

© С.П. Бесчасний

УДК 612.07:57.083.3

С.П. Бесчасний

## ВМІСТ ЛУЖНОЇ ФОСФАТАЗИ НЕЙТРОФІЛІВ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ СЕНСОНЕВРАЛЬНОЇ ПРИГЛУХУВАТОСТІ У ДІТЕЙ МОЛОДШОГО ШКІЛЬНОГО ВІКУ

Херсонський державний університет (м. Херсон)

Робота є частиною комплексних досліджень науково-дослідної теми кафедри фізіології людини і тварин Херсонського державного університету: "Дослідження фізіологічних показників функціональних систем людей з особливими потребами" (номер державної реєстрації 0105U007479).

**Вступ.** Останнім часом з'явилася значна кількість досліджень, які вказують на безпосередню участь імунної системи у розвитку порушень слуху. Зокрема 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 [10]. 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 безпосередньо впливають на реакцію імунної системи, що проявляється послабленням реакції лімфоцитів, лімфоїдних структур і дифузної лімфоїдної тканини носоглотки на антигени патогенних мікроорганізмів, підвищенням кількості імунних комплексів на слизовій оболонці слухової труби і середнього вуха [10].

Дослідження ферментного статусу нейтрофілів, як індикатора стану організму, засновано на багатьох клініко-експериментальних дослідженнях, у яких доведено, що лейкоцити – клітини, які виконують не лише спеціальні функції імунного захисту, але, 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, дозволяє прогнозувати завершення експериментальної інфекції (бактеріальної та вірусної); інтоксикації, алергічної реакції і вакцинації, дозволяє визначати ступінь гіпоксії, показники життєздатності організму на момент огляду [1, 4, 14].

Показано, що процеси адаптації організму людини до змінних умов мають чітке відображення у вигляді зміни ферментативної активності нейтрофілів [3]. Таким чином, рівень ферментативної активності нейтрофілів є суттєвою ознакою фізіологічної рівноваги або її коливання, оскільки зміни структури клітинної популяції з переважанням високо- або низькоактивних клітин, характеризують

фундаментальний рівень організації неспецифічної ланки імунітету.

Гранулоцити виконують функції виведення антигену з організму, зумовлюють розвиток запалення, 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].

Фосфатази (фосфоестерази) у нейтрофілах каталізують реакцію відщеплення фосфатних груп, а інколи і зворотний процес – синтез фосфатів.

Лужна фосфатаза також здатна гідролізувати деякі сполуки із фосфористими ангідритами (аденозин-, інозин-, уридинтрифосфат та тіамініпрофосфат). Окрім цього, вона здатна каталізувати деякі реакції трансфосфорилування. Її оптимум рН коливається у межах 9,2 – 9,8 і залежить від типу та концентрації субстрату і від буферу [8, 11].

Відповідно, лужна фосфатаза (ЛФ) здійснює дефосфорилування у процесах внутрішньоклітинної передачі сигналів з мембранних рецепторів [18].

Фермент був вперше виявлений у тих клітинних мембранах, де відбуваються процеси активного транспорту, зокрема, вона локалізується в ендоплазматичному ретикулумі, апараті Гольджі, піноцитозних пухирцях та лізосомах, в клітинній мембрані. Безпосередньо у нейтрофілах – локалізована у плазматичній мембрані та мембранах гранул [8, 16, 18, 19].

Відомо також, що на вміст ферменту в нейтрофілах впливає гормональний статус: у жінок вміст ЛФ вище, ніж у чоловіків, активність ферменту підвищується у вагітних, у період до та після пологів.

На сьогоднішній день ми не зустрічали відомостей про дослідження особливостей ферментного складу нейтрофілів крові, зокрема, вмісту лужної фосфатази, в умовах зниженої слухової функції. Разом з тим, за даними ВООЗ, до 2020 р. прогнозується збільшення чисельності населення з соціально вагомими дефектами слуху на 30% у порівнянні із сьогоднішньою кількістю. Тож, актуальною проблемою є дослідження адаптаційно-компенсаторних змін стану організму в умовах порушеної аферентації [10].

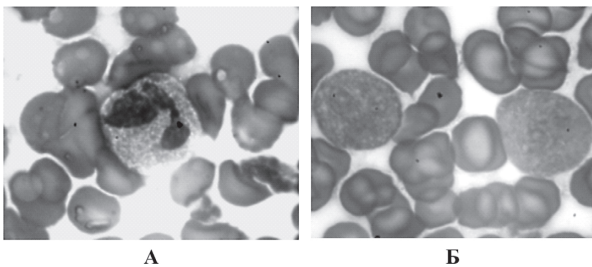
**Метою дослідження** було визначення рівня активності лужної фосфатази (за К.Ф. 1.11.1.7) нейтрофілів периферичної крові у дітей молодшого шкільного віку з вадами слуху.

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

Для дослідження лужної фосфатази використовували метод азосполучення по Кеплоу, заснований на явищі розщеплення  $\alpha$ -нафтил-фосфату (фосфорний ефір  $\alpha$ -нафтолу) з вивільненням  $\alpha$ -нафтолу, який вступає у реакцію азосполучення з сіллю діазонію. В результаті цього у місцях активності ферменту випадає осад азобарвника. Висохлі на повітрі мазки фіксували у 10% розчині формаліну в абсолютному метанолі при температурі 0-5 °С протягом 30 с. Після фіксації наносили профільтроване інкубаційне середовище й залишали при кімнатній температурі на 8-10 хв. Споліскували у проточній воді протягом 10 с. Дофарбовували метиловим зеленим (15 хв.).

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 у вигляді середнього цитохімічного коефіцієнту [6].

Типова реакція на лужну фосфатазу нейтрофілів основної та контрольної групи представлена на **рис. 1** (осінній період).



**Рис. 1.** Типові реакції лужної фосфатази на  $\alpha$ -нафтол. А – основної групи; Б – контрольної групи (1350 х 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 лужної фосфатази у досліджуваних групах судили за величиною непараметричного критерію Мана-Уїтні (незалежні вибірки), Вілкоксона (залежні). Достовірною вважали різницю при  $P < 0,05$  [7].

**Результати досліджень та їх обговорення.** Після проведення цитохімічного дослідження вмісту лужної фосфатази нейтрофілів осінню та весною, було виявлено статистично достовірне збільшення її показників у основній групі в порівнянні з контрольною.

Відповідно, у осінній період середній рівень ЛФ основної групи складав  $2,267 \pm 0,034$  од., контрольної –  $0,280 \pm 0,008$  од., у весняний період –  $2,017 \pm 0,022$  од. проти  $0,229 \pm 0,006$  од. контрольної групи. (**табл. 1**).

Дуже цікавим є те, що наші дослідження підтверджують дані про періодичність коливання показників рівня ЛФ нейтрофілів периферичної крові протягом

**Таблиця 1**

**Показники СЦК лужної фосфатази нейтрофілів у дітей основної та контрольної групи (ум. од.),  $M \pm m$**

Групи досліджуваних	Осінь	Весна
Основна	$2,267 \pm 0,034$	$2,017 \pm 0,022$ *
Контрольна	$0,280 \pm 0,008$ ♦	$0,229 \pm 0,006$ *♦

**Примітка:** \* - статистично достовірна різниця між групами досліджуваних, ( $p \leq 0,05$ ); ♦ - статистично достовірна різниця між показниками всередині однієї групи, ( $p \leq 0,05$ ).

року. Зокрема, максимум спостерігався у осінньо-зимовий, а мінімум – у весняно-літній період [5].

На **рис. 2** відображена динаміка показників ЛФ дітей основної та контрольної групи у восени та весною.

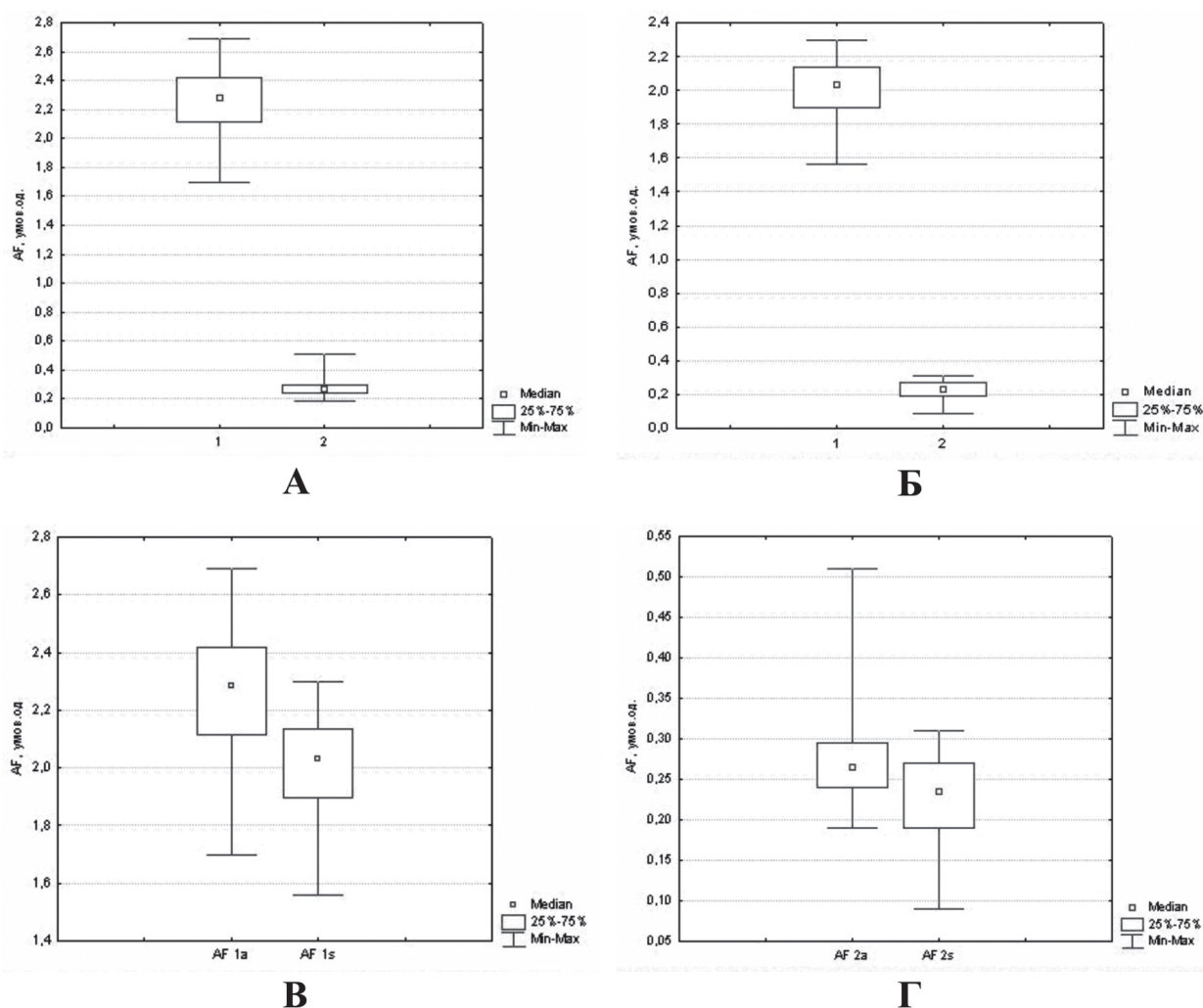
Восени медіана рівня ЛФ у дітей основної групи в середньому складав 2,3 од., при мінімальному значенні 1,67 од. і максимальному 2,7 од. Більшість досліджуваних дітей з вадами слуху мали показники рівня ЛФ у межах 2,1 – 2,4 од.

Рівень ЛФ у дітей контрольної групи був нижчим, його медіана складала 0,27 од., при мінімальному значенні 0,19 од. і максимальному – 0,51 од., переважна кількість показників коливалася в межах від 0,24 до 0,29 од.

Отже, показники вмісту ЛФ у нейтрофілах дітей з нейросенсорною приглухуватістю істотно вищі, ніж у дітей із нормальним слухом, причому, це стосується не тільки середніх, але і мінімальних та максимальних значень. При цьому спостерігалось значне коливання показників основної групи на відміну від контрольної (**рис 2. А**).

Також виявлена різниця значень медіани показника вмісту лужної фосфатази при порівнянні основної та контрольної групи у весняний період. Зокрема, показники медіани основної групи склали 2,0 од., у контрольній – 0,23 од. Більшість показників (50%) основної групи мали значення 1,9 – 2,1 од., контрольної – 0,19- 0,27 од. Відповідно, найменше значення у основній групі сягало 1,59 од., при аналогічному показнику у контрольній - 0,09 од., а найбільше, у основній групі, 2,3 од. та 0,31 од. у контрольній групі) (**рис. 2 Б**). Таким чином, спостерігалась тенденція до збільшення активності ЛФ нейтрофілів дітей основної групи як при першому, так і при другому обстеженні.

При порівнянні осінніх та весняних показників залежних груп, було встановлено незначне зниження активності ЛФ весною у обох групах. Зокрема, у основній групі медіана показників знизилася з 2,3 од. до 2,0 од., у контрольній групі – з 0,27, до 0,23 од. Переважна більшість показників у основній групі



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

перебували в межах 2,1-2,4 од (осінь) і 1,9 – 2,1 од (весна) з мінімальними значеннями осінню – 1,67 од. і весною – 1,59 од. та максимальними 2,7 од. (осінь) і 2,3 од. (весна). Показники контрольної групи осінню перебували в межах 0,24 – 0,29 од, а весною знизилися до 0,19- 0,27 од. з мінімальними значеннями осінню 0,19 од. та весною – 0,09 од. та максимальними, з 0,51 од. до 0,31 од., відповідно.

Отримано дані, які вказують на підвищений рівень активності ЛФ нейтрофілів у дітей із нейросенсорною приглухуватістю II-III ступеня. Ми припускаємо, що внаслідок підвищення впливу зорової і пропріоцептивної сенсорної імпульсації, яка призводить до підвищення рівня моторної активності, підвищення тону ерготропної системи, відбувається збільшення гіпофізарно-надниркового гормонального впливу [9, 12, 15].

Наше припущення підтверджується повідомленнями про те, що рівень ЛФ підвищується при стресорних станах, внаслідок уведення стресорних гормонів, гістаміну та прокаїну [17, 20].

Логічно припустити, що на фоні збільшення активності будуть спостерігатися зниження вмісту мієлопероксидази та фагоцитарної активності, оскільки існує обернено - пропорційна залежність між цими показниками, адже ЛФ блокує утворення активних форм кисню активованими клітинами [17, 21].

**Висновки.** Рівень активності лужної фосфатази нейтрофілів у дітей із нейросенсорною приглухуватістю II-III ступеня вище, ніж у дітей із нормальним слухом.

Встановлена сезонна періодичність коливання показників рівня лужної фосфатази нейтрофілів периферичної крові дітей молодшого шкільного віку. Максимум активності спостерігається у осінньо-зимовий, а мінімум – у весняно-літній період.

Ферментативна активність нейтрофілів, зокрема вміст лужної фосфатази, є маркером стану імунної системи в умовах порушеної слухової функції. Він може бути використаний для оцінки функціональної збереженості механізмів природного самозахисту і адаптаційних процесів в системі неспецифічної резистентності, та визначенні складових

конституційного імунітету в умовах вродженої сенсоневральної тугоухості [13].

**Перспективи подальших розробок** у даному напрямку. Планується вивчення функціональної активності нейтрофілів (мієлопероксидази, катіонних

білків, фагоцитарної активності) для дослідження процесів адаптації до умов зниження слухової функції на рівні неспецифічної ланки імунітету, що допоможе розробити принципи імуніпрофілактики таких осіб.

### Список літератури

1. 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”. – Пушино, 1978. – С. 41-50.
2. Долгушин И.И. Нейтрофилы и гомеостаз / И.И. Долгушин, О.В. Бухарин. – Екатеринбург: УрОРАН, 2001. – 288 с.
3. 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. – Пушино, 2001. С. 40 – 42.
4. 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.
5. Колісник Н.В. Активність фосфатаз лейкоцитів крові осіб, що мешкають в умовах тривалого техногенного навантаження (у окремі місяці року) / Н.В. Колісник, Ж.С. Качанова, К.В. Новикова, А.С. Сенченко // Питання біоіндикації та екології. – 2008. – Вип. 13, №2. – С. 175 – 182.
6. 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.
7. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / Лапач С.Н. Чубенко А.В., Бабич П.Н. – 2-е изд., перераб. и доп. – К.: МОРИОН, 2001. – 408с.
8. Лойда З. Гистохимия ферментов / Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т. ; пер. с англ. И.Б. Бухвалова, О.В. Копьева. – М. : Мир, 1982. – 272 с.
9. Матвеев В.Ф. Психические нарушения при дефектах зрения и слуха / В.Ф. Матвеев. – М. : Медицина, 1987. – 183с.
10. 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.
11. Руководство по гематологии: в 3 т. Т1. [Под ред. А.И. Воробьева]. – М.: Ньюдиамед, 2002. – 280 с.
12. Сараев С.Я. Особенности психовегетативной сферы детей с врожденной нейросенсорной тугоухостью / С.Я. Сараев // Новости оториноларингологии и логопатологии. – 1997. – №2 (10). – С. 19-23.
13. Проскурняков 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 Проскурняков. – Краснодар, 1998. – 20 с.
14. 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. – Пушино, 1978. – С. 54-56.
15. Шумна Т.Є. Особливості нейровегетативної регуляції серцевої діяльності у дітей з порушеннями слуху / Шумна Т.Є. // Педіатрія, акушерство та гінекологія. – 2005. - №3. – С. 12-19
16. Bednarska K. Application of intracellular alkaline phosphatase activity measurement in detection of neutrophil adherence in vitro / Bednarska K., Klink M., Sulowska Z. // Mediators Inflamm. – 2006. – Vol. 4. – P. 19307– 19312.
17. Ding J. Effects of antagonists of protein phosphatases on superoxide release by neutrophils / Ding J., Badwey JA. // J. Biol. Chem. – 1992. – Vol. 267. – 9. – P. 6442–6448.
18. Pellme S. The two neutrophil plasma membrane markers alkaline phosphatase and HLA class I antigen localize differently in granule-deficient cytoplasts. An ideal plasma membrane marker in human neutrophils is still lacking / Pellme S., Dahlgre N.C., Karlsson A. // J. Immunol. methods. – 2007. – Vol. 325. – P. 1562–1570.
19. Scott C.S. Relation of neutrophil alkaline phosphatase activity to Fc-IgG receptor development in human blood and bone marrow / Scott C.S., Cordingley R.J., Roberts B.E. et al. // J. Clin Pathol. – 1982. – Vol. 35. – P. 967–971.
20. Valentine W. N. Metabolism of the leukemic leukocyte / Valentine W. N. // Am. J. Med. – 1960. – Vol.28. – P. 699–710.
21. Zakharova N.O. Morphological indicators of the peripheral blood leukocytes at different periods of development of myocardial infarct (experimental study) / N.O. Zakharova, V. N. Shlipnikov V.N., Kozinets G.L., Shishkanova Z.G., Tarantei S.A. // Arkh. patol. – 1977. - №39 (7). – P. 29-35.

УДК 612.07:57.083.3

### СОДЕРЖАНИЕ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ НЕЙТРОФИЛОВ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕНСОНЕВРАЛЬНОЙ ТУГОУХОСТИ У ДЕТЕЙ МЛАДШЕГО ШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА

Бесчасный С.П.

**Резюме.** Проведено исследование содержания щелочной фосфатазы нейтрофилов (КФ 3.1.3.1.) в условиях хронической сенсоневральной тугоухости II – III степени у детей 6-10 лет г. Херсона. Было показано, что у детей при нарушении слуха повышена реакция щелочной фосфатазы нейтрофилов, что свидетельствует об изменении процессов внутриклеточной передачи сигналов, подавлении генерации активных форм кислорода и, соответственно, фагоцитарной активности.

**Ключевые слова:** щелочная фосфатаза, нейтрофилы, сенсоневральная тугоухость.

УДК 612.07:57.083.3

### **ВМІСТ ЛУЖНОЇ ФОСФАТАЗИ НЕЙТРОФІЛІВ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ СЕНСОНЕВРАЛЬНОЇ ПРИГЛУХУВАТОСТІ У ДІТЕЙ МОЛОДШОГО ШКІЛЬНОГО ВІКУ**

**Бесчасний С.П.**

**Резюме.** Проведено дослідження вмісту лужної фосфатази (КФ 3.1.3.1.) нейтрофілів в умовах хронічної сенсоневральної приглухуватості II-III ступеню у дітей 6-11 років. Було показано, що у дітей при порушенні слуху спостерігається підвищений рівень лужної фосфатази нейтрофілів. Це свідчить про зміни процесів внутрішньоклітинної передачі сигналів, пригнічення генерації активних форм кисню, а відповідно, фагоцитарної активності.

**Ключові слова:** лужна фосфатаза, нейтрофіли, сенсоневральна приглухуватість.

UDC 612.07:57.083.3

### **The Level Of Alkaline Phosphatase In Neutrophils The Children Of Primary School Age With Chronic Sensorineural Hearing Loss**

**Beschasni S.P.**

**Summary.** A study of alkaline phosphatase content of neutrophils (EC 3.1.3.1.) In chronic sensorineural hearing loss II - III degree in children 6-10 years. It has been shown that children with hearing loss increased neutrophil alkaline phosphatase reaction, which indicates a change in the processes of intracellular signal transduction, suppressing the generation of reactive oxygen species and, accordingly, the phagocytic activity.

**Key words:** alkaline phosphatase, neutrophils, sensorineural hearing loss.

Стаття надійшла 28.11.2011 р.