ПЛАН

ВСТУП……..3
РОЗДІЛ 1……..7
Ентеральний синдром у клінічному перебігу тиреотоксикозу……..……...7
РОЗДІЛ 2……10
МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ……...10
Визначення вмісту загального кальцію у сироватці крові……..……11
Визначення вмісту неорганічного фосфору в сироватці крові……..….12
Визначення вмісту кальцію, магнію, марганцю, міді, заліза, цинку в артеріях тонкої кишки……..……...12
Визначення загальних ліпідів……..……...12
Визначення вмісту гідропероксидів ліпідів (ГПЛ)……..……13
Визначення вмісту шиффових основ (ШО)……..……13
Підготовка гомогенатів тканин для визначення ферментативної активності……...14
Визначення супероксиддисмутазної (СОД) активності……..…14
Визначення глютатіонпероксидазної (ГП) активності……....15
Визначення вмісту води……..……16
Визначення об’єму інулінового простору……..……...16
Методи статистичної обробки експериментальних даних……..……16
РОЗДІЛ 3……18
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ……18
ВИСНОВКИ……...26
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ……...27
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ…….…….28

ВСТУП

Актуальність теми. Ендокринна патологія займає третє місце серед захворювань інших органів і систем. В її структурі перше місце посідають захворювання щитоподібної залози (ЩЗ); зокрема – дифузний токсичний зоб (ДТЗ), випереджаючи цукровий діабет (Караченцев Ю.І., 2001). Значна поширеність хворих на дифузний токсичний зоб (ДТЗ), відсутність чіткої уяви про деякі ланки патогенезу цього захворювання, не завжди задовільні результати хірургічного лікування та реабілітації хворих з означеною патологією, робить будь-яке дослідження цієї проблеми актуальним (Комиссаренко И. В. и соавт., 1998, Боровий Є. М., 1998).

Із усіх методів лікування, які використовуються для усунення надлишку тиреоїдних гормонів в організмі найшвидшим і надійним є хірургічний, який полягає у субтотальному видаленні патологічно зміненої ЩЗ (Брейдо И.С., 1989; Кирилов Ю.Б. и соавт., 1997; Комисаренко И.В., и соавт., 1998). Проте існують певні труднощі в досягненні адекватності передопераційної підготовки, забезпеченні гладкого перебігу післяопераційного періоду, ефективності реабілітації хворих.

Протягом останніх років вчені і практикуючі лікарі все більше звертають увагу на аутоімунний компонент у природі ДТЗ (Павловський М.П., Лукавецький О.В., 2000). Науковими дослідженнями доказано, що підвищена функція ЩЗ зумовлена наявністю тиреоїдстимулювальних антитіл або імуноглобулінів, які мають стимулюючий вплив на ЩЗ через рецептори тиреотропного гормону (Шевченко С.И. и соавт., 1995; Балаболкин М.И., 1997).

Науково доказаним фактом є те, що шлунково-кишковий тракт, особливо тонка кишка, є важливим імунним органом людини, який виконує індукційну та ефекторну функції (Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1997). При пошкодженнях шлунково-кишкового тракту різної природи спостерігаються порушення місцевого імунітету тонкої кишки (Іванова С.А., 2001), який відіграє важливу роль у патогенезі уражень дванадцятипалої кишки, стимуляції та гальмуванні регенераційних процесів. (Григорьев П.Я. и соавт., 1995; Крышень П.Ф., Пругло Ю.В., 1988).

Відомо, що тиреотоксикоз має патологічний вплив на всі органи та системи

організму. Не виключенням є зміни травної функції тонкої кишки в умовах надлишку тиреоїдних гормонів, які в літературі означені як тиреотоксична ентеропатія.

Порушення травної функції тонкої кишки, взагалі, і засвоєння вуглеводів та жирів, зокрема, є найменше вивченим розділом патогенезу та клініки тиреотоксичного зоба. Автори окремих робіт 60-70 років лише констатують факт порушення засвоєння вуглеводів та жирів у хворих на тиреотоксикоз.

Необхідно зазначити, що клінічні, лабораторні, морфологічні дослідження, присвячені проблемі токсичного впливу гормонів ЩЗ на шлунково-кишковий тракт, поодинокі, а отримані авторами результати — неоднорідні і суперечливі. Характерні для тиреотоксичного ентерального синдрому порушення процесів гідролізу і абсорбції змінюють клінічну картину тиреотоксикозу і доволі часто є причиною діагностичних помилок, що створює певні труднощі у лікуванні таких хворих (Чайка І.І. 1996). Тиреотоксична ентеропатія викликає значні зрушення обмінних процесів. Вивчення особливостей клінічної картини тиреотоксичного ентерального синдрому, корекція ентеральних порушень у комплексному лікуванні хворих на тиреотоксикоз, визначення реабілітаційних заходів має суттєве значення для покращання результатів лікування хворих на ДТЗ. Все це зумовлює актуальність вибраної теми.

Мета і завдання дослідження. Мета роботи — з'ясування ролі загальних порушень функції слизової оболонки тонкої кишки, зокрема фосфорно-кальцієвого обміну і місцевих змін у судинній стінці, що виникає за умов експериментального тиреотоксикозу.

Для досягнення цієї мети були поставлені наступні завдання:

1. Вивчити вплив надлишку тиреоїдних гормонів на морфологічну будову тонкої кишки в умовах експериментального тиреотоксикозу.
2. Дослідити зміни в судинах тонкої кишки при порушенні функції травлення в умовах експериментального тиреотоксикозу.
3. На основі отриманих результатів дослідження теоретично

обґрунтувати патогенетичну медикаментозну корекцію ентерального синдрому у хворих на тиреотоксикоз з метою впровадження її в практику.

Об'єкт дослідження. Тиреотоксичний ентеральний синдром і шляхи його корекції у хворих на тиреотоксикоз.

Предмет дослідження. Тонка кишка в умовах експериментального тиреотоксикозу у хворих на тиреотоксичний зоб, ускладнений ентеральними розладами. Корекція лікування тиреотоксичного ентерального синдрому і її роль в ефективності реабілітації хворих на тиреотоксичний зоб.

Методи дослідження. Біохімічні, фотометричні, статистичні**.**

Наукова новизна одержаних результатів

В умовах експерименту вивчено патоморфологічні зміни тонкої кишки при екзогенному тиреотоксикозі. Показано, що гіпертиреоз значно погіршує травну функцію тонкої кишки і зумовлює патологічні зміни в її морфологічній будові: деструкцію мікроворсинок апікальної поверхні епітеліоцитів, руйнування органел цитоплазми, гіперкальцинацію судинної стінки, некроз судинної стінки, набряк міжклітинної речовини, скупчення плазмоцитів, розширення гранулярної ендоплазматичної сітки, а також викликає ендогенну інтоксикацію.

Доведено, що тиреотоксична ентеропатія має структурно-функціональне підґрунтя, перебудова структури слизової оболонки тонкої кишки є морфологічною підставою тиреотоксичного ентерального синдрому.

Науково обґрунтовано доцільність медикаментозної корекції ентерального синдрому у хворих на тиреотоксикоз.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані нами результати можуть бути підґрунтям для використання в патогенетичній корекції лікування ентерального синдрому на тиреотоксикоз в клінічних умовах.

Особистий внесок автора. Автор опрацював 17 літературних джерел по проблемних питаннях тиреотоксичного ентерального синдрому з метою встановлення характеру, глибини морфофункціональних змін тонкої кишки у

хворих на тиреотоксичний зоб і застосування ефективної корекції ентеральних розладів.

Автор самостійно брав участь у лабораторних, фотометричних, біохімічних дослідженнях, та провів аналіз і узагальнення результатів виконаних досліджень, сформулював усі положення і висновки.

Обсяг і структура наукової роботи. Наукова робота викладена на 29 сторінках машинописного тексту і складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, аналізу і узагальнення результатів досліджень, висновків, практичних рекомендацій та ілюстрована 5 рисунками і 5 таблицями. В роботі використано 17 джерел літератури.

РОЗДІЛ 1
ТИРЕОТОКСИКОЗ І ШЛУНКОВО-КИШКОВИЙ ТРАКТ
1. 1 Ентеральний синдром у клінічному перебігу тиреотоксикозу

Тиреотоксикоз відноситься до числа найбільш поширених і в той же час недостатньо вивчених захворювань. Саме ця обставина дозволяє рахувати його подальше вивчення актуальним.

Тиреотоксикоз характеризується великим поліморфізмом та мінливістю симптомів [2]. Діапазон клінічних проявів тиреотоксикозу широкий – від легкого нервозу зі збільшенням щитовидної залози до найважливіших соматичних порушень із розвитном незворотніх змін у внутрішніх органах [1].

Дія надлишку тиреоїдних гормонів на органи шлунково-кишкового тракту залишається мало вивченим питанням. Дані авторів в цій галузі малочисельні та інколи суперечливі, що сповільнює вирішення даної проблеми.

В монографії І. О. Мельника [9] про функціональний стан шлунка, підшлункової залози і печінки при ендемічному зобі надається доказ зв’язку ураження щитовидної залози та травної системи, який заснований на спеціальних дослідженнях клініко-лабораторного порядку, що є цінним і цікавим. Автор показав, що при вираженому ендемічному зобі достатньо часто бувають порушення в системі травлення і по частоті й глибині вони конкурують з серцево-судинними розладами при ньому. І. О. Мельник висловлює припущення, що незначна в окремих випадках ефективність йодної терапії може залежати, зокрема, і від порушення всмоктування йоду.

Під впливом надлишку тиреоїдних гормонів страждають всі функції печінки: білоксинтетична, глікогенсинтетична. Вміст холестерину в крові зменшений тому, що процеси розпаду холестерину переважають над його синтезом [17].

Тиреоїдні гормони є досить сильним регулятором різних видів обміну в організмі. Вони впливають на синтез нуклеїнових кислот і білків, обмін вуглеводів та ліпідів [7].

Порушення вуглеводного обміну супроводжує захворювання щитовидної залози, що проявляються гіпертиреоїдизмом. Це підтверджено багатьма експериментальними і клінічними спостереженнями, причому, у відношенні вуглеводного обміну, направленість ефекту тиреоїдних гормонів протилежна дії інсуліну [9].

Надлишок тиреоїдних гормонів в організмі протягом тривалого часу викликає виражені порушення вуглеводного обміну, ступінь прояву яких залежить від тривалості і важкості перебігу захворювання. При гіпертиреозі змінюється також обмін ліпідів, що пов’язано безпосередньо з порушенням у вуглеводному обміні і зумовлено як дією надлишкової кількості тиреоїдних гормонів, так і змінами рівня та ефективності дії інсуліну, соматостатину, глюкокортикоїдів, катехоламінів і інших гормонів [11].

Часто у хворих гіпертиреозом виявляються зміни вуглеводного обміну, які проявляються збільшенням толерантності до глюкози в процесі перорального та внутрішньовенного глюкозотолерантного тестів і більш вираженому збільшенні рівня інсуліну при цьому, а також в порушенні форми кривої секреції інсуліну, гіпрглікемії натще, посиленні утилізації глюкози адипоцитами [2].

Відомо, що порушення функціонального стану щитовидної залози у людини і тварин супроводжується глибокими змінами ліпідного обміну [12]. Розвиток гіпертиреозу призводить до підвищення ліполітичної активності жирової тканини і печінки, а також активності ліпопротеїдліпази і лецитинхолестеринацилтрансферази, до зниження рівня холестерину і триацилгліцеринів в сироватці хворого [5]. Відновлення функціонального стану щитовидної залози й досягнення еутиреозу призводить до нормалізації ліпідного обміну. Слід відмітити, що ці дослідження проведені в основному на рівні сироватки крові або цілої тканини, і, безумовно, не дають можливості виявити механізм дії тиреоїдних гормонів на ліпідний метаболізм клітини [10].

Ліпідний стан мембран клітин-мішеней та ліпідний обмін в цілому залежать від дії тиреоїдних гормонів і функціонального стану щитовидної залози. Тиреоїдні гормони регулюють обмін ліпідів (синтез ліпідів de novo, елонгацію, десатурацію

жирних кислот і їх окислення, обмін окремих компонентів мембранних ліпідів, транспорт ліпідів і т.п.) [12].

Як бачимо, порушення функції щитовидної залози, безперечно, відображається на проміжному обміні. Зміна ж функціонального стану органів шлунково-кишкового тракту при патології щитовидної залози посилює всю важкість протікаючих в живому організмі видів обміну речовин.

Отже, як свідчать дані літератури, тиреотоксикоз не є захворюванням тільки щитовидної залози. Це хвороба всього організму. Надлишок тиреоїдних гормонів має згубний вплив на всі системи організму, в тому числі на травну систему і проміжний обмін. Розбіжність результатів досліджень деяких авторів щодо функціонального стану органів і систем організму зумовлена, очевидно, тим, в якій стадії захворювання були хворі. Вірогідно, що в початковій стадії функціональний стан органів і систем організму підвищується. У випадках же довготривалої тиреоїдної інтоксикації вона згубно діє на центральну нервову систему, серцево-судинну систему, травний тракт. Безумовно, що в лікуванні хворих на тиреотоксикоз, необхідно враховувати наявні зміни з боку органів і систем організму і проводити їх відповідну медикаментозну корекцію.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для вирішення поставлених експериментальних завдань дослідження нами виконано на 53 щурах обох статей віком 3-6 місяців, масою 100 - 250 г. Тварин утримували у стандартних умовах віварію. Досліди проводили відповідно до "Правил проведення робіт із експериментальними тваринами" з дотриманням Міжнародних принципів „Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей" (Страсбург, 18 березня 1986 р.) [10].

Розподіл тварин по серіях дослідів наведено в табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Розподіл експериментальних тварин (щурів) по серіях дослідів

№	*Умови експерименту*	*Кількість тварин*	*Вивчені показники*
1	Контроль	18	Вміст Са і P_i у сироватці крові; Са, Mg, Mn, Cu, Fe, Zn у тканинах артерій; ОІП, вміст ГПЛ, ШО, води, активність СОД, КТ, ГПв артеріальній стінці
2	Тиреоїдин дозою 1г на 1кг маси тварини	17	Вміст Са і P_i у сироватці крові, вміст ГПЛ, ШО; активність СОД, КТ, ГП в артеріальній стінці
3	Тиреоїдин протягом 7 діб дозою 1г на 1кг маси тварини	18	Вміст Са і P_i у сироватці крові; Са, Mg, Mn, Cu, Fe, Zn у тканинах артерій; ОІП, вміст ГПЛ, ШО, води, активність СОД, КТ, ГП в артеріальній стінці

Експериментальний тиреотоксикоз викликали за загальноприйнятим методом за допомогою внутрішньо шлункового введення тиреоїдину протягом 7 діб дозою 1г на 1кг маси тварини. Препарат вводили щоранку о 6:30 перед годуванням у вигляді водяної суспензії. Тварин контрольних та досліджуваних груп утримували у віварії в

однакових умовах. Через 24 години після останнього введення препарату щурів забивали шляхом декапітації й одразу проводили забір матеріалу для досліджень. Об'єктами вивчення були: сироватка крові, шматочки стінки початкового, середнього та термінального відділів тонкої кишки.

Кров після забою тварин збирали у стерильну пробірку та отримували сироватку шляхом центрифугування при 3000 об/хв протягом 10 хв [7].

Судини тонкої кишки виділяли після розкриття черевної порожнини. Ретельно відділяли від адвентиції та прилеглої жирової тканини, відмивали у фізіологічному розчині, висушували фільтрувальним папером і визначали масу.

Вибір методик дослідження був продиктований метою роботи – з'ясування ролі загальних порушень функції слизової оболонки тонкої кишки, зокрема фосфорно-кальцієвого обміну і місцевих змін у судинній стінці, що виникає за умов експериментального тиреотоксикозу. Відповідно до цього в роботі використано дві групи методик. Першу – склали ті, що дозволяють оцінювати загальний стан фосфорно-кальцієвого обміну в організмі (відповідні показники сироватки крові і кісток). Друга група охоплювала методики, що дають змогу характеризувати стан артеріальної стінки з огляду розвитку в ній ранніх дисторофічних змін та відкладання солей кальцію (вміст води, ОІП, показники ПОЛ, активність антиоксидантних ферментів, ЛФ, екто-АТФази, вміст кальцію, магнію та деяких мікроелементів, гістологічні препарати).

В роботі використано такі методики.

1. Визначення вмісту загального кальцію у сироватці крові

Концентрацію загального кальцію у сироватці крові визначали колориметричним методом, що ґрунтується на утворенні забарвлених комплексів кальцію з металохромогенним арсеназо III, що має велику спорідненість до кальцію, унаслідок чого присутність у реакційному середовищі інших катіонів майже не заважає проведенню аналізу в сироватці крові. Для цього використовували набір реагентів "Кальцій-Ново" фірми "Вектор-Бест" (Росія). Інтенсивність забарвлення проб визначали на спектрофотометрі СФ-26.

2. Визначення вмісту неорганічного фосфору в сироватці крові

Вміст неорганічного фосфату в сироватці крові оцінювали фотометрично за утворенням молібденової сині в присутності молібдату амонію і відновлювача – аскорбінової кислоти [16].

3. Визначення вмісту кальцію, магнію, марганцю, міді, заліза, цинку в артеріях тонкої кишки

Виділені тканини зважували і висушували в сушильній шафі при температурі 105 °С до постійної ваги протягом 2 діб. Сухі зразки тканин спалювали у муфельній печі при t = 450 °С до стану гомогенного сірого попелу постійної маси протягом 3 діб. Зразки окиснювали концентрованою азотною кислотою при 70-95 °С, надлишок кислоти випарювали. Мінеральні елементи проб переводили у розчинний стан додаванням 0,5 мл 20 % соляної кислоти; розчин розводили бідистильованою водою до об'єму 10 мл. Аналіз вмісту потрібних хімічних елементів у розчинах проб проводили на спектрофотометрі С-115-М-1 в атомно-абсорбційному режимі при довжині хвилі: Ca – 422,2 нм, Mg – 285,0 нм, Cu – 324,4 нм, Zn – 213,6 нм, Fe – 248,6 нм, Mn – 279,5 нм. Калібрувальні графіки будували на основі стандартних розчинів відповідних хімічних елементів ГСОРМ 21-29, розведених до відомих концентрацій.

4. Визначення загальних ліпідів

Для визначення вмісту ГПЛ і ШО у стінках кровоносних судин проби тканин фіксували в рідкому азоті. Препарати подрібнювали і отримували нефракціоновані гомогенати тканин. Для розрахунку вмісту ГПЛ і ШО на 1 мг ліпідів отримували загальний ліпідний екстракт з тканин кровоносних судин за J. Folch у модифікації E.G.Bligh та W.J.Dyer [7,16].

Для екстракції ліпідів використовували однофазну систему розчинників хлороформ-метанол-вода у співвідношенні за об’ємом 1 : 2 : 0,8, яка дозволяє ефективно і швидко вилучати ліпіди з гомогенату. Додаючи до екстракту воду і хлороформ у співвідношенні за об’ємом 1 : 1, отримували двофазну систему, нижній шар якої складається з хлороформу, а верхній – із суміші метанолу і води (1 : 0,9). Водорозчинні неліпідні домішки переходили у водно-метанольний шар, а в хлороформному шарі залишались ліпіди, практично вільні від домішок.

Для визначення загальних жирів у отриманому ліпідному екстракті використовували стандартний розчин (вміст ліпідів 8 г/л) і фосфованіліновий реактив. Принцип методу ґрунтується на здатності ненасичених жирових кислот (у складі фосфоліпідів та інших ліпідів) після гідролізу сірчаною кислотою взаємодіяти з фосфованіліновим реактивом з утворенням комплексу червоного кольору. Гідроліз ліпідів проводили у тонкостінних пробірках протягом 15 хв. на водяній бані. Оптичну густину проб визначали не пізніше 60 хв. з часу внесення фосфованілінового реактиву, її вимірювання здійснювали відносно контрольного (стандартного) розчину при довжині хвилі 540 нм.

Розрахунок вмісту загальних ліпідів (ЗЛ) проводили за формулою:

ЗЛ (г/л) = $А_{досл.}$ / $А_{контр.}$ · 8 , де $А_{досл.}$ – оптична густина досліджуваної проби,

$А_{контр.}$ – оптична густина контрольної проби (стандартного розчину).

5. Визначення вмісту гідропероксидів ліпідів (ГПЛ)

У процесі ПОЛ в молекулах ліпідного субстрату, що окиснюється, утворюються спряжені подвійні зв'язки. Принцип методу ґрунтується на здатності дієнових кон'югатів – проміжних продуктів ПОЛ, що утворюються, - зумовлювати максимум поглинання у спектрі ультрафіолетового (УФ) оптичного випромінення за довжини хвилі 232-234 нм [9].

З гомогенатів кровоносних судин ліпіди екстрагували 17 об'ємами хлороформ-метанолової суміші (2:1) протягом 10 хв. при 4°С. Екстракт фільтрували і потім тричі відмивали від неліпідних домішок 1/7 об'єму води. Метанольну фазу додатково екстрагували хлороформом. Об'єднаний екстракт упарювали у вакуумі.

Накопичення ГПЛ у полієнових ліпідах тканин кровоносних судин оцінювали спектрофотометрично за характерним для дієнових кон'югатів УФ-спектром поглинання розчину ліпідів у метанол-гексані (5:1). Коефіцієнт молярної оптичної густини при максимальній довжині хвилі 232 нм брали таким, що дорівнює $2{,}1 \cdot 10^4$ моль$^{-1}$ см$^{-1}$. Вміст ГПЛ виражали у нмоль на 1 мг ліпідів [16].

6. Визначення вмісту шиффових основ (ШО)

При взаємодії коротколанцюгових діальдегідів з аміногрупами фосфоліпідів утворюються ШО (кінцеві продукти ПОЛ). Вміст ШО у стінках кровоносних судин

визначали за допомогою флюоресцентного аналізу. Результатом реакції малонового діальдегіду з донорами аміногруп є утворення 6π-електронної кон'югованої системи 1-аміно-3-імінопропенової групи, яка має флюоресцентні властивості [9].

Гомогенат проб тканин готували в хлороформ-метанольній суміші (2:1), потім його розводили бідистильованою водою та інтенсивно збовтували. Після центрифугування суміші отриманий екстракт розводили метанолом (10:1) і проводили спектрофлюориметрію (максимум збудження флюоресценції – 360 нм, максимум випромінення – 420 – 440 нм). Для калібрування приладу перед кожною серією вимірювань використовували стандартний розчин сульфату хініну (1 мкг/мл в 0,1 н H_2SO_4) [102]. Вміст ШО виражали у відносних одиницях на 1 мг ліпідів [15,16].

7. Підготовка гомогенатів тканин для визначення ферментативної активності

Для визначення глютатіонпероксидазної (ГП), супероксиддисмутазної (СОД) і каталазної (КТ) активності готували гомогенати досліджуваних тканин у співвідношенні тканина / буферний розчин = 1 / 9. Для визначення активності ГП і СОД проби гомогенізували в 50 мМ фосфатному буфері (pH = 7,4), а для визначення активності КТ – у 50 мМ трис-HCl-буфері (pH = 7,8).

8. Визначення супероксиддисмутазної (СОД) активності

СОД є антиоксидантним ферментом, що каталізує реакцію дисмутації:

$$^{\bullet}O_2^- + {}^{\bullet}O_2^- + 2H^+ = H_2O_2 + O_2.$$

Активність СОД у тканинах кровоносних судин визначали за методом R. Fried (Fried R., 1975). Під час реакції феназинметасульфату (ФМС) з відновленою формою НАД (НАДН) утворюються супероксидні радикали, які відновлюють нітротетразолій синій (НТС) до нітроформазану. Принцип методу ґрунтується на здатності СОД інактивувати супероксидні радикали, і, як наслідок, інгібувати процес відновлення НТС.

Пробірки з гомогенатами тканин центрифугували 30 хв. при 4000-5000 об./хв. 0,1 мл супернатанту вносили в інкубаційну суміш, що містила 1 мг желатину, 37 мг ЕДТА-Na_2 (1 мкМ/л), 330 мг НТС (0,407 мМ/л), 55 мг ФМС (1,8 мкМ/л) та 0,1 мл 1

мМ/л НАДН. Загальний об'єм суміші доводили 0,15 М фосфатним буфером (pH = 7,8) до 3 мл. Інкубацію проводили 20 хв. в аеробних умовах у темноті при t = 20-22°С. Величину оптичної густини досліджуваних проб через 10 хв. вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 540 нм відносно контрольної проби, що містить усі компоненти інкубаційного середовища за винятком НАДН. Розрахунок проводили за формулою:

($E_{контр.} – E_{досл.}$) / $E_{контр.}$ · 100 = % блокування утворення нітроформазану, де $E_{контр.}$ – оптична густина контрольної проби, $E_{досл.}$ - оптична густина досліджуваної проби.

Активність СОД виражали в умовних одиницях на 1 мг білка. За одну умовну одиницю активності СОД брали 50% інгібування процесу відновлення НТС [5]. Вміст білка визначали за Lowry.

9. Визначення глютатіонпероксидазної (ГП) активності

ГП є антиоксидантним ферментом, що каталізує реакції інактивації H_2O_2 і гідропероксидів ліпідів (ROOH) при їх взаємодії з відновленим глютатіоном (ГН):

$$H_2O_2 + 2ГН = 2H_2O + Г\text{-}S\text{-}S\text{-}Г$$

$$ROOH + 2ГН = ROH + Г\text{-}S\text{-}S\text{-}Г + H_2O$$

Активність ГП у стінках кровоносних судин визначали за методом Pinto і Bartley у модифікації Кругликової Г.А. та Штутман Ц.М.[5,15]. Як субстрат для реакції використовували H_2O_2. Принцип методу полягає у відновленні пероксиду гідрогену за допомогою глютатіону в присутності ГП.

Для визначення глютатіонпероксидазної активності 2 мл гомогенату тканин кровоносних судин додавали до суміші, що містила 0,5 мл 0,25 моль/л трис-буфера (pH=7,4); 0,1 мл 0,025 моль/л ЕДТА; 0,1 мл 0,4 моль/л азиду натрію; 0,3 мл 0,05 моль/л відновленого глютатіону та 0,1 мл 0,05 моль/л H_2O_2. Після додавання H_2O_2 через 1 хв. реакцію зупиняли внесенням 1 мл 10% розчину метафосфорної кислоти. Для визначення кількості відновленого глютатіону в центрифугаті використовували дитіонітробензойну кислоту [5,15,16]. Активність ГП оцінювали за різницею між кількістю відновленого глютатіону в контрольній (без H_2O_2) та досліджуваній пробах і виражали в мкмоль відновленого глютатіону за 1 хв. на 1 г білка. Білок визначали за Lowry.

10. Визначення вмісту води

Вміст води у стінках кровоносних судин та інших тканинах є показником ступеню їх набряку, що виникає за умов дії різних ушкоджувальних чинників та порушень обміну речовин, і характеризує сумарну кількість внутрішньо- та позаклітинної води в тканинах. Вміст води у зразках артерій визначали, фіксуючи зміну ваги зразка тканини при його повному висушуванні до постійної ваги в сушильній шафі при температурі 105°С.

11. Визначення об'єму інулінового простору

ОІП є показником, прямо пропорційним об'єму інтерстиціальної рідини, ступеню проникності клітинних (плазматичних) мембран та інтенсивності загибелі клітин даної тканини.

ОІП визначали шляхом інкубації поздовжніх смужок кровоносних судин протягом 30 хв. у розчині Кребса з інуліном (0,25%). Проби тканин з поглиненим інуліном відмивали у чистому розчині Кребса протягом 90 хв. Кількість інуліну, що перейшла з тканин до розчину, визначали дифеніламіновим методом. Паралельно ставили контроль на інуліноподібні речовини, які відмивали з інтактних тканин. Розрахунок величини ОІП, об'єму внутрішньо- та позаклітинної води проводили за Н.А.Виноградовою [11,16].

12. Методи статистичної обробки експериментальних даних

Математичну обробку отриманого цифрового матеріалу здійснювали на персональному комп'ютері Celeron 667 з використанням стандартних пакетів прикладних програм Microsoft Excel 98. Статистичне опрацювання експериментальних даних проводили, використовуючи параметричні і непараметричні критерії.

Для розрахунку параметричних критеріїв статистики визначали середню арифметичну варіаційного ряду (M) і середню похибку середньої арифметичної (m). Визначення достовірності відмінностей між двома вибірками проводили за допомогою критерію Стьюдента (t). На основі величини t і кількості ступенів свободи ($l = n_1 + n_2 - 2$) по таблиці розподілу Стьюдента знаходили вірогідність

відмінностей двох виборок (p). Відмінність вважали достовірною, якщо вірогідність випадкової різниці не перевищувала 0,05 ($p < 0,05$) [5].

Розрахунок непараметричних критеріїв статистики здійснювали для оцінки відмінностей у середніх тенденціях і незалежних вибірках: визначали критерій Вілкоксона-Манна-Уїтні (критерій U) та застосовували точний метод Фішера для чотирипольної таблиці (ТМФ) [3]. Використання непараметричних статистичних критеріїв дозволяло знаходити достовірні відмінності в тих випадках, коли критерій t їх не виявляв.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Згідно літературних даних стосовно тиреотоксичних уражень судин слизової оболонки тонкої кишки до цього часу немає одностайної думки про провідний механізм патогенезу кальцифікації судинної стінки. З одного боку, інтоксикація тиреоїдином супроводжується розвитком гіперкальціємії і гіперфосфатемії, тобто чинників, що зумовлюють метастатичний варіант мінералізації м'яких тканин. З іншого боку, у багатьох роботах показано, що тиреотоксикоз призводить до ушкодження клітин і позаклітинного матриксу артеріальних судин, що само по собі може бути основою дистрофічної кальцифікації [10,17].

Серед універсальних механізмів ушкодження клітин чільне місце посідає ПОЛ – процес вільнорадикального окиснення ненасичених жирових кислот, що входять до складу фосфоліпідів клітинних мембран. Відомо, що в основі активації ПОЛ можуть лежати два механізми: посилене генерування первинних вільних радикалів (здебільшого кисневих) і недостатність антиоксидантних систем [8,13].

Найімовірнішою причиною ініціювання ПОЛ у тварин тиреотоксикозом є посилене генерування вільних радикалів і пероксидних сполук. Згідно літературних даних ці сполуки при накопиченні в тканинах можуть ставати джерелом вільних радикалів і пероксидів. Якщо потужність наявних систем антиоксидантного захисту буде недостатньою, щоб "погасити" реакції вільнорадикального окиснення, то процес набуває ланцюгового і незворотного характеру та стає чинником ушкодження клітинних мембран, білків та інших біологічних молекул.

У проведених нами дослідженнях було вивчено вміст проміжних (гідропероксиди ліпідів) і кінцевих (шиффові основи) продуктів ПОЛ в тканинах аорти щурів у динаміці гострої інтоксикації тиреоїдином.

Як випливає з наведених в табл. 3.1 і на рис. 3.1 даних, тиреотоксикоз супроводжується значним збільшенням вмісту гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) в артеріальній стінці експериментальних тварин. Так, вже через 3 доби від початку введення тиреоїдину вміст ГПЛ у тканинах артерій був у 3,3 рази більший, ніж у

контрольній групі, а через 7 діб він перевищував контрольні величини більш ніж у 7 разів.

Схожа картина характерна і для іншого показника ПОЛ (табл. 3.1, рис. 3.2). Зростання вмісту шиффових основ в тканинах артерій тонкої кишки тиреотоксичних щурів становило 2,6 рази через 3 доби експерименту і 6,4 разів – через 7 діб.

Таким чином, є всі підстави констатувати, що гостра інтоксикація тиреоїдином супроводжується активацією ПОЛ в артеріальних судинах, про що свідчить значне зростання в їх тканинах вмісту проміжних (гідропероксиди ліпідів) і кінцевих (шиффові основи) продуктів цього процесу.

Таблиця 3.1

Вміст продуктів ПОЛ в артеріальній стінці тонкої кишки щурів за умов уведення високих доз тиреоїдину *(M±m, n=6 у кожній групі)*

Показник	*Контроль (I група)*	*Тиреоїдин*	
		3 доби (II група)	*7 діб (III група)*
Гідропероксиди ліпідів (нмоль/мг ліпідів)	1,63 ± 0,3	5,42 ± 0,9*	12,05 ± 0,9*▲
Шиффові основи (відн. од./мг ліпідів)	8,8 ± 0,11	22,6 ± 1,98*	56,37 ± 4,62*▲

Примітка: * – статистично достовірні розбіжності відносно контролю (p<0,001);

▲ – між II і III групами тварин (p<0,001).

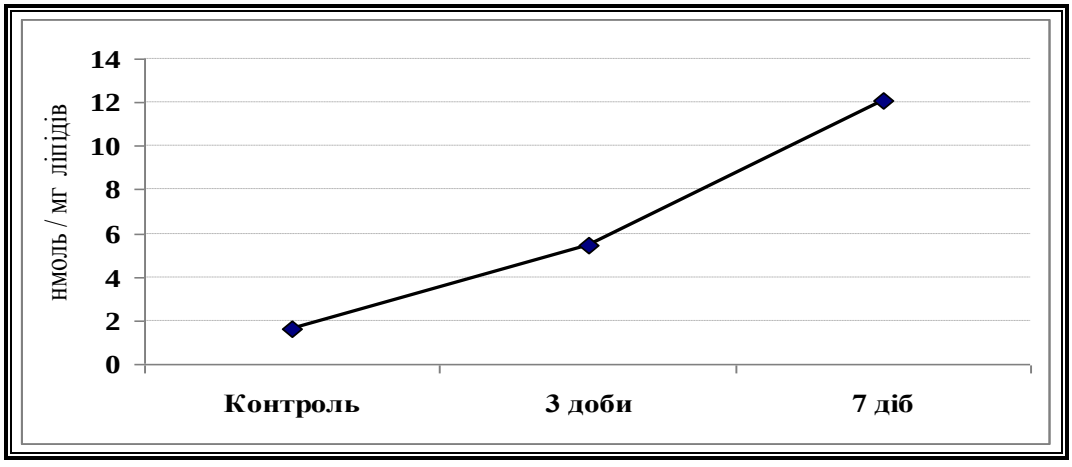

Рис. 3.1. Динаміка накопичення гідропероксидів ліпідів у тканинах артерій тонкої кишки щурів за умов тиреотоксикозу

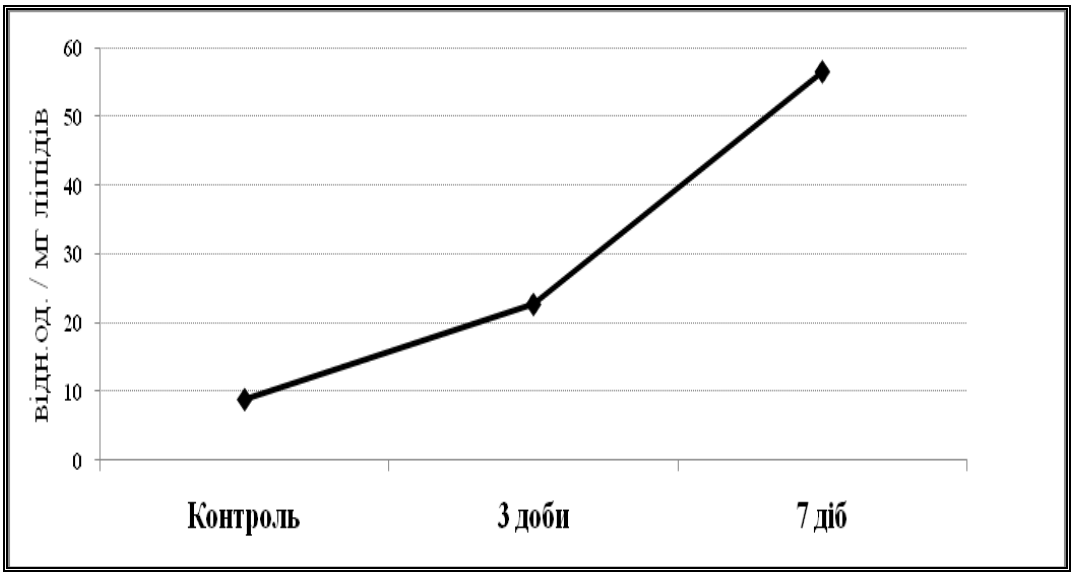

Рис. 3.2. Динаміка накопичення шиффових основ у тканинах артерій тонкої кишки щурів за умов тиреотоксикозу

Виявлена нами активація ПОЛ може бути пов'язана не тільки з посиленим первинним генеруванням вільних радикалів і пероксидних сполук, а й з недостатністю систем антиоксидантного захисту. У судинній стінці такими є антиоксидантні ферменти, серед яких глютатіонпероксидаза (ГП), супероксиддисмутаза (СОД) і каталаза (КТ).

У табл. 3.2 наведено результати досліджень активності цих ферментів у тканинах артерій щурів, що отримували високі дози тиреоїдину. Привертає до себе увагу те, що активність усіх трьох вивчених ферментів істотно падає упродовж семи днів експерименту.

Так, найбільш стрімким є падіння активності ГП (рис. 3.3): через 3 доби від початку введення тиреоїдину активність цього ферменту складала 44%, а через 7 діб – 32% від контрольних величин.

Схожі зміни відбувалися з іншим антиоксидантним ферментом – СОД (рис. 3.4). Його активність через 3 доби експерименту падала більш ніж удвічі, а через 7 діб складала 31,5%, якщо порівнювати з відповідним показником у контролі.

Менш вираженим було зменшення активності КТ (рис. 3.5). Через 3 доби інтоксикації тиреоїдином цей показник зменшувався на 33%, а через 7 діб – у 2,7 рази.

Таблиця 3.2

Активність антиоксидантних ферментів в артеріальній стінці тонкої кишки щурів за умов уведення високих доз тиреоїдину *(M±m, n=6 у кожній групі)*

Фермент	*Контроль (I група)*	*Тиреоїдин*	
		3 доби (II група)	*7 діб (III група)*
Глютатіонпероксидаза (мкмоль відн. глютатіону / хв · г білка)	27,8 ± 1,62	12,2 ± 0,85*	8,85 ± 1,13*▲
Супероксиддисмутаза (ум.од. / мг білка)	15,4 ± 1,65	7,55 ± 0,7*	4,87 ± 0,73*▲
Каталаза (ум.од. / мг білка)	0,85 ± 0,09	0,57 ± 0,05*	0,32 ± 0,05*▲

Примітка: * – статистично достовірні розбіжності відносно контролю (p<0,001);

▲ – між II і III групами тварин (p<0,001)

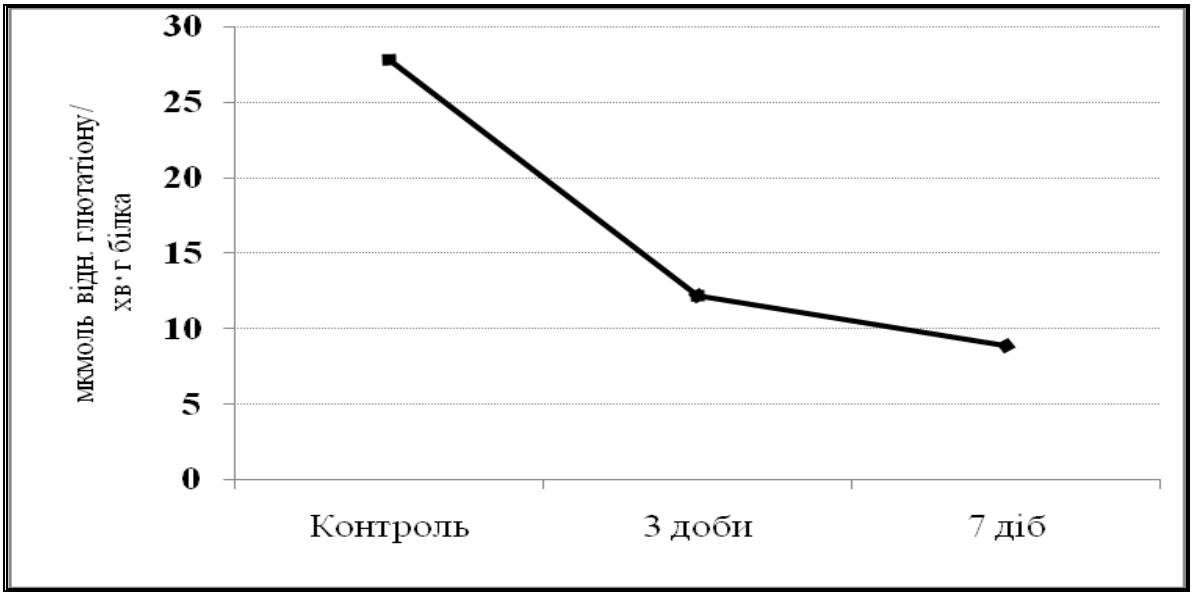

Рис. 3.3. Динаміка змін активності глютатіонпероксидази в тканинах артерій тонкої кишки щурів за умов тиреотоксикозу

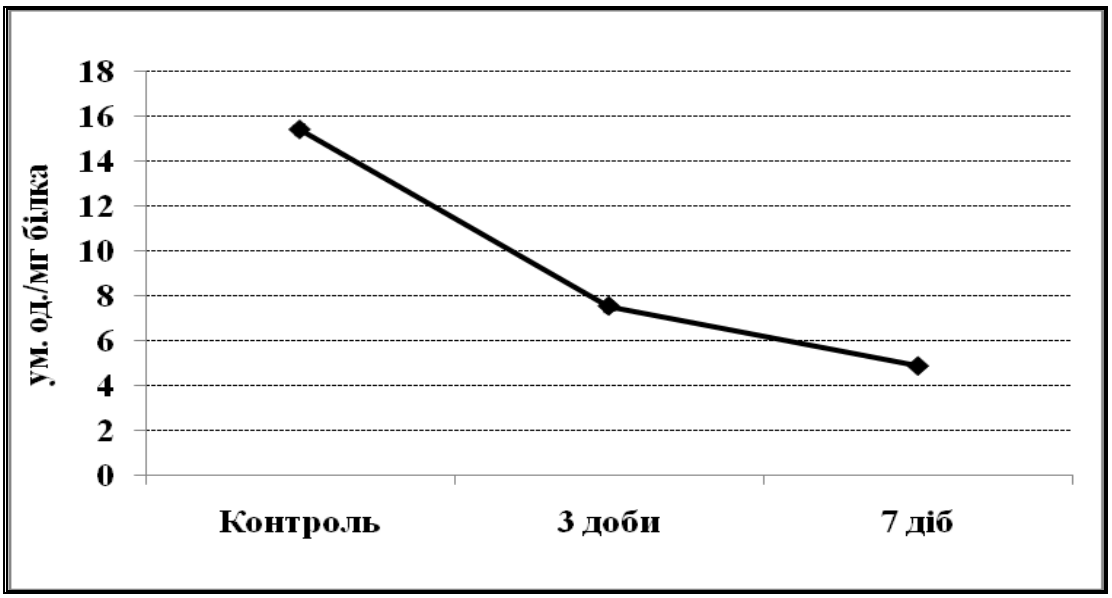

Рис. 3.4. Динаміка змін активності супероксиддисмутази в тканинах артерій тонкої кишки щурів за умов тиреотоксикозу

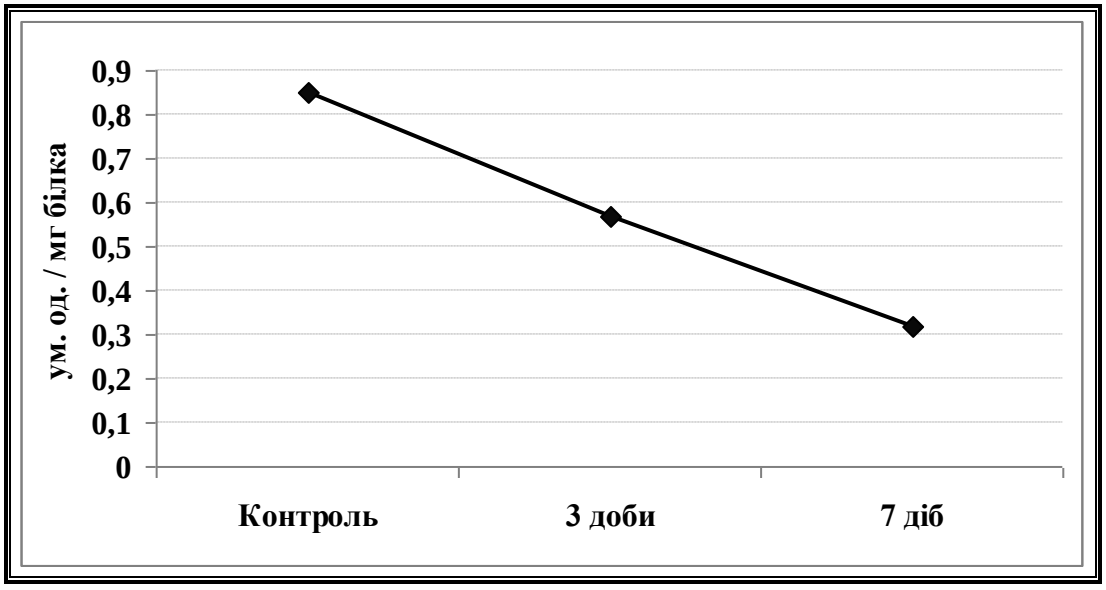

Рис. 3.5. Динаміка змін активності каталази в тканинах артерій тонкої кишки щурів за умов тиреотоксикозу

Таким чином, наведені тут результати свідчать про розвиток недостатності антиоксидантних ферментів у кровоносних судинах тварин з тиреотоксикозом, що само собою є чинником, якщо не ініціювання, то посилення ПОЛ.

Таким чином, можна стверджувати, що незалежно від початкового механізму ініціювання ПОЛ, генерування вільних радикалів та пероксидів, з одного боку, і розвиток антиоксидантної недостатності, з другого, пов’язані між собою типом патогенетичного зв’язку, що його позначають як "зачароване коло", або circulus vitiosus. Первинне посилене утворення радикалів веде через початкове збільшення активності антиоксидантних систем (фазу компенсації) до вторинної антиоксидантної недостатності (фаза декомпенсації), а та, у свою чергу, у ще більшій мірі посилює генерування вільних радикалів та пероксидів – коло замкнулося. Водночас первинна антиоксидантна недостатність зумовлює перехід у нормі контрольованих антиоксидантами окисно-відновних реакцій у неконтрольовані, тобто такі, що стають ініціаторами ПОЛ. Під час розгортання ПОЛ у клітинах настають порушення, які збільшують антиоксидантну недостатність – коло замкнулося.

Процеси ПОЛ, незалежно від конкретних механізмів їх активації, відіграють важливу патогенетичну роль в ушкодженні клітинних структур судинної стінки. Це пояснюється перш за все порушеннями бар’єрної функції клітинних мембран в умовах вільнорадикального окиснення ненасичених жирових кислот мембранних фосфоліпідів [4,6,12].

Свідченням того, що активація ПОЛ в артеріях тиреотоксикозних тварин супроводжується ушкодженням клітинних структур і розвитком унаслідок цього ранніх дистрофічних порушень, є зміни показників вмісту води та об’єму інулінового простору у вивчених нами судинах.

Дуже простий для визначення, але інформативний показник вмісту води в тканинах закономірно зростає за умов набряку. Його збільшення свідчить про накопичення води в досліджуваних структурах, незалежно від того який варіант набряку – внутрішньоклітинний чи інтерстиціальний – розвивається.

У табл. 2.3 представлено дані щодо вмісту води у стінках артерій контрольних і тиреотоксикозних тварин. Вони свідчать про те, що через 7 діб від початку експерименту вміст води у судинній стінці достовірно збільшується, якщо порівнювати з контрольними показниками ($p < 0,05$).

Таблиця 3.3

Вміст води та об'єм інулінового простору в артеріальній стінці тонкої кишки щурів через 7 днів від початку введення високих доз тиреоїдину
(M±m)

Показник	*Контроль*	*Тиреоїдин*
Вміст води (%)	74,45 ± 0,56 (6)	77,9 ± 0,68* (6)
Об'єм інулінового простору (мл/100 г вогкої тканини)	41,84 ± 0,43 (6)	48,67 ± 0,83** (6)

Примітка: * – p < 0,05; ** – p < 0,001; у дужках – кількість тварин

Ще один показник, що був об'єктом нашого дослідження, – об'єм інулінового простору (ОІП) – характеризує величину позаклітинного простору судинної стінки [5]. В основі методу визначення ОІП лежить властивість інуліну рівномірно розподілятися тільки в позаклітинному просторі тканини і не проникати всередину клітин. Це зумовлено тим, що неушкоджені плазматичні мембрани клітин у нормі непроникні для інуліну.

Збільшення ОІП, що виникає за умов дії на тканину ушкоджувальних агентів, може бути пов'язане з двома обставинами. Перша з них – інтерстиціальний набряк, що закономірно виникає в інтимі і медії судин при їх ушкодженні. Друга – це проникнення інуліну всередину ушкоджених клітин, унаслідок того що їхні плазматичні мембрани втрачають бар'єрні властивості. Незалежно від конкретних причин, що ведуть до збільшення ОІП, цей показник є однією з характеристик ушкодження судинної стінки, зумовленого різними патогенними агентами.

З даних, наведених у табл. 3.3, випливає, що токсична дія тиреоїдину супроводжується істотним зростанням ОІП в артеріальній стінці дослідних тварин. Так, через 7 діб від початку експерименту цей показник був на 16% вищим, якщо порівнювати з контролем (p < 0,001).

Паралельно з розвитком набряку судинної стінки змінюється вміст кальцію, магнію і мікроелементів у тканинах артерій тиреотоксичних тварин. Про це свідчать дані, представлені в табл. 3.4.

Таблиця 3.4

Вміст кальцію, магнію і мікроелементів в артеріальній стінці тонкої кишки щурів через 7 днів від початку введення високих доз тиреоїдину

(мг/0,1 г сухої речовини; M±m; n=6 у кожній групі)

Хімічний елемент	*Контроль*	*Тиреоїдин*
Кальцій	5,07 ± 0,56	44,9 ± 2,58**
Магній	0,9 ± 0,22	2,19 ± 0,2**
Залізо	0, 35± 0,01	0,32 ± 0,03
Цинк	0,19 ± 0,013	0,16± 0,012
Мідь	0,021 ± 0,0009	0,043 ± 0,0007*
Марганець	0,029 ± 0,001	0,016 ± 0,0004**

Примітка: * ($p<0,01$), ** ($p<0,001$) – статистично достовірні розбіжності відносно контролю.

Так, вміст кальцію в артеріальній стінці дослідних тварин зростав майже в 9 разів, а магнію – у 2,5 рази, якщо порівнювати з контролем. Що стосується кількісного складу мікроелементів судинної стінки, то він також зазнає певних змін у тварин з тиреотоксикозом. У тканинах артерій змінюється вміст марганцю і міді, а рівень заліза і цинку залишається без змін. Щодо марганцю, то в судинах вміст цього елементу зменшувався.

ВИСНОВКИ

1. Тиреотоксичний ентеральний синдром є складовою частиною клінічного перебігу тиреотоксичного зобу і зустрічається більше ніж у 50% хворих на тиреотоксикоз

2. У щурів експериментальний тиреотоксикоз викликає різкі дистрофічні зміни як в початковому, так і в термінальному відділах всіх компонентів слизової оболонки тонкої кишки.

3. В експерименті у щурів на тиреотоксичний зоб, ускладнений ентеральним синдромом, настає деструкція всіх складових слизової оболонки тонкої кишки. Із наростанням важкості перебігу тиреотоксикозу зростає рівень ендогенної інтоксикації

4. У щурів на тиреотоксичний зоб ускладнений ентеральним синдромом характерним є зменшення активності ферментів, що забезпечують антиоксидантний захист судинної стінки тонкої кишки – глутатіонпероксидази, супероксиддисмутази і каталази, а також супроводжується активацією ПОЛ в тканинах кровоносних судин, про що свідчить накопичення проміжних (гідропероксидних ліпідів) і кінцевих (шиффові основи) продуктів цього процесу в артеріальній стінці тонкої кишки. Внаслідок цього пригнічується функція травлення тонкої кишки, зменшується інтенсивність порожнинного та мембранного травлення, знижується активність ентероцинтих ферментів розщеплення вуглеводів і жирів, порушується абсорбційна здатність кишки.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. При обстеженні хворих на тиреотоксичний зоб з клінічними проявами ентерального синдрому необхідно включати визначення активності ферментативного гідролізу вуглеводів і жирів у слизовій оболонці тонкої кишки.

2. Лікування хворих на тиреотоксичний зоб з синдромом ентеральної недостатності необхідно доповнювати медикаментозною корекцією ентеропатії. Вона повинна включати ферментні та судинні препарати, вітамінні комплекси, індуктори синтезу мембранних ферментів. Дози препаратів визначаються важкістю клінічного перебігу тиреотоксикозу та ентерального синдрому.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Абрамова Ж. И. Человек и противоокислительные вещества \ Ж. И. Абрамова, Г. И. Оксенгендлер. – М.: Наука, 1985. – 230 с.

2. Атаман О. В. Патологічна фізіологія в запитаннях і відповідях / Атаман О. В. – Вінниця : Нова Книга, 2010. – 510 с.

3. Атаман О. В. Венозна стінка: загальнотеоретичні й експериментальні аспекти / Атаман О. В. – Суми : Англо, 2001. – 248 с.

4. Барабой В. А. Перекисное окисление и радиация / В. А. Барабой, В. Э. Орел, И. М. Карнаух. – К. : Наукова думка, 1991. – 256 с.

5. Гублер В. Е. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях / В. Е. Гублер, А. А. Генкин. – Ленинград : Медицина, Ленинградское отд., 1973. – 141 с.

6. Ефективність ентеросорбції в корекції синдрому ендогенної інтоксикації, зумовленого екзогенним тиротоксикозом (експериментальне дослідження)/ Шідловський В. О., Дейкало І. М., Курко В. С., Саюк Ю. М., Чонка І. І., Доброродній В. Б., Гривенко С. Г., П'ятикоп Г. І., Мацюк Ю. О., Гудима А. А., Баран І. І.// Здобутки клініч. та эксперим. медиц.- Тернопіль: Укрмедкнига, 1999.- Вип. 4.- С. 449-452.

7. Клініко – лабораторна діагностика ентерального синдрому у хворих на дифузний токсичний зоб: Методичні рекомендації/ Скл.: В. О. Шідловський, І. М. Дейкало, І. І. Чонка, Г. І. П'ятикоп.- Тернопіль: Укрмедкнига, 2000.- 10 с.

8. Корекція ентерального синдрому в передопераційній підготовці хворих на тиротоксичний зоб/ Шідловський В. О., Ляпіс М. О., Дячук І. О., Дейкало І. М., Чонка І. І., Паламарчук А. І., Мазур П. А., Герасимчук П. О., Левчук Р. Д., П'ятикоп Г. І.// Здобутки клінічної та експериментальної медицини: Матер. XXXIX підсумкової конференц.- Тернопіль, 1996.- С. 197-200.

9. Мельник І. А. Функциональное состояние желудка, поджелудочной железы и печени при эндемическом зобе.-Чернівці-Тернопіль, 1959.-88с.

10. П’ятикоп Г. І., Боднар Л. П. Морфофункціональні зміни тонкої кишки у щурів в умовах експериментального гіпертироідизму// Галицький Лікарський вісник.- 1999.- №3.- С. 107.

11. П’ятикоп Г.І. Мембранний гідроліз вуглеводів та жирів у хворих на тиреотоксичний зоб і його значення в клінічному перебігу захворювання// Актуальные проблемы медицины: Сб. науч. тр. молод. учёных Украины, Запорожский ин-т. усов. врачей, окт.-нояб. 1997 г. – Запорожье, 1997.- С. 90-93.

12. П’ятикоп Г.І., Левчук Р.Д. Ентеральний синдром у хворих на тиротоксичний зоб// Вісник наукових досліджень.- 1997.- № 2-3.- С. 52-54

13. Смоляницкий А. Я. Методы исследования системы гемостаза / А. Я. Смоляницкий – М.: Медицина, 1987. – С. 150.

14. Струков А. И. Патологическая анатомия / А. И. Струков, В. В. Серов – М. : Медицина, 1995. – 649 с.

15. Урбах В. Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях / В. Ю Урбах – М. : Медицина, 1975. – 295 с.

16. Хеннинг А. Минеральные вещества, витамины, биостимуляторы в кормлении сельскохозяйственных животных / Хеннинг А. – М. : Колос, 1976. – 560 с.

17. Шідловський В. О., П’ятикоп Г. І. Морфологічні зміни слизової оболонки та травна функція тонкої кишки у хворих на дифузний токсичний зоб// Галицький Лікарський вісник.- 1999.- №3.- С.