



Пухтинская М.Г., Эстрин В.В.

ПРОФИЛАКТИКА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У НОВОРОЖДЕННЫХ С РЕСПИРАТОРНЫМ ДИСТРЕСС-СИНДРОМОМ ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ РЕКОМБИНАНТНЫМ ГРАНУЛОЦИТАРНЫМ КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИМ ФАКТОРОМ

ФГУ Ростовский НИИ акушерства и педиатрии Росздрава
Россия, 344013, г. Ростов-на-Дону, ул. Мечникова, 43. E-mail: m.lelik@rniiap.ru

Целью исследования стало определение иммунологических критериев назначения чр-ГКСФ доношенным новорожденным с РДС второго типа, находящимся на ИВЛ.

Материалы и методы: у 64 новорожденных при поступлении определяли: уровень Г-КСФ, ФРФ, sFas, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-4, ИЛ-1, ФНО (ИФА); субпопуляционный состав лимфоцитов; апоптоз (проточная цитометрия, окрашивание аннексином и пропидием йодида; Beckman Coulter Epics, США).

Выводы: критериями для назначения чр-ГКСФ является снижение эндогенного Г-КСФ ниже 1556 пкг/мл и увеличение лимфоцитов, находящихся в раннем и позднем апоптозе свыше 9,5% и 0,56% (соответственно). Необходимо проведение рандомизированных исследований использования чр-ГКСФ до развития нейтропении.

Ключевые слова: нейтропения, сепсис, новорожденный, цитокины, апоптоз.

Puchtinskaya M.G., Estrin V.V.

PREVENTIVE MAINTENANCE OF BACTERIAL COMPLICATIONS AT NEWBORNS WITH THE RESPIRATORY DISTRESS-SYNDROME BY HUMAN RECOMBINANT GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR

Rostov Scientific Research Institute of Obstetrics and Pediatrics
43 Mechnikova st., Rostov-on-Don, 344013, Russia. E-mail: m.lelik@rniiap.ru

Purpose: Definition of immunological criteria of purpose of rhGCSF became research aim newborns with respiratory distress syndrome, being on PPV.

Materials and Methods: At 64 newborns determined at receipt: G-CSF, FRF, sFas, IL-6, IL-8, IL-4, IL-1, TNF (IFA), subpopulational structure of lymphocytes and level of lymphocytes in early and late apoptosis (flow cytometry with colouring annexin and propidium iodide; Beckman Coulter Epics, USA).

Summary: Criteria for prescription of rhGCSF are decrease of plasma level of endogenous hr-GCSF low 1556 pg/ml and increase of lymphocytes, being in early and late apoptosis, above 9,5% and 0,56% (accordingly). Realization of randomized studies use rh-GCSF at newborns to development of neutropenic is necessary.

Keywords: neutropenia, sepsis, newborn, cytokin, apoptosis.



Введение

Высокий уровень бактериальных осложнений у доношенных новорожденных с респираторным дистресс-синдромом (РДС), находящихся на искусственной вентиляции легких (ИВЛ), определяет необходимость совершенствования существующих методов профилактики сепсиса [4-5].

В этой связи возможность коррекции нейтропении у новорожденных с РДС на ИВЛ человеческим рекомбинантным гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (чр-ГКСФ), о которой впервые сообщил E.R. Gillan с соавторами в 1994 году, представляла большой научный и практический интерес [6]. В исследовании положительный терапевтический эффект (снижение числа заболевших сепсисом) был достигнут благодаря способности чр-ГКСФ повышать уровень зрелых активных нейтрофилов в периферической крови.

Затем в научной литературе появился целый ряд подобных работ. Анализ результатов опубликованных рандомизированных исследований доказал безопасность использования чр-ГКСФ у новорожденных с РДС, однако в некоторых из них эффективность использования чр-ГКСФ не подтверждалась [7-13].

Следует подчеркнуть, что во всех проводимых исследованиях критерием для назначения чр-ГКСФ новорожденным служило снижение количества нейтрофилов в периферической крови пациента менее 1500 кл/мм³ [7-13].

Перечисленные выше факты позволили предположить, что развитие абсолютной нейтропении является следствием истощения костно-мозговых резервов и возможностей иммунной системы новорожденного ребенка с тяжелой респираторной патологией. Поэтому назначение чр-ГКСФ с целью увеличения количества зрелых активных нейтрофилов могло оказаться неэффективным. Кроме того, время ожидания развития нейтропении такого уровня оставалось безвозвратно потерянным для лечащего врача и пациента.

Поэтому, в соответствии с рекомендациями CONSORT (2001), с одобрения локального этического комитета и письменного согласия родителей каждого пациента, нами было проведено контролируемое рандомизированное слепое клиническое испытание, в котором критерием для назначения чр-ГКСФ новорожденным с РДС на ИВЛ служило снижение в гемограмме общего количества лейкоцитов менее $6 \times 10^9/\text{л}$. Полученные результаты подтвердили эффективность и безопасность использования чр-ГКСФ у новорожденных без выраженной нейтропении (снижение заболеваемости сепсисом в 5,5 раз, летальности в 6 раз и финансовых затрат в 1,3 раза) [14].

Таким образом, необходимость поиска иных лабораторных критериев назначения чр-ГКСФ новорожденным с РДС на ИВЛ, позволяющих обеспечить его наибольшую клиническую эффективность, стала очевидной.

Целью настоящего исследования стало определение иммунологических критериев назначения чр-ГКСФ, основанное на изучении иммунопатогенеза развития нейтропении у новорожденных с РДС, находящихся на ИВЛ.

Материалы и методы

В исследование, одобренное локальным этическим комитетом и письменными согласиями родителей пациентов, вошли 64 новорожденных с РДС, поступивших в

реанимационное отделение в тяжелом состоянии на ИВЛ, родившихся в сроке гестации $39 \pm 2,1$ недель, с массой тела 3700 ± 565 грамм, от матерей в возрасте $26 \pm 7,4$ лет с отягощенным акушерским анамнезом, с оценкой по Апгар $3,2 \pm 1,6$ балла.

Тяжесть состояния пациентов была обусловлена дыхательной недостаточностью (гипоксемия $pO_2 < 50$, гиперкапния $pCO_2 > 45$, выраженный ацидоз - pH капиллярной крови $< 7,25$). Все дети были переведены на ИВЛ в родильном зале и транспортированы в отделение реанимации в первые часы жизни ($3 \pm 0,9$).

При поступлении, помимо стандартного обследования, пациентам проводилось определение:

- плазменного уровня интерлейкинов ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-4, ИЛ-1; фактора некроза опухоли (ФНО), эндогенного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), фактора роста фибробластов (ФРФ), sFas методом иммуноферментного анализа (ИФА) на многофункциональном программируемом счетчике для иммунологических исследований с программным обеспечением (Victor, Финляндия), используя тест-системы фирмы Cytimmune sciences inc. (США) и Bender MedSystems GmbH (Австрия, Вена);

- субпопуляционного состава лимфоцитов крови методом однопараметрического иммунофенотипирования, используя реагенты фирмы Immunotech Beckman Coulter (США): флуоресцентно-меченные CD 3, CD 4, CD 8, CD 14, CD 19, CD 34, CD 56, CD 69, CD 71, CD 95, HLA-DR моноклональные антитела;

- процентного количества лимфоцитов, находящихся в раннем и позднем апоптозе, используя антитела к аннексину и прокрашивание пропидием йодида, с учетом результатов на проточном цитометре Beckman Coulter Epics XL (США), используя стандартные протоколы. Пул лейкоцитов крови выделяли лизирующим раствором OptiLyse C Beckman Coulter (США) по прилагаемому протоколу.

Ретроспективно все пациенты были разделены на 2 группы. У 30 детей (I группа) на 3-4 сутки пребывания в отделении в гемограмме наблюдалось снижение абсолютного числа нейтрофилов ($M < 2000 \text{ кл}/\text{мм}^3$). У 34 пациентов (II группа) количество нейтрофилов в периферической крови не снижалось.

Результаты исследования оценивались методом вариационной статистики с использованием выборочного среднего, стандартного отклонения, средней квадратичной ошибки, доверительных интервалов, медианы и ошибки медианы. Достоверность различия отдельных выборок определялась с использованием непараметрического критерия Вилкоксона. Абсолютный и относительный риск развития неонатального сепсиса и летального исхода оценивались методом четырехпольных таблиц. Достоверность полученных результатов оценена критерием Гехана-Вилкоксона. Достоверность предположений подтверждена посредством использования точного теста Фишера-Ирвина при 5% уровне значимости в отношении двухсторонней альтернативы. Статистическая мощность исследования составила 80% ($\alpha \leq 0,05$). В исследовании общие статистические показатели определялись с использованием Excel-2000; для оценки достоверного различия выборок и вида распределения эмпирических данных применялся пакет прикладных программ «Мегастат». Для оценки долей по методу Фишера-Ирвина и расчета мощности исследования использовался пакет Statistica-6.



Результаты и обсуждение.

Из 30 детей с нейтропенией (I группа) неонатальный сепсис был диагностирован на 5-6 сутки пребывания в отделении у 26 пациентов. Летальный исход заболевания в этой группе зарегистрирован у 11 новорожденных; из них 8 погибло от неонатального сепсиса. Представленные показатели статистически значимо превышали аналогичные во II группе ($p < 0,05$), где из 34 пациентов только у 5 человек РДС осложнился развитием сепсиса. Летальный исход во II группе отмечен у 6 новорожденных, из них от септической инфекции умер 1 ребенок.

В нашем исследовании основанием для постановки клинического диагноза «сепсис» служило сочетание не менее двух симптомов системной воспалительной реакции организма (СВРО) с наличием любого гнойно-воспалительного очага, или с положительной гемокультурой, или с наличием клинических симптомов инфекции [15].

У всех пациентов с неонатальным сепсисом в случае летального исхода клинический диагноз был подтвержден патологоанатомическим вскрытием.

У пациентов с нейтропенией (I группа) при поступлении в отделение регистрировался статистически значимо более низкий уровень эндогенного Г-КСФ, ФРФ и sFas по сравнению с новорожденными без нейтропении (II группа). Кроме того, у пациентов первой группы определялось статистически значимое увеличение уровня стволовых клеток (CD34) и лимфоцитов, готовых к апоптозу (CD95) и находящихся в раннем и позднем апоптозе (таблица 1).

Остальные иммунологические показатели у пациентов обеих групп статистически значимо не отличались.

Таблица 1

Иммунологические показатели крови, статистически значимо отличающиеся при поступлении у пациентов с развившейся в последующем нейтропенией и без нее

Показатель	I группа (медиана) (n=30)	II группа (медиана) (n=34)	P
CD34%	0,3	0,1	0,017794
Г-КСФ пкг/мл	995	1600	0,000000
sFAS пкг/мл	5927,1	7319,7	0,004788
ФРФ пкг/мл	20,0	34,9	0,029117
CD95%	9,2	1,9	0,000482
Апоптоз ранний %	13,5	12,3	0,036122
Апоптоз поздний %	1,99	0,3	0,006958

Для каждого из представленных критериев была построена характеристическая ROC-кривая с определением числового значения («точки cutoff»), позволяющего диагностировать развитие нейтропении с высокой чувствительностью, специфичностью и точностью. В таблице представлены данные расчета диагностической значимости изучаемых тестов (таблица 2).

Таблица 2

Диагностическая значимость иммунологических критериев, прогнозирующих развитие нейтропении у новорожденных с РДС на ИВЛ

Показатель/ Cutoff	Чувствительность %	Специфичность %	Точность %	ПЦП	ПЦО	ПЦТ %
Г-КСФ/1556 пкг/мл	85,1	75,6	79,6	71,8	87,5	84
sFAS/5870 пкг/мл	69,5	74,4	71,9	74,4	60,4	80
ФРФ/25,7 пкг/мл	68	82	74,4	82	61	85
CD95/5,1%	75	68	86,2	79	65	78,5
Апоптоз поздний/0,56%	94,1	98	85,3	89,1	94,1	86,5
Апоптоз ранний/9,59%	82	93	74	87	72	74

Полученные результаты подтвердили, что у пациентов с нейтропенией неонатальный сепсис осложнял течение основного заболевания в 5 раз чаще, чем у детей без нейтропении. Кроме того, летальный исход заболевания в этой группе отмечался в 8 раз чаще.

Статистически значимое повышение процентного содержания плюрипотентной гемопоэтической стволовой клетки (CD34) в периферической крови подтверждало достаточность костномозговых резервов у пациентов I группы. Однако стволовые клетки не реализовывались в зрелые нейтрофилы. Возможно, по причине недостаточно высокого уровня эндогенного Г-КСФ, являющегося физиологическим колониеобразующим регулятором нейтрофилов [9, 10]. Не случайно в нашем исследовании уро-

вень эндогенного Г-КСФ у пациентов I группы был почти в 2 раза ниже, чем у новорожденных II группы.

Полученные результаты подтвердили, что у детей с развившейся в последующем нейтропенией уже при поступлении в отделение (то есть на самых ранних этапах заболевания) превалировали процессы альтерации иммунокомпетентных клеток над процессами пролиферации. Так плазменный уровень антиапоптозного и пролиферативного факторов (sFAS и ФРФ), участвующих в регуляции процесса естественной гибели клеток [12 - 15], был статистически значимо ниже у пациентов этой группы по сравнению с новорожденными II группы. На этом фоне вполне закономерным было определение у пациентов I группы высокого процента лимфоцитов, находящихся в



раннем и позднем апоптозе. Что, в свою очередь, согласно законам «обратной связи», вызывало компенсаторное повышение относительного содержания CD34 в периферической крови, обнаруженное нами у пациентов I группы.

Выводы:

1. Развитие нейтропении у новорожденных с респираторной патологией обусловлено дефицитом эндогенного Г-КСФ и активацией процессов апоптоза иммунокомпетентных клеток.
2. Новорожденные с РДС на ИВЛ на ранних этапах развития нейтропении обладают достаточным костномозговым резервом.
3. Снижение эндогенного Г-КСФ и усиление апоптоза лимфоцитов крови с высокой точностью, чувствительностью и специфичностью прогнозирует развитие

нейтропении уже при поступлении пациента в отделение реанимации.

4. Необходимость использования чр-ГКСФ в интенсивной терапии подтверждена происходящими иммунопатогенетическими процессами в организме новорожденного с РДС, находящегося на ИВЛ.
5. Назначать чр-ГКСФ новорожденным с РДС на ИВЛ следует при снижении плазменного уровня эндогенного Г-КСФ ниже 1556 пкг/мл и увеличении в периферической крови относительного содержания лимфоцитов, находящихся в раннем и позднем апоптозе, свыше 9,5% и 0,56% (соответственно).
6. Необходимо проведение рандомизированных исследований по эффективности и безопасности использования чр-ГКСФ у новорожденных с РДС на ИВЛ до развития нейтропении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов А.Г., Володин Н.Н., Гребенников В.А. и др. Принципы ведения новорожденных с респираторным дистресс-синдромом: Метод. рекомендации. - М.: Б. и., 2002. - С. 14 -18.
2. Белушкина Н.Н., Хасан Хамад Али, Северин С.Е. Молекулярные основы апоптоза //Вопросы биол. мед. и фарм. Химии. - 1998. - №4. - С.15-23.
3. Бочоришвили В. Г. Новая иммунологическая концепция сепсиса и ее клиническое значение //Междунар. журн. иммуно-реабилитации. - 1997.- № 6.- С. 42-31.
4. Галактионов В. Г. Иммунология. - М.: Изд-во МГУ, 1998.- 479 с.
5. Дементьева Г. М. Пульмонологические проблемы в неонатологии //Пульмонология. - 2002.- № 12.- С.6 -12.
6. Gillan E.R., Christensen R.D., Yu Suen et al. A randomized, placebo-controlled trial of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor administration in newborn infants with presumed sepsis: significant induction of peripheral and bone marrow neutrophilia //Blood. - 1994. -Vol. 84. - P. 1427-1433.
7. Bronchud M. H., Potter M.R., Morgenstern G. et al. In vitro and in vivo analysis of the effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients //Br. J. Cancer. - 1988. - Vol. 58.- P. 64-69.
8. Cairo M.S., Christensen R., Sender L.S. et al. Results of a phase I/ II trial of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in very low birthweight neonates: significant induction of circulatory neutrophils, monocytes, platelets, and bone marrow neutrophils //Blood. - 1995. - Vol. 86.- P. 2509-2515.
9. Chang Z.S., Zeng L.B., Chang C.S., Qing W.W. Aggregate formation of hepatitis B virus X protein affects cell cycle and apoptosis //World J. Gastroenterol. - 2003. - V. 9. - P. 1521-1524.
10. Gessler P., Luders R., Konig S. et al. Neonatal neutropenia in low birthweight premature infants //Am. J. Perinatol. - 1995.- Vol.12. - P. 34-38.
11. Gillan E.R., Christensen R.D., Yu Suen et al. A randomized, placebo-controlled trial of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor administration in newborn infants with presumed sepsis: significant induction of peripheral and bone marrow neutrophilia //Blood. - 1994. -Vol. 84. - P. 1427-1433.
12. Manroea B.L., Weinberg A.G., Rosenfeld C.R., Browne R. The neonatal blood count in health and disease. I. Reference values for neutrophilic cells //J. Pediatr. - 1979. - Vol. 95.- P. 89-98.
13. Schibler K., Osbome K., Leung L. et al. A randomized, placebo-controlled trial of granulocyte colony-stimulating factor administration to newborn infants with neutropenia and clinical signs of early-onset sepsis // Pediatrics. - 1998. - Vol. 102. - P. 6-13.
14. Эстрин В.В., Ефанова Е.А., Пухтинская М.Г. Профилактика и терапия бактериальных осложнений рекомбинантным гранулоцитарным колониестимулирующим фактором у новорожденных в критических состояниях. - Ростов-на-Дону: Изд. Феникс, 2007. - С. 64-91.
15. Исаков Ю. Ф., Белобородова Н. В. Сепсис у детей.- М.: Изд. Мокеев, 2001. - С. 44-45.

ПОСТУПИЛА: 19.10.2010