

МЕХАНИЗМ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ РЕАКЦИИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ НИТРОСИНЕГО ТЕТРАЗОЛИЯ НЕЙТРОФИЛАМИ ЧЕЛОВЕКА

А. Н. Маянский, Е. А. Пазюк, Т. П. Макарова,
Р. А. Паршакова, О. И. Пикуза

Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии (директор — канд. мед. наук
Т. А. Башкирцев)

К достоинствам методов цитохимического исследования относятся техническая простота, доступность, минимальные требования к объему исследуемого материала. Это делает реальным их внедрение в повседневную практику клинических лабораторий. Вместе с тем они позволяют обнаружить такие изменения в нейтрофилах, которые сложно, а порой невозможно выявить при помощи других, гораздо более трудоемких методов.

Реакция бесубстратного восстановления нитросинего тетразолия нейтрофилами человека (НСТ-тест) была описана в 1967—1968 гг. [15]. С тех пор НСТ-тест прошел широкую научно-практическую апробацию. Принцип метода состоит в том, что НСТ, сталкиваясь с активированным нейтрофилом, восстанавливается в диформаза, который в виде гранул, не растворимых в воде и большинстве органических растворителей, откладывается внутри или на поверхности клеток¹. Количество выпавшего диформаза служит мерилем интенсивности реакции. Диформаза можно экстрагировать горячим пиридином, диоксаном, диметилсульфоксидом и затем определить оптическую плотность на спектрофотометре, но чаще пользуются обычной микроскопией, подсчитывая процент нейтрофилов, содержащих диформаза. Это проще и экономичнее — расход крови сведен к минимуму, что нередко определяет выбор методики (например, в педиатрии). Есть предложение учитывать НСТ-тест, подобно другим цитохимическим реакциям, по степеням активности цитохимического показателя [3, 11]². Кроме нейтрофилов, восстановление НСТ происходит в моноцитах и тромбоцитах. Их влияние на оценку результатов исключают, контрастируя ядра любым красителем, который по цвету отличается от диформаза.

Один из главных механизмов, приводящих к образованию диформаза, можно представить следующим образом (см. рис.). Стимуляция нейтрофила растормаживает



Основная цепь реакций, приводящих к восстановлению НСТ стимулированным нейтрофилом. ГМФШ — гексозомонофосфатный шунт; O_2^- — супероксид-анион; НАДФ — никотинамидадениндинуклеотидфосфат; НАДФ·Н₂ — восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата.

НАДФ·Н₂-оксидазу, которая, окисляя НАДФ·Н₂ до НАДФ, активирует гексозомонофосфатный шунт (ГМФШ). По законам внутриклеточного гомеостаза ГМФШ нарабаты-

¹ НСТ как реактив широко используется в цитохимии. Однако, в отличие от НСТ-теста, его восстановление всегда происходит в присутствии неспецифических ферментных субстратов.

² Технические детали постановки НСТ-теста подробно изложены нами в методических рекомендациях «Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия» (Казань, 1979, утв. МЗ РСФСР).

вает новую порцию НАДФ · Н₂, замыкая положительную обратную связь. Электроны, снимаемые с НАДФ · Н₂, переводят молекулярный кислород в супероксидный анион, которому принадлежит непосредственная роль в восстановлении НСТ [17]. В целом НСТ-тест отражает степень активации кислородзависимого метаболизма нейтрофила, прежде всего функцию ГМФШ и связанную с ним наработку высокореактогенных свободных радикалов.

НАДФ · Н₂-оксидаза локализуется в плазматической мембране и при фагоцитозе вместе с ней инвагинируется внутрь клетки. Поэтому активация, связанная с поглощательной реакцией нейтрофила, сопровождается внутрифагосомальным восстановлением НСТ [16]. При стимуляции растворимыми агентами фагосом не образуется и диформазан откладывается на плазматической мембране.

Сказанное выше определяет возможности и сферу применения НСТ-теста в клинико-лабораторных и научных исследованиях. Нейтрофилы крови в норме пребывают в покоящемся (неактивированном) состоянии и поэтому в подавляющем большинстве не восстанавливают НСТ. Число нейтрофилов, которые метятся диформазаном, у здоровых людей, как правило, не превышает 10%. Увеличение этого показателя говорит о сдвиге во внутренней среде организма, которые можно квалифицировать как нарушение гомеостаза. Анализ причин, спровоцировавших реактивные изменения в нейтрофилах, составляет основное клиническое содержание подобных исследований. Этот вариант мы называем спонтанным НСТ-тестом, имея в виду, что он проводится без дополнительной стимуляции клеток. Подобно другим цитохимическим индикаторам, спонтанный НСТ-тест отражает степень функционального раздражения нейтрофилов *in vivo*, являясь своеобразным зеркалом гомеостаза.

Метаболическую активацию нейтрофилов можно воспроизвести *in vitro*. Вариант ее регистрации при помощи реакции восстановления НСТ мы называем индуцированным НСТ-тестом. Он характеризует функциональный резерв нейтрофилов, вскрывая их потенциальную способность ответить респираторным взрывом на адекватное раздражение.

Появившись около десяти лет назад, НСТ-тест не стал очередным «украшением» арсенала цитохимических приемов в изучении нейтрофила. По информативности он быстро выдвинулся на одно из первых мест наряду с такими интегральными показателями, как случайная миграция, хемотаксис, бактерицидность, адгезивность и пр. Преимущества НСТ-теста перед другими цитохимическими методами определяются, на наш взгляд, двумя главными причинами. Во-первых, НСТ-тест выявляет компоненты, которых нет (или почти нет) в покоящемся нейтрофиле. Они возникают только при стимуляции, а потому отлично дифференцируют интактные и активированные клетки. Минимальные показатели спонтанного НСТ-теста у здоровых служат четким критерием для отсчета патологических сдвигов и уровня искусственно наведенной активации. Другие цитохимические реакции менее альтернативны, ибо в той или иной степени они воспроизводимы с большинством нестимулированных нейтрофилов. Это затрудняет трактовку индивидуальных показателей, ограничивая исследования рамками популяционного анализа (сопоставление средних величин). Второе достоинство НСТ-теста заключается в том, что он отражает итоговую реакцию одной из ключевых ферментных систем, ответственных за бактерицидность нейтрофила [18].

Нарушение способности к восстановлению НСТ совпадает с патологией кислородзависимого аппарата бактерицидности [15]. Отсюда индуцированный НСТ-тест можно рассматривать как цитохимический критерий готовности нейтрофилов к завершеному фагоцитозу. Следует помнить, что индуцированный НСТ-тест с цельной кровью не вычленяет дефектов собственно нейтрофилов и гуморального (опсонического) звена фагоцитарной системы. Интеграция фактов на таком уровне имеет свою логику, ибо с практической точки зрения важно знать состояние фагоцитарной функции в целом. Чтобы решить вопрос о локализации дефекта, требуется раздельное изучение реактивности нейтрофилов и опсонических свойств плазмы [3].

Большое внимание привлекает применение НСТ-теста для дифференциации бактериальных и вирусных инфекций. Как было впервые установлено Парком и соавт. (1968), спонтанный НСТ-тест повышен у большинства больных с острыми пиогенными инфекциями и обычно не меняется при заболеваниях вирусной этиологии. В последующем эти данные в целом были подтверждены [12—14]. Вместе с тем было замечено, что спонтанный НСТ-тест иногда повышен при заболеваниях, не связанных с острой инфекционной патологией, или, напротив, не меняется, несмотря на присоединение бактериальных инфекций. Такие результаты относят к «ложноположительным» и «ложноотрицательным», подразумевая их дезориентирующую роль в клинике инфекционных заболеваний (см. табл.). Причиной «ложноотрицательных» результа-

тов является слабая стимуляция периферических нейтрофилов при недостаточной генерализации инфекционного процесса, либо (если процесс генерализован) врожденная или приобретенная патология нейтрофилов. В последнем случае низкие показатели НСТ-теста служат плохим прогностическим признаком. Обе причины легко дифференцировать, проверив активность нейтрофилов в индуцированном НСТ-тесте. «Ложноположительные» результаты до сих пор не получили должного объяснения и клинического толкования. Несомненно, как и при бактериальных инфекциях, нейтрофилы активируются *in vivo* медиаторными продуктами плазмы, клеток крови [6], а возможно, и непосредственно экзогенными агентами.

Анализ подобных ситуаций с позиций реактивности нейтрофила принесет, по нашему мнению, большую пользу в изучении вопросов патогенеза, лабораторной диагностики и контроля за течением целого ряда патологических процессов. Именно здесь с наибольшей вероятностью может проявиться роль нейтрофила (и, конкретно, НСТ-теста) как тонкого индикатора нарушений гомеостаза.

В нашей лаборатории было показано, что спонтанный НСТ-тест улавливает такие отклонения в организме человека, которые не регистрируются общепринятыми клинико-лабораторными методами и другими цитохимическими маркерами нейтрофила (щелочная фосфатаза, миелопероксидаза). Например, спонтанный НСТ-тест повышен почти у половины больных с аллергическими заболеваниями. Он оказался значительно информативнее, чем эозинофилия — признанный и пока единственный общий показатель активности аллергического процесса [8]. Спонтанный НСТ-тест может быть использован как диагностический и прогностический признак латентно протекающего пиелонефрита у детей. По показателям НСТ-теста предложено судить о динамике некоторых заболеваний крови [1, 7]. Высокая чувствительность и лабильность реакций, лежащих в основе НСТ-теста, делают его ценным методом для контроля за развитием инфекции у восприимчивых больных, например, при оценке эффективности антибактериальной терапии [19]. Если лечение выбрано правильно, процент активированных нейтрофилов обычно быстро возвращается к норме. Антибиотики рекомендуется назначать только тем больным, у которых результат спонтанного НСТ-теста превышает 20%.

В 1967 г. Бехнер и Натан обнаружили, что нейтрофилы детей, страдающих системным хроническим гранулематозом, не восстанавливают НСТ [15]. Поглощение и образование фаголизосом происходит нормально, но поглощенные бактерии остаются жизнеспособными, дети погибают от рецидивирующих нагноительных процессов (гранулемы), вызываемых нормально персистирующими пиогенными бактериями — обычно стафилококками и грамотрицательными палочками. Оказалось, что нарушение бактерицидной функции отражает врожденную патологию ГМФС (дефект по глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназе), которая блокирует наработку кислородзависимых бактерицидных факторов. С этого момента началось применение индуцированного НСТ-теста для скрининга системного гранулематоза и пограничных с ним клинических состояний. Одновременно стало очевидным, что НСТ-тест может быть полезен при изучении более широкого круга вопросов, связанных с функциональным состоянием нейтрофильного фагоцитоза и его потенциальных ресурсов. Потребность в такой информации нередко возникает в клинической практике в связи с прогнозом инфекционных осложнений. Допускается, что низкая реактивность нейтрофилов в индуцированном НСТ-тесте представляет собой неблагоприятный прогностический признак [5]. В подтверждение приведем пример из работы, выполненной в нашей лаборатории [10]. При изучении острой респираторной патологии у новорожденных было обнаружено резкое ослабление индуцированного НСТ-теста у большинства детей, у которых ОРЗ осложнилось пневмонией. У части из них снижение показателя выявлено за 2—3 дня до развития клинических признаков воспаления легких. Это явилось основанием рекомендовать индуцированный НСТ-тест для определения группы больных с повышенным риском осложнения пневмонией. Заметим, что спонтанный НСТ-тест в тех же исследованиях не давал клинически значимой информации.

Говоря о принципиальных возможностях НСТ-теста, мы сознательно опустили изложение частных деталей, зафиксированных в многочисленных публикациях зарубежных, а в последние годы — и отечественных авторов. Они лишь глубже подчеркивают большой интерес к этому методу и практическую ценность основанных на нем выводов.

По-видимому, настал момент, когда из всех цитохимических реакций, предложенных для изучения нейтрофила, следует отобрать наиболее простые и информативные и включить их в число стандартных методов клинических лабораторий. Одним из первых кандидатов на эту роль, несомненно, является НСТ-тест.

Применение НСТ-теста не ограничено рамками клиничко-лабораторной практики. Информативность и возможность точной количественной оценки сделали его одним из постоянных методов фундаментальных исследований. Здесь он успешно соседствует (а иногда конкурирует) с более сложными способами оценки метаболической активации нейтрофила — полярографией, хемилюминесценцией, изотопной маркировкой промежуточных и конечных метаболитов.

Причины «ложноположительных» и «ложноотрицательных» результатов спонтанного НСТ-теста

«Ложноположительные» результаты	«Ложноотрицательные» результаты
Новорожденные (до 2 месяцев) Гемофилия	Хронический системный гранулематоз
Остеогенная недостаточность	Врожденная или приобретенная агаммаглобулинемия
Инфаркт миокарда	Серповидноклеточная анемия
Полицитемия	Системная красная волчанка
Гемодиализ	Сахарный диабет
Синдром Чедиака — Хигасши	Квашиоркор
Талассемия	Тяжелые ожоги
Лимфопролиферативные заболевания	Лечение цитостатиками, кортикостероидами, фенилбутазоном
Протозойные инфекции (малярия, амёбные абсцессы печени, лейшманиоз)	Тяжелые дистрофические процессы (алкоголизм, нефрозы)
Вакцинальные реакции	Хирургический стресс
Радиотерапия	Сочетание с гриппозной и некоторыми другими вирусными инфекциями
Пероральная контрацептивная терапия	Некоторые формы локальных пиогенных инфекций (аппендицит)
Вирусные энцефалиты (коревой, паротитный, эховирусы)	
Период реконвалесценции после бактериальных инфекций	
Болезни иммунных комплексов (ревматоидный артрит)	
Циркулирующие иммунные комплексы	
Аллергические заболевания	

ЛИТЕРАТУРА

1. Борецкий В. А., Выговская Я. И., Логинский В. Е. Тер. арх., 1980, 9.—2. Васильев В. С. Лаб. дело, 1978, 9.—3. Виксман М. Е., Маянский А. Н. Бюлл. экспер. биол., 1980, 2.—4. Лецкий В. Б. Цитохимические исследования лейкоцитов. Л., Медицина, 1973.—5. Маянский А. Н., Виксман М. Е., Котельников П. Н., Молчанова И. В. Журн. микробиол., 1977, 6.—6. Маянский А. Н., Виксман М. Е., Попова Л. Г., Зубанров Д. М. Бюлл. экспер. биол., 1978, 2.—7. Медникова В. Г. Клиническое значение тетразолиевого теста и уровня фосфатной активности нейтрофильных лейкоцитов при остром лейкозе, лимфогранулематозе и гнойно-бактериальных процессах у детей. Автореф. канд. дисс., М., 1980.—8. Пазюк Е. А., Маянский А. Н. В кн.: «Иммунитет и аллергия в инфекционной и неинфекционной патологии». Фрунзе, 1980.—9. Пигаревский В. Е. Зернистые лейкоциты и их свойства. М., Медицина, 1978.—10. Пикунза О. И., Гуревич Е. П., Маянский А. Н., Виксман М. Е. Педиатрия, 1980, 9.—11. Шубич М. Г., Медникова В. Г. Лаб. дело, 1978, 9.—12. Шубич М. Г., Нагоев Б. С. Щелочная фосфатаза лейкоцитов в норме и патологии. М., Медицина, 1980.—13. Шубич М. Г., Нестерова И. В., Старченко В. М. Лаб. дело, 1980, 6.—14. Шубич М. Г., Рыковская Г. И. Там же, 1980, 5.—15. Baechner R. J., Nathan D. G. Science, 1967, 155, 835.—16. Briggs R. T., Drath D. V., Karnovsky M. J., Karnovsky M. L. J. Cell. Biol., 1974, 63, 36 a

(abstr.)— 17. Curnutte J. T., Babiog B. M. J. Clin. Invest., 1974, 53. — 18. Klebanoff S., Clark R. The neutrophil Function and Clinical Disorders. Amsterdam — New-York — Oxford, 1978. — 19. Matula G., Paterson Ph. G. New Engl. J. Med., 1971, 285, 6. — 20. Park B. H., Fikrig S. M., Smithwick S. M. Lancet, 1968, 2, 532.

Поступила 6 января 1981 г.

ОБМЕН ОПЫТОМ И АННОТАЦИИ

УДК 616.233+616.24]—002.2—081.213

Н. А. Черкасова, М. Х. Габидуллина, Э. Х. Шакирова (Казань). Опыт организации санаторного лечения детей с бронхолегочными заболеваниями в условиях городской детской больницы

В течение последних двух лет при 4-й детской больнице в летнее время функционирует отделение санаторного лечения детей с бронхолегочными заболеваниями (2 смены по 1,5 мес). У 71 из 177 детей, получивших санаторное лечение за это время, была хроническая пневмония, у 7 — бронхиальная астма, у 99 — частые заболевания органов дыхания (пневмония и бронхит 3—4 раза в год). 20 детей были в возрасте до 3 лет, 90 — от 3 до 7 лет и 67 — от 7 до 14 лет.

В санаторное отделение поступали дети вне обострения легочного процесса. Большинство детей жаловались на быструю утомляемость, вялость, снижение аппетита, плохой сон. У части больных была субфебрильная температура. У 33% детей при обследовании отмечена бледность кожи, пониженная упитанность, у 16,3% — кашель с отхождением мокроты, у 35% в легких выслушивались влажные хрипы разного калибра.

В первые три дня пребывания в санаторном отделении у детей проводили полное клиническое обследование и консультации специалистов. Каждый ребенок был осмотрен отоларингологом и физиотерапевтом.

У 43% детей были выявлены очаги инфекции: у 27% — хронический тонзиллит и аденоиды, у 11% — гнойный хронический отит, гайморит, у 5% — хронический холецистит.

Основу комплекса санаторного лечения составляли правильная организация режима дня, диетотерапия, физиотерапия, лечебная дыхательная гимнастика, массаж грудной клетки, медикаментозные средства. Лечение каждого ребенка проводилось с учетом его индивидуальных особенностей и реакции на лечебные процедуры. Распорядок дня предусматривал длительное пребывание на свежем воздухе на озелененной территории больницы. Обязательным был дневной сон после обеда в течение 2 часов. Для повышения эмоционального тонуса проводились прогулки, посещение кинотеатра, к организации которых широко привлекались родители. Было организовано полноценное, разнообразное, сбалансированное пятиразовое питание. Дополнительно детям давали в 7 ч утра кефир, на полдник — свежие фрукты, овощи, соки. Большую роль в комплексе лечения больных отводили физиотерапии. В среднем каждый больной получил по 38 физиопроцедур (электрофорез на область легких с раствором хлористого кальция, никотиновой и аскорбиновой кислот, сернокислой магнезии, индуктотермия, микроволновая терапия и т. д.).

Особое внимание обращали на лечение хронических очагов инфекции в носоглотке. Тубускварц и ультразвук на область миндалин и носовых ходов получили 29% детей, ингаляцию с панкреатином, отварами календулы, эвкалипта, настойкой прополиса — 73,4% детей. Всем детям назначали кислородный коктейль с отварами трав (мать-и-мачеха, душица, липовый цвет, зверобой), витамины В₁, В₆, аскорбиновую и никотиновую кислоты.

Все дни пребывания в больнице дети занимались лечебной физкультурой; каждому проведено 15 сеансов массажа грудной клетки.

В результате лечения состояние всех детей значительно улучшилось, дети окрепли, 60% детей прибавили в массе тела от 500 до 2000 г. Улучшился сон, восстановился аппетит. Утомляемость и вялость сохранились лишь у 4,5% детей. У всех детей нормализовалась температура, исчез кашель. Хрипы в легких обнаруживались только у 5% больных.

Таким образом, состояние всех детей, получавших санаторное лечение в течение 1,5 мес, значительно улучшилось.

Организация санаторного лечения в летнее время в отделении детской больницы является эффективным мероприятием по оздоровлению детей с бронхолегочными заболеваниями.

Опыт лечения таких больных может быть использован и в других стационарах города.