

ЦИТОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ У ДЕТЕЙ, БОЛЬНЫХ АЦЕТОНЕМИЧЕСКОЙ РВОТОЙ, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА

Демидов А.А.¹, Башкина О.А.¹, Демидов А.А.¹

¹ФГБОУ «Астраханский ГМУ» Минздрава России, Астрахань, e-mail: daa2@bk.ru

Проводилось полное клинико-лабораторное обследование 50 детей с синдромом ацетонемической рвоты (АР) на базе отделения реанимации и интенсивной терапии № 2 ГУЗ «Областная клиническая больница им Н.Н. Силищевой» в возрасте от 1 года до 16 лет. На базе детской поликлиники МУЗ «ГБ № 5» были обследованы 58 здоровых детей, соответствующих по половому и возрастному составу основной группе. Эти дети составили контрольную группу. Все дети, как здоровые, так и больные АР, обследовались на активность цитохимических ферментов в нейтрофилах. В нейтрофилах крови определяли активность метаболических ферментов: сукцинатдегидрогеназы (СДГ), данный фермент отражает цикл Кребса; лактатдегидрогеназы (ЛДГ), отвечающей за анаэробный гликолиз; и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ), ответственной за активность пентозофосфатного шунта. В результате исследований было выяснено, что как количественная, так и качественная активность вышеуказанных ферментов имеет существенные отличия у здоровых детей и детей, больных АР. Также были выявлены отличия в данных группах по среднему цитохимическому показателю (СЦП) в зависимости от возраста детей. Отмечалось снижение активности СДГ, ЛДГ и Г-6-ФДГ у младшей и старшей возрастных групп, тогда как у детей средней возрастной группы этот показатель был повышен. Качественная активность метаболических ферментов различна у детей различных возрастных групп. В младшей и средней группе СЦП формируется за счет клеток низшей активности (степень «а»), в старшей преобладают клетки степени «в» (высшая степень активности).

Ключевые слова: ацетонемическая рвота, кетоацидоз, метаболические ферменты, нейтрофилы.

CYTOCHEMICAL ACTIVITY OF NEUTROPHILS IN CHILDREN WITH ACETONEMIC VOMITING, DEPENDING ON AGE

Demidov A.A.¹, Bashkina O.A.¹, Demidov A.A.¹

¹FGBOU Astrakhan State Medical University, Astrakhan, e-mail: daa2@bk.ru

A complete clinical and laboratory examination of 50 patients with acetonemic vomiting syndrome (AVS) at the age from 1 year to 16 years, who were treated in the intensive care unit № 2 of the «Regional children's clinical hospital named By N.N. Silischeva» was conducted. The control group consisted of 57 healthy children of the same age and sex composition examined in the conditions of children's polyclinic № 5. All children underwent cytochemical study of the enzymatic activity of neutrophils. The following enzymes were studied: succinate dehydrogenase (SDG) reflecting the Krebs cycle; lactate dehydrogenase (LDH) reflecting anaerobic glycolysis; glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-FDG) reflecting the activity of pentose-phosphate shunt. The results of the study showed that the quantitative activity of metabolic enzymes in children with AVS with ketoacidosis differs significantly from these indicators in healthy children. The average cytochemical activity of metabolic enzymes varies in children with AVS with ketoacidosis, depending on the age group. Thus, in patients of the younger and older groups, the cytochemical activity of all studied enzymes is reduced, in patients of the middle group – increased. Qualitative activity of metabolic enzymes is different in children of different age groups. In the younger and middle group, the average cytochemical index is formed by cells of lower activity (degree "a"), in the older group – by cells of higher activity (degree "b").

Keywords: acetonemic vomiting, ketoacidosis, metabolic enzymes, neutrophils.

Наш организм состоит из отдельных клеток. Изучая отдельную клетку, можно понять, какие именно изменения предстоят на уровне целостного организма [1]. Многие ученые считают, что отдельная клетка или целый клеточный пул работают как открытая система. Не обязательно, что изменения в структуре или функции клетки обязательно вызовут определенные заболевания, но можно говорить о снижении сопротивляемости целого организма и его резервных возможностей [2].

В чем же конкретно может выразиться снижение резервных возможностей макроорганизма? Во-первых, снижение реактивности. То есть макроорганизм неспособен адекватно отреагировать на внешнюю опасность. Следствием этого может являться гибель клетки и развитие болезни [3].

Достаточно часто задолго до проявления клинической симптоматики можно выявить различные изменения на клеточном уровне. Кроме того, при многих заболеваниях изменения в клеточной структуре сохраняются еще некоторое время после исчезновения клинических симптомов [4].

На современном этапе своевременно выявить патологию функционирования клетки дает возможность цитохимический анализ крови [5].

Цитохимию можно назвать особым разделом цитологии. Данная наука для изучения строения клетки, ее функциональной активности применяет биохимический метод. Если ферментативная активность в биохимии выражается исключительно в средних цифровых данных, то в цитохимическом анализе подсчитывается как качественный, так и количественный показатели активности фермента. Количественно подсчитывается число гранул активного вещества. Каждой клетке присуще свое количество активного вещества, что позволяет выделять их по степени активности. Здоровым людям в основном присущи клетки с низкой ферментативной активностью [6].

Роль местного иммунитета давно известна и во многом разработана. Такие факторы защиты, как лизоцим, лактоферрин, НСТ-тест, иммуноглобулин А, а также дефенсин и клетки эпителия, и их роль при различных заболеваниях освещены во многих научных трудах [7].

Нейтрофильные гранулоциты долгое время оставались на «задворках» местного иммунитета. Тем не менее исследования последних лет показали, что нейтрофильные гранулоциты выполняют массу полезных функций в деле поддержания местного иммунитета. Так, например, непрерывно мигрируя в полость рта, нейтрофилы создают надежный барьер для попадания возбудителей и проявления их патогенных реакций [8].

Изменения степени клеточной активности, различные вариации преобладания высшей, средней и низшей степеней активности нейтрофилов не носят специфического характера и могут отмечаться при самых различных заболеваниях [9].

Неравномерность распределения активного вещества в нейтрофилах позволяет судить о течении заболевания, способствовать правильному прогнозу и оптимизации лечения, в частности, применяя иммуномодулирующие препараты, позволяющие сбалансировать местный иммунитет при патологических процессах в пораженных органах и тканях [10].

Таким образом, информативность и простота в постановке реакций и подсчета

результатов указывает на цитохимический анализ как на один из оптимальных методов изучения клетки, что делает актуальной тему нашего исследования.

Цель исследования: выявить изменения метаболической активности нейтрофилов крови у детей, больных ацетонемической рвотой, в зависимости от возраста.

Материалы и методы исследования. Проводилось полное клиничко-лабораторное исследование 50 пациентов с кетоацидозом при ацетонемической рвоте (АР), находившихся на лечении в отделении реанимации и интенсивной терапии № 2 ГУЗ «Областная детская клиническая больница им. Н.Н. Силищевой» г. Астрахани. Обследовались дети различных возрастных групп: в младшую группу вошли пациенты от 3 до 6 лет. Среднюю группу составили дети в возрасте от 6 до 12 лет. Старшая группа состояла из детей в возрасте от 12 до 16 лет. В контрольную группу вошли 57 здоровых детей в возрасте от 1 года до 16 лет. Все здоровые дети проходили обследование на базе детской поликлиники МУЗ «ГБ № 5».

Диагноз ацетонемической рвоты ставился на основании анамнеза, выраженных клинических проявлений, лабораторных обследований. Критерии диагностики оценивались согласно действующим временным отраслевым стандартам. По данным существующей международной классификации болезней 10 пересмотра (МКБ 10) АС шифровался как R.11- «тошнота и рвота».

Для цитохимических исследований в нейтрофилах крови детей определяли активность метаболических ферментов: сукцинатдегидрогеназы (СДГ), данный фермент отражает цикл Кребса, лактатдегидрогеназы (ЛДГ), отвечающей за анаэробный гликолиз, и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ), ответственной за активность пентозофосфатного шунта.

Все реакции проводились согласно методике Нарциссова Р.П. (1970). Мы несколько усовершенствовали методику, заменив рекомендуемый Р.П. Нарциссовым тетразолий фиолетовый на тетразолий нитро-синий 4-Nitroblautetrazoliumchlorid (Nitro BT) фирмы Serva (Германия).

Данный выбор был осуществлен по следующим причинам. Р.П. Нарциссов и его ученики применяли методику определения ферментативной активности только в лимфоцитах. Все, весьма редко встречающиеся в литературе, работы по исследованию ферментов в нейтрофилах выполнялись авторами с применениями нитро-ВТ.

В пробирку с 1 мл гепарина, разведенного в 0,9% растворе хлорида натрия (10 Ед в 1 мл), у каждого пациента забирали по 5 мл крови, из которой готовили мазки для подсчета нейтрофилов.

Оценку результатов цитохимических реакций проводили полуколичественным методом Kaplow.

В 100 нейтрофилах подсчитывали количество гранул выпавшего в осадок цитохимически активного вещества. В зависимости от количества гранул определяли качественную степень реакции клетки. Если гранулы цитохимически активного вещества занимали до 25% цитоплазмы, данная клетка классифицировалась как низшая степень активности и получала степень «а». Если гранулы цитохимически активного вещества занимали от 30 до 70% цитоплазмы, то активность клетки определялась как средняя и получала степень «б». К высшей степени активности относили клетки, цитоплазма которых была заполнена цитохимически активным веществом на 70-100%. Такие клетки определялись как степень «в». Клетки без гранул определялись как нулевая степень активности.

Определяли, сколько активных клеток среди 100 подсчитанных, а также степень активности каждой клетки. Следующим шагом был подсчет среднего цитохимического показателя (СЦП), который определяли по формуле: $СЦП = a + 2б + 3в$.

Статистическую обработку данных проводили при помощи программы Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., США). Для каждого показателя и групп наблюдений вычисляли медиану, 5 и 95 процентиля. Поскольку в большинстве групп признаки имели отличное от нормального распределение, то для проверки статистических гипотез при сравнении числовых данных двух несвязанных групп использовали U-критерий Манна-Уитни. За критический уровень статистической значимости принимали 5% ($p = 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение. У детей, больных АР с кетоацидозом, в возрасте от 3 до 6 лет (младшая группа) метаболическая ферментативная активность в нейтрофилах значительно отличалась от таковой в норме у этой же возрастной группы (таблица 1). Так, активность СДГ в нейтрофилах при кетоацидозе составляла 11,11 ЕД [0,55; 10,55], что в 5,8 раза меньше таковой в норме.

Активность лактатдегидрогеназы в исследуемой группе также отличалась от аналогичных показателей здоровых детей. Так, если СЦП ЛДГ у здоровых детей составляла 72,02 [3,60; 68,41] УЕ, то у детей, больных АР с кетоацидозом, данный показатель составлял 21,01 [1,05; 19,95] УЕ, что в 3,4 раза ниже нормы для данной группы.

Таблица 1

Активность метаболических ферментов в нейтрофилах детей, больных АР с кетоацидозом, 3-6 лет (младшая группа), усл. ед.

ФЕР-МЕНТ	Время обследования	% реагир. клеток	Степени реакции			СЦП
			а	б	в	
С Д Г	норма	32,03 [1,60; 30,42]	0	32 [1,60;30,40]	0	64,14 [3,20; 60,93]
	кетоацидоз	11,11 [0,55; 10,55]	11,11 [0,55;10,55]	0	0	11,11* [0,55; 10,55]
Л Д Г	норма	36,01 [1,80; 34,20]	0	36,01 [1,80; 4,20]	0	72,02 [3,60; 68,41]
	кетоацидоз	21,01 [1,05; 19,95]	21,01 [1,05;19,95]	0	0	21,01* [1,05; 19,95]
Г-6-ФДГ	норма	43,01 [2,15;40,85]	0	43,01 [2,15;40,85]	0	86,14 [4,30; 81,83]
	кетоацидоз	27,01 [1,35; 25,65]	27,01 [1,35;25,65]	0	0	27,01* [1,35; 25,65]

* $p < 0,05$ при сравнении с нормой.

Активность пентозофосфатного шунта у детей младшей возрастной группы также намного снижалась по сравнению с нормальными показателями. У здоровых детей СЦП активности Г-6-ФДГ составил 86,14 [4,30; 81,83] УЕ, тогда как у детей с кетоацидозом СЦП данного фермента равнялся 27,01 [1,35; 25,65] УЕ, что в 3,2 раза меньше такового в норме.

Мы изучили не только количественные, но и качественные изменения активности реагирующих клеток. Цитохимический анализ активности нейтрофилов в данной группе показал, что у больных АР с кетоацидозом количественное изменение активности всех трех изучаемых ферментов сопровождалось качественным изменением реагирующих клеток.

Так, основное количество клеток, формировавших средний цитохимический показатель активности исследуемых нами ферментов детей контрольной группы младшего возраста, было клетками средней степени активности. У детей, больных АР с кетоацидозом, СЦП активности ферментов был обусловлен клетками с низшей степенью активности. Ни у тех, ни у других клетки, реагирующие по степеням «б» и «в», не отмечались.

Результаты исследования ферментативной активности нейтрофилов крови детей с кетоацидозом в возрасте от 6 до 11 лет (средняя группа) также отличались от таковых у

здоровых детей данного возраста (таблица 2).

Таблица 2

Активность метаболических ферментов в нейтрофилах детей, больных АР с кетоацидозом, 6-11 лет (средняя группа), усл. ед.

ФЕР-МЕНТ	Время обследования	% реагир. клеток	Степени реакции			СЦП
			а	б	в	
С Д Г	норма	16,03 [0,80; 15,22]	0	16,11 [0,80; 5,30]	0	32,14 [1,60; 30,53]
	кетоацидоз	45,71 [2,28; 43,42]	45,71 [2,28;43,42]	0	0	45,71* [2,28; 43,42]
Л Д Г	норма	24,01 [1,20; 22,80]	0	23,15 [1,15; 1,99]	0	46,30 [2,31; 43,98]
	кетоацидоз	54,51 [2,72; 51,78]	54,51 [2,72;51,78]	0	0	54,51* [2,72; 51,78]
Г-6-ФДГ	норма	22,01 [1,10; 20,90]	0	21,11 [1,05; 20,05]	0	42,22 [2,11; 40,10]
	кетоацидоз	64,12 [3,20; 60,91]	64,12 [3,20; 0,91]	0	0	64,12* [3,20; 60,91]

* $p < 0,05$ при сравнении с нормой.

У детей средней возрастной группы средний цитохимический показатель активности цикла Кребса в нейтрофилах составлял 45,71 [2,28; 43,42] УЕ, что в 1,7 раза выше, чем в контрольной группе детей данного возраста (СЦП_N= 32,14 [1,60; 30,53] УЕ). Отмечалось повышение активности ЛДГ (СЦП_{лдг}=54,51 [2,72; 51,78] УЕ) в 2,3 раза по сравнению с таковой у здоровых детей данной возрастной групп (СЦП_N=46,30 [2,31; 43,98] УЕ). Наибольшее снижение ферментативной активности было отмечено при исследовании Г-6-ФДГ. У больных кетоацидозом активность данного фермента повышалась в 2,4 раза (СЦП_{г-6-фдг}=64,12 [3,20; 60,91] УЕ при норме 42,22 [2,11; 40,10] УЕ).

Результаты изучения качественной активности нейтрофилов крови детей с кетоацидозом средней группы значительно отличались от таковых у больных младшей группы. Если в младшей группе СЦП у больных кетоацидозом был сформирован клетками низшей степени активности, то у больных средней группы все реагирующие клетки классифицировались как степень «б», так же как и у здоровых детей. Однако у больных кетоацидозом в данной группе процент реагирующих клеток был значительно меньше.

У детей, больных АР с кетоацидозом, старшей возрастной группы (12-16 лет)

ферментативная активность существенно отличалась от таковой у здоровых детей (таблица 3).

Таблица 3

Активность метаболических ферментов в нейтрофилах детей, больных АР с кетоацидозом, 12-16 лет (старшая группа), усл. ед.

ФЕР-МЕНТ	Время обследования	% реагир. клеток	Степени реакции			СЦП
			а	б	в	
С Д Г	норма	18,02 [0,90;17,11]	18,02 [0,90;17,11]	0	0	18,02 [0,90; 17,11]
	кетоацидоз	4,30 [0,21; 4,08]	0	0	4,30 [0,21; 4,08]	12,90* [0,64; 12,25]
Л Д Г	норма	23,01 [1,15;21,85]	23,01 [1,15; 21,85]	0	0	23,01 [1,15;21,85]
	кетоацидоз	5,11 [0,25; 4,85]	0	0	5,11 [0,25; 4,85]	15,33* [0,76; 14,56]
Г-6-ФДГ	норма	38,01 [1,90;36,10]	38,01 [1,90; 36,10]		0	38,01 [1,90; 36,10]
	кетоацидоз	6,72 [0,33; 6,38]	0	0	6,72 [0,33; 6,38]	20,16* 1,00; 19,15]

* $p < 0,05$ при сравнении с нормой.

Так, активность СДГ была ниже нормы в 1,4 раза (СЦП_{СДГ}=12,90 [0,64; 12,25] УЕ при норме 18,02 [0,90; 17,11] УЕ). СЦП ЛДГ составлял 15,33 [0,76; 14,56] УЕ, снижаясь, таким образом, по отношению к норме в 1,5 раза (СЦП_Н=23,01 [1,15; 21,85] УЕ). Более всего снижалась активность Г-6-ФДГ. СЦП ФДГ составлял 20,16 [1,00; 19,15] УЕ при норме 38,01 [1,90; 36,10]. Таким образом, активность ГФДГ снижалась в 1,9 раза.

Выводы

1. Количественная активность метаболических ферментов у детей, больных АР с кетоацидозом, существенно отличается от данных показателей у здоровых детей.
2. Средний цитохимический показатель активности метаболических ферментов различается у детей, больных АР с кетоацидозом, в зависимости от возрастной группы. Так, у больных младшей и старшей групп цитохимическая активность всех исследуемых

ферментов снижена, у больных средней группы – повышена.

3. Качественная активность метаболических ферментов различна у детей различных возрастных групп. В младшей и средней группе СЦП формируется за счет клеток низшей активности (степень «а»), в старшей – за счет клеток высшей степени активности (степень «в»).

Список литературы

1. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Мешкова Р.Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 640 с.
2. Маянская И.В., Шабунина Е.И., Ашкинази В.И. Лейкоцитмодулирующая активность сыворотки крови у детей с хроническими воспалительными заболеваниями органов пищеварения // Вопросы диагностики в педиатрии. 2009. Т. 1. № 1. С. 28-32.
3. Климова С.В. Клиническое значение активности митохондриальных ферментов лимфоцитов при воспалительных заболеваниях кишечника у детей: дис. ... канд. мед. наук. Москва, 2010. 108 с.
4. Крылова Н.В. Клеточные и молекулярные механизмы противовирусной защиты при клещевом энцефалите: дис. ... докт. биол. наук. Москва, 2014. 270 с.
5. Нарциссов Р.П. Цитохимия ферментов лейкоцитов в педиатрии: автореф. дис. ... докт. мед. наук. Москва, 1970. 47 с.
6. Герасимов И.Г. Субпопуляции нейтрофилов периферической крови и возможности НСТ-теста в диагностике заболеваний новорожденных // Клиническая лабораторная диагностика. 2011. № 4. С. 42-44.
7. Алиева А.А., Галимзянов Х.М. Динамика цитохимической активности моноцитов крови у больных хроническим вирусным гепатитом с низкой степенью активности в зависимости от гендерных особенностей // Врач-аспирант. 2013. Т. 60. № 5(2). С. 293-298.
8. Долгушин И.И., Савочкина А.Ю. Секреторные функции нейтрофилов // Аллергология и иммунология. 2015. Т. 16. № 2. С. 209-212.
9. Алиева А.А. Ферментативная активность нейтрофилов крови у больных хроническим вирусным гепатитом С в зависимости от гендерных особенностей // Клиническая лабораторная диагностика. 2015. Т. 60. № 2. С. 33-36.
10. Самойленко В.А. Клинико-цитохимические особенности рецидивирующей герпетической инфекции у детей: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Ставрополь. 2009. 26 с.