
МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ — В ПРАКТИКУ

© Коллектив авторов, 2003

Г. И. Гордиенко, Т. М. Бородина, Т. А. Дудина, Г. А. Самсыгина

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОГЛОТИТЕЛЬНОЙ И МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА

Российский государственный медицинский университет, Москва

Авторы представили результаты обследования 36 практически здоровых детей в возрасте от 1 мес до 4 лет с помощью модифицированных методов исследования поглотительной и метаболической активности нейтрофилов периферической крови. Преимуществами предложенных методик являются использование минимального количества крови, хорошее воспроизведение методики, экологическая безопасность, быстрота и простота для выполнения за счет их унифицированности, низкие материальные затраты (использование оборудования и реактивов стандартной клинической лаборатории). Модифицированные методы изучения поглотительной фазы фагоцитоза с латексом и кислородзависимого метаболизма нейтрофилов периферической крови в реакциях НСТ-теста могут быть рекомендованы для широкого использования в практическом здравоохранении.

Authors presented the results of examination of 36 practically healthy children in the age of 1 month — 4 years old. Absorptive and metabolic activity of peripheral blood neutrophils was studied by modified methods. Advantages of these methods are — usage of minimal blood specimens, good reproducibility of results, ecologic safety, quickness and simplicity because of their unification, low cost (equipment and reagents of standard clinical laboratory were used). Modified methods for the study of absorptive phagocytosis phase with latex and oxygen-depended metabolism of peripheral blood neutrophils in NBT-reactions can be recommended for usage in practical health care service.

Изучение фагоцитарной и метаболической активности нейтрофилов имеет большое значение для комплексной оценки противoinфекционной защиты больного ребенка. Это связано с ведущей ролью фагоцитоза в неспецифической защите организма от инфекции. Показано, что течение и исход инфекционно-воспалительного процесса в значительной мере определяются адекватной реакцией нейтрофилов, которые являются важнейшим элементом первой линии антимикробной защиты [7, 8].

Становление процессов окислительного метаболизма гранулоцитов происходит к концу раннего неонатального периода [11]. При этом тест с нитросиним тетразолием (НСТ-тест) отражает степень активности кислородзависимого метаболизма и прежде всего функцию гексозомонофосфатного шунта и связанное с ним образование свободных радикалов фагоцитирующими клетками [3].

Целью настоящего исследования явилась оценка возможности модифицированных методов исследования поглотительной и метаболической активности

нейтрофилов периферической крови у детей первых лет жизни.

Материалы и методы исследования

В работе представлены результаты обследования 36 практически здоровых детей в возрасте от одного месяца до 4 лет. 1-ю группу составили 16 детей в возрасте от 2 месяцев до 1 года (средний возраст $4,2 \pm 1,1$ мес), 2-ю группу — 20 детей в возрасте от 1 года до 4 лет (средний возраст $2,7 \pm 0,9$ лет).

Определяли поглотительную и метаболическую активность нейтрофилов периферической крови с помощью модифицированных методов [1—5, 9, 10] (фагоцитоз с латексом, НСТ-тест спонтанный и стимулированный латексом), разработанных на кафедре детских болезней № 1 РГМУ с курсом кардиологии и кардиоревматологии детского возраста ФУВ (зав. проф. Г. А. Самсыгина).

В качестве тест-системы использовали стандартные частицы латекса для фагоцитоза (10% полистирольная суспензия) диаметром 1,5 мкм, производства фирмы ДиаэМ (Россия). Исходный 10% латекс трижды отмывали физиологическим раствором натрия хлорида (центри-

фугировали по 10 мин при 1500 об/мин), доводили средой 199 до 5 мл. Хранили суспензию в холодильнике при температуре +4°C не более 5 суток.

Для НСТ-теста использовали нитросиний тетразолий ($C_{40}H_{30}Cl_2N_{10}O_6$) с молекулярной массой 817,65 (Германия).

Исследование проводили в венозной крови. В качестве стабилизатора использовали раствор гепарина (в соотношении 400 ЕД/мл), приготовленный из фармакопейного раствора гепарина для инъекций с активностью 5000 ЕД/мл.

В окончательном варианте методика фагоцитоза выглядела следующим образом. 0,1 мл гепаринизированной крови инкубировали при температуре 37°C в конических пробирках с 0,1 мл суспензии латекса. Через 5 мин, 30 мин и 1 ч готовили мазки инкубационной смеси на стекле, которые после высыхания, фиксации в пламени горелки, окраски 1% раствором метиленового синего микроскопировали при увеличении 90 × 15 или 90 × 10 под иммерсией. Учитывали данные на 100 нейтрофилов, из которых рассчитывали фагоцитарный индекс (%Ф) — процент фагоцитирующих клеток (фагоцитарный показатель по Гамбургеру); фагоцитарное число (ФЧ) — среднее количество частиц, захваченных одной клеткой (фагоцитарное число по Райту); фагоцитарный интегральный индекс (ФИ) — среднее число фагоцитированных частиц латекса на 100 посчитанных нейтрофилов [1, 2, 5, 10]. Отдельно учитывали результаты через 5 мин, 30 мин и 1 ч инкубации. Высчитывали коэффициент фагоцитарного числа (КФЧ) — отношение минимального ФЧ (ФЧ 5 мин) к стандартному ФЧ (ФЧ 30 мин) — КФЧ 1 и отношение минимального (ФЧ 5 мин) к максимальному (ФЧ 1 ч) — КФЧ 2. Показатели КФЧ 1 и КФЧ 2 характеризуют скорость фагоцитоза.

Из той же порции крови, одновременно с исследованием реакций фагоцитоза, ставили НСТ-тест: 0,1 мл гепаринизированной крови и 0,1 мл 0,1% водного раствора НСТ инкубировали в конических пробирках при температуре 37°C в течение 40 мин с 0,1 мл среды 199 — спонтанный НСТ-тест (сп. НСТ-тест) — или с 0,1 мл суспензии латекса — стимулированный частицами латекса НСТ-тест (ст. НСТ-тест). Аналогично приготовлению мазка для метода фагоцитоза готовили мазки: 0,2 мл инкубационной смеси наносили на стекло, просушивали, фиксировали, окрашивали 1% раствором метиленового синего, высушивали и микроскопировали под иммерсией при увеличении 90 × 15 или 90 × 10.

Оценку НСТ-теста проводили по следующим показателям (считали на 100 нейтрофилов, причем частицы латекса в ст. НСТ-тесте при подсчете не учитывали): процент положительных клеток (%ПК) — процент формазанопозитивных нейтрофилов (гранулы красителя занимают не менее 1/4 части цитоплазмы); визуальная оценка с использованием принципа Карлов (1955) и вычислением цитохимического показателя активности (ЦПА) по формуле:

$$\frac{0a+1b+2c+3d+4e}{100},$$

где a, b, c, d, e — количество клеток соответственно 0, 1, 2, 3, 4-й степени [10].

Высчитывали индекс стимуляции частицами латекса кислородзависимого метаболизма нейтрофила (ИС НСТ) — отношение %ПК в ст. НСТ-тесте к %ПК в сп. НСТ-тесте [6].

Обработку полученных результатов выполняли с использованием методов вариационной статистики и корреляционного анализа на компьютере IBM PC/AT-386 с использованием пакетов прикладных программ по обра-

ботке биомедицинской информации STATGRAPHICS, статистическую значимость полученных результатов оценивали параметрическими критериями Стьюдента, Фишера и Ван дер Вадена.

Результаты и их обсуждение

В процессе отработки метода установлено, что для одновременного исследования поглотительной фазы фагоцитоза и метаболизма нейтрофилов в НСТ-тесте рационально использовать неокрашенный латекс с диаметром частиц 1,5 мкм. Использование более крупных и/или окрашенных частиц латекса затрудняет визуальную оценку ст. НСТ-теста по принципу Карлов. Более мелкие частицы латекса захватываются нейтрофилами в значительном количестве (20—30 частиц на одну клетку), что затрудняет их подсчет с применением обычного светового микроскопа.

Исследовано влияние формы дна пробирки — круглой и конической. В конических пробирках мы наблюдали более высокие показатели, как фагоцитоза, так и НСТ-теста. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы [5, 9] и, по нашему мнению и мнению других исследователей, повышение показателей фагоцитарной и метаболической активности нейтрофилов при инкубации в конических пробирках обусловлено влиянием короткодистанционного взаимодействия клеток. Это послужило критерием выбора лабораторной посуды — как было отмечено при описании методики, мы использовали только пробирки конической формы.

Проведено исследование зависимости поглотительной способности и метаболической активности нейтрофилов от различных стабилизаторов (гепарин, трилон Б — динатриевая соль ЭДТА). Установлено, что трилон Б подавляет фагоцитоз, значительно снижает кислородзависимый метаболизм нейтрофилов.

Изучена зависимость показателей фагоцитоза от длительности инкубации. Установлено, что %Ф и ФЧ достоверно увеличиваются во времени, достигая максимальных значений к 1 ч. При дальнейшей инкубации показатели фагоцитоза достоверно не меняются (см. рисунок).

Таким образом, длительная инкубация (в течение 2 или 3 ч), предлагаемая некоторыми авторами [1, 4, 5, 9], при исследовании реакций фагоцитоза с применением в качестве тест-системы латекса не рациональна, так как частицы латекса фагоцитами не перевариваются.

Изучена зависимость показателей фагоцитоза (табл. 1) и НСТ-теста (табл. 2) от возраста детей. Установлено, что такие показатели фагоцитоза, как %Ф 30 мин и ФЧ 30 мин (стандартная методика) у детей 1-й группы достоверно ниже, чем у детей 2-й группы. При изучении показателей НСТ-теста как спонтанного, так и стимулированного латексом, прослеживается обратная зависимость. Это позволяет сделать заключение о том, что у здоровых детей на 1-м году жизни скорость поглощения нейтрофилами

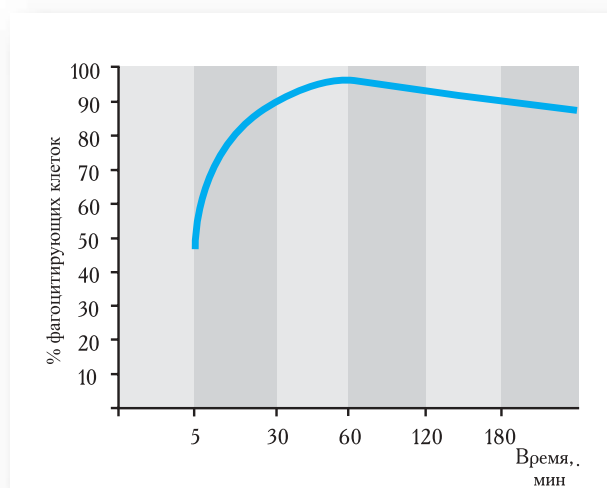


Рисунок. Зависимость показателей фагоцитоза от времени инкубации.

Таблица 1

Показатели фагоцитоза у здоровых детей раннего возраста

Показатели	1-я группа (n=16)	2-я группа (n=20)	p
%Ф 5 мин	31,8 ± 6,2	55,3 ± 7,2	> 0,05
ФЧ 5 мин	2,66 ± 0,78	2,57 ± 0,61	> 0,05
%Ф 30 мин	53,2 ± 7,3	76,8 ± 5,9	< 0,05
ФЧ 30 мин	2,86 ± 0,32	3,84 ± 0,48	< 0,05
%Ф 1 ч	77,4 ± 3,9	88,5 ± 5,5	< 0,05
ФЧ 1 ч	4,47 ± 0,98	6,69 ± 0,81	< 0,05
КФЧ1	0,72 ± 0,08	0,68 ± 0,06	> 0,05
КФЧ2	0,59 ± 0,07	0,41 ± 0,05	< 0,05
ФИ	2,01 ± 0,51	2,94 ± 0,55	> 0,05

Таблица 2

Показатели НСТ-теста у здоровых детей раннего возраста

Группы детей	сп. НСТ		ст. НСТ		ИС НСТ
	%ПК	ЦПА	%ПК	ЦПА	
1-я (n=16)	36,5 ± ± 4,4	0,97 ± ± 0,09	50,0 ± ± 5,8	1,46 ± ± 0,11	1,51 ± ± 0,09
2-я (n=20)	26,1 ± ± 3,3	0,62 ± ± 0,03	44,3 ± ± 5,6	1,28 ± ± 0,17	1,71 ± ± 0,08
p	< 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,05

ниже, чем в другие периоды жизни, а кислородзависимый метаболизм клетки повышен. По-видимому, это один из компенсаторных механизмов, позволяющий быстрее реализовать функцию фагоцитоза (при сниженной скорости поглощения) при развитии инфекционно-воспалительного процесса у детей первых месяцев жизни.

Заключение

Предложенные методы исследования объективно отражают поглотительную фазу фагоцитоза и кислородзависимый метаболизм нейтрофилов периферической крови. У здоровых детей установлены возрастные особенности многих показателей фагоцитарной и метаболической активности циркулирующих нейтрофилов.

Преимуществами модифицированных методов являются следующие: для исследования требуется минимальное количество крови; методики хорошо воспроизводятся, экологически безопасны, быстры и просты для выполнения за счет их унифицированности; используются оборудование и реактивы стандартной клинической лаборатории, что приводит к снижению материальных затрат.

Таким образом, модифицированные методы исследования поглотительной фазы фагоцитоза с использованием в качестве тест-системы частиц латекса и изучения кислородзависимого метаболизма нейтрофилов периферической крови в реакциях спонтанного и стимулированного латексом НСТ-теста могут быть рекомендованы для широкого использования в практическом здравоохранении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алмазова Т. Н., Рябов С. И. Методы функционального исследования системы крови. — Л., 1993.
2. Блиндарь В. Н., Зубихина Г. Н., Круглова Н. Б., Никитина Т. А. //Клин. лаб. диагн. — 1996. — № 2. — С. 18—20.
3. Виксман М. Е., Маянский А. Н. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия. — Казань, 1979.
4. Дуглас С. Д., Куй П. Г. // Исследование фагоцитоза в клинической практике: Пер. с англ. — М., 1983.
5. Лабораторные исследования в клинике. / Под ред. В. В. Меньшикова. — М., 1987.
6. Исаева Н. В. Статус активных доноров крови и ее компонентов по иммунологическим критериям: Дисс. ... канд. биол. наук. — М., 2000.
7. Мацнер Я. // Гематол. трансф. — 1993. — Т. 38, № 8. — С. 42—45.
8. Маянский А. Н., Пикуза О. И. Клинические аспекты фагоцитоза. — Казань, 1993.
9. Медведев А. Н., Чаленко В. В. // Лаб. дело. — 1991. — № 2. — С. 19—20.
10. Нестерова И. В., Слынько Л. И., Светличная М. А., Майченко Л. Г. Диагностика изменений в микробицидной системе нейтрофильных гранулоцитов при аллергических заболеваниях. — Краснодар, 1989.
11. Ткаченко С. К., Булиенко Л. Ф., Головки И. М. и др. // Педиатрия. — 1989. — № 9. — С. 14—17.

© Коллектив авторов, 2003

Н. Н. Савва, С. К. Клецкий, О. Г. Сахарова, Л. Ю. Федорова,
Ю. А. Мороз, Р. И. Юцкевич, О. В. Алейникова

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОСТНОГО МОЗГА В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКОГО СИНДРОМА И ОСТРОГО МИЕЛОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА У ДЕТЕЙ

Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии (РНПЦДОГ),
г. Минск, Республика Беларусь

Миелодиспластические синдромы (МДС) у детей — группа крайне редко встречающихся клональных заболеваний, в основе классификации которой лежит цитоморфологическое исследование периферической крови (ПК) и костного мозга (КМ). Целью данного исследования была клиничко-лабораторная характеристика *de novo* рефрактерной анемии с бластозом в ПК (РАИБ) и рефрактерной анемии с бластозом в КМ (РАИБ-т) у детей и определение достаточности критериев Fab-классификации при диагностике этих типов МДС в детском возрасте. Проанализированы данные клиничко-лабораторного, в том числе цитогенетического, обследования у 8 больных с РАИБ и у 7 — с РАИБ-т, которые проходили лечение в РНПЦДОГ г. Минск с 1989 по 2000 гг., а также в РДКБ г. Москва. При данном анализе выявлены 2 случая заболевания, которые по всем критериям Fab-классификации относились к РАИБ и РАИБ-т (по одному больному соответственно), однако имели хромосомные транслокации, специфичные для острого миелобластного лейкоза ($t(9;11)(p22;q23)$ и $t(8;21)(q22;q23)$). В статье показана недостаточность цитоморфологического и актуальность цитогенетического исследования КМ при постановке диагноза МДС у детей.

Pediatric myelodysplastic syndromes (MDS) are the group of very rare clonal diseases, which are classified on the base of peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) cytomorphologic study. The aim of this study was to characterize pediatric *de novo* refractory anemia with blastosis in peripheral blood (RAIN) and refractory anemia with blastosis in bone marrow (RAIB-t) and to estimate sufficiency of Fab-classification criteria in diagnosis of these types of MDS in children. Authors analyzed data of clinical and laboratory (including cytogenetic) examination of 8 patients with RAIB and 7 — with RAIB-t which were treated in Republic pediatric clinic of Minsk and in Republic children hospital in Moscow in 1989—2000 years. Analysis detected 2 cases of disease which was classified as RAIB (1 case) and RAIB-t (1 case) according to all criteria of Fab-classification, but these patients had chromosomal translocations specific for acute myeloblastic leukemia ($t(9;11)(p22;q23)$ and $t(8;21)(q22;q23)$). The article showed insufficiency of cytomorphologic examination and actuality of cytogenetic BM examination in diagnosis of pediatric MDS.

Миелодиспластические синдромы (МДС) у детей — группа крайне редко встречающихся и объединенных искусственно клональных заболеваний стволовой клетки: рефрактерная анемия без увеличения бластов в периферической крови (ПК) и/или костном мозге (КМ) (РА/РАКС), рефрактерная анемия с бластозом в ПК и/или КМ (РАИБ/РАИБ-т) и ювенильный миеломоноцитарный лейкоз [1]. Fab-классификация МДС, принятая в 1982 г., основана на цитологическом исследовании клеток ПК и КМ и не учитывает биологические особенности гемопоэтических клеток [2, 3]. При постановке диагноза МДС (РАИБ, РАИБ-т) встает необходимость дифференциальной диагностики этих заболеваний с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) с низким количеством бластов в КМ (менее 30%).

Целью нашего исследования была клиничко-лабораторная характеристика *de novo* РАИБ и РАИБ-т у детей и определение достаточности критериев Fab-классификации при диагностике этих типов МДС в детском возрасте.

Материалы и методы исследования

Мы проанализировали основные клиничко-лабораторные параметры у 8 больных РАИБ и у 7 — РАИБ-т, которые проходили лечение в РНПЦДОГ г. Минск с 1989 по 2000 гг., а также в РДКБ г. Москва (данные любезно предоставлены докт. мед. наук Масчаном А.А.).

Диагноз *de novo* МДС (РАИБ и РАИБ-т) устанавливали на основании общепринятых критериев: отсутствие данных о применении цитотоксических и иммуносупрессивных

агентов, а также лучевой терапии в анамнезе; выявление цитопении в ПК и признаков клеточной дисплазии при цитоморфологическом исследовании ПК и КМ при относительном содержании бластов в КМ менее 30%; тип МДС определяли в соответствии с рекомендациями Fab-классификации; в качестве дополнительных исследований для уточнения диагноза использовали цитогенетическое исследование ПК и КМ. Выявление транслокаций, характерных только для ОМЛ — $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q11-12)$, $inv 16$ и варианты, реаранжировки с участием хромосомы $11q23$, — позволяло отнести заболевание не к МДС, а к ОМЛ у больных, имевших количество бластов в КМ менее 30% (EWOG, 1998).

Клеточность КМ определяли на гистологических срезах КМ визуально полуколичественно с учетом возрастной нормы. Смещение миелоидных предшественников с поверхности эндоста в центр межтрабекулярного пространства расценивали как аномальную локализацию незрелых предшественников (АНЛП). Присутствие 3 и более скопленных АНЛП в поле зрения на среднем увеличении рассматривали как ранний морфологический признак аккумуляции бластов в КМ. Фиброз КМ оценивали методом световой микроскопии с использованием следующих методик: серебрение ретикулярной стромы по Гомеру, окрашивание гематоксилином и эозином по Массону.

Для цитогенетического исследования ПК и КМ использовали общепринятый метод краткосрочного культивирования клеток КМ с последующей дифференциальной G-окраской метафазных хромосом. Хромосомные aberrации описывали по международной номенклатуре (ISCN, 1995). Аномальный клон определяли по наличию не менее двух метафазных пластин с идентичной хромосомной aberrацией при анализе не менее 20 метафаз. Идентичную хромосомную aberrацию в лимфоцитах ПК расценивали как конституциональную. Молекулярно-биологическое исследование КМ проводили методом полимеразной цепной реакции для определения химерных генов, ассоциированных с ОМЛ, — $AML1(CBF\alpha)/ETO$; $PML/RAR\alpha$; $CBF\beta/MYH11$; MLL .

Результаты и их обсуждение

В группу РАИБ мы включили 8 детей в возрасте от 1,2 до 13,6 лет (медиана 5,3 года). Соотношение полов было 1 : 1 (4 мальчика и 4 девочки). Конституциональные изменения были описаны у 3 из 8 детей с РАИБ: болезнь Дауна — у одного больного, остеохондропатия (болезнь Шойерманн – Мау) — у одного, дополнительная хорда в левом желудочке сердца — у одного. Цитогенетическое исследование КМ было проведено 5 больным. Клональные аномалии кариотипа выявлены у одного пациента: $dup(5)(p15),+21$.

В группу больных РАИБ-т мы включили 7 детей в возрасте от 3,8 до 13,6 лет (медиана 8,2 года), из них 5 были мальчики. Конституциональные изменения описаны у 2 из 7 детей: синдром Кабуки — у одного, дефект межжелудочковой перегородки — у одного. Клональные аномалии кариотипа выявлены у 3 из 7 больных: простые — у 2 (моносомия 7), комплексные — у одного ($-7, -21, +3, +mar$).

По данным литературы, МДС в детском возрасте в $1/3$ случаев развивается на фоне конституциональных изменений [4, 5]. В нашей группе исследования также у большого количества больных мы наблюдали те или иные изменения конституции. При этом мы не

выявили специфических изменений конституции и аномалий кариотипа, что также согласуется с исследованиями других авторов [4—7].

В клинической картине заболевания у детей с РАИБ ведущими были анемический и геморрагический синдромы. На момент постановки диагноза 2 больных РАИБ имели инфекционные осложнения — пневмония у одного, ангина у одного ребенка. Частота основных клинических синдромов у больных РАИБ представлена в табл. 1. При клиническом осмотре анемический синдром зарегистрирован у всех больных РАИБ-т, геморрагический — у большинства. Инфекционные осложнения на момент поступления отмечены у 2 из 7 больных — воспаление придаточных пазух носа у одного, *herpes labialis* у одного ребенка.

Таблица 1

Клиническая характеристика больных РАИБ и РАИБ-т

Клинические синдромы		РАИБ	РАИБ-т
		(n=8)	(n=7)
Анемический		7	7
Геморрагический		5	5
Гиперпластический	лимфоаденопатия	5	3
	гепатомегалия	2	1
	спленомегалия	1	—
	гепатоспленомегалия	2	3
Инфекционные осложнения		2	2

При лабораторном обследовании (табл. 2) у всех больных РАИБ выявили анемию I—II степени тяжести. У большинства больных РАИБ количество лейкоцитов было нормальным или сниженным. Тромбоцитопения различной степени тяжести на фоне снижения или отсутствия мегакариоцитов отмечена у большей части детей с РАИБ. У $1/4$ пациентов признаки дисплазии отмечены только в миелоидной линии гемопоэза, примерно у $1/3$ — в миелоидной и эритроидной. При исследовании лабораторных показателей у всех больных РАИБ-т выявлена анемия I—III степени тяжести и тромбоцитопения. Лейкоцитоза не было ни у одного больного. Мегакариоциты были снижены или отсутствовали у большинства больных. Дисплазия миелоидной и эритроидной наблюдалась у половины пациентов, у остальных диспластические изменения клеток ПК и КМ найдены во всех трех линиях.

У половины больных РАИБ клеточность КМ была в пределах возрастной нормы, у всех пациентов (из тех, кому проводилась трепанобиопсия) найдена АНЛП в КМ (табл. 3). При цитоморфологическом исследовании КМ у больных РАИБ-т нами установлено, что в этой группе одинаково часто встречались больные

Таблица 2

Лабораторная характеристика больных РАИБ и РАИБ-т

Показатели		РАИБ (n=8)	РАИБ-т (n=7)
Гемоглобин, г/л	> 110	—	—
	110—90	4	3
	89—70	4	2
	< 70	—	2
	M ± m	90 ± 4,4	80,6 ± 6,0
Лейкоциты, · 10 ⁹ /л	> 11	2	—
	3,5—11	4	4
	< 3,5	2	3
	M ± m	7,2 ± 1,8	5,1 ± 1,2
Нейтрофилы, мм ³	> 1500	4	4
	500—1500	2	2
	200—499	2	1
	< 200	—	—
	M ± m	2310,5 ± 986,4	1155,7 ± 476,1
Тромбоциты, · 10 ⁹ /л	> 150	2	—
	31—150	4	3
	10—30	1	2
	< 10	1	2
	M ± m	123,9 ± 69,5	54,7 ± 21,6
Мегакариоциты в костном мозге	нормальное количество	1	1
	снижены/отсутствуют	7	6
Дисплазия клеток костного мозга	однолинейная	2	—
	двухлинейная	3	4
	трехлинейная	3	3

Таблица 3

Цитоморфологические особенности костного мозга у больных РАИБ И РАИБ-т

Группы больных	Клеточность			Фиброз			АНЛП		
	повышена	норма	снижена	есть	нет	норма	есть	нет	норма
РАИБ	2	4	2	1	6	1	7	н/д	1
РАИБ-т	3	1	3	2	5	н/д	7	н/д	н/д

н/д — трепанобиопсию не проводили.

с гипоклеточным и гиперклеточным КМ. У большинства пациентов зафиксировано отсутствие фиброза, у всех больных визуально выявлена АНЛП в КМ.

При анализе клинико-лабораторных параметров *de novo* МДС у детей мы выявили два случая заболевания, которые по всем критериям Fab-классификации относились к РАИБ и РАИБ-т (по одному больному соответственно), однако имели хромосомные транслокации, специфичные для ОМЛ. Этим больным был выставлен диагноз ОМЛ, мы не включили их в группу исследования и, ввиду крайне редкой встречаемости ОМЛ с низким количеством бластов, ниже приводим клинические примеры обоих случаев этого заболевания.

Ребенок Сергей Ш., 26.07.1997 г.р., болен с апреля 2000 г., когда появилась фебрильная температура (до 39°C), припухлость в околоушной области. 21.04.00 ребенок госпитализирован в инфекционное отделение Петриковской ЦРБ с диагнозом: «Эпидемический паротит, лимфоаденопатия». 24.04.00 появились носовые кровотечения, в общем анализе крови — глубокая анемия и тромбоцитопения, в связи с чем ребенок переведен в гематологическое отделение Гомельской областной клинической больницы, где был выставлен диагноз: «Миелодиспластический синдром с избыточным количеством бластов». 16.05.00 ребенок госпитализирован в РНПЦДОГ для дальнейшего обследования и лечения.

Состояние при поступлении тяжелое. Кожные покровы бледные, сыпи нет. Периферические лимфатические узлы не увеличены, эластичные, безболезненные. Тоны сердца ритмичные, легка приглушены, ЧСС 130 ударов в мин. Легкие без особенностей, ЧД 30 в мин. Живот мягкий, безболезненный. Печень выступает из-под края реберной дуги на 3 см, селезенка — на 5 см. Функциональные отправления не нарушены.

Общий анализ крови при поступлении: Нб 72 г/л, эр. $2,91 \cdot 10^{12}/л$, тр. $179 \cdot 10^9/л$, л. $6,0 \cdot 10^9/л$, н. 1%, сегм. 9%, лимф. 89%, мон. 1%, СОЭ 56 мм/ч.

Костно-мозговая пункция от 29.05.00: миелобласты 19,5%, нейтрофильный росток 26%, лимфоциты 23,5%, моноциты 0,5%, эритроидный росток 30,5%, миелокариоциты $50 \cdot 10^9/л$, мегакариоциты 0. Заключение: КМ умеренно богат клеточными элементами, много разрушенных клеток; единичные мегакариоциты, не функционируют; мало свободно лежащих тромбоцитов; выражен дизгранулопоэз — диссоциация созревания ядра и цитоплазмы, гипогрануляция нейтрофилов, дегенеративные изменения нейтрофилов; выражен дизэритропоэз — вакуолизация цитоплазмы эритрокариоцитов, карioreкис и пикноз ядра.

Трепанобиопсия от 19.05.00: гиперплазия кроветворных клеток (клеточность КМ 100%) за счет гранулоцитарного ряда, в котором преобладают молодые клетки, отмечается аномальная локализация незрелых предшественников, количество эритроидных островков уменьшено; популяция мегакариоцитов представлена как зрелыми формами, так и микромегакариоцитами; сосуды расширены; перитрабекулярный миелофиброз. Заключение: морфологическая картина соответствует МДС с АНЛП в КМ и очаговым миелофиброзом.

На основании цитогенетического исследования КМ от 29.05.00 (результаты получены 18.06.00), показавшего наличие хромосомной транслокации, специфичной только для ОМЛ (46, XY, t(9;11)(p22;q23) [9] /46, XY [1]), ребенку был выставлен окончательный диагноз: острый миелобластный лейкоз (M1 морфология по Fab-классифи-

кации), период разгара. С 29.06.00 по 20.05.01 получал лечение по протоколу ММ — ОМЛ-2000. Гематологическая ремиссия достигнута после первого блока полихимиотерапии. В настоящее время больной находится в первой полной ремиссии.

Ребенок Таисия П., 14.04.1991 г.р., больна с сентября 1999 г., когда появились вялость, слабость, боли в животе, периодические подъемы температуры тела до субфебрильных цифр. 29.02.00 амбулаторно был сделан общий анализ крови, в котором обнаружены анемия, тромбоцитопения и «атипичные» клетки. 01.03.00 поступила в РНПЦДОГ для обследования и лечения.

Состояние при поступлении тяжелое, температура тела 37,1°C. Кожные покровы бледные, на коже нижних конечностей экхимозы, геморрагическая сыпь. Периферические лимфатические узлы не увеличены, эластичные, безболезненные. Слизистая оболочка полости рта чистая, зев гиперемирован. Отмечается слизисто-гнойное отделяемое из носа. Множественный кариес зубов. Тоны сердца ритмичные, громкие, ЧСС 106 ударов в мин. В легких разнокалиберные влажные хрипы в нижних отделах, в нижней доле слева мелкопузырчатые хрипы на вдохе, ЧД 24 в мин. Живот мягкий, безболезненный. Пальпируется край печени, селезенка не пальпируется. Функциональные отправления без особенностей.

Рентгенограмма придаточных пазух носа: двусторонний острый гайморит. Рентгенограмма легких: данных за пневмонию нет.

Общий анализ крови при поступлении: Нб 71 г/л, эр. $2,18 \cdot 10^{12}/л$, тр. $18 \cdot 10^9/л$, л. $3,2 \cdot 10^9/л$, сегм. 7%, лимф. 86%, мон. 2%, бласты 5%.

Костно-мозговая пункция от 02.03.00: миелобласты 18% (M2 морфология по Fab-классификации), нейтрофильный росток 62,25%, эозинофилы 4%, лимфоциты 7,5%, моноциты 4%, плазматические клетки 0,25%, эритроидный росток 4%, миелокариоциты $198 \cdot 10^9/л$, мегакариоциты 0. Заключение: КМ очень богат клеточными элементами, свернулся; мегакариоциты единичные, функционирующие не найдены; мало свободно лежащих тромбоцитов; в бластах имеется зернистость и палочки Ауэра; выражены явления дизгранулоцитопоза в виде гипогрануляции нейтрофилов, их макроцитоза, диссоциации созревания ядра и цитоплазмы.

Иммунофенотипирование КМ от 02.03.00: представлена фенотипическая характеристика всей популяции мононуклеаров.

02.03.00 девочке выставлен предварительный диагноз: миелодиспластический синдром, рефрактерная анемия с избытком бластов в трансформации; ОРВИ, двусторонний острый гайморит, острый бронхит. Однако на основании результата цитогенетического исследования КМ от 02.03.00 (результаты получены 15.03.00), показавшего наличие специфичной для ОМЛ транслокации (45,X — X, t(8;21)(q22;q23) [19]) был выставлен окончательный диагноз: острый миелобластный лейкоз (M2 морфология по Fab-классификации), период разгара. Лечение начато 17.03.00 по протоколу ММ — ОМЛ — 2000. Гематологическая ремиссия была достигнута после первого блока полихимиотерапии.

Несмотря на то что Fab-классификация стала единым языком общения между клиницистами, морфологами и исследователями, открытие биологических особенностей гемопоэтических клеток при МДС диктовали необходимость использования для постановки диагноза не только цитологических, но и цитогенетических параметров [2]. В нашей работе мы так-

же показали, что у детей в некоторых случаях невозможно выставить правильный диагноз, ориентируясь только на критерии Fab-классификации, на что указывают и другие авторы [3].

Таким образом, Fab-классификация МДС не учитывает такую патологию, как ОМЛ с низким количеством бластов, которая по цитологическим показателям сходна с МДС (РАИБ или РАИБ-т), но имеет клональные аномалии кариотипа — t(8;21) и t(9;11), — специфичные для ОМЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bennett J. // *Br. J. Haematol.* — 1982. — Vol. 51, № 2. — P. 189—199.
2. Harris N. L., Jaffe E. S., Diebold J. et al. // *The Hematology Journal.* — 2000. — № 1. — P. 53—66.
3. Чан Г., Ванг В., Раймонди С. и др. // *Гематология и трансфузиология.* — 1998. — Т. 43, № 3. — С. 33—34.
4. Forty-four cases of childhood myelodysplasia with cytogenetics, documented by the Group Francais de Cytogenetique Hematoloque // *Leukemia.* — 1997. — Vol. 11, № 9. — P. 1278—1285.
5. Luna-Fineman S., Shannon K., Atwater S. et al. // *Blood.* — 1999. — Vol. 93, № 2. — P. 459—466.
6. Novitzky N., Prindul G. // *Am. J. Hematol.* — 2000. — № 63. — P. 212—222.
7. Hasle H., Arico M., Basso G. et al. // *Leukemia.* — 1999. — № 13. — P. 376—385.

В ПОМОЩЬ ПРАКТИЧЕСКОМУ ВРАЧУ

© Морозов В. И., Ахунзянов А. А., 2003

В. И. Морозов, А. А. Ахунзянов

ЗНАЧЕНИЕ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В РАЗВИТИИ ЗАПОРОВ У ДЕТЕЙ

Кафедра детской хирургии с курсом ПДО (зав. акад. РАМТН, проф. А. А. Ахунзянов)
Казанского государственного медицинского университета, Республика Татарстан, РФ

Авторы анализируют варианты функциональных запоров у детей с негрубой клиникой перинатальных поражений нервной системы, описывают отдельные клинические формы запоров в зависимости от уровня поражения нервной системы. Авторы приходят к убеждению, что механизм развития нейрогенных запоров зависит от топике поражения нервной системы, и предлагают варианты реабилитации этой группы больных детей.

Authors analyze variants of functional constipation in children with clinical picture of non-severe perinatal nervous system damage. Different variants of constipation are described in dependence on the level of nervous system lesion. Authors conclude that mechanism of neurogenic constipation development depends on localization of nervous system damage and propose some variants of rehabilitation for this group of patients.

По данным различных авторов, частота запоров у детей колеблется от 10 до 25% [1, 4]. Этиология и патогенез их развития у детей различны, однако ведущую роль в патогенезе заболевания отводят кинетическим расстройствам в виде гипо-атонических сочетаний, спазмов, гипермоторных нарушений толстой кишки, сфинктерным нарушениям [2—4]. По данным Т. П. Сашенковой и соавт. [8], у большинства детей (73,7%) основой хронических запоров являются функциональные расстройства, а именно нейрогенные и воспалительные заболевания и их сочетание. В отличие от воспалительных заболеваний, нейрогенные заболевания, являющиеся причиной запоров у детей, до настоящего времени изучены недостаточно.

Согласно рекомендациям Римского комитета, диагноз функциональных болезней желудочно-кишечного тракта устанавливается лишь после детального обследования и исключения органического заболевания [5].

Материалы и методы исследования

Нами обследовано 36 детей в возрасте от 3 до 12 лет с синдромом хронических запоров функционального характера. Мальчиков было 22, девочек 14.

Органические причины заболевания были исключены в процессе параклинического обследования с помощью рентгеноконтрастных и эндоскопических исследований,

УЗИ, копрологических и лабораторных методов диагностики. Все дети имели негрубую неврологическую симптоматику, характерную для определенного уровня поражения ЦНС. Последний уточняли окончательно данными параклинических методов неврологического обследования — краниоспондилографии, ЭМГ, РЭГ, ЭХО ЭГ, ЭЭГ, МРТ. Оценку данных неврологического обследования проводили при участии детских невропатологов.

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований все больные были разделены на 2 клинические группы: 1-я группа (24 ребенка) — с «высоким» уровнем поражения ЦНС — церебральный, цервикальный; 2-я группа (12 детей) — с поражением дистальных отделов спинного мозга — конуса и эпиконуса. Решающим методом диагностики у детей 2-й группы, имевших, как правило, субклиническую неврологическую симптоматику, оказалась ЭМГ с длинных мышц-выпрямителей спины в области ромбовидного треугольника. Эти участки мышц иннервируются из передних рогов сегментов S₂—S₄ спинного мозга (спинальный центр иннервации прямой кишки и мочевого пузыря), что позволяло косвенно судить о степени выраженности расстройств спинальной иннервации прямой кишки и мочевого пузыря [7].

У всех больных 1-й группы имели место различные осложнения перинатального периода — асфик-

сия в родах, натальная травма головного и спинного мозга и др. При сборе анамнеза установлено, что клинические проявления дискинезий проксимальных отделов желудочно-кишечного тракта имели место уже в грудном возрасте в виде упорных срыгиваний, дисфагии, режы рвоты. При проведении пассажа бариевой взвеси у этих больных определялись спастические гипермоторные дискинезии желудка, 12-перстной и тонкой кишок. Рентгеноанатомия толстой кишки имела симптоматику синдрома «раздраженной» толстой кишки. Стул больных часто имел вид «овечьего кала», что, как известно, характерно для спастического колита. На наш взгляд, при ускоренном пассаже необработанной пищеварительными ферментами верхних отделов желудочно-кишечного тракта пищи она быстро «сбрасывается» в дистальные отделы толстой кишки. Последняя реагирует спазмом, следствием которого являются спастические запоры. Кроме того, у детей этой группы имели место дисфункции и других висцеральных органов — дискинезии желчевыводящих путей с признаками (по данным УЗИ) холецистохолангита, функциональная кардиопатия. 23 ребенка лечились только консервативно с хорошими клиническими результатами. При этом базисной терапией у всех больных была терапия, направленная на очаг поражения ЦНС, выявленный при неврологическом обследовании. Симптоматическое лечение было направлено на нормализацию моторно-эвакуаторной функции желудочно-кишечного тракта, купирование воспалительных изменений его проксимальных (гастродуоденит, холецистохолангит) и дистальных (левосторонний спастический колит) отделов, коррекцию биоценоза толстой кишки. У больных с гипертонусом тазовой диафрагмы и анального сфинктера проводили повторную (2 раза в неделю) анодигитоклазию — пальцевое растяжение анального сфинктера. Один ребенок в возрасте 3 лет был оперирован с диагнозом «болезнь Гиршпрунга». В удаленном сегменте толстой кишки аганглиоз не был выявлен. Как показали катанестические исследования, через год после операции запоры у ребенка возобновились уже через неделю после выписки из стационара.

Во 2-й группе больных со скрытой миелодисплазией на почве антенатального поражения дистальных отделов спинного мозга синдром хронического запора был обусловлен колосфинктерной диссинергией вследствие «ригидности» тазовой диафрагмы, которая неадекватно участвовала в рефлекторной деятельности опорожнения толстой кишки. У этих больных были отмечены снижение анального и ахиллова рефлексов, затруднения при волевом повышении тонуса анального сфинктера во время ректального осмотра. При рентгеноконтрастном исследовании толстой кишки определялись мегаректум и мегадолихосигма. Значительное количество контрастной массы после дефекации оставалось в дистальных отделах толстой кишки. У 3 из 12 детей этой

клинической группы в анамнезе отмечалось периодическое каломазание по типу парадоксальной ишурии у больных с хронической задержкой мочи. Клинические запоры у этих больных имели более выраженный характер (по 4—5 и более дней). Дефекация осуществлялась при помощи клизм и фармакопрепаратов с выделением большого количества каловых масс. В клинику детской хирургии такие дети госпитализировались, как правило, с диагнозом «болезнь Гиршпрунга».

Консервативное лечение больных проводили по тем же принципам, что и у детей 1-й группы. На очаг поражения ЦНС назначали электрофорез со спазмолитиками, затем индуктотермию (на L₁—S₁ сегменты спинного мозга), прозерин внутримышечно, дибазол энтерально, электростимуляцию толстой кишки, коррекцию дисбактериоза. Также проводили лечебную гимнастику для укрепления мышц брюшного пресса и промежности, тонизирующий массаж длинных мышц спины в поясничной области, амбулаторно — иглорефлексотерапию, Су-Джок-терапию. Результаты консервативной терапии у этой группы больных оказались менее обнадеживающими. 4 детей, ввиду отсутствия эффекта от длительной консервативной терапии, лечились оперативно (операция Соаве). Отдаленные результаты хирургического лечения, по данным катанеза, в течение года оказались хорошими.

Гистологическое изучение удаленных сегментов толстой кишки показало, что у больных этой группы при длительном течении заболевания (до 4—5 лет и более) развивается склероз подслизистого и серозного слоев. Появляются необратимые изменения интрамурального нервного аппарата до полной деструкции отдельных ганглиев. При сравнении с 1-й группой больных очевидно, что дискинезии толстой кишки у больных 2-й группы представляют собой более тяжелое заболевание, при котором могут развиваться местные и общие осложнения, переходящие в грубую органическую патологию, нуждающуюся в оперативном лечении. Это подтверждает гипотезу А. М. Ногаллера [6] и других авторов о том, что «в клинике часто наблюдается переход функциональных расстройств в органические заболевания».

Необходимо отметить и тот факт, что у всех 36 детей при комплексном параклиническом обследовании с применением урологических методов диагностики (регистрация суточного ритма спонтанных мочеиспусканий, урофлоуметрия, УЗИ мочевого пузыря до и после мочеиспускания и др.) были выявлены признаки компенсированного нарушения уродинамики различной степени выраженности на уровне нижних мочевыводящих путей. Данная патология по своей симптоматике укладывалась в клинику нейрогенной дисфункции мочевого пузыря. Оказалось, что при «высоких» уровнях поражения ЦНС (1-я группа) выявлялась симптоматика гиперрефлекторных форм дисфункции мочевого пузыря, гипертонус уrogenитальной диафрагмы в отдельных

случаях; у больных с дистальными поражениями спинного мозга (2-я группа) — гипорефлексия мочевого пузыря (синдром «вялого мочевого пузыря»), цистоцеле и детрузорно-сфинктерная диссинергия.

В качестве примера приводим следующее клиническое наблюдение.

Больной Б., 3 лет, поступил в клинику детской хирургии с рецидивом заболевания (хронический запор) через 1 год после радикальной операции по поводу «болезни Гиршпрунга». Ребенок родился от I беременности, I досрочных родов (преждевременное отхождение околоплодных вод) на сроке 37 недель беременности, массой тела 2700 г. Роды быстрые, со стимуляцией. Со слов матери во время родов «застряли» плечики. Закричал сразу. После родов был выставлен диагноз «натальная травма шейного отдела позвоночника». В грудном возрасте ребенок наблюдался и лечился детским невропатологом. До 9 мес жизни упорно срыгивал, иногда отмечалась и рвота. С первого месяца жизни появились запоры, по поводу которых в возрасте 1 года 7 месяцев ребенок госпитализировался в хирургический стационар с диагнозом «болезнь Гиршпрунга». В стационаре проводилось комплексное параклиническое обследование. Пассаж бария по желудочно-кишечному тракту: гипермоторные спастические дискинезии проксимальных отделов желудочно-кишечного тракта (через 1,5 ч после приема бариевой взвеси последняя уже определяется в восходящей толстой кишке). Заключение: синдром «раздраженной» толстой кишки, левосторонний спастический колит.

Ирригография толстой кишки: убедительных участков аганглиоза не определяется, определенные сомнения в их наличии в дистальном отделе сигмовидной кишки; долихосигма.

Заключение невропатолога: минимальная церебральная дисфункция с легким пирамидным синдромом, повышен тонус в аддукторах бедер, сухожильные рефлексы оживлены с рук и ног.

Спондилограмма пояснично-крестцового отдела позвоночника: патологии не выявлено. Электромиография с мышц ног и длинных мышц-выпрямителей спины в области ромбовидного треугольника: убедительных данных за поражение сегментарных мотонейронов не выявлено, выявляются надсегментарные изменения.

ЭКГ: синусовая тахикардия, положение электрической оси сердца соответствует возрасту.

УЗИ почек: пиелозктазия с обеих сторон, объем лоханки слева 0,8 см³, справа — 1,8 см³; мочевой пузырь башенной формы, стенки его не утолщены, объем мочевого пузыря до мочеиспускания 190 см³, после мочеиспускания — 14 см³ (7%); объем лоханки после микции: справа 2,6 см³, слева 0,9 см³.

Урофлоуметрия: гиперкинетический тип кривой, время задержки начала мочеиспускания завышено до 14,05 с.

Суточный ритм спонтанных мочеиспусканий с тенденцией к поллакиурии.

После проведенного обследования проведена радикальная операция по методике Соаве, удален сегмент толстой кишки (переход нисходящей в сигму) с последующим его гистологическим исследованием. Заключение

патоморфолога: в исследованных препаратах данных за аганглиоз нет. Через 10 дней проведен второй этап операции — отсечение культи низведенной толстой кишки с последующим его гистологическим исследованием. Заключение патоморфолога: в пределах исследованных участков кишки данных за аганглиоз нет, подслизистый слой расширен с явлениями хронического воспаления, с единичными гранулемами (типа инородных тел). С возрастанием порядковых номеров срезов нарастает и выраженность перипроцесса.

Через 7 дней после выписки из стационара запоры возобновились и продолжались в течение года. Через год после операции ребенок вновь госпитализирован в хирургический стационар, где повторно проводилось рентгеноконтрастное исследование желудочно-кишечного тракта. Результаты последнего оказались аналогичными прежним (как и до операции, исключая долихосигму). Дополнительно проведены функциональные урологические исследования и функциональные исследования аноректальной области — выявлены признаки гиперрефлексии мочевого пузыря, повышенный тонус мышц тазовой диафрагмы, анального сфинктера.

Рентгенография шейного отдела позвоночника выявила косвенные признаки натальной травмы шейного отдела позвоночника. Проведена целенаправленная консервативная терапия с хорошим клиническим результатом.

Выводы

1. Перинатальные поражения ЦНС могут быть причиной некоторых форм хронических запоров у детей.

2. Механизм развития и клиника хронических запоров у детей с перинатальными поражениями ЦНС зависят от уровня поражения нервной системы.

3. Функциональные запоры у детей с перинатальными поражениями ЦНС сочетаются с нейрогенной дисфункцией мочевого пузыря.

4. Отсутствие эффекта от повторных курсов консервативной терапии хронических запоров у детей с миелодисплазией является показанием к их оперативному лечению.

ЛИТЕРАТУРА

1. Григович И. Н., Шорохова Н. В., Иудин А. А. // Педиатрия. — 1990. — № 10. — С. 62—64.
2. Лёнюшкин А. И., Анам Нурул // Вест. хир. им. Гренова. — 1986. — № 4. — С. 89—93.
3. Лёнюшкин А. И. // Детский доктор. — 2000. — № 1. — С. 28—31.
4. Мазурин А. В., Цветкова Л. Н., Филин В. А. // Педиатрия. — 2000. — № 5. — С. 19—22.
5. Мяжова Л. // Врач. — 2000. — № 3. — С. 39—40.
6. Ногаллер А. М. // Клин. мед. — 1995. — № 6. — С. 72—74.
7. Ратнер А. Ю. Поздние осложнения родовых повреждений нервной системы. — Казань, 1990. — 308 с.
8. Сашенкова Т. П., Шульман С. А., Беляева Т. Ю. // Педиатрия. — 1990. — № 10. — С. 64—68.