В последнее время нарушения функционально-го состояния щитовидной железы приобрели широкое распространение. Данные литературы свидетельствуют о частом поражении пародонта при дисфункции щитовидной железы, а степень и выраженность патологического процесса зависит от тяжести и длительности гипотиреоза [4]. Недостаточно полно изученная роль гормонов щитовидной железы в реализации функциональной активности клеток иммунной системы определила актуальность изучения особенностей течения воспаления на фоне гипотиреоза.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Поскольку динамика и исход воспалительного процесса во многом зависит от функциональной активности полиморфно-ядерных лейкоцитов, saniрующая активность которых в первую очередь обусловлена продукцией активных метаболитов кислорода [3], то целью настоящей работы явилось исследование влияния пониженной продукции тиреоидных гормонов на кислородзависимую бицидность нейтрофилов.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на самцах крыс Вистар массой (200 ± 20) г, полученных из вивария НГМУ, в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.77

№ 755). Животные находились на полноценном общевиварном рационе со свободным доступом к воде.

Гипотиреоз моделировали ежедневным введением *per os* с помощью специального зонда фармакопейного тиреостатика мерказолила («Акрихин», Россия) в дозе 25 мг/кг в течение 21 дня [2]. Полноту достижения гипотиреоза контролировали измерением концентрации трийодтиронина и тироксина в сыворотке крови.

Влияние гипотиреоза на течение воспалительного процесса изучали на модели воспаления, вызванного острой механической травмой мягких тканей десны [5]. Животным под эфирным наркозом с губной стороны параллельно зубному ряду в зубодесневую борозду в области верхних резцов на глубину 1,5 мм вводили металлический крючок. Операцию проводили на 14-е сутки после первого введения мерказолила. Через 1 и 7 суток после операции крысы декапитировали. Группами сравнения служили животные с экспериментальным гипотиреозом и крысы с острой механической травмой мягких тканей десны. Контролем служил материал от интактных животных.

Кислородзависимую бицидность нейтрофилов оценивали с помощью спонтанного НСТ-теста (сНСТ-тест) в модификации Д. Н. Маянского [1]. Результат выражали в процентах диформазан-положительных нейтрофилов от общего числа подсчитанных клеток. Для определения функционального резерва нейтрофилов использовали индуцированный НСТ-тест (зНСТ-

тест) [1], для этого в среду инкубации дополнительно добавляли суспензию зимозана (конечное разведение 10 мкг/100 мкл). Результат выражали в процентах диформазан-положительных нейтрофилов на 100 нейтрофилов и в единицах индекса стимуляции, который рассчитывали отношением значений зНСТ-теста к сНСТ-тесту.

Для приготовления гомогената образцы ткани десны растирали в фарфоровой ступке с предварительно истолченным стеклом при 4 °С и суспендировали в 9 объемах 0,25 М раствора сахарозы с 0,001М этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА), рН 7,4. Стекло и оставшиеся неразрушенные соединительно-тканые элементы удаляли центрифугированием (1000 об/мин в течение 3 мин) при охлаждении. Надосадочную часть гомогената десны использовали для определения содержания малонового диальдегида (МДА) и восстановленного глутатиона (GSH). Для приготовления гемолизата использовали осадок эритроцитов, который отмывали до исчезновения следов гемолиза холодным физиологическим раствором. Затем эритроцитарную массу разводили в 5 раз дистиллированной водой и оставляли на холоде при 4 °С на 30 минут. После центрифугирования (3000 об/мин) собирали надосадок, в котором определяли содержание восстановленного глутатиона.

Содержание GSH в гомогенате десны и гемолизате эритроцитов определяли методом I. Kagiw и K. S. Mirfit (1960). Концентрацию глутатиона выражали в гомогенате десны в мг/г, в гемолизате — в мг %. Содержание МДА оценивали по образованию триметинового комплекса при взаимодействии малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой (Gutteridge M. C., Tickner T. R., 1978). Концентрацию МДА выражали в сыворотке в мкмоль/л, в гомогенате — в мкмоль на 1 г белка. Содержание общего тироксина и общего трийодтиронина в сыворотке определяли методом иммуноферментного анализа с помощью наборов «Т₃-ИФА-Бест-стрип», «Т₄-ИФА-Бест-стрип» (ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ», Россия). Концентрацию гормонов выражали в нмоль/л. Содержание белка в гомогенате определяли по методу J. N. Lowry с соавт. (1951) и выражали в г/л.

При статистическом анализе данных использовались следующие показатели вариационной статистики: среднее арифметическое значение (*M*), стандартная ошибка среднего значения (*m*). Определенные достоверности различий сравниваемых параметров между разными выборками проводили с использованием непарного критерия Стьюдента (достоверным считали различия при $p < 0,05$) [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки функционального состояния щитовидной железы при моделировании гипотиреоза были определены концентрации тиреоидных гормонов в

крови. Содержание трийодтиронина через 14 дней с момента начала эксперимента было в 2,5 раза ниже показателей у интактных крыс и составило $(0,56 \pm 0,07)$ нмоль/л. Уровень тироксина был снижен в 3,5 раза и составил $(19,4 \pm 1,05)$ нмоль/л.

Сравнительное исследование кислородзависимой биоцидности нейтрофилов (табл. 1) не выявило различий в показателях сНСТ-теста у крыс с экспериментальным гипотиреозом и интактных животных, однако при стимуляции зимозаном количество диформазан-положительных нейтрофилов повысилось в меньшей степени у крыс с пониженной продукцией тиреоидных гормонов. Индекс стимуляции у крыс с гипотиреозом был на 13 % ниже ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Таблица 1

Показатели НСТ-теста у крыс с острой травмой десны

Условия опыта	сНСТ-тест	зНСТ-тест	Индекс стимуляции
Интактные ($n = 16$)	$14,40 \pm 1,41$	$26,10 \pm 2,51$	$1,81 \pm 0,09$
Гипотиреоз ($n = 16$)	$17,20 \pm 3,14^a$	$28,20 \pm 5,72$	$1,63 \pm 0,07^a$
Острая травма ($n = 12$)	1-е сутки	$26,70 \pm 0,82^a$	$1,44 \pm 0,06^a$
	7-е сутки	$17,30 \pm 0,61^c$	$1,59 \pm 0,05^a$
Острая травма + гипотиреоз ($n = 12$)	1-е сутки	$20,30 \pm 0,72^{ab}$	$1,40 \pm 0,02^a$
	7-е сутки	$12,60 \pm 2,52^{bc}$	$1,28 \pm 0,04^{abc}$

Примечание. Здесь и далее статистически значимые различия означены при сравнении: ^a различных экспериментальных воздействий с интактными животными, $p < 0,05$; ^b соответствующих показателей у крыс с острой травмой без гипотиреоза $p < 0,05$; ^c показателей на 7-е сутки от соответствующих показателей на первые сутки эксперимента $p < 0,05$.

Содержание МДА (табл. 2) в гомогенате десны не отличалось от контрольных показателей, тогда как в сыворотке крови концентрация МДА была в 1,8 раз ниже по сравнению с интактными крысами. Ряд авторов также показали снижение уровня МДА в сыворотке крови при гипотиреозе [8, 11].

Таблица 2

Содержание малонового диальдегида у крыс с острой травмой десны

Условия опыта	Гомогенат десны, мкмоль/г	Сыворотка, мкмоль/л
Интактные ($n = 16$)	$9,38 \pm 1,11$	$16,90 \pm 0,17$
Гипотиреоз ($n = 16$)	$9,25 \pm 1,83$	$9,25 \pm 0,30^a$
Острая травма ($n = 12$)	1-е сутки	$17,5 \pm 0,27^a$
	7-е сутки	$15,5 \pm 0,27^a$
Острая травма + гипотиреоз ($n = 12$)	1-е сутки	$10,3 \pm 0,44^b$
	7-е сутки	$13,1 \pm 0,64^{ab}$

Уровень GSH (табл. 3) в гомогенате десны у крыс с гипотиреозом был достоверно ниже и составил $(12,2 \pm 0,30)$ мг/г. Полученные данные согласуются с результатами исследований, свидетельствующими о снижении уровня GSH в различных тканях при гипо-

тиреозе [13, 14]. Определение GSH в гемолизате эритроцитов крыс с гипотиреозом также выявило более низкие его значения по сравнению с интактными животными.

Таблица 3

Содержание восстановленного глутатиона у крыс с острой травмой десны

Условия опыта	Гомогенат десны, мг/г	Гемолизат эритроцитов, мг%
Интактные (n = 16)	17,7 ± 1,13	9,5 ± 0,19
Гипотиреоз (n = 16)	12,18 ± 0,30 ^a	7,05 ± 0,26 ^a
Острая травма (n = 12)	1-е сутки	12,4 ± 0,32 ^a
	7-е сутки	11,5 ± 0,39 ^a
Острая травма + гипотиреоз (n = 12)	1-е сутки	7,35 ± 0,14 ^{a,b}
	7-е сутки	7,67 ± 0,13 ^{a,b}

Развитие воспаления в десне характеризовалось увеличением содержания активных нейтрофилов в периферической крови. На 1-е сутки от начала эксперимента показатели сНСТ-теста были выше на 85 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. В меньшей степени, на 48 % ($p < 0,05$) изменились показатели индуцированного НСТ-теста, индекс стимуляции составил $1,44 \pm 0,06$. Уменьшение индекса стимуляции отражает снижение функциональных резервов нейтрофилов, характерное для воспаления. На 7-е сутки с момента нанесения травмы показатели сНСТ-теста и зНСТ-теста снизились до уровня интактных крыс. Индекс стимуляции на 7-е сутки с момента нанесения повреждения оставался ниже контрольных значений ($1,40 \pm 0,02$, $p < 0,05$). В экспериментах *in vivo* и *in vitro* показано снижение продукции супероксидного анион-радикала на фоне гипотиреоза, что согласуется с полученными нами результатами [10, 12]. Снижение кислородзависимой биоцидности нейтрофилов сопровождалось посттравматическими нагноениями, процент которых к 7-м суткам в группе крыс с неизменным гормональным фоном составил 62,5 %.

Воспалительный процесс сопровождался развитием оксидативного стресса, характеризующегося увеличением содержания МДА как в ткани пародонта в очаге повреждения, так и в сыворотке крови (табл. 2). Наибольшее повышение уровня МДА наблюдали на первые сутки после нанесения острой травмы. Через 7 суток концентрация малонового диальдегида понизилась, но оставалась выше контрольных значений. Ряд авторов также показали снижение содержания МДА при гипотиреозе в воспалительном очаге в различных моделях [9, 15]. Определение GSH в гомогенате десны (табл. 3) показало снижение его содержания, начиная с первых суток эксперимента. К 7-м суткам концентрация GSH оставалась пониженной. В гемолизате эритроцитов крыс с острой травмой десны наблюдали тенденцию к повышению уровня глутатиона, и к 7-м суткам с момента нанесения травмы уровень GSH в гемолизате был выше исходных значений (табл. 3).

Исследование кислородзависимой биоцидности нейтрофилов периферической крови у крыс с воспалением, протекающим на фоне гипотиреоза, показало снижение интенсивности дыхательного взрыва в полиморфно-ядерных лейкоцитах. На всех сроках эксперимента значения как спонтанного, так и стимулированного НСТ-теста (табл. 1) были ниже таковых по сравнению с животными, у которых воспалительный процесс протекал без изменения гормонального фона. На первые сутки эксперимента у крыс с гипотиреозом показатели сНСТ-теста и зНСТ-теста были ниже в 1,31 раза и 1,35 раза соответственно. Индекс стимуляции в первые сутки с момента нанесения травмы не отличался в сравниваемых группах. Через 7 суток с момента нанесения повреждения десны у крыс с гипотиреозом показатели НСТ-теста снизились, что сопровождалось уменьшением индекса стимуляции до $1,28 \pm 0,04$. В этот срок эксперимента значения сНСТ-теста и зНСТ-теста были ниже в 1,37 раза и 1,7 раза по сравнению с животными, у которых воспаление протекало без нарушений гормонального фона.

Снижение продукции супероксидного анион-радикала НАДФН-оксидазой нейтрофилов у крыс с гипотиреозом сопровождалось также уменьшением уровня конечного продукта перекисного окисления липидов МДА как в гомогенате десны из очага повреждения, так и в сыворотке крови на всех сроках эксперимента (табл. 2). На первые сутки с момента нанесения раны уровень МДА в гомогенате десны у крыс с гипотиреозом был в 1,7 раза ниже по сравнению с животными с эутиреозом, в сыворотке крови — в 1,5 раза. На 7-е сутки эксперимента значения МДА в гомогенате десны у крыс с гипотиреозом были ниже на 15,5 %, в сыворотке крови — на 12,3 % по сравнению с животными, у которых воспаление протекало на фоне эутиреоза. Более низкие показатели НСТ-теста и уровня МДА у крыс с гипотиреозом сопровождалось уменьшением посттравматических нагноений в 1,5 раза. Содержание GSH (табл. 3) в гомогенате десны у крыс с гипотиреозом было ниже на 40,7 % и на 33,3 % (в первые и седьмые сутки после нанесения острой травмы соответственно) по сравнению с крысами, у которых воспаление протекало на фоне неизменного гормонального фона. Содержание GSH в гемолизате эритроцитов в этой группе было также более низким и составило в первые сутки — 6,12 мг %, на 7-е сутки — 5,40 мг %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты наших исследований, а также данные других авторов, полученные на разных экспериментальных моделях, показали, что гипотиреоидные крысы более устойчивы к оксидативному стрессу и тканевому повреждению, чем эутиреоидные животные [7, 9]. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что тиреоидный статус

оказывает влияние не только на продукцию активных метаболитов кислорода в организме, но и на активность антиоксидантной защиты. Наличие гипотиреоза у экспериментальных животных оказывает влияние на кислородзависимую биоцидность нейтрофилов и приводит к снижению их функциональных резервов. Воспалительный процесс, протекающий в пародонте у крыс на фоне гипотиреоза, характеризуется более низкими показателями hNCT-теста и zNCT-теста по сравнению с животными с эутиреозом. Снижение метаболических и оксидативных процессов в очаге повреждения при гипотиреозе сопровождается понижением уровня МДА и GSH как в очаге повреждения пародонта, так и в крови, что обуславливает уменьшение интенсивности повреждения тканей и более низкий уровень нагноительных процессов у крыс с острой травмой мягких тканей десны.

ЛИТЕРАТУРА

1. Диагностическая ценность лейкоцитарных тестов. II. Определение биоцидности лейкоцитов. Методические рекомендации / Под ред. Д. Н. Маянского. — Новосибирск, 1996. — 32 с.
2. Кузьмак Н. И. // Вопросы медицинской химии 1978. — Т. 246, № 1. — С. 52—56.
3. Маянский Д. Н., Урсов И. Г. Лекции по клинической патологии. Руководство для врачей. Новосибирск: Изд-во СО РАМН, 1997. — 249 с.
4. Москвина Т. С. // Стоматология. — 2001. — № 1. — С. 47—50.
5. Немирович О. В., Маянская Н. Н., Вохминцева Л. В. и др. // Сибирский консилиум. — 2001. — № 4. — С. 45.
6. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTIKA. — М.: Медиа Сфера, 2002. — 312 с.
7. Allen T., Rana S. V. // *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* — 2003. — Vol. 135. — P. 157—162.
8. Brzezinska-Slebodzinska E. // *Acta. Vet. Hung.* — 2003. — Vol. 51, № 3. — P. 343—351.
9. Isman C. A., Yegen B. C., Alican I. // *J. Endocrinol.* — 2003. — Vol. 177, № 3. — P. 471—476.
10. Marino F., Guasti L., Cosentino M., et al. // *Life Sci.* — 2006. — Vol. 78, № 10. — P. 1071—1077.
11. Messarah M., Boulakoud M.S., Boumendjel A., et al. // *C. R. Biol.* — 2007. — Vol. 330, № 2. — P. 107—112.
12. Mezosi E., Szabo J., Nagy E. V., et al. // *J. Endocrinol.* — 2005. — Vol. 185, № 1. — P. 121—129.
13. Mogulkos R., Baltaci A.K., Avdin L., et al. // *Acta Physiol. Hung.* — 2005. — Vol. 92, № 1. — P. 39—46.
14. Sener G., Kabasakal L., Atasov B. M., et al. // *J. Endocrinol.* — 2006. — Vol. 189, № 2. — P. 257—269.
15. Tenorio-Velazquez V. M., Barrera D., Franco M., et al. // *BMC Nephrol.* — 2005. — № 6. — P. 12.

Контактная информация

Вохминцева Лариса Вениаминовна — к.м.н., доцент кафедры биологической химии Новосибирского государственного медицинского университета, e-mail: vokhmintseva@yandex.ru