

На правах рукописи

РГБ СД

4 МАР 2002

БАНЩИКОВА ЕЛЕНА СЕРГЕЕВНА

**Особенности клинического течения и морфофункциональное
состояние эритроцитов у детей с наследственной
энзимопенической метгемоглобинемией**

14.00.09 – Педиатрия

03.00.15 – Генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

ТОМСК 2002

Работа выполнена в Сибирском государственном медицинском университете, НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН г.Томска и отделении гематологии НЦМ г.Якутска

Научный руководитель:

заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук, профессор

И.И. Балашева

Научный консультант:

доктор медицинских наук

Л.П. Назаренко

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук

Е.Б. Кравец

кандидат медицинских наук

Г.В. Карпова

Ведущая организация:

Алтайский государственный медицинский университет (г. Барнаул)

Защита состоится «28» сентября 2002 г. в 12 ч.
на заседании диссертационного совета Д 208.096.02. в Сибирском
Государственном медицинском университете по адресу:
634050, г.Томск, Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научной медицинской библиотеке
Сибирского Государственного медицинского университета
(634050, г.Томск, пр. Ленина, 107)

Автореферат разослан «26» сентября 2001 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Э.И.Белобородова

БЧ

Р 733. УИ. 033.9 - 3,0

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

НЭМ - наследственная энзимопеническая метгемоглобинемия

НЦМ - национальный центр медицины

ПОЛ - перекисное окисление липидов

МДА - малоновый диальдегид

СОД - супероксиддисмутаза

ЭКГ - электрокардиограмма

ЭХО-КГ - эхокардиография сердца

НАДН-цитохром-b5-редуктаза – ген НЭМ

НМАО - суммарные низкомолекулярные антиоксиданты

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Наследственная энзимопеническая метгемоглобинемия (НЭМ), или метгемоглобинемия, обусловленная дефицитом НАДН-цитохром-b5-редуктазы (МММ 250800) до сих пор остается мало изученной патологией, особенно у детей (Jaffe E.R., 1986; Shirabe K., Yubisui T., 1991; Wu Y., Mota L.V., Kaplan J.C., 1995; Chang-Hui Huang, 1998; Dekker J., Eppink M., 2001). Патогенез клинических проявлений НЭМ определяется хронической гипоксией вследствие окисления части гемоглобина в метформу и образования «валентных» гибридов, не способных захватывать кислород в легких и доставлять его тканям (Андреева А.П., 1976, 1977; Захарова Ф.А., 1982; Токарев Ю.Н., 1983). Степень выраженности клинической симптоматики зависит от содержания метгемоглобина в крови и компенсаторных способностей сердечно-сосудистой, дыхательной и гемопозитической систем в процессе адаптации к гипоксии (Кушаковский М.С., 1968; Ниссан Л.Г., 1987; Аскерова Т.А., 1995).

В литературе имеются описания клинической картины заболевания и состояния периферической крови у взрослых (Захарова Ф.А., 1982; Токарев Ю.Н., 1983; Jenkins J.M., 1992; Shirabe K., 1995; Wang Y., Wu Y., 2000). При этом установлено увеличение содержания гемоглобина, эритроцитов, очевидно, носящее компенсаторный характер (Токарев Ю. Н., 1980, 1983). Захарова Ф.А. (1982) сообщает о повышении уровня сывороточного железа у больных. Однако в литературе нет данных о функционально-морфологическом состоянии периферического звена эритрона при этом заболевании. Имеются лишь единичные сведения об изменениях морфологической характеристики эритроцитов при различных гемоглобинопатиях, сопровождающихся гипоксией (Ковалева Л.Г., Постников Ю.В., 1987; Казанец Е.Г., 1990; Троицкая О.В., 1996, 1999; Nagai T., 1980). Вместе с тем, в Якутии зарегистрировано необычайно высокое распространение НЭМ I типа у коренных жителей республики (Токарев

Ю.Н., 1983). По сути дела, Якутия является единственным очагом данного заболевания на территории России. Возможно, что накопление этого заболевания произошло вследствие эффекта основателя – популяционно-генетического феномена, связанного с ограниченной репродуктивной численностью в прошлом достаточно изолированных популяций (Серошевский В.Л. 1993). Данное обстоятельство открывает новые перспективы более углубленного изучения этой патологии. Несомненный интерес представляет изучение морфофункционального состояния эритроцитов у детей, страдающих НЭМ. Используя современные методы исследования морфологической характеристики клеток, а также перекисного окисления липидов и активности антиоксидантных систем, можно получить ценную информацию о патогенетических механизмах данного заболевания. Знание особенностей состояния эритроцитов при НЭМ позволит определить пути к ее адекватной терапии. Кроме того, большой интерес для регионального медико-генетического консультирования и разработки новых методов дородовой диагностики данного заболевания в семьях высокого риска представляет поиск возможных мутаций гена НЭМ - НАДН-цитохром-b5-редуктазы, локализованного на 22 хромосоме (22q13.31-qter).

Цель исследования. Оценить особенности клинического течения и морфофункциональное состояние эритроцитов у детей с наследственной энзимопенической метгемоглобинемией с обоснованием подходов к коррекции проводимой терапии.

Задачи исследования.

1. Описать особенности клинической картины наследственной энзимопенической метгемоглобинемии у детей в зависимости от возраста.

2. Дать комплексную морфофункциональную оценку состояния периферического звена эритрона у детей с наследственной энзимопенической метгемоглобинемией.
3. Провести молекулярно-генетическое обследование больных с наследственной энзимопенической метгемоглобинемией, проживающих в Якутии, с целью поиска основных мутаций гена НАДН-цитохром-b5-редуктазы, характерных для жителей стран восточной Азии – Японии и Китая.
4. Обосновать подходы к коррекции патогенетической терапии у детей с наследственной энзимопенической метгемоглобинемией.

Научная новизна. В результате проведенного исследования впервые установлены особенности клинической картины наследственной энзимопенической метгемоглобинемии у детей в зависимости от возраста. Впервые описаны морфологические особенности эритроцитов у детей и дана характеристика перекисного окисления липидов и активности антиоксидантов при наследственной энзимопенической метгемоглобинемии, что позволило выявить глубокие нарушения функционирования этих систем. Впервые в России проведено молекулярно-генетическое исследование больных с наследственной энзимопенической метгемоглобинемией для выявления точковых мутаций гена b5-редуктазы. Выделен ряд лабораторных показателей, позволяющих проводить дифференциальную диагностику наследственной энзимопенической метгемоглобинемии с заболеваниями, сопровождающимися синтезом патологических гемоглобинов. Предлагается схема лечения наследственной энзимопенической метгемоглобинемии у детей.

Практическая значимость работы.

1. Предлагается использование метода определения активности метгемоглобинредуктазы для диагностики гомо- и гетерозиготных форм наследственной энзимопенической метгемоглобинемии, а также проведение сканирующей электронной микроскопии для верификации диагноза.
2. Предлагается схема лечения наследственной энзимопенической метгемоглобинемии у детей.
3. Обоснованы подходы для включения в патогенетическую терапию, наряду с аскорбиновой кислотой, препаратов мембранстабилизирующего действия.
4. По данным диссертации подготовлено методическое письмо для органов практического здравоохранения.

Внедрение результатов работы. Данные, полученные в диссертации, используются в лаборатории БГФ Якутского государственного университета для диагностики наследственной метгемоглобинемии. Материалы работы включены в практические занятия со студентами педиатрического факультета Якутского медицинского института и используются в преподавании цикла «гематология» у студентов педиатрического факультета Сибирского медицинского университета.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены и обсуждены на 9 Интернациональном симпозиуме медицинских технологий (Канава, Япония, 2001), научно-практической конференции, посвященной 50-летию кафедры детских инфекций СГМУ (Томск, 1997), заседании проблемной комиссии по педиатрии (Томск, 2001).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано пять работ.

Структура и объем диссертации. Материал диссертации изложен на 150 страницах машинописного текста. Диссертация состоит из введения, пяти глав, выводов, практических рекомендаций, указателя литературы (128 отечественных и 88 иностранных источников). Иллюстративный материал представлен 14 рисунками, 31 таблицей.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Клиническая картина наследственной энзимопенической метгемоглобинемии у детей характеризуется цианозом различной степени выраженности, функциональной кардиопатией, астеническим синдромом на фоне гипоксии. Выраженность симптомов зависит от уровня метгемоглобина и нарастает при взрослении ребенка.
2. Наследственная энзимопеническая метгемоглобинемия сопровождается выраженными нарушениями морфофункциональных характеристик периферического звена эритрона: увеличением молодых форм эритроцитов, большим процентом дегенеративных и плоских форм этих клеток. Отмечается активация перекисного окисления липидов при относительной слабости антиоксидантных систем.
3. Молекулярно-генетический анализ якутских больных с наследственной энзимопенической метгемоглобинемией не выявил точковых мутаций Arg57Gln, Leu72Pro и Val105Met в гене НАДН-цитохром-b5-редуктазы, характерных для жителей Японии и Китая.

Материал и методы исследования

Всего под нашим наблюдением было 115 детей якутской национальности - 50 детей, страдающих наследственной энзимопенической метгемоглобинемией, и 65 здоровых детей. При этом было выявлено среди больных детей 46 гомозигот и 4 гетерозиготы по НЭМ. Возраст больных колебался от 2 до 16 лет. Соотношение полов было равным.

Дети наблюдались в отделении гематологии, или амбулаторно в детской поликлинике Национального Центра медицины г. Якутска. Обследование включало подробный анализ анамнестических данных с учетом сведений о состоянии здоровья родителей, построение родословных и выяснение данных о перенесенных заболеваниях. Наряду с общеклиническим обследованием всем детям проводился общий анализ крови на аппарате Coulter, включающий определение уровня гемоглобина, количества эритроцитов, ретикулоцитов, тромбоцитов, лейкоцитов с подсчетом лейкоцитарной формулы. Проводился биохимический анализ крови с определением общего белка и его фракций, общего билирубина и его фракций, холестерина, трансаминаз, глюкозы. Также исследовался общий анализ мочи, проводилась ЭКГ, УЗИ брюшной полости и ЭХО-кардиография.

Кроме того, был использован комплекс специальных биохимических методов, включающих определение уровня метгемоглобина (Evelyn K.A., Malloy N.T., 1938), активности метгемоглобинредуктазы (Hegesh E., Calvanovici N., 1968), определение коэффициентов Бетке (Betke K., 1972), интенсивности перекисного окисления липидов по накоплению малонового диальдегида (Гончаренко М.С., Латина А.М., 1985), активности супероксиддисмутазы (Constantine N.G., 1977), каталазы (Королюк М.А., 1988), суммарного содержания низкомолекулярных антиоксидантов (Рогожин В.В., 1999). Наряду с количественными показателями красной крови для оценки периферического звена эритрона изучалась поверхностная архитектура эритроцитов методом сканирующей электронной микроскопии (Козинец Г.И., 1982) и величина сухой массы клеток методом интерференционной микроскопии (Козинец Г.И., 1980). Больные обследовались при постановке на диспансерный учет и после проведения патогенетической терапии, а также наблюдались в катамнезе до четырех лет.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась на персональном компьютере с использованием программы «Statistica 5.0»,

методом вариационной статистики с вычислением средней величины и средней ошибки. Проверка на нормальность проводилась по критерию Колмогорова-Смирнова. Средние значения для нормально распределенных показателей сравнивались по параметрическому критерию Стьюдента для независимых выборок. Сравнение показателей, распределенных не по нормальному закону, проводилось с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Взаимосвязь показателей исследовалась с помощью оценки ранговых корреляций Спирмена с расчетом коэффициента корреляции R.

Влияние отдельных клинических симптомов на распределение некоторых биохимических показателей крови и на частоту встречаемости дегенеративных и предгемолитических форм эритроцитов оценивалось по результатам дисперсионного анализа. Для оценки встречаемости альтернативных признаков использовался критерий Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

50 детей, больных НЭМ находились под постоянным наблюдением в гематологическом отделении НЦМ г. Якутска. Возрастно-половой состав больных представлен в табл. 1.

Таблица 1

Возрастно-половое распределение детей больных НЭМ.

Возраст больных	Число больных		
	Мальчики	Девочки	Всего
2-7 лет	10	8	18
8-16 лет	17	15	32

Диагноз основывался на данных анамнеза, осмотра и определении уровня метгемоглобина и активности метгемоглобинредуктазы крови. При этом у детей дошкольного возраста содержание метгемоглобина составляло

16,65±8,88%, активность метгемоглобинредуктазы 0,26±0,13Ед (в группе здоровых дошкольников уровень метгемоглобина - 0,2±0,03%, активность метгемоглобинредуктазы - 3,05±0,95 ед). У школьников содержание метгемоглобина равнялось 18,61±7,05%, активность метгемоглобинредуктазы - 0,22±0,15Ед (у здоровых детей - 0,2±0,03% и 2,54±0,61соответственно). Необходимо отметить, что полученные нами данные близки с ранее проведенными исследованиями у взрослого населения (Захарова Ф.А., 1981).

Все пациенты с НЭМ были якутской национальности. Наибольшее количество наблюдаемых детей проживало в центральной части Якутии, преимущественно в сельской местности. Соотношение городских и сельских детей было 7 и 43 соответственно. При этом наибольшее число больных было обнаружено в Виллойской группе районов. Это подтверждает полученные ранее данные Токарева Ю.Н. (1983), Ильинских И.И. (1978), обнаруживших эпидемический очаг НЭМ в этих же районах. У всех обследованных детей выявлен I тип НЭМ.

Клинико-генеалогическое исследование семей с НЭМ показало аутосомно-рецессивный тип наследования данного заболевания, что подтверждает данные других авторов (Дервиз Г.В., 1967; Токарев Ю.Н. 1983, Соради И. 1984, Hirano T.1981, Jaffe E.R. et al. 1971, Matsuki K. 1981). У 51,1% наших больных аналогичное заболевание было выявлено среди ближайших родственников, а у остальных детей оно носило спорадический характер.

В настоящее время при I типе НЭМ известно семь мутаций гена НАДН-цитохром-b5-редуктазы (Dekker J., Eppink M. et al., 2001). Учитывая территориальную близость Якутии с Японией и Китаем, а также предположение о возможности единого родоначальника заболевания, нами были отобраны 3 ранее описанные в этих странах точковые мутации данного

гена (Leu72Pro, Val105Met, Arg57Gln). Молекулярно-генетический анализ наших больных не выявил ни одну из этих мутаций на территории Якутии. Полученные данные свидетельствуют о возможности иных мутаций у якутов, имеющих дефект метгемоглобинредуктазы. Следует отметить, что подобные исследования у больных НЭМ в нашей стране еще не проводились.

Заболевание проявляло себя уже в период новорожденности с не проходящего разлитого цианоза кожных покровов и слизистых, чаще всего возникало подозрение на врожденный порок сердца. Ведущей жалобой больных в младшей и, особенно, в старшей возрастной группе также была синюшность кожных покровов (100%), усиливающаяся в зимнее время года (рис. 1.). Интенсивность цианоза была от слабо выраженной синюшности до разлитого грифельно-серого цвета кожных покровов, слизистых оболочек ротовой полости, языка, губ, ушных раковин и ногтевых пластинок. Аналогичную симптоматику у взрослых отмечают ряд авторов (Ильинская И.И., 1973; Салиев К.К., 1985; Токарев Ю.Н., 1987; Аскерова Т.А., 1993). По интенсивности данный симптом преобладал у детей старшей группы и также зависел от уровня метгемоглобина в крови. Кроме того, характерными для старшей возрастной группы, в отличие от младших детей, были жалобы на быструю утомляемость (31,25% и 0% соответственно), головную боль (28,1% и 11,1% соответственно). Жалобы кардиального характера имели прямую зависимость от уровня метгемоглобина крови и наиболее часто проявлялись у старших детей болями в сердце (12,5%), сердцебиением (12,5%), одышкой (37,5%). Изменения со стороны сердечно-сосудистой системы в старшей возрастной группе проявлялись изменением частоты сердечных сокращений - тахикардией, а также коротким систолическим шумом на верхушке сердца. Для младших детей такие симптомы были менее характерны. Данные симптомы не сопровождалась изменениями на ЭКГ и ЭхоКГ. Таким образом, заболевание наиболее ярко протекало в старшем возрасте, что, очевидно, может быть связано с начинающейся декомпенсацией процесса.

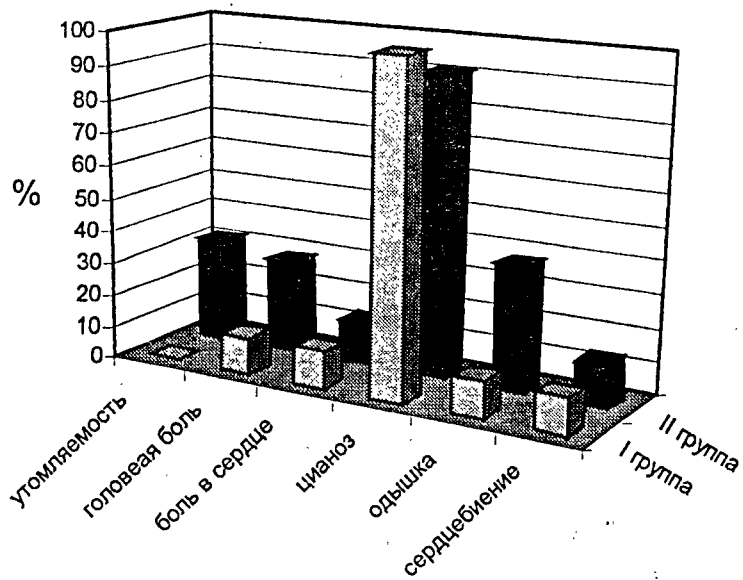


Рис. 1. Жалобы больных НЭМ в зависимости от возраста

Кроме того, у обследованных нами детей также были отмечены малые аномалии развития, при этом чаще всего встречались готическое небо, аномалии ушных раковин и башенный череп. Рядом авторов (Гембицкий Е.В. и соавт., 1975; Fialkow P.J. et al., 1965) также описываются разнообразные стигмы дизэмбриогенеза у этих пациентов.

Хотя по данным литературы (Соради И., 1984; Jaffe E.R., 1986) гемолиз при НЭМ мало характерен, в старшей группе детей мы обнаружили 4 ребенка (12,5%) с умеренными проявлениями этого процесса в виде желтушности склер, увеличения уровня билирубина за счет непрямой фракции, ретикулоцитоза. Данное состояние можно объяснить запуском компенсаторных механизмов, направленных на снижение вязкости крови (Токарев Ю.Н., 1983). Это косвенно подтверждается тем, что гемолиз наблюдался нами у детей с наивысшими показателями метгемоглобина, эритроцитов, гемоглобина и гематокрита.

При определении конституционального типа выявлено, что в младшей и старшей возрастных группах преобладал астеноидно-торакальный тип телосложения - 58,3% и 53,8% соответственно. Оценка антропометрических показателей детей выявила, что большинство девочек младшей возрастной группы не отстает от своих сверстников, а среди мальчиков в половине случаев наблюдается отставание в росте и массе тела. Для старшей возрастной группы характерно отставание в росте и массе тела независимо от пола, что, видимо, связано с явлениями хронической гипоксии, претерпеваемой растущим организмом. В младшем возрасте это состояние частично компенсируется.

При проведении корреляционного анализа была выявлена прямая достоверная корреляция между уровнем метгемоглобина и выраженностью цианоза ($p=0,99$) и одышки ($p=0,97$), а также обратная между активностью метгемоглобинредуктазы и наличием систолического шума на верхушке сердца ($p=-0,83$) у детей младшей группы. В старшей возрастной группе

определялась прямая корреляция между уровнем метгемоглобина и одышкой ($p=0,98$), болями в сердце ($p=0,98$), а также обратная корреляция между активностью метгемоглобинредуктазы и головной болью ($p=-0,96$), болями в сердце ($p=-0,93$), что подтверждает усиление клинических симптомов при нарастании уровня метгемоглобина и снижении активности метгемоглобинредуктазы.

При исследовании периферической крови у детей, больных НЭМ, необходимо отметить, что, независимо от возраста, показатели лейкограммы и тромбоцитарного звена не отличались от таковых здоровых детей. Эти данные совпадают с наблюдениями Дервиз Г.В. (1977), Захаровой Ф.А. (1982), Tanishima K., Tomoda A. et al. (1985), которые отмечали подобную закономерность у взрослых больных.

Показатели гемоглобина и эритроцитов у детей младшего возраста соответствовали нормам. Однако у них отмечены признаки напряжения кроветворения – умеренное увеличение содержания ретикулоцитов в периферической крови $6,83 \pm 1,66\%$ ($<0,05$). Более выраженные изменения красной крови наблюдались у больных старшей группы. У них отмечалось достоверное увеличение содержания гемоглобина $137,34 \pm 5,39$ ($<0,05$), и ретикулоцитов $6,05 \pm 1,6\%$ ($<0,05$), а также тенденция к повышению количества эритроцитов $4,83 \pm 0,32$ ($>0,05$). Показатели гематокрита были нормальными.

Таким образом, при анализе показателей периферической крови детей с НЭМ можно отметить изменения, близкие к таковым у взрослых. Также имеют место явления, направленные на компенсацию тканевой гипоксии – увеличение количества незрелых форм эритроцитов, что косвенно свидетельствует о раздражении красного кровяного ростка. Однако отмечается менее выраженный рост количества эритроцитов и гемоглобина, чем у взрослых, что может быть связано с относительной компенсацией процесса в детском возрасте и более низким, по сравнению со взрослыми

большими, уровнем метгемоглобина в эритроцитах. Данное утверждение подтверждается наличием устойчивой корреляции между уровнем гемоглобина и метгемоглобина у детей старшей группы ($r=0,66$).

При помощи метода сканирующей электронной микроскопии при НЭМ установлен факт повышения количества эритроцитов с измененной поверхностной архитектурой (предгемолитические, дегенеративные формы) на фоне снижения нормальных дискоцитов. В младшей и старшей возрастных группах обращает на себя внимание значительное снижение дисковидных форм $80,20 \pm 0,14$ и $80,06 \pm 0,14$ ($p < 0,01$) соответственно по сравнению с контролем ($88,1 \pm 0,14$ и $88,04 \pm 0,67$). Наибольшие изменения наблюдались среди дегенеративных форм эритроцитов и были одинаково выражены среди больных младшей и старшей групп ($1,3 \pm 0,13\%$ и $1,3 \pm 0,16\%$ соответственно). Кроме того, было увеличено содержание плоских форм эритроцитов – у младших детей $1,3 \pm 0,1\%$, у старших $1,49 \pm 0,12\%$. При проведении электронной микроскопии нами не было выявлено особых патологических форм, способных служить маркером данного заболевания.

Наличие большого количества дегенеративных форм эритроцитов в русле крови в первую очередь может свидетельствовать об их преждевременном старении. Как известно, в процессе старения этих клеток уменьшается активность различных ферментов, в том числе метгемоглобинредуктазы, что приводит к избыточному накоплению в них метгемоглобина. Таким образом, процессы, протекающие в стареющем эритроците, аналогичны процессам, происходящим при наследственном дефиците метгемоглобинредуктазы.

Величина сухой массы является интегрированным показателем, отражающим процессы гемоглобинизации эритроидных элементов и характеризующим их по степени насыщения гемоглобином (Гольдберг Е.Д., Степанова Е.И., 1983). Результаты наших исследований показали, что величина сухой массы эритроцитов в среднем равнялась $30,54 \pm 0,31$ пг, что

практически не отличалось от показателя здоровых детей ($31,9 \pm 0,8$ пг). Анализ структуры популяции эритроцитов по степени насыщения их гемоглобином позволил выявить признаки ее явной перестройки. При этом большая часть эритроцитов имела сухую массу в пределах 20-29 пг ($54,8 \pm 15,2\%$, при показателях контроля $13,0 \pm 1,5\%$, $p < 0,01$). В то же время было отмечено и увеличение количества «тяжелых» эритроцитов – $8,8 \pm 1,0\%$. Такая гетерогенность популяции эритроцитов может быть объяснена, с одной стороны, большим количеством дегенеративных форм эритроцитов, имеющих высокую плотность. С другой стороны, высокий уровень метгемоглобина в эритроцитах может способствовать образованию легких форм, что подтверждено работой Кислякова Ю.Я., Волжской А.М. (1993), описывающей феномен снижения количества гемоглобина в эритроцитах при экспериментальной острой нитритной метгемоглобинемии у крыс-самцов. Так же о снижении концентрации гемоглобина в эритроцитах косвенно свидетельствует увеличение внутреннего диаметра эритроцитов, наблюдаемое в обеих группах.

Учитывая явления хронической гипоксии у детей с НЭМ, можно было предполагать наличие усиления процессов ПОЛ. Проведенные нами исследования показали, что независимо от возраста у больных отмечалось увеличение уровня малонового диальдегида в среднем до $0,83 \pm 0,12$ нмоль/л.эр. ($p < 0,05$) в младшей возрастной группе до $0,71 \pm 0,04$ нмоль/л.эр. ($p < 0,05$) в старшей группе при контроле $0,32 \pm 0,19$ нмоль/л.эр. и $0,36 \pm 0,2$ нмоль/л.эр. соответственно. Одновременно существуют внутриклеточные системы защиты, ингибирующие этот процесс за счет инактивации продуктов ПОЛ и активных форм кислорода. При адекватном ответе организма на ускорение процессов перекисного окисления липидов происходит активация антиоксидантных систем. У обследованных нами детей наибольшим изменениям подвергалась активность каталазы. Однако у

больных отмечалось не увеличение, а снижение данного показателя в среднем до $64,5 \pm 9,07$ мкат/л ($p < 0,01$) и $81,36 \pm 4,34$ мкат/л ($p < 0,05$) против контроля $126,5 \pm 4,75$ мкат/л и $123,2 \pm 7,28$ мкат/л соответственно. Возможно, это связано с ингибцией фермента перекисью водорода, которая способна накапливаться при хроническом течении гипоксии (Королюк М.А. 1988). Кроме того, у больных детей младшего возраста отмечалось достоверное снижение содержания низкомолекулярных антиоксидантов в среднем до $748,0 \pm 3,79$ мг.экв кв/мл эр. против $922,75 \pm 55,9$ мг.экв кв/мл эр. у здоровых детей. У больных старшей группы этот процесс был выражен в меньшей степени ($744,92 \pm 23,35$ мг.экв кв/мл эр в контроле $782,75 \pm 55,1$ мг.экв кв/мл эр). По нашему мнению, это может быть связано с тем, что рост концентрации функционально неактивного метгемоглобина приводит к гиперпродукции $\bullet O_2^-$, который в повышенных концентрациях неферментативно активирует ПОЛ и окисляет (расходует) НМАО (Зборовская И.А., 1995). Необходимо отметить, что состояние СОД в группе старших детей не отличалось от показателей контроля ($0,2 \pm 0,02$ ммоль/мл эр и $0,19 \pm 0,05$ ммоль/мл эр, $p > 0,05$), тогда как в младшей группе имелась тенденция к ее повышению ($0,23 \pm 0,03$ ммоль/мл эр против $0,13 \pm 0,06$ ммоль/мл эр контроля, $p = 0,05$).

Таким образом, у детей, больных НЭМ, отмечается усиление перекисного окисления липидов при сравнительной слабости антиоксидантных систем, что может способствовать прогрессированию процесса и усилению гипоксии органов и тканей. В условиях Якутии эти процессы могут усугубляться дефицитом поступления витамина С с пищей в связи с недостаточным содержанием в рационе детей свежих овощей, фруктов, зелени (Закс А.С., 1977), а также особенностями климатических условий региона. В связи с этим для нормализации процесса ПОЛ в эритроцитах больных НЭМ необходимо экзогенное поступление

антиоксидантных средств, в частности, аскорбиновой кислоты в достаточных дозах.

С лечебной целью все дети, больные НЭМ, наблюдаемые нами с первого дня госпитализации и верификации диагноза получали аскорбиновую кислоту. При выборе схемы мы руководствовались дозами аскорбиновой кислоты, приводимыми в литературе для взрослых больных НЭМ - в среднем 1,0-1,5 г в сутки (Ильинская И.И., 1973; Токарев Ю.Н., 1980; Hines J.D., 1975). В младшей возрастной группе согласно фармакопее, мы назначали $1/3$ от этой дозы, в старшем возрасте - $1/2$. При этом дети в младшей возрастной группе получали аскорбиновую кислоту в дозе 0,15 г 3 раза в день, старшие 0,25 г 3 раза в день в течение 7 дней с последующим переходом на поддерживающую дозу, составляющую $1/2$ от лечебной. Курс лечения продолжался 3 недели, затем делался перерыв на 21 день, после чего прием аскорбиновой кислоты возобновлялся в лечебной дозе. Данная схема была разработана нами и применена в отделении гематологии НЦМ (г. Якутск). Эффективность лечения оценивалась по динамике клинических симптомов, уровню метгемоглобина, показателям гемограммы, уровню МДА, активности антиоксидантных систем.

На фоне проводимой терапии состояние детей быстро улучшалось (рис.2.). С третьего-четвертого дня лечения отмечалось уменьшение общего цианоза, особенно заметное в старшей возрастной группе. Несколько длительнее сохранялся цианоз слизистых оболочек губ и ротовой полости. Этот симптом исчезал к 7 дню. С четвертого дня менее выраженными становились жалобы на слабость, быструю утомляемость у детей старшего возраста. Симптомы исчезали к 7-10 дню лечения. Кроме того, у всех детей к третьему дню исчезли жалобы кардиального характера (одышка, сердцебиение, боли в области сердца). Показатели гемограммы на фоне лечения не претерпевали значительных изменений. Было выявлено лишь снижение уровня ретикулоцитов до средних показателей здоровых детей

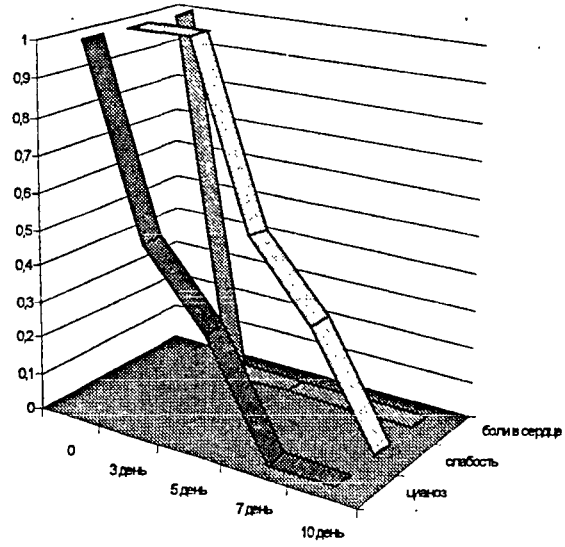


Рис 2. Динамика клинических симптомов у детей, больных НЭМ, на фоне лечения аскорбиновой кислотой.

($4,4 \pm 1,8\%$, $p > 0,05$). На фоне лечения наблюдалось быстрое снижение уровня метгемоглобина у всех больных детей до 10 – 12%, однако даже пролонгированное применение аскорбиновой кислоты не приводило к снижению этого показателя до нормы.

Показатели перекисного окисления липидов после курса лечения оставались на высоких цифрах и даже имели тенденцию к повышению (МДА составил $0,8 \pm 0,21$ нмоль/мл эр при норме $0,36 \pm 0,21$ нмоль/мл эр) (рис.3.). В тоже время прием аскорбиновой кислоты способствовал повышению уровня суммарных низкомолекулярных антиоксидантов ($879,0 \pm 12,0$ мг.экв кв/мл эр), не влияя на уровень СОД. Умеренное повышение ПОЛ в процессе лечения у больных НЭМ может быть связано с тем, что аскорбиновая кислота в повышенных концентрациях начинает проявлять свойства прооксиданта. Эти процессы, по данным литературы, делают лечение витамином С недостаточно эффективным и даже могут приводить к ряду нежелательных эффектов. Для уменьшения частоты возможных осложнений применяется прерывистый курс терапии. Для нормализации окислительно-антиокислительного гомеостаза эритроцитов и уменьшения скорости процессов старения клеток перспективным представляется использование в комплексе с витамином С широко применяемых в клинике высокоэффективных антиоксидантов - рутина и ненасыщенных высших жирных кислот, входящих, в частности, в состав эссенциале.

Катамнестическое наблюдение осуществлялось нами в гематологическом отделении НЦМ. За период с 1997 по 2001 годы под наблюдением находилось 27 детей, из них 11 в возрасте от 2 до 7 лет и 16 человек от 8 до 16 лет. Кратность наблюдения была до 4 раз в год, кроме того, больные обращались за консультацией гематолога при ухудшении состояния. При приеме аскорбиновой кислоты по схеме состояние детей оставалось удовлетворительным. Активных жалоб не было. Отмечался

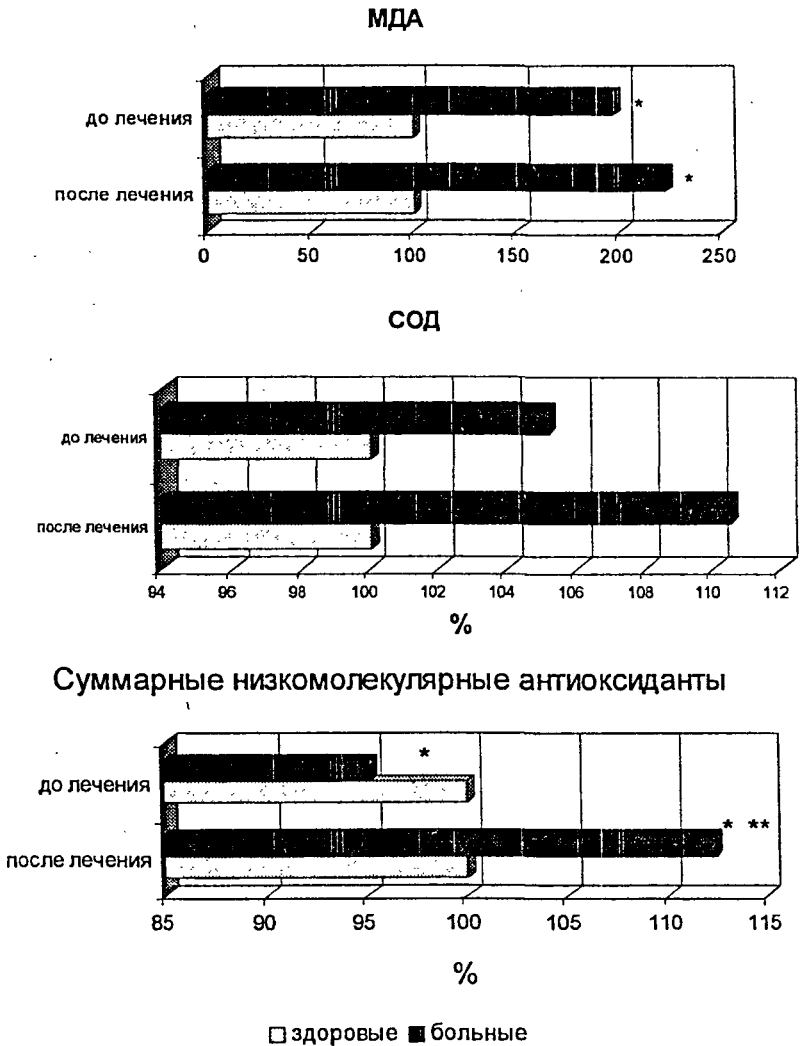


Рис. 3. Динамика показателей ПОЛ и антиоксидантных систем на фоне лечения

* - достоверность различий показателей здоровых детей и группы катамнеза

** - достоверность различий показателей у детей до лечения и после лечения

умеренный цианоз кожных покровов, ногтевых пластинок, более выраженный в зимнее время. Школьники не испытывали недомоганий, связанных с гипоксией – головных болей, утомляемости, одышки. Это благотворно сказывалось на их школьных успехах. У детей, регулярно получавших аскорбиновую кислоту, улучшились показатели физического развития. Уровень метгемоглобина у них составлял 13-15%. Таким образом, регулярный прием витамина С способствовал улучшению качества жизни у детей, больных НЭМ. Все дети, обследованные в катамнезе, посещали детские учреждения соответственно возрасту. Школьники обучались по программе общеобразовательной школы, все они занимались физической культурой в лечебной группе. Дети, страдающие НЭМ, подлежат диспансерному наблюдению весь период детства с передачей во взрослую сеть.

Резюмируя вышесказанное, необходимо сказать, что наследственная энзимопеническая метгемоглобинемия до сих пор является малоизученным заболеванием, особенно у детей. В настоящее время не вызывает сомнений аутомно-рецессивный тип наследования НЭМ. В то же время, проведенное у якутских детей молекулярно-генетическое исследование не подтвердило наличия в якутских популяциях ни одной из 3 мутаций гена НАДН-цитохром-b5-редуктазы, встречающихся у японцев и китайцев. Возможно, что на территории Якутии имеют место другие мутации данного гена, идентификация которых будет являться предметом будущих исследований. Наиболее характерными симптомами НЭМ у детей является цианоз кожных покровов и слизистых, функциональные изменения со стороны сердечно-сосудистой системы в виде тахикардии, систолического шума на верхушке. Клиническая картина НЭМ зависит от возраста детей и ярче проявляется у школьников. Диагностическим критерием НЭМ является повышение содержания метгемоглобина и снижение активности метгемоглобинредуктазы. В детском возрасте не отмечается характерного

для взрослых повышения содержания гемоглобина и эритроцитов. Характерным для НЭМ был выход в периферическое русло крови молодых форм эритроцитов. По данным электронной микроскопии отмечалось повышение содержания дегенеративных и плоских эритроцитов. Состояние хронической гипоксии при НЭМ сопровождалось усилением ПОЛ и слабостью антиоксидантных систем организма. Применение аскорбиновой кислоты способствует исчезновению ряда симптомов, снижению уровня метгемоглобина, а также повышению активности суммарных антиоксидантов. Применение в комплексной терапии НЭМ препаратов мембранстабилизирующего действия представляется весьма перспективным.

ВЫВОДЫ

1. Клиническая картина наследственной энзиматической метгемоглобинемии у детей имеет возрастные особенности: для школьников характерен более выраженный цианоз, симптомы функциональной кардиопатии и гипоксии.
2. Показатели массы тела и роста у детей с наследственной энзимопенической метгемоглобинемией ниже средних показателей, причем их дефицит увеличивается с возрастом.
3. Периферическое звено эритрона у больных независимо от возраста характеризуется увеличением числа незрелых форм эритроцитов, а также значительным увеличением дегенеративных и плоских форм эритроцитов.
4. Пациенты с наследственной энзимопенической метгемоглобинемией независимо от возраста имели усиление перекисного окисления липидов и снижение активности антиоксидантных систем – каталазы и низкомолекулярных антиоксидантов. Для младшей группы детей характерно увеличение супероксиддисмутазы.
5. Патогенетическая терапия аскорбиновой кислотой приводит к улучшению состояния детей, снижению уровня метгемоглобина и повышению активности суммарных антиоксидантов.

6. Молекулярно-генетическое исследование якутских больных с НЭМ не подтвердило наличие 3 точковых мутаций гена НАДН-цитохром-b5-редуктазы (Arg57Gln, Leu72Pro, Val105Met), встречающихся на территории Азии у японцев и китайцев.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Определение уровня метгемоглобинредуктазы может быть использовано как скрининговый тест для выявления гомо- и гетерозиготных больных в эндемическом очаге НЭМ.
2. Выявленные нарушения морфологии эритроцитов – увеличение плоских и дегенеративных форм – может быть использовано для дифференциальной диагностики наследственной энзимопенической метгемоглобинемии с другими заболеваниями, сопровождающимися синтезом патологических гемоглобинов.
3. Детям, больным наследственной энзимопенической метгемоглобинемией, рекомендуется применение аскорбиновой кислоты в дозе 0,15г 3 раза в день для дошкольного возраста и 0.25г 3 раза в день для школьного возраста в течение 7 дней с последующим переходом на поддерживающую дозу, составляющую $\frac{1}{2}$ от лечебной. Курс лечения 3 недели, затем перерыв на 21 день после чего прием аскорбиновой кислоты возобновляется в лечебной дозе.
4. По данным диссертации подготовлено методическое письмо для органов практического здравоохранения.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1.Случай врожденной энзимопенической метгемоглобинемии. //Дальневосточный медицинский журнал.-2001.-№2.-С.90-92.(Соавт. И.И. Балашева, Е.Ф. Аргунова)
- 2.Состояние ангиоксидантной системы эритроцитов у больных наследственной энзимопенической метгемоглобинемией. //Сборник молодых ученых.-Якутск.-2001.-С.14-15. (Соавт. В.В. Шаройко)
- 3.The antioxidative status of children with hereditary enzymopenic methemoglobinaemia in Sakha Republic (Yakutia) //The ninth international symposium of the Japan- Russia medical exchange.-Kanazawa 2001.-P.144. (V. V. Scharoyko)
- 4.Предварительные данные о метгемоглобинемии у детей Якутии.//Сборник «50 лет кафедре детских инфекций».-Томск.-1998.-С.88.
- 5.Исследование перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной защиты эритроцитов больных наследственной энзимопенической метгемоглобинемией. Новый подход к диагностике и биохимически адекватное ведение поддерживающей терапии больных.// Дальневосточный медицинский журнал.-2002.-№1.-С.83-86.(Соавт. Б.М. Кершенгольц, В.В. Шаройко).