

12. Health-related quality of life in patients with myasthenia gravis and the relationship between patient-oriented assessment and conventional measurements / Padua L., Evoli A., Aprile I., Caliendo P., Mazza S., Padua R., Tonali P. // Neurological Sciences. 2001. Vol. 22, Issue 5. P. 363–369. doi: 10.1007/s100720100066

13. Sleep, lung function, and quality of life in patients with myasthenia gravis: A cross-sectional study / Oliveira E. F., Nacif S. R., Urbano J. J., Silva A. S., Oliveira C. S., Perez E. A. et. al. // Neuromuscular Disorders. 2017. Vol. 27, Issue 2. P. 120–127. doi: 10.1016/j.nmd.2016.11.015

14. Quality of life in 188 patients with myasthenia gravis in China / Yang Y., Zhang M., Guo J., Ma S., Fan L., Wang X. et. al. // International Journal of Neuroscience. 2015. Vol. 126, Issue 5. P. 455–462. doi: 10.3109/00207454.2015.1038712

*Рекомендовано до публікації д-р мед. наук Погорелов О. В.
Дата надходження рукопису 22.02.2018*

Кальбус Олександр Іванович, кандидат медичних наук, асистент, кафедра неврології і офтальмології, ДЗ «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України», вул. Володимира Вернадського, 9, м. Дніпро, Україна, 49044
E-mail: kalbus.dp@gmail.com

УДК 616.322-002.2:616.379-008.64]-053.2-074:612.1:611-018.1
DOI: 10.15587/2519-4798.2018.127424

ЦИТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ КЛІТИН КРОВІ ДІТЕЙ, ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ТОНЗИЛІТ І ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ 1 ТИПУ

© Ю. В. Гавриленко, А. А. Лайко, А. Ф. Карась, Г. А. Карась

У роботі проведено вивчення стану активності ферментів енергетичного обміну сукцинатдегідрогенази (СДГ) і гідролітичного ферменту кислої фосфатази (КФ) на основі їх цитохімічного дослідження в нейтрофілах і лімфоцитах клітин крові у дітей, хворих на ЦД-1 і ХТ. Виявлені зміни СДГ та активності кислої фосфатази, що визначають характер функціональної активності нейтрофілів та лімфоцитів, мають важливе значення для розробки терапевтичних стратегій лікування хворих

Ключові слова: цукровий діабет 1 типу, хронічний тонзиліт, цитохімічний аналіз, кисла фосфатаза, сукцинатдегідрогеназа

1. Вступ

На сьогоднішній день, не дивлячись на доступність сучасних методів діагностики та лікування запальних захворювань ЛОР-органів, часто можна спостерігати їх перехід в хронічну форму. Зокрема, проблема хронічного тонзиліту (ХТ) у дітей є завжди актуальною у практиці отоларинголога, що обумовлено недостатнім рівнем зрілості імунної системи, особливо лімфоаденоїдного апарату, а також ймовірністю розвитку тонзилітогенних ускладнень та хронічних захворювань інших органів і систем. За даними літератури, в Україні частота даної патології у дітей до 12 років складає 12 % [1].

Виняткового значення патологія ЛОР-органів набуває при коморбідності перебігу її з тяжкими аутоімунними хворобами, одним з яких є цукровий діабет 1 типу (ЦД-1) [2, 3]. Поєднання декількох хвороб у одного пацієнта, що в літературі описується як «коморбідність», привертає особливу увагу науковців та є серйозною проблемою для охорони здоров'я в умовах тривалої вузької спеціалізації лікувальних установ і підрозділів. Це вимагає нових підходів в оцінці стану хворого, розробки сучасних методів лікування та зумовлює збільшення витрат. Зокрема, перебіг ХТ і ЦД-1 являє собою непросту задачу в

плані лікування як для оториноларинголога, так і ендокринолога.

2. Обґрунтування дослідження

Порушення метаболізму та імунітету при ЦД-1 тісно пов'язані, а підвищена сприйнятливості до інфекцій у пацієнтів з ЦД-1 пов'язана з порушеннями захисних функцій імунної системи, посиленням клітинної адгезії мікроорганізмів, наявністю мікро- і макроангіопатії, нейропатії [4, 5]

Крім того, у хворих на ЦД-1 спостерігається схильність до катаболічних процесів. При цьому, змінюється синтез антитіл, знижується фагоцитарна активність макрофагів і лейкоцитів, знижується регенераційна здатність всіх тканин, знижується бар'єрна функція слизових оболонок [6–8]. Таким чином, ХТ посилює метаболічні порушення, призводить до декомпенсації вуглеводного обміну і кетоацидозу, які в свою чергу погіршують перебіг патологічного процесу в мигдаликах [9]. Варто зазначити, що дана проблема не знайшла достатнього висвітлення у літературі, однак потребує додаткового вивчення та більш активної розробки профілактичних та лікувальних заходів.

Зміни, що відбуваються на клітинному рівні, не завжди реалізуються у вигляді захворювання,

але знижують резервні можливості організму. Зниження резервних можливостей організму клінічно проявляється його нездатністю адекватно відповісти на зовнішній вплив, що можна визначити як зміна реактивності. Початковий стан клітини (резервні можливості) визначає її відповідь на дію зовнішнього патологічного фактора. Зі зниженням резервних можливостей клітини підвищується ймовірність її загибелі і розвиток хвороби [10, 11]. Зміни на клітинному рівні з'являються найчастіше до формування клінічних симптомів хвороби і зберігаються деякий час після їх усунення. Сучасні підходи до оцінки і корекції стану ряду енергозабезпечуючих систем організму в нормі та при наявності патології неможливі без цитохімічного вивчення клітин крові [12].

На відміну від звичайних біохімічних досліджень, при яких активність ферменту лужної фосфатази (ЛФ), сукцинатдегідрогенази (СДГ), лактатдегідрогенази (ЛДГ та ін.) характеризується тільки середніми цифровими значеннями в тканині, цитохімічний аналіз передбачає визначення активності ферменту в цілій клітинній популяції. Цілоком природно, що в клітинному пулі клітини знаходяться на різних рівнях функціональної активності [12]. Відповідно, активність енергетичних ферментів в клітинах різна, що дозволяє виділити різні клітинні субпопуляції, що розрізняються за активністю ферменту. Зміна структури клітинної популяції з переважанням високо- або низькоактивних клітин неспецифічної активності може спостерігатися при різних захворюваннях, так як характеризує фундаментальний рівень організації з іншого боку, дані параметри розподілу клітинної популяції за активністю ферменту дають уявлення про фазу перебігу захворювання, що може використовуватися для прогнозу і обґрунтуванню ступінчастої терапії, спрямованої на відновлення енергетичного балансу в патологічно змінених тканинах і органах.

3. Мета дослідження

Вивчення стану активності ферментів енергетичного обміну сукцинатдегідрогенази (СДГ) і гідролітичного ферменту кислої фосфатази (КФ) в нейтрофілах і лімфоцитах на основі їх цитохімічного дослідження у клітинах крові дітей, хворих на ХТ і ЦД-1.

4. Матеріали і методи дослідження

За 2014–2015 роки було обстежено 41 дитина, віком від 6 до 12 років, які знаходились на лікуванні в ендокринологічному відділенні Національної дитячої спеціалізованої лікарні «ОХМАТДИТ» МОЗ України. Всі хворі були розділені на 2 клінічні групи: в першу (основну) групу увійшло 30 дітей, у яких було виявлено ХТ в поєднанні з ЦД-1 (середній вік, $9,5 \pm 0,4$ років) в другу (групу порівняння) – 11 дітей з ХТ без ЦД-1 (середній вік $9,4 \pm 0,8$ років).

Основними клінічними характеристиками ХТ у хворих на ЦД-1 були симптоми Гізе, Зака, Преображенського, наявність патологічного вмісту в ла-

кунах піднебінних мигдаликів. Важливою і характерною особливістю перебігу ХТ у дітей, хворих на ЦД-1 було збільшення кількості випадків наявності супутнього підгострого або хронічного фарингіту з характерним і вираженим запаленням слизової оболонки задньої стінки глотки. Тривалість захворювання на ЦД-1 становила від 1 до 10 років. Контроль тяжкості захворювання ЦД-1 проводився за допомогою визначення глікозильованого гемоглобіну та, відповідно, рівня глікемічного контролю. У хворих дітей основної групи ($n=30$) цей показник (HbA1c був більше 9 %).

Для проведення наміченого дослідження у дітей, хворих на ЦД-1 натщесерце забирали кров, готували мазки та проводили фарбування за Романовським для ідентифікації клітин, а також цитохімічне дослідження СДГ за методом Нахласа та КФ за методом Гомори [13]. Мазки досліджувались під світловим мікроскопом та масляною імерсією. Отримані результати оцінювали напівкількісним методом, з обчисленням середнього цитохімічного коефіцієнта (СЦК). В кожному окремому мазку при оглядовому перегляді вибирали еталони - клітини, що містять досліджувану речовину. Відсутність забарвлення цитоплазми приймалася за нульову ступінь. Наявність в цитоплазмі невеликої пофарбованої ділянки, що становить 1/4 частину всієї цитоплазми, відповідає інтенсивності реакції 1-го ступеня (А). Фарбування 8/10 цитоплазми приймається за 2-у ступінь насичення (В). При 3-му ступені інтенсивності реакції досліджувана речовина заповнювала всю цитоплазму і навіть виявлялася на ядрі. Потім в різних ділянках мазка підраховували, не пропускаючи, 100 однотипних клітин і розраховують процентний вміст клітинних елементів з різною інтенсивністю реакції. Показник активності в умовних одиницях обчислюється за відомою формулою: $3C + 2B + A$. Середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК) обчислюється за формулою Кеплоу (За Kaplow):

$$\text{СЦК} = \frac{3C + 2B + A}{100}$$

При обчисленні показника активності, клітини з інтенсивністю 0 виключаються; 0 відсотку клітин з інтенсивністю 1 (А) додається відсоток клітин з інтенсивністю 2 (В), помножений на коефіцієнт 2 і кількість клітин з інтенсивністю 3 (С), помножене на коефіцієнт 3. Показник активності в умовних одиницях від 0 до 300, СЦК 0–3 % [14].

Статистичну обробку результатів здійснювали в програмі Statistica 6.0, за допомогою t-критерію Стьюдента. Результати представлені у вигляді середнього значення і стандартної помилки середнього значення ($M \pm m$), різницю вважали статистично достовірною при $p < 0,05$.

5. Результати дослідження

За отриманими результатами проведеного дослідження у дітей, хворих на ХТ та ЦД-1 спостері-

гається зниження активності ферменту СДГ у лімфоцитах та нейтрофілах (рис. 1), а також достовірно видна чітка локалізація продукту ферментативної реакції формазану у вигляді гранул (рис. 2) у дітей контрольної групи.

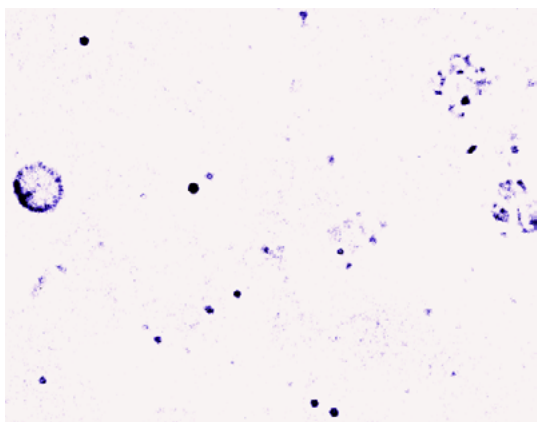


Рис. 1. Низька активність СДГ в лімфоцитах та нейтрофілах у хворих основної групи. Мікрофото. Об. 60, ок. 10

СДГ є одним із ключових ферментів метаболічного окислення, що відповідають за енергетичний потенціал, а її локалізація пов'язана з внутрішньою мембраною мітохондрій. Активність СДГ, у даному випадку відображає наявність активних мітохондрій при ХТ та їх активний функціональний стан.

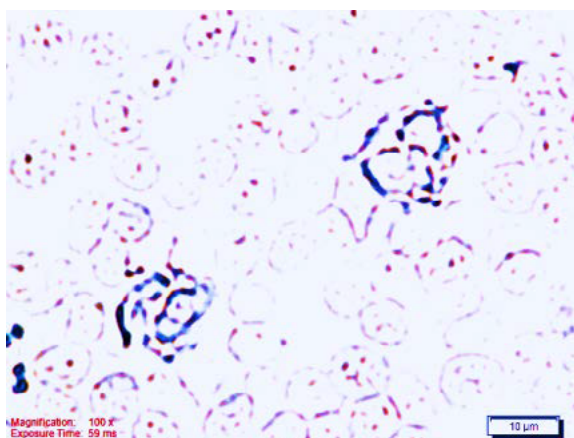
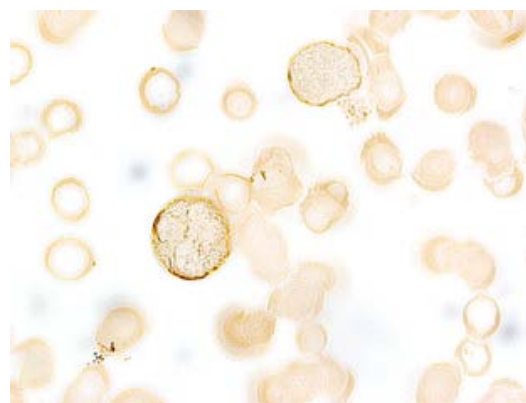


Рис. 2. Чітка локалізація продукту ферментативної реакції формазану у вигляді гранул у дитини групи порівняння. Мікрофото. Об. 60, ок. 10

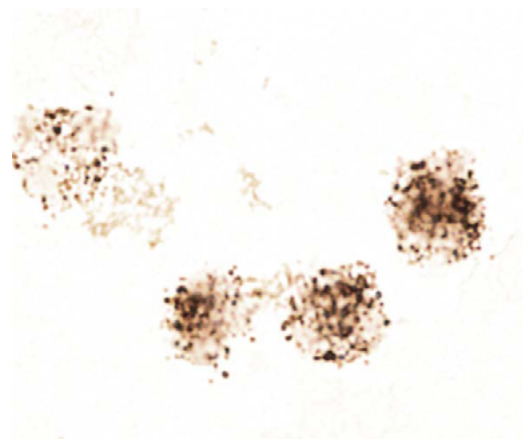
При наявності поєднаної патології у нейтрофілах та лімфоцитах також виявляється як суттєве зниження активності гідролітичного ферменту КФ, так і має місце виявлення клітин з (переважно нейтрофілів) з високою активністю ферменту, що вірогідно підтверджує те, що клітини знаходяться на різних рівнях функціональної діяльності [12] (рис. 3, а, б).

В той же час у групі хворих на ХТ характер гранул та їх локалізація суттєво відрізнялися. Продукт ферментативної реакції виявлявся у лімфоцитах та нейтрофілах у вигляді дрібних гранул і мав периферійну локалізацію, що свідчить про збережен-

ня структури клітин та участь ферменту у функціональних процесах (рис. 4).



а

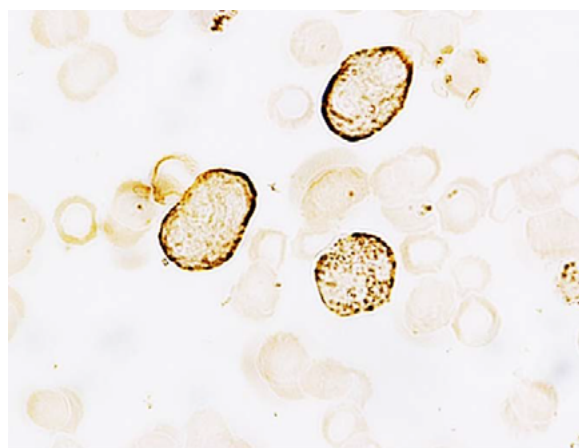


б

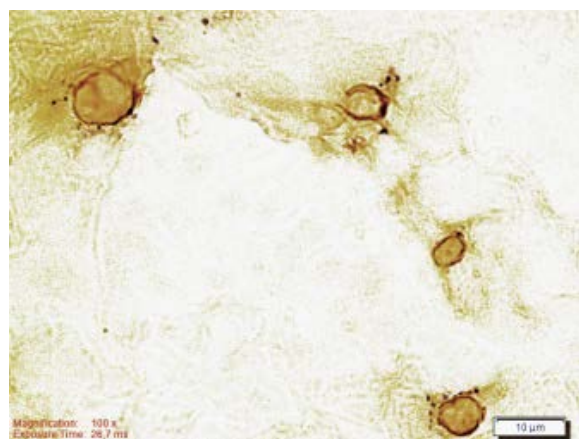
Рис. 3. Активність ферменту КФ у клітинах крові дітей основної групи: а – низька активність КФ в клітинах крові; б – висока активність ферменту в окремих нейтрофілах дитини, хворої на ЦД-1 з ХТ. Мікрофото. Об. 60, ок. 10

Даний фермент каталізує реакції гідролітичного (за участю води) розщеплювання внутрішньомолекулярних зв'язків, є маркером лізосом, проявляє високу активність в гранулах нейтрофілів, зрілих клітинах, а також слабку та помірну – в цитоплазмі лімфоцитів.

При проведенні цитохімічних досліджень СДГ на основі підрахунку гранул формазану, що відображають рівень активності ферменту, було виявлено виражене зниження СДГ в лейкоцитах, показник активності СЦК у групі хворих на ХТ в поєднанні з ЦД-1 склав відповідно для нейтрофілів $0,85 \pm 0,22$ та $1,27 \pm 0,31$ для лімфоцитів в порівнянні з даними хворих лише на ХТ для нейтрофілів $0,37 \pm 0,18$ ($p < 0,05$) та $0,53 \pm 0,12$ ($p < 0,05$) для лімфоцитів. Зважаючи на те, що СДГ є одним із ключових ферментів метаболічного окислення, а її локалізація пов'язана з внутрішньою мембраною мітохондрій, активність СДГ в даному випадку відображає зниження кількості активних мітохондрій, енергетичного потенціалу клітин та їх функціонального стану клітин.



а



б

Рис. 4. Активність ферменту КФ у клітинах крові дітей контрольної групи: а – помірна активність КФ з периферійною локалізацією його в нейтрофілах; б – висока активність ферменту в лімфоцитах крові дитини, хворої на ХТ. Мікрофото. Об. 60, ок. 10

Поєднання ЦД-1 і ХТ в порівнянні з наявністю лише ХТ суттєво знижує в цілому активність гідролітичного лізосомального ферменту КФ в цитоплазмі нейтрофілів та лімфоцитів. При цьому СЦК при поєднаній патології складає для нейтрофілів $0,286 \pm 0,07$ і для лімфоцитів $0,165 \pm 0,055$, та при ХТ відповідно $0,362 \pm 0,057$ ($p < 0,05$) і $0,213 \pm 0,038$ ($p < 0,05$).

6. Обговорення результатів дослідження

При проведенні нами досліджень клітин крові у дітей не було виявлено достовірних відхилень клітинного складу крові між показниками обох груп дослідження, що узгоджується із загальновідомими даними про те, що цитологічні дослідження мають допоміжне значення у діагностиці цих захворювань.

В той же час проведення нами цитохімічних досліджень дозволило виявити у пацієнтів виражені відмінності у локалізації та активності ферментів енергозабезпечення та гідролітичних процесів у лейкоцитах крові дітей, хворих на ХТ та при його

поєднанні з ЦД-1, що детально відображено у попередньому розділі.

Оскільки ЦД-1 відноситься до захворювань з метаболічними порушеннями, що супроводжуються мітохондріальною дисфункцією, то виражене зниження активності СДГ у дітей основної групи при наявності ХТ вірогідно зумовлено саме поєднанням цих патологій.

Слід також зазначити, що завдяки активності гідролітичних ферментів забезпечується роль нейтрофілів, як першої лінії клітинного захисту організму, а зниження активності процесів гідролізу свідчить про відповідний прояв функціональної активності клітин, бактерицидної функції, порушення фагоцитозу, що сприяє схильності до інфекції та тяжкості протікання запальних процесів, в тому числі ХТ за наявності ЦД-1.

Виявлені зміни цитохімічної характеристики лімфоцитів також свідчать про вплив ЦД-1 на їх функціональну активність, та з урахуванням ролі цих клітин в імунних процесах можуть відображати зміни функції піднебінних мигдаликів при поєднаній патології ХТ та ЦД-1 у дітей і збереження помірної та високої активності гідролітичних ферментів у функціонально активних лімфоцитах.

Таким чином виявлені зміни цитохімічного складу клітин крові вірогідно визначають характер метаболічних порушень при ЦД-1 у дітей та впливають на перебіг ХТ та імунологічну функцію піднебінних мигдаликів, що узгоджується з даними інших дослідників про те, що імунна система і метаболізм тісно інтегровані [15, 16].

Однак, варто відмітити, що отримані нами результати цитохімічних досліджень клітин крові можуть бути практично корисними для дитячих ендокринологів, педіатрів, оториноларингологів, але мають певні можливі обмеження, що накладаються умовами клінічної практики.

7. Висновки

1. Проведені цитохімічні дослідження клітин крові дітей, хворих на ХТ та при його розвитку на тлі ЦД-1 свідчать про те, що при поєднанні хвороб у нейтрофілах та лімфоцитах крові пацієнтів спостерігається виражене зниження активності окисно-відновного ферменту СДГ та ферменту гідролізу КФ при одночасному прояві високої активності в лізосомах окремих нейтрофілів.

2. Виявлені порушення активності вказаних ферментів енергозабезпечення та гідролізу в нейтрофілах та лімфоцитах відображають зниження функціональної активності даних клітинних елементів, що може впливати на забезпечення ними бактерицидного та імунологічного захисту у хворих при наявності поєднаної патології ХТ та ЦД-1, а також сприяти більш тяжкому перебігу ХТ та частих загострень хронічних захворювань лімфоепітеліальних структур глотки.

3. Виявлення помірної та високої активності СДГ в окремих лімфоцитах як при ХТ, так і поєд-

нання ЦД-1 і ХТ ймовірно відображає збереження їх функціональної активності та участі в імунних процесах.

4. Отримані нами результати досліджень підкреслюють важливість їх урахування при розробці

терапевтичних стратегій застосування комплексного підходу до лікування, яке здатне покращити окисно-відновні, метаболічні, катаболічні та імунологічні процеси і тим самим підвищити ефективність лікування дітей, хворих на ЦД-1 і ХТ.

Література

1. Баричева Л. Ю., Ердни-Горяева Н. Е. Функциональная активность нейтрофилов при сахарном диабете 1 типа у детей // FUNDAMENTAL RESEARCH. 2013. № 9. С. 32.
2. Бірюкова О. В., Гуров О. В., Юшкіна М. О. Цукровий діабет і гнійно-запальні захворювання ЛОР-органів // Цукровий діабет. 2012. № 2. С. 54–59.
3. Особливості порушень гуморальної ланки імунітету у хворих на хронічний тонзиліт при наявності цукрового діабету та їх корекція / Вдовіченко Н. І., Тупотілов О. В., Бойко А. А., Коляда О. М. // *Аннали Мечниковського інституту*. 2015. № 2. С. 215–219.
4. Шишкова В. Н. Особливості розвитку гострого і хронічного запалення верхніх дихальних шляхів у пацієнтів з цукровим діабетом // *Consilium Medicum*. 2015. № 17 (4). С. 40–43.
5. Alves C., Casqueiro J., Casqueiro J. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis // *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2012. Vol. 16, Issue 7. P. 27. doi: 10.4103/2230-8210.94253
6. Acute hyperglycaemia induces an inflammatory response in young patients with type 1 diabetes / Gordin D., Forsblom C., Rönnback M., Parkkonen M., Wadén J., Hietala K., Groop P.-H. // *Annals of Medicine*. 2008. Vol. 40, Issue 8. P. 627–633. doi: 10.1080/07853890802126547
7. Lo H.-C., Lin S.-C., Wang Y.-M. The relationship among serum cytokines, chemokine, nitric oxide, and leptin in children with type 1 diabetes mellitus // *Clinical Biochemistry*. 2004. Vol. 37, Issue 8. P. 666–672. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2004.02.002
8. IL-15 is elevated in serum patients with type 1 diabetes mellitus / Kuczyński S., Winiarska H., Abramczyk M., Szczawińska K., Wierusz-Wysocka B., Dworacka M. // *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2005. Vol. 69, Issue 3. P. 231–236. doi: 10.1016/j.diabres.2005.02.007
9. Increased Risk of Common Infections in Patients with Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus / Muller L. M. A. J., Gorter K. J., Hak E., Goudzwaard W. L., Schellevis F. G., Hoepelman A. I. M., Rutten G. E. H. M. // *Clinical Infectious Diseases*. 2005. Vol. 41, Issue 3. P. 281–288. doi: 10.1086/431587
10. Shah B. R., Hux J. E. Quantifying the Risk of Infectious Diseases for People With Diabetes // *Diabetes Care*. 2003. Vol. 26, Issue 2. P. 510–513. doi: 10.2337/diacare.26.2.510
11. Bacterial infections in patients with type 1 diabetes: a 14-year follow-up study / Simonsen, J. R., Harjutsalo, V., Järvinen, A., Kirveskari, J., Forsblom, C., Groop, P.-H., & Lehto, M. // *BMJ Open Diabetes Research & Care*. 2015. Vol. 3, Issue 1. P. e000067. doi: 10.1136/bmjdr-2014-000067
12. Цитохимическая диагностика в лабораторной гематологии: Методическое руководство. Атлас. СПб, 2003. 80 с.
13. Берстон М. Гистохимия ферментов. М.: МИР, 1965. 464 с.
14. Karlow L. S. Histochemical Procedure for Localizing and Evaluating Leucocyte Alkaline Phosphatase Activity in Smears of Blood and Marrow // *Blood*. 1955. Vol. 10, Issue 10. P. 1023–1029.
15. The metabolic regulation in immune cells and pathogenesis of systemic lupus erythematosus ~toward new therapeutic applications~ / Takeshima Y., Iwasaki Y., Okamura T., Fujio K., Yamamoto K. // *Japanese Journal of Clinical Immunology*. 2017. Vol. 40, Issue 1. P. 12–20. doi: 10.2177/jsci.40.12
16. The short chain fatty acid receptor GPR43 regulates inflammatory signals in adipose tissue M2-type macrophages / Nakajima A., Nakatani A., Hasegawa S., Irie J., Ozawa K., Tsujimoto G. et. al. // *PLOS ONE*. 2017. Vol. 12, Issue 7. P. e0179696. doi: 10.1371/journal.pone.0179696

Дата надходження рукопису 22.02.2018

Гавриленко Юрій Володимирович, кандидат медичних наук, асистент, кафедра дитячої оториноларингології, аудіології та фоніатрії, Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика, вул. Дорогожицька, 9, Київ, Україна, 04112
E-mail: yesyur@ukr.net

Лайко Андрій Афанасійович, доктор медичних наук, професор, кафедра дитячої оториноларингології, аудіології та фоніатрії, Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика, вул. Дорогожицька, 9, Київ, Україна, 04112

Карась Антон Феодосійович, кандидат біологічних наук, завідувач лабораторії, лабораторія біофізики, Державна установа «Інститут отоларингології ім. проф. О. С. Коломійченка Національної академії медичних наук України», вул. Зоологічна, 3, м. Київ, Україна, 03057
E-mail: karasaf@bigmir.net

Карась Галина Афанасіївна, кандидат біологічних наук, провідний науковий співробітник, лабораторія біофізики, Державна установа «Інститут отоларингології ім. проф. О. С. Коломійченка Національної академії медичних наук України», вул. Зоологічна, 3, м. Київ, Україна, 03057
E-mail: gkaras@ukr.net