

С.П. Бесчасний

Стресорний вплив вродженої сенсоневральної туговухості на імунну систему дітей 7–11 років

Досліджували вплив хронічної двобічної сенсоневральної туговухості III–IV ступеня на вміст інтерлейкінів, імуноглобулінів сироватки крові й слини, функціональну активність гранулоцитарно-моноцитарної ланки імунітету та оцінювали активність гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної системи дітей 7–11 років. Встановлено, що внаслідок стресорної активації гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної системи пригнічується функція гранулоцитарно-моноцитарної ланки імунітету із відповідним переважанням продукції протизапальних інтерлейкінів. Продукція гранулоцитами та Т-хелперами 2-го типу протизапальних інтерлейкінів ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-10 та ІЛ-13 спричинює активацію В-клітин. Таким чином, у дітей 7–11 років, із вродженою двобічною сенсоневральною туговухістю, відбувається стресорне послаблення неспецифічного імунітету з переважанням гуморального типу імунної відповіді з підвищеним вмістом ІgG.

Ключові слова: сенсоневральна туговухість, інтерлейкіни, гранулоцити, фагоцитоз.

ВСТУП

Поширення алергічних реакцій, вторинних ускладнень після вірусних інфекцій, застосування ототоксичних антибіотиків і поява резистентних мікроорганізмів – усе це щорічно призводить до збільшення в Україні показників ураження слухового аналізатора на 3,3 % серед дитячого населення [7].

У 1969 р. Гюллінг уперше висловив припущення про роль алергічних реакцій у генезі порушень слухового аналізатора, а через десять років McCabe увів термін „аутоімунне захворювання внутрішнього вуха”. Нині застосовують термін „імуноопосередковане зниження слуху” [5, 9].

Залучення імунної системи до розвитку хронічної сенсоневральної туговухості (СНТ) підтверджує наявність у крові сенсibiliзованих лімфоцитів-ефекторів, антитіл до мієліну і нейроспецифічної енолази [2, 4, 6, 9]. Це явище передусім пов’язують із циркуляцією нейроспецифічних білків у крові внаслідок

© С.П. Бесчасний

збільшення проникності гематоенцефалічного та гематолабиринтного бар’єрів [10, 12].

Встановлено, що за умов гострої форми СНТ у крові підвищується вміст фактора некрозу пухлин, ІЛ-1 і природних кілерів. Після переходу СНТ у хронічну форму, навпаки, констатують зниження цих показників у декілька разів [9, 10, 12]. Також за умов хронічної СНТ у крові виявлено підвищений вміст Т-хелперів [1, 7, 9].

Однак залишається невивченим питання залучення неспецифічної ланки імунної системи, її взаємодія з імунокомпетентними клітинами та станом активності гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної системи у дітей із вродженою двобічною СНТ. Особливої уваги заслуговують дослідження впливу хронічної СНТ у молодшому шкільному віці, оскільки цей період характеризується становленням гуморальної ланки імунітету (відповідно до рівня дорослих), завершенням розвитку системи неспецифічного захисту та підвищенням частоти аутоімунних процесів.

Мета роботи – дослідити особливості функціонування імунної системи в залежності від стану активності гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної системи у дітей 7–11 років в умовах вродженої СНТ.

МЕТОДИКА

Обстежено 120 дітей, яких розділили на дві групи по 60 осіб у кожній: основну – діти із вродженою двобічною СНТ III–IV ступеня, ускладненою двобічним кохлеарним невритом і, контрольну – діти з нормальним слухом. Особливості міжлейкоцитарної взаємодії вивчали за вмістом прозапального ІЛ-2 і протизапальних ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-10, ІЛ-13 у сироватці крові та слині. Стан гуморального імунітету оцінювали за вмістом ІgА, ІgМ та ІgG у сироватці крові та слині, гранулоцитарно-моноцитарну ланку – за допомогою показників фагоцитозу, вмісту лужної фосфатази (ЛФ), мієлопероксидази, катіонних білків і фосфоліпідів. Активність гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної системи визначали за вмістом адреналіну та 17-кетостероїдів у добовій порції сечі.

Функціональний стан гранулоцитарно-моноцитарної ланки вивчали, досліджуючи фагоцитарну активність нейтрофілів і моноцитів периферичної крові за методикою Кост, Стенко. [3]. Під час мікроскопії підраховували число фагоцитуючих лейкоцитів, розраховували показник фагоцитарного індексу (відсоток лейкоцитів, які брали участь у фагоцитозі) та фагоцитарного числа (середня кількість фагоцитованих мікроорганізмів одним фагоцитом).

Для визначення ефекторних впливів сенсоневральної туговухості на метаболічну активність гранулоцитів периферичної крові, досліджували вміст мієлопероксидази, катіонних білків, ліпідів і ЛФ. Вміст виражали за допомогою принципу Astaldi, заснованого на оцінці інтенсивності специфічної цитохімічної реакції із використанням чотирибальної шкали [3].

Активність ЛФ визначали методом азосполучення, який оснований на явищі розще-

плення ЛФ α -нафтил-фосфату із вивільненням α -нафтолу, котрий вступає у реакцію азосполучення з сіллю діазонію [3]. В результаті реакції у місцях активності ферменту випадає осад азобарвника.

Вміст катіонних білків виявляли за методикою Шубича, основою на вибіркового забарвленні катіонних білків бромфеноловим синім. Катіонний білок у цитоплазмі гранулоцитів був у вигляді синіх гранул [3].

Вміст мієлопероксидази досліджували за методом Graham, Knoll, який оснований на явищі окиснення бензидину пероксидом водню за наявності пероксидази у коричневий оксibenзидин [3]. Препарати дофарбовували барвником Романовського–Гімзи.

Цитохімічне виявлення фосфоліпідів периферичної крові проводили за методом Гольдмана із фарбуванням нейтрального жиру Суданом III у помаранчевий колір [3].

Вміст імуноглобулінів визначали із використанням стандартних наборів реагентів твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА), виготовлених НВЛ “Гранум” (м. Харків, Україна). Кров забирали за стандартною методикою за допомогою пробірок “Vacuete” для сироватки з активатором згортання. Для запобігання помутніння сироватки забір крові проводили натщесерце.

Для визначення вмісту саліварних імуноглобулінів протягом 5 хв збирали змішану нестимульовану слину (після полоскання ротової порожнини фізіологічним розчином) у стерильні пронумеровані мікробіологічні пробірки. Зразки слини заморожували і зберігали у морозильній камері.

Вміст інтерлейкінів ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-10 та ІЛ-13 сироватки крові та слини також визначали за допомогою ІФА з використанням стандартних наборів реагентів “ProCon ІЛ-2”, “ProCon ІЛ-4”, “ProCon ІЛ-5”, “ProCon ІЛ-10”, “ProCon ІЛ-13” виробництва “Протеиновый контур” (м. Санкт-Петербург, Росія). Взяття та підготовку сироватки крові і слини здійснювали аналогічно методиці визначення вмісту імуноглобулінів. Детекцію результатів

ІФА сироватки і слини проводили за допомогою стрипового аналізатора Stat Fax 303 plus («Awareness Technology», США).

Добову порцію сечі для визначення вмісту адреналіну та 17 - кетостероїдів збирали у спеціальну ємність із консервантом. Під час усього періоду збору посудину зберігали у холодильнику при +10 °С. Перед проведенням аналізу діти не приймали препарати, які могли впливати на результати досліджень.

Вміст адреналіну у зразках добової сечі визначали колориметричним методом із використанням реактиву Фоліна [3]. Вміст 17-кетостероїдів також розраховували колориметричним методом із використанням спиртового розчину М-динітробензену.

Проводили статистичний і графічний аналіз результатів із використанням програми Statistica 6.0. Достовірність відмінностей визначали за непараметричним критерієм Манна–Уїтні. Характеристику набору бальних оцінок здійснювали за допомогою медіани. Критичний рівень достовірності був при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що вміст адреналіну у добовій порції сечі дітей із СНТ був вищим (46,04 мг/добу)

порівняно з контролем (16,78 мг/добу; рис. 1,а).

Аналогічна ситуація спостерігалася із вмістом 17-кетостероїдів. У основній групі він був достовірно вищим і становив 5,62 мг/добу порівняно з контролем – 4,54 мг/добу ($P \leq 0,05$; див. рис. 1,б). Отримані результати вказують на наявність стрес-реакції у дітей із СНТ.

Функціональна активність лейкоцитів периферичної крові дітей із СНТ також відрізнялася ($P \leq 0,05$) від значень у дітей контрольної групи. У дітей із СНТ показники фагоцитозу були зниженими зокрема, фагоцитарний індекс у основній групі становив 70,8 %, у контрольній – 93,8 % (рис. 2,а). Фагоцитарне число у основній групі сягало 3,6 %, у контролі – 10,4 % (див. рис. 2,б).

Відомо, що ЛФ лейкоцитів, здійснюючи дефосфорилування, бере безпосередню участь у процесах внутрішньоклітинної передачі сигналів з мембранних рецепторів. У гранулоцитах ЛФ безпосередньо локалізована у плазматичній мембрані та мембранах гранул [11].

Вміст ЛФ у гранулоцитах периферичної крові дітей із СНТ був вищим ($P \leq 0,05$; рис. 3), що вказує на пригнічення функції гранулоцитів за рахунок впливу підвищеної кількості адреналіну та 17-кетостероїдів. Наше припущення підтверджується відомостями про те,

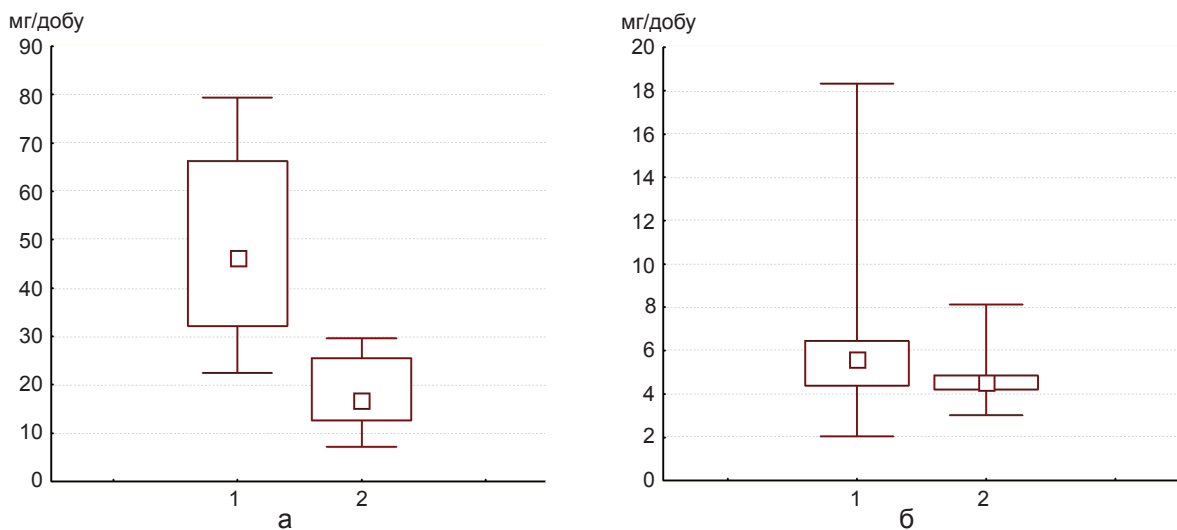


Рис. 1. Вміст адреналіну (а) та 17-кетостероїдів (б) у добовій порції сечі основної (1) та контрольної (2) груп. $P \leq 0,05$

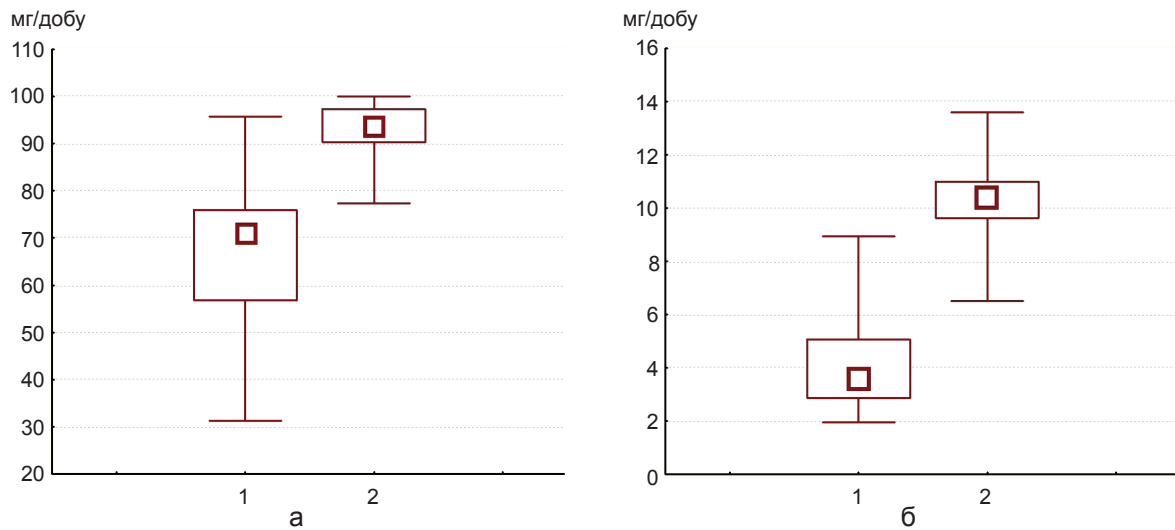


Рис. 2. Фагоцитарний індекс (а) та фагоцитарне число (б) дітей основної (1) та контрольної (2) груп. $P \leq 0,05$

що вміст ЛФ підвищується при стресорних станах, внаслідок уведення стресорних гормонів [8].

У дітей основної групи порівняно з контрольною слід відмітити зниження вмісту мієлопероксидази (0,65 щодо 2,2 ум.од.), катіонних білків (0,9 щодо 1,25 ум.од.) і фосфоліпідів (2,1 щодо 2,4 ум.од.).

Згідно з літературними даними, високий вміст ЛФ блокує утворення активних форм кисню активованими клітинами, змінює рН і призводить до блокування активних центрів катіонних білків [30, 31]. Ми припускаємо, що подібний механізм лежить в основі зниження показників фагоцитозу в групі дітей із туговухістю, оскільки антимікробна здатність гранулоцитів забезпечується внаслідок так званого „респіраторного вибуху”, який реалізується за безпосередньої участі мієлопероксидази. Знижений вміст фосфоліпідів, що становлять 10–20 % сухої маси у лейкоцитах, вказує на знижену ефективність захисних реакцій, які здійснюються цими клітинами.

При порівнянні вмісту імуноглобулінів сироватки крові у дітей дослідної групи було виявлено вищий вміст IgA (2,5 г/л; $P \leq 0,05$) та IgG дослідної (21,5 г/л) у порівнянні з контролем: 1,5 і 12,5 г/л відповідно. Водночас спостерігали знижений вміст IgM (0,88 г/л

порівняно з 1,3 г/л у контролі; рис. 4).

Підвищення вмісту IgG ми вважаємо ознакою аутоімунних процесів у дітей із СНТ, вмісту IgA – про запальні процеси слизової слухової труби та внутрішнього вуха. Зниження вмісту IgM, що пояснюється переключенням плазмоцитів на синтез IgG у дітей із СНТ, також є несприятливим фактором, оскільки основна функція цих імуноглобулінів полягає у хемотаксисі та активації фагоцитуючих клітин.

Вивчення вмісту саліварних імуноглобулінів важливе, оскільки цей метод не потребує інвазійного втручання, що має особливе

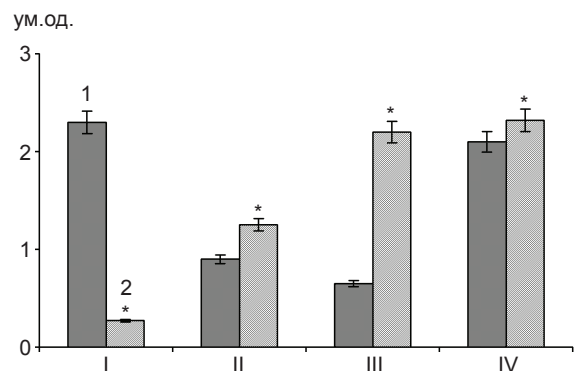


Рис. 3. Вміст лужної фосфатази (I), катіонних білків (II), мієлопероксидази (III), фосфоліпідів (IV) у гранулоцитах периферичної крові дітей основної (1) та контрольної (2) груп (середній цитохімічний коефіцієнт). * $P \leq 0,05$ порівняно з контролем

значення при скринінгових дослідженнях стану місцевого імунітету у школярів. Ці імуноглобуліни мають подвійне походження: за рахунок місцевого синтезу плазматичними клітинами та трансудації через ясенний жолобок, який являє собою головне джерело лейкоцитів у ротовій порожнині.

Порівняння вмісту саліварних імуноглобулінів показало, що вміст IgA основної групи був нижчим (0,26 г/л; $P \leq 0,05$) у порівнянні з контролем (1,3 г/л). У слині дітей із СНТ встановлено зниження вмісту IgM (0,48 г/л) відносно контролю (0,8 г/л). Разом з тим вміст саліварного IgG був вищим (1,8 г/л) порівняно із контрольною групою (0,98 г/л; див. рис. 4). Отримані нами результати вказують на дисбаланс продукції імуноглобулінів IgA, IgM та IgG у дітей молодшого шкільного віку із СНТ.

Відомо, що інтерлейкіни – білкові або поліпептидні продукти активованих клітин імунної системи, які відіграють роль медіаторів взаємодії у розвитку імунної відповіді. Їхня основна біологічна функція полягає у регуляції імунної відповіді на етапах проліферації, диференціації попередників функціональноактивних імунокомпетентних клітин, активації проліферації антигенчутливих лімфоцитів, диференціації В-лімфоцитів у плазматичні клітини, переключенні синтезу різних типів імуноглобулінів.

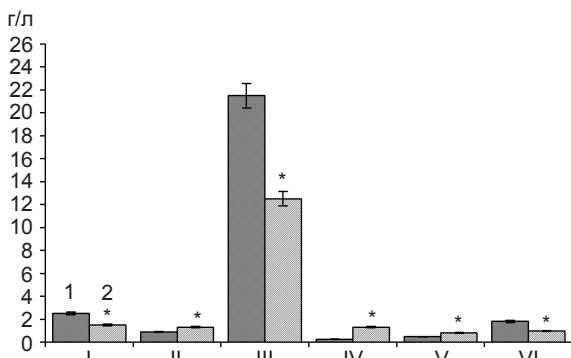


Рис. 4. Вміст імуноглобулінів IgA (I), IgM (II), IgG (III) у сироватці крові та IgA (IV), IgM (V), IgG (VI) у слині дітей основної (1) та контрольної (2) групи. * $P \leq 0,05$ порівняно з контролем

При дослідженні вмісту інтерлейкінів сироватки крові у дітей із СНТ було виявлено певні особливості їх розподілу. Вміст прозапального ІЛ-2 у основній групі був нижчим (2,3 пг/мл; $P \leq 0,05$), ніж у контрольній (3,64 пг/мл). На протипагу цьому вміст протизапальних ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-10 та ІЛ-13 у основній групі був вищим. Слід відмітити високий вміст ІЛ-13 у сироватці крові дітей із туговухістю (29,95 пг/мл) при порівнянні з контролем (8,01 пг/мл), який є потужним стимулятором для диференціації Т-хелперів 0-го типу у Т-хелпери 2-го типу (рис. 5).

При дослідженні вмісту інтерлейкінів у слині було встановлено аналогічний розподіл показників. У основній групі вміст саліварного ІЛ-2 становив 0,01 пг/мл, у контрольній – 1,23 пг/мл. У дослідній групі, вміст ІЛ-4 (54,2 пг/мл), ІЛ-5 (3,82 пг/мл), ІЛ-10 (0,02 пг/мл) був вище, ніж у контрольній (0,31 пг/мл, 1,04 пг/мл та 0,02 пг/мл відповідно). Також зафіксовано підвищений вміст ІЛ-13 у основній групі (9,47 пг/мл) на відміну від контрольної (2,25 пг/мл; рис. 6).

Аналіз отриманих результатів свідчить про те, що у дітей молодшого шкільного віку під впливом хронічної двобічної СНТ спостерігається стресорна активація гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної системи. Адреналін і кортикостероїди, діючи на гранулоцитарно-моноцитарну ланку імунітету, пригнічують їх функції та спричиняють

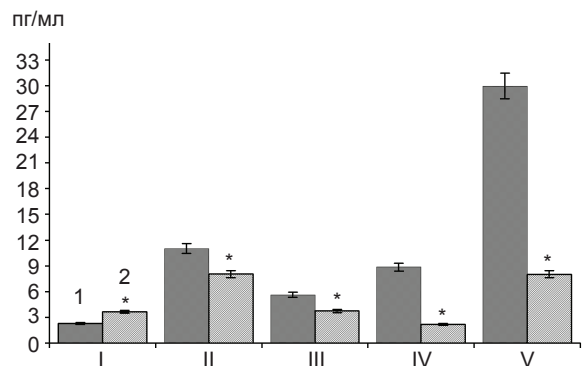


Рис. 5. Вміст інтерлейкінів ІЛ-2 (I), ІЛ-4 (II), ІЛ-5 (III), ІЛ-10 (IV), ІЛ-13 (V) у сироватці крові дітей основної (1) та контрольної (2) групи. * $P \leq 0,05$ порівняно з контролем

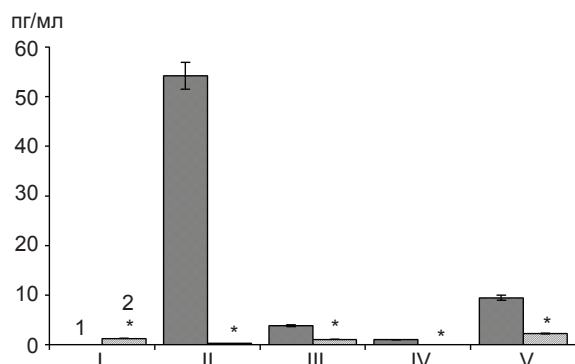


Рис. 6. Вміст саліварних інтерлейкінів ІЛ-2 (І), ІЛ-4 (ІІ), ІЛ-5 (ІІІ), ІЛ-10 (ІV), ІЛ-13 (V) дітей основної (1) та контрольної (2) групи. * $P \leq 0,05$ порівняно з контролем

переважання протизапальних інтерлейкінів. Внаслідок підвищення вмісту протизапальних інтерлейкінів переважають Т-хелпери 2-го типу, що узгоджується з літературними даними [1, 7, 9]. Продукція гранулоцитами та Т-хелперами 2-го типу відповідних інтерлейкінів спричиняє активацію В-клітин і перетворення їх у плазматичні клітини – активні продуценти імуноглобулінів. Таким чином, у дітей 7–11 років в умовах СНТ послаблюється неспецифічний імунітет із переважанням гуморального типу імунної відповіді з підвищеним вмістом IgG.

ВИСНОВКИ

1. У дітей молодшого шкільного віку із двобічною СНТ встановлено підвищення вмісту адреналіну та 17-кетостероїдів, що вказує на наявність стрес-реакції.

2. Після дослідження функціонального стану гранулоцитарно-моноцитарної ланки імунітету зафіксовано підвищений вміст ЛФ з одночасним зниженням вмісту мієлопероксидази, катіонних білків і фосфоліпідів у гранулоцитах на тлі знижених показників фагоцитозу.

3. У сироватці крові виявлено підвищений вміст IgA, IgG та знижений вміст IgM. Вміст саліварних IgA та IgM – знижений, IgG – підвищений. Встановлений дисбаланс імуноглобулінів (із підвищенням вмісту IgG)

вказує на латентний запальний процес.

4. Внаслідок впливу підвищених концентрацій адреналіну та 17-кетостероїдів на лейкоцити-продуценти інтерлейкінів у сироватці крові та слині дітей із туговухістю переважають протизапальні інтерлейкіни, які модулюють імунну відповідь за гуморальним типом із активацією В-лімфоцитів і переключенням на синтез IgG.

С.П. Бесчасний

СТРЕССОРНОЕ ВЛИЯНИЕ ВРОЖДЕННОЙ СЕНСОНЕВРАЛЬНОЙ ТУГОУХОСТИ НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ ДЕТЕЙ 7–11 ЛЕТ

Исследовали влияние хронической двухсторонней сенсоневральной тугоухости III–IV степени на содержание интерлейкинов, иммуноглобулинов сыворотки крови и слюны, функциональную активность гранулоцитарно-моноцитарной ячейки иммунитета, оценивали активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы детей 7–11 лет. Установлено, что вследствие стрессорной активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы угнетается функция гранулоцитарно-моноцитарной ячейки иммунитета с соответствующим преобладанием продукции противовоспалительных интерлейкинов. Продукция гранулоцитами и Т-хелперами 2-го типа интерлейкинов ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10 и ИЛ-13 приводит к активации В-лимфоцитов. Таким образом, у детей 7–11 лет с хронической двухсторонней сенсоневральной тугоухостью ослабляется неспецифический иммунитет с преобладанием гуморального типа иммунного ответа с повышенным содержанием IgG.

Ключевые слова: сенсоневральная тугоухость, интерлейкины, гранулоциты, фагоцитоз.

S.P. Beschasniu

EFFECT OF CHRONIC SENSORINEURAL HEARING LOSS AT SEVERAL INDICATORS OF IMMUNE AND ENDOCRINE SYSTEMS OF CHILDREN 7–11 YEARS

We investigated the effects of chronic bilateral sensorineural hearing loss of III–IV degree on the performance of interleukins, immunoglobulins serum and saliva, the functional activity of granulocyte-monocyte cell immunity, evaluated the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal system in children aged 7–11 years. It was found that due to stress activation of the sympathetic-adrenal system the function of granulocytes and monocytes is suppressed, with a predominance of production of anti-inflammatory interleukins. This leads to the dominance of T-helper type 2. Products granulocytes and T-helper type-2

anti-inflammatory interleukins IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 leads to the activation of B-cells. Thus, in children 7-11 years of age with congenital bilateral sensorineural hearing loss is a decrease of non-specific humoral immunity dominated type of immune response to increased levels of IgG.

Keywords: sensorineural hearing loss, interleukins, granulocytes, phagocytosis.

Kherson State University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гребенюк И.Э. Этиопатогенетические аспекты сенсоневральной тугоухости: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2007. – 22 с.
2. Золотова Т. В. Дифференциальный подход к лечению сенсоневральной тугоухости: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2004. – 41 с.
3. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / под ред. В.В. Меншикова. – М.: Медицина, 1987. — 368 с.
4. Мельников О.Ф., Сидоренко Т.Ф., Заяц Т.А., Тимен Г.Э., Чашева Е.Г. Аутоиммунные реакции гуморального и клеточного типов на антигены нервной ткани у детей с сенсоневральной тугоухостью // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. – 2003. – №6. – С. 5–8.
5. Нугуманов А.А. Аутоиммунные заболевания внутреннего уха и методы их лечения: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Санкт-Петербург, 2008. – 28 с.
6. Тимен Г.Э. Мельников О.Ф., Писанко В.Н., Самбур М.Б., Голод А.Н. Клинико-аудиологические признаки аутоиммунной СНТ // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. – 2000. – №6. – С. 105–108.
7. Чашева О.Г. Клініко-імунологічні аспекти в діагностиці та лікуванні дітей з сенсоневральною приглухуватістю: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – К., 2007. – 20 с.
8. Bednarska K., Klink M., Sulowska Z. Application of intracellular alkaline phosphatase activity measurement in detection of neutrophil adherence in vitro // Mediators Inflamm. – 2006. – 4. – P. 19307–19312.
9. Broughton S.S., Meyerhoff W.E., Cohen S.B. Immune-mediated inner ear disease: 10-year experience // Semin. Arthritis. Rheum. – 2004. – 34, №2. – P.544–548.
10. Garcia Berrocal J.R., Berrocal, R. Ramirez-Camacho Sudden sensorineural hearing loss: supporting the immunologic theory // Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. – 2002. – №111. – P. 989–997.
11. Pellme S., Dahlgre N.C., Karlsson A. 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 // J. Immunol. Methods. – 2007. – 325. – P. 1562–1570.
12. Reddy M.V., Satyanarayana V.V., Hemabindu L. Immunological studies in children with hearing impairment // Indian. Med. Assoc. – 2005. – 103, №10. – P.520–521.

Херсон. ун-т

E-mail: beschasniu@yandex.ru

Матеріал надійшов до редакції 22.11.2012