

УДК 616-053.31+616.2-022.7+576.3/4

© М. Г. Пухтинская, 2013.

## КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЦИТОКИНОВ И АПОПТОЗА Т-ЛИМФОЦИТОВ В РАЗВИТИИ НЕЙТРОПЕНИИ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У НОВОРОЖДЕННЫХ С РЕСПИРАТОРНЫМ ДИСТРЕСС-СИНДРОМОМ

**М. Г. Пухтинская**

*Отдел анестезиологии и реаниматологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ростовский научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии» Минздрава России (директор – профессор В. А. Линде); 344012, Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. Мечникова, 43; E-mail: secretary@miiar.ru*

### CLINICAL END DIAGNOSTIC VALUE OF CYTOKINE ACTIVITY AND APOPTOSIS OF T-LYMPHOCYTES IN THE DEVELOPMENT OF NEUTROPENIA AND BACTERIAL COMPLICATIONS IN NEWBORNS WITH THE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME

**M. G. Pukhtinskaya****SUMMARY**

In order to optimize the prevention of neonatal sepsis by studying the immunopathogenesis of neutropenia and establishing the predictors of development in 64 infants with RDS on mechanical ventilation, retrospectively divided into two groups, with neutropenia development for up to 4 days of hospitalization (I, n=30) and without neutropenia development (II, n=30) we measured the cytokine activity by ELISA and the apoptosis of T lymphocytes by immunophenotyping. A reduction of G-CSF, FGF and sFas-L to levels less than 1556, 25,7 and 5870 pg/ml correspondingly and an increase in the relative number of lymphocytes in the early and late apoptosis by over 9,5% and 0,6% correspondingly predicts with high accuracy, sensitivity and specificity the development of neutropenia and bacterial complications in infants with RDS on mechanical ventilation.

### КЛІНІКО-ДІАГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ЦИТОКІНІВ І АПОПТОЗУ Т-ЛІМФОЦИТІВ У РОЗВИТКУ НЕЙТРОПЕНІЇ ТА БАКТЕРІАЛЬНИХ УСКЛАДНЕНЬ У НОВОНАРОДЖЕНИХ З РЕСПИРАТОРНИМ ДИСТРЕСС-СИНДРОМОМ

**М. Г. Пухтинська****РЕЗЮМЕ**

З метою оптимізації профілактики неонатального сепсису шляхом вивчення імунопатогенезу нейтропенії та визначення предикторів її розвитку у 64 новонароджених з респіраторним дистрес-синдромом (РДС) на штучній вентиляції легень (ШВЛ), ретроспективно розділених на дві групи: з розвитком нейтропенії до 4 діб госпіталізації (I, n=30) і без (II, n=30), визначали методом імуноферментного аналізу активність цитокінів та методом імунофенотипування апоптоз Т-лімфоцитів. Зниження рівня Г-КСФ, ФРФ і sFas-L менш 1556, 25,7 і 5870 пкг/мл (відповідно) і збільшення відносного вмісту лімфоцитів в ранньому і пізньому апоптозі більше 9,5% і 0,6% (відповідно) з високою точністю, чутливістю і специфічністю прогнозує розвиток нейтропенії та бактеріальних ускладнень у новонароджених з РДС на ШВЛ.

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

Развитие нейтропении у новорожденных с респираторным дистресс-синдромом (РДС), находящих на искусственной вентиляции легких (ИВЛ), к 3-5 суткам госпитализации в отделении реанимации является симптомом реализации бактериальных осложнений [1, 2]. Внедрение в клиническую практику иммунологических предикторов неблагоприятного течения заболевания весьма актуально для клиницистов [3, 4]. Выявление новорожденных, нуждающихся в усиленной интенсивной терапии на раннем этапе не только снизит частоту развития бактериальных осложнений и летальность, но и значительно сократит финансовые затраты на терапию.

Современная лабораторная диагностика, позволяющая разобраться в наиболее тонких механизмах иммунопатогенеза нейтрофильной недостаточности, способна решить эту задачу [5-7].

Таким образом, целью исследования стала оптимизация профилактики неонатального сепсиса путем изучения иммунопатогенеза нейтропении и определения предикторов ее развития.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ**

После получения разрешения этического комитета и письменных информационных согласий родителей пациентов в исследование были включены 64 новорожденных с РДС, поступивших в реанима-

ционное отделение в тяжелом состоянии на ИВЛ, родившихся в сроке гестации 39,0±2,1 недель с массой тела 3700±565 грамм, от матерей в возрасте 26,0±7,4 лет с отягощенным акушерским анамнезом, с оценкой по Апгар 3,2±1,6 баллов, без клинических признаков инфицирования. Тяжесть состояния новорожденных 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 родильных залах роддомов и транспортированы в отделение реанимации после рождения.

При поступлении, помимо стандартного обследования, пациентам определяли:

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

– субпопуляционный состав лимфоцитов крови методом однопараметрического иммунофенотипирования, используя реагенты фирмы Immunotech Beckman Coulter (США): фитц-меченные CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD34, CD56, CD69, CD71, CD95, HLA-DR моноклональные антитела;

– относительное содержание Т-лимфоцитов в раннем (AnnexinV-FITC+PI-) и позднем (AnnexinV-FITC+PI+) апоптозе, используя AnnexinV+, меченый FITC и пропидиум йодида (PL+), меченный PE (Caltag, США), с учетом результатов на цитометре Beckman Coulter Epics XL (США) по стандартным протоколам. Выделение пула лейкоцитов крови проводили с использованием лизирующего раствора 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 госпитализации в гемограмме наблюдали снижение абсолютного числа нейтрофилов ( $M < 2000$  кл/мм<sup>3</sup>).

У 34 пациентов (II группа) развития нейтропении не произошло.

Результаты исследования оценивали методами вариационной статистики с использованием выборочного среднего, стандартного отклонения, средней квадратичной ошибки, доверительных интервалов, медианы и ошибки медианы. Достоверность различия отдельных выборок определяли непараметрическим критерием Вилкоксона. Абсолютный и относительный риск развития неонатального сепсиса и летального исхода заболевания оценивали методом четырехпольных таблиц. Достоверность результатов подтверждена критерием Гехана-Вилкоксона. Достоверность предположений подтверждена тестом Фишера-Ирвина при 5% уровне значимости в отношении двухсторонней альтернативы. Статистическая мощность исследования составила 80,0% ( $\alpha \leq 0,05$ ). В исследовании использовались Excel-2000, «Мега-стат», Statistica-6.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из 30 детей с нейтропенией (I группа) неонатальный сепсис диагностировали на 5-6 сутки госпитализации у 26 пациентов ( $p < 0,05$ ). Летальный исход заболевания зарегистрирован у 11 новорожденных; из них 8 – от неонатального сепсиса ( $p < 0,05$ ). Во II группе из 34 пациентов у 5 детей РДС осложнился развитием сепсиса. Летальный исход во II группе зарегистрирован у 6 новорожденных; от сепсиса погиб 1 ребенок.

В исследовании клинический диагноз «сепсис» подтверждали при сочетании не менее двух симптомов системной воспалительной реакции организма (СВРО) с наличием любого гнойно-воспалительного очага, или с положительной гемокультуры, или с наличием клинических симптомов инфекции [8]. У всех пациентов с неонатальным сепсисом и летальным исходом клинический диагноз подтвержден патологоанатомически.

При поступлении в отделение у пациентов I группы отмечался статистически значимо более низкий уровень эндогенного Г-КСФ, ФРФ, sFas-L; повышенное содержание стволовых клеток (CD34+) и лимфоцитов в раннем и позднем апоптозе относительно детей II группы ( $p < 0,05$ ) (табл. 1).

Таблица 1

**Некоторые иммунологические показатели пациентов обеих групп при поступлении в отделение реанимации**

Показатель	I группа (медиана) (n=30)	II группа (медиана) (n=34)	p
CD34 (%)	0,3	0,1	0,017794
Г-КСФ (пк/мл)	995	1600	0,000000
sFAS-L (пк/мл)	5937,1	7319,7	0,004788

Продолжение таблицы 1

Показатель	I группа (медиана) (n=30)	II группа (медиана) (n=34)	p
ФРФ (пк/мл)	20,0	34,9	0,029117
(AnnexinV-FITC+PI-) (%)	13,5	9,3	0,036122
(AnnexinV-FITC+PI+) (%)	1,99	0,3	0,006958

Для каждого из представленных показателей методом построения характеристических ROC-кривых определили значение («точка cutoff»), по-

зволяющее диагностировать развитие нейтропении с наибольшей чувствительностью, специфичностью и точностью (табл. 2).

Таблица 2

**Диагностическая значимость иммунологических предикторов нейтропении у новорожденных с РДС на ИВЛ**

Значение «Cutoff»	Чувствительность %	Специфичность %	Точность %	Предсказательная ценность положительного результата %	Предсказательная ценность отрицательного результата %	Предсказательная ценность теста %
Г-КСФ 1556 пкг/мл	85,1	75,6	79,6	71,8	87,5	84,0
sFAS-L 5870 пкг/мл	69,5	74,4	71,9	74,4	60,4	80,0
ФРФ 25,7 пкг/мл	68,0	82,0	74,4	82,0	61,0	85,0
AnnexinV-FITC+PI- 0,56%	94,1	98,0	85,3	89,1	94,1	86,5
AnnexinV-FITC+PI+ 9,59%	82,0	93,0	74,0	87,0	72,0	74,0

Таким образом, у пациентов с нейтропенией неонатальный сепсис осложнял течение основного заболевания в 5 раз чаще, чем у детей без нейтропении. Следовательно, иммунопатогенетические механизмы развития нейтропении детерминировали последующее развитие бактериальных осложнений у новорожденных с РДС на ИВЛ.

Статистически значимое повышение в периферической крови относительного содержания плюрипотентной гемопоэтической стволовой клетки (CD34+) у пациентов с последующим развитием нейтропении, с нашей точки зрения, свидетельствовало о наличии достаточного костномозгового резерва. Стволовые клетки по механизму обратной связи поступали из костного мозга в кровь при активации апоптоза Т-лимфоцитов, однако не реализовались в зрелые нейтрофилы, возможно,

по причине дефицита эндогенного Г-КСФ, являющегося физиологическим колониеобразующим регулятором нейтрофилов, обеспечивающим их пролиферацию, дифференцировку и активацию [9, 10]. Не случайно в нашем исследовании уровень эндогенного Г-КСФ у пациентов I группы был почти в 2 раза ниже, чем у новорожденных II группы.

Полученные результаты подтверждали, что у детей с нейтропенией преобладали процессы альтерации иммунокомпетентных клеток над процессами пролиферации [11-14]. Так, у пациентов I группы уровень пролиферативного ФРФ и антиапоптогенного sFas-L, участвующих в регуляции процесса естественной гибели клеток, был статистически значимо ниже при высоком содержании лимфоцитов в апоптозе ( $p < 0,05$ ).

## ВЫВОДЫ

Снижение уровня пролиферативных факторов и активация апоптоза Т-лимфоцитов являются патогенетическими механизмами развития нейтропении у доношенных новорожденных с дыхательными расстройствами. Снижение плазменного уровня Г-КСФ, ФРФ, sFas-L менее 1556, 25,7 и 5870 пкг/мл (соответственно) и увеличение относительно содержания лимфоцитов в раннем и позднем апоптозе более 9,5% и 0,6% (соответственно) ассоциируется с развитием нейтропении и высокой заболеваемостью сепсисом. Дальнейший прогресс в терапии РДС новорожденных связан с внедрением в интенсивную терапию лекарственных препаратов, способных повышать уровень зрелых активных, нейтрофилов и нормализовать апоптоз лимфоцитов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аббасова С. Г. Система Fas-FasL в норме и при патологии / С. Г. Аббасова, В. М. Липкин, Н. Н. Трапезников [и др.] // Вопросы биологии, медицины и фармакологической химии. – 1999. – № 3. – С. 3–6.
2. Принципы ведения новорожденных с респираторным дистресс-синдромом : метод. рекомендации / А. Г. Антонов, Н. Н. Володин, В. А. Гребенников [и др.]. – М. : Б. и., 2002. – С. 14–18.
3. Белушкина Н. Н. Молекулярные основы апоптоза / Н. Н. Белушкина, Хасан Хамад Али, С. Е. Северин // Вопросы биологии, медицины и фармакологической химии. – 1998. – № 4. – С. 15–23.
4. Бочоришвили В. Г. Новая иммунологическая концепция сепсиса и ее клиническое значение / В. Г. Бочоришвили // Международный журнал иммунореабилитации. – 1997. – № 6. – С. 42–31.
5. Галактионов В. Г. Иммунология / В. Г. Галактионов. – М. : Изд-во МГУ, 1998. – 479 с.
6. Дементьева Г. М. Пульмонологические проблемы в неонатологии / Г. М. Дементьева // Пульмонология. – 2002. – № 12. – С. 6–12.
7. Исаков Ю. Ф. Сепсис у детей / Ю. Ф. Исаков, Н. В. Белобородова. – М. : Изд. Мокеев, 2001. – 369 с.
8. Ярилин А. А. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии / А. А. Ярилин // Актуальные проблемы патофизиологии. – М. : Медицина, 2001. – С. 13–56.
9. In vitro and in vivo analysis of the effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients / Bronchud M. H., Potter M.R., Morgenstern G. [et al.] // Br. J. Cancer. – 1988. – Vol. 58. – P. 64–69.
10. 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 / M. S. Cairo, R. Christensen, L. S. Sender [et al.] // Blood. – 1995. – Vol. 86. – P. 2509–2515.
11. Aggregate formation of hepatitis B virus X protein affects cell cycle and apoptosis / Z. S. Chang, L. B. Zeng, C. S. Chang [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2003. – Vol. 9. – P. 1521–1524.
12. Neonatal neutropenia in low birthweight premature infants / P. Gessler, R. Luders, S. Konig [et al.] // Am. J. Perinatol. – 1995. – Vol. 12. – P. 34–38.
13. Hayward A. Proliferative and cytokine responses by human newborn T-cells stimulated with staphylococcal enterotoxin B / A. Hayward, M. Cosyns // Pediatr. Res. – 1994. – Vol. 35, № 3. – P. 293–298.
14. The neonatal blood count in health and disease. I. Reference values for neutrophilic cells / B. L. Manroea, A. G. Weinberg, C. R. Rosenfeld [et al.] // J. Pediatr. – 1979. – Vol. 95. – P. 89–98.