

## ЦИТОМОРФОЛОГИЯ КРОВИ У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ АППЕНДИЦИТОМ

**А.Е. ЛЫСОВ<sup>1</sup>**

**Т.В. ПАВЛОВА<sup>1</sup>**

**Н.М. ПОЗДНЯКОВА<sup>1,2</sup>**

*<sup>1</sup>Белгородский государственный национальный исследовательский университет*

*<sup>2</sup>АНО «Научно-исследовательский медицинский центр «Геронтология», г. Москва*

*e-mail: toxa\_1984@pochta.ru*

В статье рассмотрены морфофункциональные особенности клеток венозной крови детей с острым аппендицитом, а также рельефа их мембран, изученные методом АСМ. Проведен сравнительный анализ ряда морфологических параметров клеток при деструктивном и недеструктивном аппендиците в сопоставлении с контрольной группой, изучена динамика этих показателей в процессе лечения.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, нейтрофил, эритроцит, аппендицит, дети.

**Введение.** Проблеме острого аппендицита посвящено огромное количество научных работ, широко освещены проблемы диагностики и выбора оптимальной хирургической тактики при этом заболевании, изучена патофизиология развития воспалительного процесса в червеобразном отростке. Однако, несмотря на значительные успехи, достигнутые в лечении этого заболевания, низкую летальность (0,7-1,7%), точная постановка диагноза, своевременное определение четких показаний к хирургическому вмешательству до сих пор является трудной задачей даже для опытного хирурга, особенно – когда речь идет о пациентах детского возраста [3]. Более того, развитие и внедрение в клиническую практику новейшей медицинской техники практически не сказалось на частоте выполнения необоснованных аппендэктомий. Доля их от общего количества хирургических вмешательств при остром аппендиците как в России, так и в мировой практике остается крайне высокой и варьирует от 10-15 до 30% и более [4, 10, 11]

Таким образом, на сегодняшний день остается открытым вопрос о дополнительных методах исследования, которые позволят повысить точность и специфичность диагностики острого аппендицита. В мировой литературе рассмотрена масса биохимических параметров, клинических симптомов, создан ряд шкал балльной оценки состояния больного, однако высокочувствительный и специфичный маркер острого аппендицита пока не найден [8, 9].

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) – сравнительно молодой метод исследования, и, хотя возможности ее весьма широки, попытки внедрения АСМ в клиническую практику начались лишь недавно [3, 12, 13, 14]. Некоторые авторы пытались применить данный метод для изучения свойств клеток крови при токсокарозе, механической желтухе, сахарном диабете, другой патологии, что позволило рассмотреть изучаемые ими проблемы под новым углом [1, 2, 12, 13, 14], однако у больных с острым аппендицитом АСМ до сих пор не применялась.

**Цель исследования.** Целью настоящего исследования явилось изучение рельефа поверхности клеточных мембран и морфофункциональных особенностей нейтрофилов и эритроцитов венозной крови детей, оперированных по поводу острого аппендицита, а также провести их сравнительный анализ в зависимости от патоморфологической характеристики аппендицита и этапа лечения.

**Материалы и методы.** Выполнены исследования клеток венозной крови 35 детей, находившихся на лечении в Детской областной клинической больнице г. Белгород с острым аппендицитом. 6 детей были прооперированы по поводу недеструктивного аппендицита. 29 детей оперированы по поводу деструктивных форм аппендицита. В работе нами использована классификация В.И. Колесова (1959) [5] как наиболее широко распространенная в клинической практике. Неравновесность выборок по объему отражает реальное соотношение указанных форм острого аппендицита в клинической практике. Контрольную группу составили 14 детей, поступивших в стационар с абдо-



минальным болевым синдромом, которым впоследствии диагноз острой хирургической патологии был исключен.

Забор крови производился с согласия родителей ребенка по стандартной методике путем пункции кубитальной вены. Кровь набиралась в стерильную одноразовую вакуумную пробирку с добавлением гепарина в дозе 10ЕД/мл в день поступления и при выписке. Патоморфологические изменения стенки аппендикса изучали стандартными методами. Для оценки ультраструктуры и упругих свойств клеточной поверхности использовали атомно-силовой микроскоп NTEGRA Vita фирмы NT-MDT (г. Зеленоград).

Измеряли диаметр и высоту профиля клетки, то есть максимальную его высоту от подложки, глубину и диаметр центральной ямки эритроцитов; с помощью прилагающейся АСМ графической программы рассчитывались площадь поверхности и объем клетки, максимальные высота и ширина основания микровыростов клеточной мембраны нейтрофила, перепады высот ядра и цитоплазмы. Учитывая, что изолированная оценка диаметра и высоты клетки для характеристики ее функциональной активности явно недостаточна, и эти взаимосвязанные параметры должны рассматриваться в комплексе, нами был введен коэффициент распластанности клетки, представляющий собой отношение диаметра нейтрофила к его высоте.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного пакета «Microsoft Office XP» методами параметрического анализа [9]. Определяли среднее ( $\bar{X}$ ), ошибку среднего ( $m$ ) и среднеквадратичное отклонение ( $\delta$ ). Достоверность различий определяли по  $t$ -критерию Стьюдента. Уровень значимости  $p$  выбран менее 0,05.

**Результаты исследования.** В режиме 3D нами были получены трехмерные реконструкции плазматической мембраны нейтрофилов, где четко определялись контуры ядра и микровыросты цитоплазмы, контурировались рельеф цитоскелета, определялись глобулы, являвшиеся, вероятно, белковыми комплексами плазмолеммы. В разных участках клетки по скоплениям гранул можно косвенно судить об активности окислительно-восстановительных реакций.

В контрольной группе профиль ядра нейтрофила преобладал по высоте над цитоплазмой в среднем на  $9,4 \pm 6,9$  нм. Число микровыступов мембраны на стандартном участке составило  $10 \pm 2,4$ , их высота  $21,9 \pm 1,2$  нм, диаметр основания  $252,4 \pm 32,3$  нм. Площадь поверхности нейтрофила составила  $215,5 \pm 28,1$  мкм<sup>2</sup>, объем клетки  $57,8 \pm 12,6$  мкм<sup>3</sup>, диаметр клетки  $11,8 \pm 0,61$  мкм, высота  $625 \pm 112$  нм. Коэффициент распластанности клетки составил  $19,5 \pm 2,7$ .

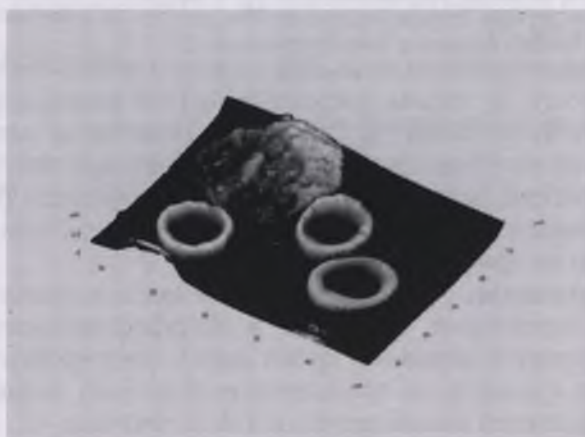


Рис. 1. 3D-реконструкция поверхности клеток крови у ребенка с деструктивным аппендицитом при поступлении

Поверхность мембраны нейтрофилов у детей с деструктивным аппендицитом характеризовалась следующими особенностями. При поступлении профиль ядра был относительно низким. Высота цитоплазмы относительно ядра составила  $63,9 \pm 8,8$  нм; количество микровыступов на выбранном в качестве стандартного квадратном участке мембраны нейтрофила со стороной  $2,25$  мкм –  $14,2 \pm 3,2$  нм, максимальная высота вы-

ступа  $45 \pm 8,8$  нм, максимальный диаметр основания  $630 \pm 139$  нм. Следует отметить, что довольно часто на поверхности мембран нейтрофилов при поступлении образовывались достаточно крупные возвышения, и составлявшие их микровыступы, слившиеся воедино, было трудно дифференцировать друг от друга. Такие агломераты оценивались и измерялись как единое целое (рис. 1).

К моменту выписки поверхность нейтрофилов у детей с деструктивными формами аппендицита претерпевала ряд изменений (рис. 2).



Рис. 2. 3D-реконструкция поверхности нейтрофила у ребенка с деструктивным аппендицитом при выписке

Профиль ядра относительно цитоплазмы становился выше. Цитоплазма и ядро имели практически одинаковую высоту (перепад составлял около  $4,2 \pm 4,9$  нм; количество микровыступов на стандартном квадратном участке мембраны нейтрофила со стороной 2,25 мкм сокращалось до  $7,7 \pm 1,8$ , максимальная высота выступа – в среднем до  $20,2 \pm 3,2$  нм, максимальный диаметр основания – до  $267 \pm 22$  нм. При поступлении у детей с острым деструктивным аппендицитом отмечается достоверное уменьшение диаметра ( $12,14 \pm 0,73$  мкм при поступлении и  $12,7 \pm 0,9$  мкм при выписке,  $p < 0,05$ ) и увеличение высоты клетки ( $560 \pm 130$  нм при поступлении и  $460 \pm 90$  нм при выписке,  $p < 0,05$ ). Коэффициент распластанности клеток при поступлении составил  $23,96 \pm 6$ , при выписке  $28,82 \pm 5,62$ . Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

**Достоверные отличия рельефа нейтрофилов у детей с деструктивными формами острого аппендицита при поступлении и выписке ( $p < 0,05$ )**

	Поступление	Выписка	Контроль
Число выступов	$14,2 \pm 3,2$	$7,7 \pm 1,8$	$10 \pm 2,4$
Высота выступов, нм	$45 \pm 8,8$	$20,2 \pm 3,2$	$21,9 \pm 1,2$
Ширина основания выступов, нм	$630 \pm 139$	$267 \pm 22$	$252,4 \pm 32,3$
Перепад высот между цитоплазмой и ядром, нм	$63,9 \pm 8,8$	$4,2 \pm 4,9$	$-9,4 \pm 6,9$
Диаметр клетки, мкм	$12,14 \pm 0,73$	$12,7 \pm 0,9$	$11,8 \pm 0,61$
Высота клетки, нм	$560 \pm 130$	$460 \pm 90$	$625 \pm 112$
Коэффициент распластанности	$23,96 \pm 6$	$28,82 \pm 5,62$	$19,5 \pm 2,7$

В группе детей с недеструктивным аппендицитом указанные выше характеристики нейтрофилов распределились иначе.

При поступлении соотношение высоты профиля цитоплазмы и ядра было обратным – ядро было выше цитоплазмы на  $22,7 \pm 4,7$  нм; количество микровыступов на стандартном квадратном участке мембраны нейтрофила со стороной 2,25 мкм –  $14,3 \pm 3$ , максимальная высота выступа –  $22 \pm 0,67$  нм, максимальный диаметр основания –  $246,8 \pm 28,8$  нм.



К моменту выписки поверхность нейтрофилов у детей с недеструктивными формами острого аппендицита претерпела ряд изменений. Профиль ядра относительно цитоплазмы был выше на  $5 \pm 5,9$  нм; количество микровыступов на стандартном квадратном участке мембраны нейтрофила со стороны  $2,25$  мкм сокращалось в среднем до  $9,7 \pm 3,1$ , максимальная высота выступа – до  $14,9 \pm 3,4$  нм, максимальный диаметр основания – до  $181,4 \pm 37,2$  нм. При поступлении у детей с острым недеструктивным аппендицитом отмечается увеличение диаметра ( $11,47 \pm 0,87$  мкм при поступлении и  $10,78 \pm 0,88$  мкм при выписке) и высоты клетки ( $600 \pm 80$  нм при поступлении и  $470 \pm 60$  нм при выписке). Также в данной группе отмечается снижение распластанности нейтрофилов ( $23,62 \pm 3,49$  при поступлении и  $19,79 \pm 4,01$  при выписке). Однако все указанные изменения статистически не достоверны ( $p > 0,05$ ). Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

### Особенности рельефа нейтрофилов у детей с недеструктивными формами острого аппендицита ( $p > 0,05$ )

	Поступление	Выписка	Контроль
Число выступов	$14,3 \pm 3$	$9,7 \pm 3,1$	$10 \pm 2,4$
Высота выступов, нм	$22 \pm 0,67$	$14,9 \pm 3,4$	$21,9 \pm 1,2$
Ширина основания выступов, нм	$246,8 \pm 28,8$	$181,4 \pm 37,2$	$252,4 \pm 32,3$
Перепад высот между цитоплазмой и ядром, нм	$-22,7 \pm 4,7$	$-5 \pm 5,9$	$-9,4 \pm 6,9$
Диаметр нейтрофила, мкм	$11,47 \pm 0,87$	$10,78 \pm 0,88$	$11,8 \pm 0,61$
Высота нейтрофила, нм	$600 \pm 80$	$470 \pm 60$	$625 \pm 112$
Коэффициент распластанности	$23,62 \pm 3,49$	$19,79 \pm 4,01$	$19,5 \pm 2,7$

Расчет t-критерия Стьюдента показал, что в группе детей с деструктивным аппендицитом при поступлении морфофункциональные характеристики нейтрофилов, а именно перепад высот цитоплазмы относительно ядра, количество и максимальная высота микровыступов мембраны, а также максимальный диаметр их основания достоверно отличались от таковых в группе с недеструктивным аппендицитом и контрольной группы ( $p < 0,05$ ). (табл. 3)

Таблица 3

### Особенности рельефа нейтрофилов у детей с деструктивными и недеструктивными формами острого аппендицита при поступлении ( $p < 0,05$ )

	Поступление	Недеструктивный	Контроль
Число выступов	$14,2 \pm 3,2$	$14,3 \pm 3$	$10 \pm 2,4$
Высота выступов, нм	$45 \pm 8,8$	$22 \pm 0,67$	$21,9 \pm 1,2$
Ширина основания выступов, нм	$630 \pm 139$	$246,8 \pm 28,8$	$252,4 \pm 32,3$
Перепад высот между цитоплазмой и ядром, нм	$63,9 \pm 8,8$	$-22,7 \pm 4,7$	$-9,4 \pm 6,9$
Диаметр нейтрофила, мкм	$12,14 \pm 0,73$	$11,47 \pm 0,87$	$11,8 \pm 0,61$
Высота нейтрофила, нм	$560 \pm 130$	$600 \pm 80$	$625 \pm 112$
Коэффициент распластанности	$23,96 \pm 6$	$23,62 \pm 3,49$	$19,5 \pm 2,7$

При анализе морфологии эритроцитов методом АСМ выявлен ряд статистически достоверных отличий как при поступлении между двумя группами, так и в группе детей с деструктивным аппендицитом при поступлении и при выписке.

При сопоставлении морфофункциональных особенностей эритроцитов у детей с деструктивным и с недеструктивным аппендицитом при поступлении, а также контрольной группы обнаружено, что в первой группе при поступлении достоверно больше, чем в двух других диаметр эритроцита ( $7,85 \pm 0,36$  мкм при деструктивном аппендиците и  $7,37 \pm 0,18$  при катаральном,  $7,48 \pm 0,37$  в контроле,  $p < 0,05$ ), а также диаметр центральной ямки эритроцита ( $5,69 \pm 0,43$  мкм при деструктивном аппендиците и  $5,1 \pm 0,28$  при катаральном,  $5,34 \pm 0,25$ ,  $p < 0,05$ ). Кроме того, в первой группе достоверно выше, чем в контрольной, площадь эритроцита ( $98,83 \pm 10,54$  мкм<sup>2</sup> при деструктивном аппендиците и  $90,25 \pm 7,26$  в контрольной группе,  $p < 0,05$ ) (табл. 4)



Таблица 4

**Статистически значимые отличия морфофункциональных особенностей эритроцитов у детей с острым деструктивным и недеструктивным аппендицитом при поступлении и контрольной группы ( $p < 0,05$ )**

	Деструктивный аппендицит	Недеструктивный аппендицит	Контрольная группа
Площадь эритроцита, мкм <sup>2</sup>	98,83±10,54	91,35±6,44	90,25±7,26
Диаметр эритроцита, мкм	7,85±0,36	7,37±0,18	7,48±0,37
Диаметр центральной ямки эритроцита, мкм	5,69±0,43	5,1±0,28	5,339±0,25

Анализ динамики морфофункциональных особенностей эритроцитов у детей с острым деструктивным аппендицитом в процессе лечения выявил следующие характерные особенности. Площадь эритроцита при поступлении была достоверно выше (98,83±10,54 мкм<sup>2</sup> при поступлении и 89,05±8,24 мкм<sup>2</sup> при выписке,  $p < 0,05$ ), объем клетки при поступлении также был достоверно выше (28,08±4,46 мкм<sup>3</sup> при поступлении и 24,26±2,8 мкм<sup>3</sup> при выписке,  $p < 0,05$ ). Аналогичная динамика отмечена для диаметра центральной ямки эритроцита (5,69±0,43 мкм при поступлении и 5,35±0,34 мкм при выписке,  $p < 0,05$ ). Изменения глубины центральной ямки имели обратную динамику – при поступлении она была меньше (373±114 нм при поступлении и 464±105 нм при выписке,  $p < 0,05$ ) (табл. 5).

Таблица 5

**Статистически значимые отличия морфофункциональных особенностей эритроцитов у детей с острым деструктивным аппендицитом при поступлении и при выписке ( $p < 0,05$ )**

	Поступление	Выписка
Площадь эритроцита, мкм <sup>2</sup>	98,83±10,54	89,05±8,24
Объем эритроцита, мкм <sup>3</sup>	28,08±4,46	24,26±2,8
Диаметр центральной ямки эритроцита, мкм	5,69±0,43	5,35±0,34
Глубина центральной ямки эритроцита, нм	373±114	464±105

Подводя итог, можно утверждать, что увеличение диаметра эритроцита и его центрального углубления характерно для всех форм острого аппендицита. В то же время для деструктивного аппендицита характерно увеличение площади поверхности эритроцитов, что является достоверным отличием данной группы больных.

Наличие острого воспалительного процесса в брюшной полости не влияет на такие фундаментальные параметры морфологии нейтрофилов, как объем клетки и площадь мембраны. Имеются статистически достоверные отличия в функциональных параметрах клетки, наглядной иллюстрацией которых служит коэффициент распластанности клетки и ее рельеф. Кроме того, увеличение коэффициента распластанности нейтрофилов при выписке у пациентов с деструктивным аппендицитом можно расценить как не успешную восстановиться к моменту клинического выздоровления дисфункцию клеток, либо продолжающееся воздействие провоспалительных цитокинов, выделение которых в кровь при недеструктивном аппендиците прекращается быстрее, чем при деструктивном.

**Литература**

1. Бондарь, Т.П. Наностроение поверхности мембран эозинофилов у пациентов с токсокарозом /Т. П. Бондарь, Н. М. Ишкова, Е. А. Мельченко// Вестник Ставропольского государственного университета – 2009. – №63. – С. 223-227
2. Бондарь, Т.П. Использование атомно-силовой микроскопии для изучения морфофункционального состояния эозинофилов у больных токсокарозом / Т.П. Бондарь, Н.М. Ишко-



ва, Е.А. Мельченко, А.Б. Эльканова // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2010. – №4. – С. 57-61.

3. Завада Н.В., Борисенко В.Е., Груша В.В., Соловей А.Л. Особенности структурных параметров эритроцитов при атомно-силовой микроскопии у пациентов с механической желтухой // Медицина. – 2008 – №2 (61). – С. 35-43/

4. Карасева О.В., Капустин В.А., Брянцев А.В. Лапароскопические операции при абсцедирующих формах аппендикулярного перитонита у детей // Детская хирургия. – 2005. – №3. – С. 25–29/

5. Колесов В.И. Острый аппендицит. М.: Медгиз, 1959. – 290 с.

6. Луговская С. А., Морозова В. Т., Почтарь М. Е., Долгов В.В. Лабораторная гематология. – М.: Изд-во ЮНИМЕД-пресс, 2002. – 120 с.

7. Новицкий, В.В. Молекулярные механизмы нарушения взаимодействия эффекторных клеток крови при патологии инфекционной и неинфекционной природы / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Л.С. Литвинова // Бюллетень Сибирского отделения РАМН. – 2008. – №4. – С. 36-47.

8. Полетаева, О.Г. Учет результатов иммуноферментного анализа при тканевых гельминтозах в антительных единицах / О.Г. Полетаева, Т.В. Старкова, Н.Н. Красовская // Медицинская паразитология и паразитологические болезни. – 2007. – №1. – С. 24-26.

9. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных / О.Ю. Реброва. – М., 2006. – 312 с.

10. Bruno Ramalho de Carvalho; Augusto Diogo-Filho; Cleiton Fernandes; Cristiane Borges Barra Leucograma, proteína C reativa, alfa-1 glicoproteína ácida e velocidade de hemossedimentação na apendicite aguda // Arquivos de Gastroenterologia. – 2003. – vol. 40 no.1.

11. Gerald D.G. Brennan Pediatric appendicitis: pathophysiology and appropriate use of diagnostic imaging // Canadian journal of emergency medicine. – 2006. – №8(6) – P. 425-432.

12. Girasole M, Dinarelli S, Boumris G. Structure and function in native and pathological erythrocytes: a quantitative view from the nanoscale. – Micron. – 2012 Dec;43(12)/

13. Fornal M, Lekka M, Pyka-Fościan G, Lebed K, Grodzicki T, Wizner B, Styczeń J. Erythrocyte stiffness in diabetes mellitus studied with atomic force microscope. // Clin Hemorheol Microcirc. 2006;35(1-2):273-6/

14. Musielak M. Red blood cell-deformability measurement: review of techniques // Clin Hemorheol Microcirc. 2009;42(1).

## BLOOD CYTOMORPHOLOGY IN CHILDREN WITH ACUTE APPENDICITIS

**A.E. LYSSOV<sup>1</sup>**

**T.V. PAVLOVA<sup>1</sup>**

**N.M. POZDNYAKOVA<sup>1,2</sup>**

*Belgorod National Research University*

*<sup>2</sup>ANO "Research Medical Centre "Gerontology", Moscow*

*e-mail: toxa\_1984@pochta.ru*

The article deals with morpho-functional peculiarities of venous blood cells retrieved from children with acute appendicitis. The comparative analysis of blood cell morphologic characteristics in destructive and non-destructive appendicitis was undertaken; their dynamics during treatment was studied.

Key words: atomic force microscopy, neutrophil, appendicitis, children.