

УДК 612.07:57.083.3

## МІЕЛОПЕРОКСИДАЗНА АКТИВНІСТЬ НЕЙТРОФІЛІВ У ДІТЕЙ ІЗ ВАДАМИ СЛУХУ

Бесчасний С.П., Гасюк О.М.

Херсонський державний університет

*Досліджувався рівень активності мієлопероксидази (МПО) нейтрофілів крові у дітей молодшого шкільного віку з вадами слуху. Було встановлено, що за умов сенсоневральної туговухості II – III ступеню спостерігається статистичне зниження рівня МПО у нейтрофілах. Також виявлено сезонне коливання рівня ферменту*

*Ключові слова: мієлопероксидаза нейтрофілів, неспецифічний імунітет, стрес, сенсоневральна туговухість, ферментативна активність.*

**Вступ.** Останнім часом з'явилася значна кількість досліджень, які вказують на безпосередню участь імунної системи у розвитку порушень слуху. Так, стверджується, що у більш ніж 60% дітей з хронічною сенсоневральною туговухістю (СНТ) спостерігаються підвищені титри антитіл і наявність сенсibiliзованих лімфоцитів-ефекторів до антигенів нервової тканини, зокрема до основного білка мієліну і у меншій мірі – до нейроспецифічної енолази [8]. Також зустрічаються повідомлення про те, що основою патогенетичних реакцій при СНТ є надмірна продукція фактору некрозу пухлин (TNF) та інтерлейкіну-1 (IL 1).

Доведено, що захворювання внутрішнього вуха проявляється послабленням реакцій лімфоцитів, лімфоїдних структур і дифузної лімфоїдної тканини носоглотки на антигени патогенних мікроорганізмів, підвищення кількості імунних комплексів на слизовій оболонці слухової труби і середнього вуха [8].

Дослідження ферментного статусу лейкоцитів, як індикатора впливу на імунну систему, засновано на багатьох клініко-експериментальних дослідженнях, де доведено, що лейкоцити – клітини, які виконують не лише спеціальні функції імунного захисту, а в той же час є елементами єдиної інформаційної системи, яка точно відображає стан організму і процес його розвитку. Зокрема, ферментний статус лейкоцитів відображає стан ферментного статусу клітин мозку, міокарду, печінки, нирок, селезінки, тимусу, м'язів, слизової шлунка і кишковика, що дозволяє прогнозувати завершення експериментальної інфекції (бактеріальної та вірусної); інтоксикації, алергічної реакції і вакцинації, дозволяє визначати ступінь гіпоксії, показники життєздатності організму на момент огляду [3, 6, 11].

Процеси адаптації організму людини до змінних умов мають чітке відображення у вигляді зміни ферментативної активності лімфоцитів [5].

Таким чином, рівень ферментної активності є суттєвою ознакою фізіологічної рівноваги або її коливання, оскільки зміни структури клітинної популяції з переважанням високо- або низькоактивних клітин характеризують фундаментальний рівень організації.

Гранулоцити і мононуклеарні фагоцити створюючи першу лінію захисту організму, забезпечують неспецифічний протиінфекційний захист організму за рахунок процесів синтезу і секреції регуляторних цитокінів, які запускають загальні реакції у відповідь на появу чужорідної генетичної інформації. Реалізація цієї функції забезпечується завдяки здатності до хемотаксису, адгезії, фагоцитозу, дегрануляції та перетравлювання поглинутих часток [2].

Антимікробна здатність нейтрофілів, у свою чергу, забезпечується за рахунок так званого „респіраторного вибуху” фагоцитів, який супроводжує фагоцитоз завдяки наявності мієлопероксидази [12].

Мієлопероксидазу (МПО, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-оксидоредуктазу, ЕС 1. 11. 1. 7.) відносять до сімейства гемвімісних пероксидаз ссавців, яка міститься у азурофільних гранулах нейтрофілів (до 5% сухої ваги клітини), моноцитів і деяких видів тканинних макрофагів і секретується при фагоцитозі

всередину фагосоми. Генерація цим ферментом активної форми кисню та вільних радикалів забезпечує антимікробну активність нейтрофілів, тим самим забезпечуючи вроджений неспецифічний імунітет. За окремих умов, мієлопероксидаза може секретуватися у міжклітинну рідину і приймати участь у пошкодженні власних тканин організму [14, 15].

Важливу увагу заслуговує те, що у 80-х роках минулого століття було виявлено аутоантитіла до цитоплазматичних лізосомальних компонентів нейтрофілів і моноцитів, зокрема мієлопероксидази. Їх назва – антинейтрофільні цитоплазматичні аутоантитіла (ANCA) які були асоційовані із мікроваскулярним запаленням і некрозом [18].

У літературі значну увагу приділяють явищу „мієлопероксидазної недостатності”, при цьому лейкоцити мають нормальну активність гексозофосфатного шунту, нормальну продукцію кисневих радикалів і перекису водню. Показники фагоцитозу дещо знижені і можуть досягати нормальних значень при збільшенні строків інкубації *in vitro*. Необхідно зазначити, що основна проблема організму за цих обставин – схильність до кандидозної та стафілококової інфекції [16].

Отже, певні процеси в імунній системі можуть бути маркером погіршення стану слухової функції. Ревень мієлопероксидази може бути використаний для оцінки функціональної збереженості механізмів природного самозахисту і адаптаційних процесів в системі неспецифічної резистентності [10]. Проте, на сьогоднішній день ми не зустрічали відомостей про дослідження стану ферментної активності нейтрофілів периферичної крові у дітей з вадами слуху. Разом з тим, за даними ВОЗ, до 2020 р. прогнозується збільшення чисельності населення з соціально вагомими дефектами слуху на 30% у порівнянні із сьогоднішньою кількістю, що підтверджує актуальність нашого дослідження [4].

Таким чином, нашою метою було дослідження рівня активності мієлопероксидази (за К.Ф. 1.11.1.7) нейтрофілів периферичної крові у дітей молодшого шкільного віку з вадами слуху.

**Матеріали та методи дослідження.** Матеріалом для дослідження слугували зразки периферичної крові 60-ти дітей, які мають вади слуху (нейросенсорна туговухість II-III ступеню) та 60-ти нормальнослухуючих дітей які за результатами попередньо проведеного медичного огляду вважалися відносно здоровими. Перед початком дослідження було отримано письмові дозволи батьків та керівництва закладів освіти. Відповідно, діти з вадами слуху склали основну групу, нормальнослухуючі – контрольну. Дослідження проводилося у два етапи – восени та весною.

Мієлопероксидазу (МПО) виявляли за методом Грехема-Кноля [7]. Метод заснований на явищі окиснення бензидину дигідроген пероксидом у присутності мієлопероксидази у коричневий оксибензидин.

Свіжі мазки крові фіксували у 4% формаліново-спиртовому розчині (1 частина 40% формаліну й 9 частин 96<sup>0</sup> етилового спирту) протягом 30 с. Після фіксації обмивали у проточній воді й висушували. Надалі заливали пероксидазним реактивом на 5 хв (бензидин розчиняли у 6 мл 96<sup>0</sup> етилового спирту, додавали 4 мл води й 0,02 мл 3% дигідроген пероксиду). Ретельно промивали в проточній воді й висушували. Дофарбовували барвником Романовського-Гімзи.

Препарати переглядали за допомогою імерсійної системи мікроскопа фірми Micromed, фотографували цифровою камерою eTREK DCM 320 - 3.0 M. Реакцію оцінювали за допомогою принципу Astaldi і виражали за допомогою середнього цитохімічного коефіцієнту [7].

Типова реакція на бензидиновий реактив нейтрофілів основної та контрольної групи представлена на рис 1. (осінній період).

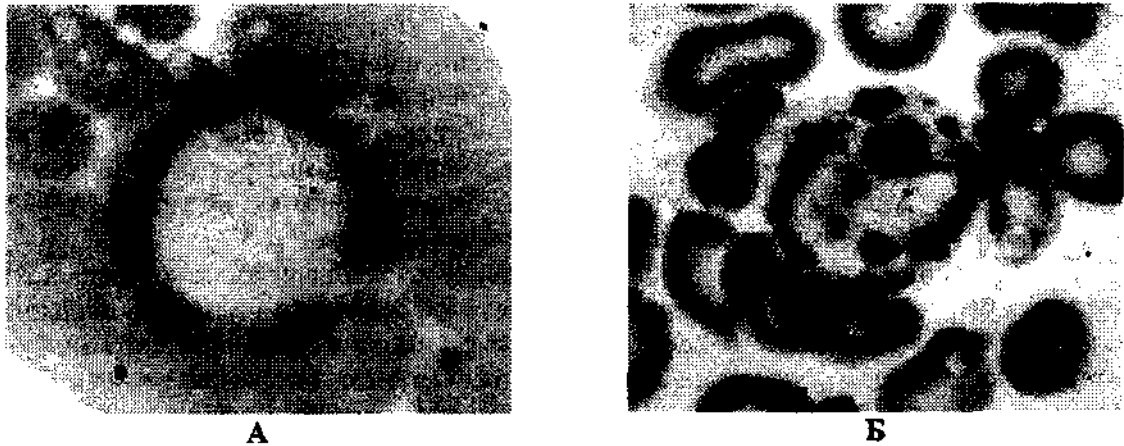


Рис. 1. Типова реакція нейтрофілів на бензидиновий реактив.

А – основної групи; Б – контрольної групи

(1350 x збільшення, цифрова камера-окуляр-мікрометр eTREK DCM 320 3.0 M).

Статистичний та графічний аналіз даних здійснювали з використанням програми Statistica 6.0., про достовірність відмінностей показників активності мієлопероксидази у досліджуваних групах судили за величиною непараметричного критерію Мана-Уїтні (незалежні вибірки), Вілкоксона (залежні). Достовірними вважали різницю при  $p < 0,05$ .

Результати дослідження та їх обговорення. Після проведення цитохімічного дослідження вмісту МПО лейкоцитів осінню та восени, було виявлено статистично достовірне зниження її рівня в основній групі у порівнянні з контрольною (табл. 1).

Таблиця 1.

Показники СЦК мієлопероксидази нейтрофілів у дітей основної та контрольної груп (ум. од.),  $M \pm m$

Групи	Осінь	Весна
Основна	$0,73 \pm 0,054$	$0,67 \pm 0,048^*$
Контрольна	$2,32 \pm 0,048^\diamond$	$2,22 \pm 0,044^{*\diamond}$

Примітка: \* - статистично достовірна різниця між групами, ( $p \leq 0,05$ );

♦ - статистично достовірна різниця між показниками всередині групи, ( $p \leq 0,05$ ).

Відповідно, у осінній період її середній рівень у основній групі складав  $0,73 \pm 0,054$  од., у контрольній -  $2,32 \pm 0,048$  од., у весняний період -  $0,67 \pm 0,048$  од. проти  $2,22 \pm 0,044$  од. контрольної групи.

Разом з тим, у основній групі рівень МПО весною складав  $0,67 \pm 0,048$  од., що є нижчим у порівнянні з осінню. Те ж саме явище спостерігали і в контрольній групі ( $2,32 \pm 0,048$  од. та  $2,22 \pm 0,044$  од. відповідно) (табл. 1.).

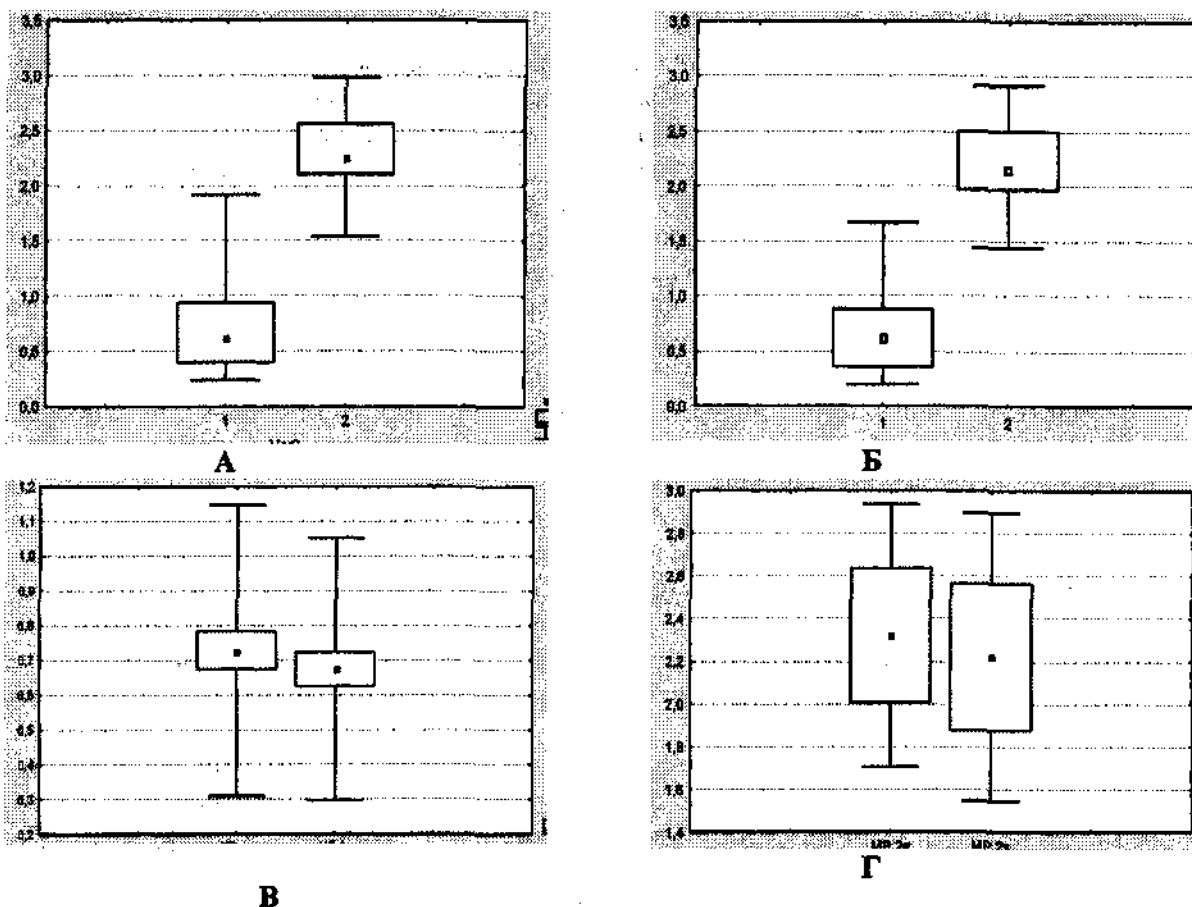


Рис. 2 - Медіана розподілу показників, мінімальні та максимальні показники рівня МПО нейтрофілів. А – основна (1а) та контрольна група (2а) (осінь); Б - основна (1s) та контрольна група (2s) (весна); В – основна група осінь (1а) та весна (1s); Г – контрольна група осінь (2а) та весна (2s).

Зокрема, осінній показник медіани у дітей контрольної групи складав 0.65 од. при мінімальному значенні 0.25 од і максимальному – 1.9 од. При цьому, основна частина усіх показників коливалася у межах 0.4 – 0.9 од. Показник медіани у дітей контрольної групи знаходився на рівні 2.2 од., при мінімальному значенні 1.5 од. та максимальному – 2.9 од., переважна кількість показників коливалася в межах 2.1-2.6 од. Таким чином, показники медіани основної групи менші, ніж у контрольній; відрізняються мінімальні та максимальні значення (рис 2. - А).

Спостерігається також різниця значень медіани при порівнянні основної і контрольної групи у весняний період. Зокрема, показники медіани основної групи перебувають у межах 0.6 од., у контрольній – 2.15 од. При цьому, більшість показників основної групи мали значення 0.3-0.9 од., контрольній – 1.95 – 2.5 од. Разом з тим, найменше значення у основній групі сягали 0.2 од. і у контрольній – 1.45 од., найбільше – 1.7 од. (основна група) та 2.9 од. (контрольна) (рис 2. - Б).

При порівнянні осінніх та весняних показників залежних груп було виявлено зниження активності МПО весною. Зокрема, у основній групі значення медіани сягало 0.69 од. весною проти 0.72 од. осінню. При цьому, осінню більшість показників складала 0.69 – 0.79 од. з найменшими значеннями 0.3 од. і найбільшими – 1.15 од. (рис 2. - В).

При аналізі сезонних змін всередині контрольної групи також спостерігалось зниження медіани з 2.25 од. до 2.19 од. Основні показники осінню були в межах 2.1 – 2.59 од. з мінімальним значенням 1.55 од. та максимальним – 2.89 од.; весною перебували у межах 1.9 – 2.5 од. з мінімальним значенням, яке сягало 1.4 од., максимальне – 2.9 од. (рис 2. - Г). Таким чином, весною спостерігалось зниження ферментативної активності в обох групах, що можна пояснити зимовим виснаженням організму на фоні авітамінозу.

**Підсумки.** Зниження рівня МПО у основній групі може бути наслідком процесів, які відбуваються з нейтрофілами або на етапі диференціації, оскільки біосинтез МПО відбувається під час диференціації мієлоцитів у кістковому мозку та завершується до часу виходу зрілих гранулоцитів у кровоносне русло або вже під час циркуляції у кровотоці [17].

Ми припускаємо, що зниження слухової функції призводить до підсилення сенсорної імпульсації зорової та пропріоцептивної модальності. Як наслідок, це призводить до підсилення функціонального тону неспецифічної вихідної активуючої системи стовбура мозку, яка спричиняє тонізуючий вплив на кору головного мозку і підвищення рівня моторної активності та тону ерготропної системи, впливаючи на вегетативну нервову систему. Виникає явище гіперспатикотонічної вегетативної реактивності (стресорної), що проявляється змінами рівня обмінних процесів (синдром психоемоційного напруження) [9].

Внаслідок цього, адаптивні зміни обмінних процесів призводять до підвищення рівня молочної кислоти, активності лактатдегідрогенази, пірувату, сукцинат-дегідрогенази та гіперактивації перекисного окиснення ліпідів.

Оскільки лейкоцити несуть на своїй поверхні ліганди до біологічно-активних речовин (цитокінів, гормонів - маркерів стресу), не виключений вплив на стадії дозрівання адреналіну або глюкокортикоїдів.

Зокрема, підвищення продукції глюкокортикоїдів спостерігається при дії на організм стресорних стимулів, що являє собою пусковий момент для розвитку адаптаційного синдрому. При цьому, глюкокортикоїди призводять до пригнічення клітинного та гуморального імунітету, зниження активності фагоцитозу [9].

Зниження рівня МПО у нейтрофілах периферичної крові може бути наслідком того, що фермент вивільняється у позаклітинне середовище (у кров), у тому випадку, якщо нейтрофіл по якій-небудь причині не може фагоцитувати мішень, при клітинному лізисі [1, 15]. Також, МПО може зв'язуватися з негативно зарядженою клітинною мембраною, зокрема ендотеліальною, і при наявності субстрату має змогу викликати окисні ушкодження тканин організму у місцях запалення [13].

Вірогідним представляється й те, що внаслідок аутоімунної агресії проти ростових факторів можлива інактивація нейтрофілів унаслідок підвищеного рівня лейкоцитарної еластази.

Отже, у зв'язку з тим, що нейтрофіли після декількагодинного перебування у кровотоці мігрують у слизові оболонки і там виконують функцію захисту від патогенних бактерій, зниження пероксидазної активності нейтрофілів вказує на зниження спроможності їх знищувати фагоцитовані бактерії. Таким чином можна припустити, що у дітей з вадами слуху молодшого шкільного віку страждає ланка неспецифічного імунітету.

Вельми перспективним є подальше дослідження адреналового та глюкокортикоїдного профілів у дітей з вадами слуху з подальшим встановленням взаємозв'язків між ними та показниками рівня МПО нейтрофілів.

#### Література

1. Березная Н.М. Нейтрофилы и иммунологический гомеостаз / Н.М. Березная. – К. : Наукова думка, 1988. – 192 с.
2. Долгушин И.И. Нейтрофилы и гомеостаз / И.И. Долгушин, О.В. Бухарин. - Екатеринбург: УрОРАН, 2001. - 288 с.
3. Духова З.Н. Прогностическое значение активности дегидрогеназ лейкоцитов / Духова З.Н., Кондратова Т.Т., Катосова Р.К. и др. // Митохондриальные процессы во временной организации жизнедеятельности: мат. всесоюз. семинара „Регуляция энергетического обмена и физиологическое состояние”. – Пуццоно, 1978. – С. 41-50.
4. Золотова Т.В. Экспериментальная сенсоневральная тугоухость ототоксического генеза у животных: апоптотический путь гибели клеток спирального органа/Т.В. Золотова, С.Н. Панченко // Вестник оториноларингологии. – 2010. - №4. – С. 29-32.)

5. Измайлова Т.Д. Отражение процессов адаптации новорожденных на митохондриальном уровне / Измайлова Т.Д., Кузнецова Е.Ю., Петричук С.В. и др. // Митохондрии в патологии: материалы всероссийского совещания. - Пуццино, 2001. С. 40 - 42.
6. Катосова Л.К. Координация ферментных систем лимфоцитов и резистентность мышей к действию стафилококкового токсина // Катосова Л.К., Катосова Р.К., Нарциссов Р.П. // Бюлл. exper. биол. - 1975. - №6. - С. 74-77.
7. Лабораторные методы исследования в клинике / [Меншиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др.]; под ред. В.В. Меншикова. - М.: Медицина, 1987. - 368 с.
8. Мельников О.Ф. Аутоімунні реакції гуморального та клітинного типів на антигени нервової тканини у дітей з сенсоневральною приглухуватістю / Мельников О.Ф., Тімен Г.Е., Чащева О.Г., Заяц Т.А., Сидоренко Т.В. // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. - 2003. - №6. - С. 5-8.
9. Панин Л.Е. Психосоматические взаимоотношения при хроническом эмоциональном напряжении / Л.Е. Панин, В.П. Соколов. - Новосибирск : Наука. 1981. - 177 с.
10. Проскуряков И.Г. Изменение ферментной формулы нейтрофильных лейкоцитов при острых заболеваниях органов брюшной полости: автореф. дис. на соискание уч. степени канд. мед. наук : спец. 14.00.27 „Хирургия” / Игорь Геннадиевич Проскуряков. - Краснодар, 1998. - 20 с.
11. Стаханов Н.Э. Количественное определение активности дегидрогеназ лимфоцитов и органов при экспериментальном инфаркте миокарда // Стаханов Н.Э., Духова З.Н. и др. // Митохондриальные процессы во временной организации жизнедеятельности. - Пуццино, 1978. - С. 54-56.
12. Babior B.M. The respiratory burst oxidase / B.M. Babior // Hematol. Oncol. Clin. North Amer. - 1988. - V. 2. - P.201 - 212.
13. Eiserich J.P. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase / Eiserich J.P., Baldus S., Brennan M.L., et al. // Science. - 2002. V. 296 - P.2391-2394.
14. Klebanoff S.J. Myeloperoxidase / Klebanoff S.J. // Proc. Assoc. Am. Physicians. - 1999. - V. 111(5). - P. 383-389.
15. Klebanoff S.J. The role of myeloperoxidase in the microbicidal activity of polymorphonuclear leukocytes / Klebanoff S.J., Rosen H. // Ciba Found Symp. - 1978. - V. 65. - P. 263-284.
16. Nauseef W.M. Myeloperoxidase deficiency / Nauseef W.M. // Hematol. Pathol. - 1990. - V. 4. P. 165-178.
17. Nichols B.A. Differentiation of human monocytes in bone marrow and blood. Sequential formation of two granule populations / Nichols B.A., Bainton D.F. // Lab. Invest. - 1973 - V.29. - P. 27 - 40.
18. Van der Woude Fj. Autoantibody against neutrophils and monocytes. tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis / van der Woude Fj, Rasmussen N., Lobatto S., et al. // Lancet - 1985 - V.1(8426). - P. 425-429.

## MYELOPEROXIDASE ACTIVITY OF LEUKOCYTES AT CHILDREN WITH A HEARING DISORDER

Beschasni S., Gasiuk E.

*Summary.* It is investigated level myeloperoxidase of leukocytes. Blood took from children of 6-11 years with infringement of acoustical function. Level myeloperoxidase of leukocytes was more low, than in the autumn in the spring. Activity level myeloperoxidase of leukocytes at children with a hearing disorder was (is statistically confirmed) than at coevals with normal hearing more low. In this connection, we assert that nonspecific immunity at children with infringement of acoustical function suffers.

*Key words:* myeloperoxidase of leukocytes, infringement of acoustical function, nonspecific immunity, stress