

Эффективность метода кариометрии лимфоцитов в диагностике тяжести гипоксического перинатального поражения центральной нервной системы у новорожденных

Н.Е. Громада

Efficiency of lymphocytic caryometry in the diagnosis of the severity of perinatal hypoxic central nervous system lesion in the newborn

N.E. Gromada

Уральская государственная медицинская академия, Екатеринбург

Представлены результаты кариометрии лимфоцитов у доношенных новорожденных детей с гипоксическим поражением центральной нервной системы в 1-е, на 3, 5–7, 25, 28-е сутки жизни. Дана клиническая характеристика детей. Предлагается способ оценки степени тяжести гипоксического перинатального поражения центральной нервной системы по изменению количества ДНК в ядрах лимфоцитов крови новорожденных.

Ключевые слова: новорожденные, перинатальное гипоксическое поражение центральной нервной системы, степень тяжести, кариометрия.

The paper presents the results of lymphocytic caryometry in term neonates with hypoxic central nervous system lesion on days 1, 3, 5–7, and 25–28 of life. It provides the babies' clinical characteristics. The author proposes a procedure for evaluating the severity of perinatal hypoxic central nervous system lesion from the changes in the amount of DNA in the neonatal lymphocytic nuclei.

Key words: neonatal, perinatal hypoxic central nervous system lesion, severity, caryometry.

Сложность диагностики перинатальных гипоксических поражений головного мозга у доношенных новорожденных в первые дни жизни обусловлена трудностью дифференцирования физиологических адаптационных процессов с патологическими как при клиническом осмотре, так и при использовании методов нейровизуализации. Для раннего выявления патологии требуются объективные и надежные критерии [1, 2]. Между тем своевременная диагностика тяжести гипоксии в раннем неонатальном периоде имеет значение для дальнейшего прогноза.

Ранее мы проводили изучение взаимосвязи иммунных реакций (цитокинов, субпопуляций лимфоцитов) и энергетического метаболизма (активность митохондриальных ферментов в лимфоцитах) у новорожденных с гипоксической энцефалопатией различной степени тяжести, используя в качестве информационной модели клетки крови — лимфоциты. Сходные исследования осуществлялись другими авторами [3–8].

Для оценки степени тканевой гипоксии большого внимания заслуживает метод кариометрии лимфоцитов (определение оптической плотности ядер лимфоцитов). Методология и методика исследования предложены и усовершенствованы в течение двух десятилетий Г.Г. Автандиловым [9–11]. Данный метод применялся с целью дифференциальной патогистологической диагностики стадий канцерогенного процесса, динамики атеросклероза, ишемической болезни сердца, функционального состояния гепатоцитов. Использовались компьютерные микротелефотометрические автоматизированные системы с математическим моделированием гистопатологического процесса. Согласно сведениям литературы, с целью диагностики степени тяжести гипоксии у новорожденных данный метод ранее не применялся.

Характеристика детей и методы исследования

Обследованы 114 доношенных новорожденных (59 мальчиков, 55 девочек) с перинатальным гипоксическим поражением центральной нервной системы различной степени тяжести. Средняя масса тела новорожденных $3400 \pm 240,8$ г, длина тела — $51,4 \pm 1,4$ см. Критериями исключения явилось наличие у детей врожденных пороков

© Н.Е. Громада, 2008

Ros Vestn Perinatol Pediat 2008; 2:19–23

Адрес для корреспонденции: 620219 Екатеринбург, ул. Репина, д. 3

развития, синдрома задержки внутриутробного развития, недоношенности, внутриутробной инфекции и гнойно-воспалительных заболеваний. Все дети были разделены на три группы: 1-я группа ($n=23$) — гипоксическая энцефалопатия I степени (легкая степень); 2-я группа ($n=23$) — II степень тяжести (средняя степень); 3-я группа ($n=23$) — гипоксическая энцефалопатия III степени тяжести (тяжелая). Группы наблюдения были сопоставимы по следующим характеристикам: антропометрическим параметрам, полу, гестационному возрасту, факторам риска развития перинатальной патологии, клиническим синдромам, проводимой патогенетической терапии.

В контрольную (4-ю) группу наблюдения включены 45 здоровых детей без неврологических и соматических отклонений.

Детям всех групп проводили общеклиническое динамическое наблюдение, оценку неврологического статуса, нейрофизиологические исследования. Исследования у новорожденных проводили в 1-е и на 3-и сутки на базе родильного отделения городской больницы №14 Екатеринбурга. В дальнейшем дети 2-й и 3-й групп были переведены для клинического наблюдения, обследования и лечения в отделение патологии новорожденных детской городской больницы №5. Новорожденные с легкой степенью гипоксической энцефалопатии и дети контрольной группы были выписаны домой и практически не нуждались в проведении лечебных мероприятий.

У всех детей осуществляли кариометрию лимфоцитов в 1-е, на 3, 5—7 и 28-е сутки жизни. Указанные периоды наблюдения соответствуют физиологическим точкам транзитного состояния лимфоцитов неонатального гемопоэза [12]. В процессе исследования определяли среднее количественное значение ДНК в ядрах лимфоцитов периферической крови новорожденных [9—11].

Для проведения кариометрии лимфоцитов кровь собирали в стерильные стандартные пробирки, обработанные фиксатором Cytospin Collection Fluid (США) в разведении 1:1. Далее осуществляли центрифугирование 0,5 мл крови с одновременным изготовлением мазков в автоматизированной системе Cytospin-3 (США) на стандартных стеклах Shandon (США) толщиной 1 мм в течение 5 мин при режиме 1000 об/мин с малым ускорением. После центрифугирования готовые мазки высушивались и окрашивались в автомате Shandon Linistain GLX (США) по методу Фельгена для выявления ДНК в ядрах лимфоцитов. Препараты просматривались при помощи микроскопа Nikon Eclipse E-400 (Япония) с использованием окуляра 10× и объектива 100×1,25 с масляной иммерсией. Изображения препаратов с микроскопа с помощью

цифровой телекамеры Mintron 62W1P и программы ASUS Digital VCR выводились в компьютер Pentium-4, сохранялись в виде файлов формата JPEG и визуально анализировались с применением программы Adobe Photoshop 6.0.

Данные денситометрического исследования ядер определялись в относительных единицах оптической плотности — пикселах с построением гистограмм. В каждом препарате производили вычисления не менее чем по 25 ядрам, определяли средние величины, минимальное и максимальное значение относительных единиц с применением непараметрического критерия метода углового преобразования Фишера и критерия Розенбаума. Число единиц наблюдения в выборках определялось по таблице Г.Г. Автандилова.

Статистическую обработку данных осуществляли в операционной среде Windows 2000 с использованием программы Statistika. После проверки данных на нормальность распределения для сравнения показателей использовались непараметрические методы (тесты Манна—Уитни, Вилкоксона).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У детей с легкой степенью гипоксического поражения центральной нервной системы преимущественно отмечался синдром повышенной нервно-рефлекторной возбудимости. Дети 2-й и 3-й групп наблюдения имели клинические признаки гипоксического поражения центральной нервной системы (табл. 1). Во 2-й группе (средняя степень тяжести) достоверно чаще наблюдались гипертонзивный синдром и синдром вегетовисцеральных дисфункций. В 3-й группе (тяжелая форма заболевания) ведущими клиническими синдромами были судорожный, синдром угнетения и кома.

Факторы риска хронической внутриутробной гипоксии и острой асфиксии в интранатальном периоде часто наблюдались во 2-й и 3-й группах. Беременность у матерей этих детей протекала неблагоприятно, но при тяжелой форме патологии женщины в 2 раза чаще болели хроническими заболеваниями (пиелонефрит, гастрит, холецистит) и острыми респираторными вирусными инфекциями. У матерей детей 3-й группы в 1,5 раза чаще, чем во 2-й группе, имели место быстрые роды, обвитие пуповины вокруг шеи, экстренное (незапланированное) кесарево сечение, стимуляция родовой деятельности и длительный безводный период. У большинства детей 2-й и 3-й групп наблюдалось сочетание двух факторов риска и более.

Сравнительная характеристика данных нейровизуализации (нейросонография) структур головного мозга показала (табл. 2), что церебральная ишемия III степени чаще наблюдалась при тяже-

Таблица 1. Синдромы гипоксического поражения центральной нервной системы новорожденных при различных формах тяжести в остром периоде (5—7-е сутки жизни)

Ведущий синдром	1-я группа (n=23)		2-я группа (n=23)		3-я группа (n=23)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Синдром повышенной нервно-рефлекторной возбудимости	18	78,3	3	13,1	0	0
Синдром угнетения	0	0	6	26,1	17	73,9
Кома (1—7-е сутки жизни)	0	0	0	0	10	43,5
Судорожный синдром	0	0	0	0	7	30,4
Синдром внутричерепной гипертензии	0	0	17	73,9	7	30,4
Синдром вегетовисцеральных дисфункций	0	0	15	65,2	6	26,1

лом поражении центральной нервной системы, а ишемия II степени была характерна для гипоксической энцефалопатии средней тяжести. Частота внутрижелудочковых кровоизлияний была почти одинакова в обеих группах, но только у детей с тяжелым поражением центральной нервной системы наблюдались внутрижелудочковые кровоизлияния III степени. У большинства детей с легкой степенью гипоксической энцефалопатии структурных изменений не было.

Установлено, что оптическая плотность ядер лимфоцитов при окраске по Фельгену отражает степень тяжести гипоксического поражения центральной нервной системы новорожденных в первые сутки жизни и в дальнейшем в динамике, в течение 1-го месяца жизни. Результаты исследования достоверно показали, что чем ниже показате-

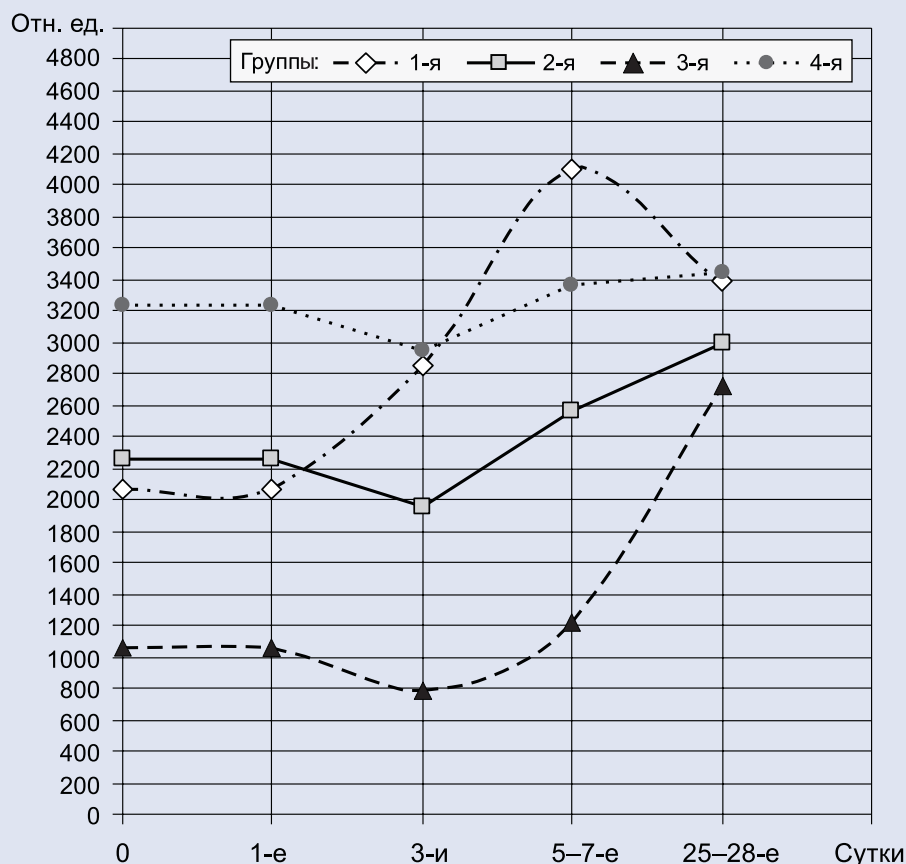
ли оптической плотности ядер лимфоцитов периферической крови новорожденных, тем тяжелее церебральные нарушения.

В 1-й группе наблюдения у детей с легкой степенью поражения на 5—7-е сутки жизни отмечалось увеличение среднего количества ДНК; к 25—28 дням жизни произошла нормализация показателей. Это указывает на высокие компенсаторные возможности детей 1-й группы (см. рисунок).

У новорожденных с гипоксической энцефалопатией средней и тяжелой степени (2-я и 3-я группы) в первые 3 сут жизни отмечалось достоверное ($p<0,001$) снижение среднего количества ДНК в ядрах лимфоцитов практически в 3 раза по сравнению со здоровыми детьми. Причем к 25—28 дням эти показатели не приходили к норме (см. рисунок).

Таблица 2. Характеристика данных нейросонографии у детей с гипоксическим поражением центральной нервной системы

Клинико-патологическая характеристика	1-я группа (n=23)		2-я группа (n=23)		3-я группа (n=23)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Церебральная ишемия						
I степени	3	13,1	2	8,7	0	0
II степени	0	0	21	91,3	0	0
III степени	0	0	0	0	23	100
Внутрижелудочковые кровоизлияния						
всего	0	0	11	47,8	9	39,1
в том числе I—II степени	0	0	11	47,8	6	26,1
III степени	0	0	0	0	3	13,1
Морфологическая незрелость головного мозга	4	17,4	9	39,1	11	47,8
Без структурных изменений	16	69,5	0	0	0	0



Сравнительная характеристика средних величин оптической плотности ядер лимфоцитов в зависимости от степени тяжести гипоксического поражения центральной нервной системы у новорожденных.

Одним из объяснений полученных результатов, по нашему мнению, может быть предположение о том, что в условиях гипоксии нарушена трансформация пролимфоцитов в полноценные лимфоциты (иммунокомпетентные клетки), участвующие в иммунных реакциях и процессах клеточного энергетического метаболизма центральной нервной системы. Низкие показатели кариометрии лимфоцитов определяются у детей с гипоксическим поражением центральной нервной системы средней и тяжелой степени. Результаты применения

данного метода могут служить одним из критериев неблагоприятного прогноза и выделения среди новорожденных группы риска, нуждающейся в наблюдении педиатра и невролога, проведении иммунокорригирующей и метаболической терапии.

Таким образом, наши исследования показали, что определение оптической плотности ядер лимфоцитов является объективным количественным методом и позволяет не только установить степень гипоксии у новорожденного, но и наметить врачебную тактику лечения детей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Володин Н.Н., Медведев М.И., Рогаткин С.О. Актуальные проблемы перинатальной неврологии на современном этапе. Журн неврол и психиат 2001; 7: 4—8.
2. Барашнев Ю.И. Гипоксическая энцефалопатия: гипотезы патогенеза церебральных расстройств и поиск методов лекарственной терапии. Рос вестн перинатол и педиат 2002; 1: 6—13.
3. Сухоруков В.С. Нарушение клеточного обмена у детей. Рос вестн перинатол и педиат 2002; 5: 44—50.
4. Сухоруков В.С., Николаева Е.А. (ред.) Нарушение клеточного энергообмена у детей. М: Атес Медика Софт 2004; 79.
5. Николаева Е.А. Сухоруков В.С. Современная диагностика митохондриальных болезней. Рос вестн перинатол и педиат 2006; 4: 11—21.
6. Ларионова А.В., Беликова М.Э., Чаша Т.В. Цитокиновый профиль у новорожденных с перинатальными поражениями центральной нервной системы. Рос-

- сийский форум «Мать и дитя», 7-й: Материалы. М 2005; 556—557.
7. Громада Н.Е., Ковтун О.П. Иммунные нарушения и биоэнергетическая недостаточность у детей с перинатальными гипоксическими поражениями центральной нервной системы и их коррекция. Рос вестн перинатол и педиат 2007; 1: 26—30.
8. Никулин Л.А., Каюмова Д.А., Левченко Л.А. Некоторые иммунологические показатели у новорожденных детей с перинатальным поражением головного мозга. Всероссийский конгресс «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии», 1-й: Материалы. М 2002; 188.
9. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М 1990; 384.
10. Автандилов Г.Г. Перспективы развития диагностической морфометрии. Диагностическая медицинская морфометрия. М: РМАПО 2002; 4—24.
11. Автандилов Г.Г. Перспективы развития диагностической медицинской морфометрии. Клинико-лабораторный консилиум 2004; 2: 39—42.
12. Шабалов Н.П. Неонатология. М: МЕДпресс-информ 2004; 1: 608.

Поступила 06.12.07

Взаимосвязь качества воздуха и обострений бронхиальной астмы у детей

Air quality and pediatric asthma-related emergencies

H.C. Wang, E. Yousef

J Asthma 2007; 44: 10: 839—841

Ранее проводимые исследования показали, что существует взаимосвязь качества воздуха, аэроаллергенов и частоты приступов астмы и ее обострений. В статье описываются результаты ретроспективного 4-летнего исследования роли сезонности, качества воздуха, аэроаллергенов и окружающего климата в возникновении приступов бронхиальной астмы у детей (по частоте обращения в педиатрическое отделение).

Самая высокая частота обращений ($p < 0,01$) наблюдалась в сентябре. В дни с наибольшим количеством обращений ($p = 0,05$) отмечено снижение температуры и количества выпавших осадков ($p < 0,01$) наряду с более высоким содержанием пыльцы в воздухе ($p = 0,05$). В то время как не обнаружено какой-либо значимой связи с содержанием в воздухе плесневых грибов, озона и NO. Сделано заключение, что все обращения пациентов были связаны с наличием аэроаллергенов и климатическими факторами, а не с качеством воздуха.

Референт А.И. Асманов