

**СОЛДАТОВА
ИРИНА ГЕННАДЬЕВНА**

**Роль провоспалительных цитокинов,
рецепторного антагониста интерлейкина –1
в диагностике и лечении бактериальных инфекций
у новорождённых детей.**

14.00.09. - Педиатрия.

14.00.36. - Аллергология и иммунология.

**Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук.**

Работа выполнена на кафедре неонатологии факультета усовершенствования врачей Российского Государственного Медицинского Университета МЗ РФ.

Научные руководители:

Доктор медицинских наук

М.В.Дегтярёва

Доктор медицинских наук, профессор

А.С.Симбирцев

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор

Г.М.Дементьева

Доктор медицинских наук

И.В.Кондратенко

Ведущая организация:

Научный Центр Акушерства, Гинекологии и Перинатологии РАМН.

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2003г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д.208.050.01 в НИИ детской гематологии МЗ РФ (117513, г. Москва, Ленинский проспект, д.117, корп.2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИ детской гематологии МЗ РФ (117513, г. Москва, Ленинский проспект, д.117, корп.2).

Автореферат разослан « ____ » _____ 2003 г.

*Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук, доцент*

В.М. Чернов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность работы. Последнее десятилетие характеризуется интенсивным развитием перинатальной медицины. Внедрение в практику новых высокоэффективных технологий в диагностике и выхаживании новорождённых детей позволило снизить показатели младенческой смертности с 20,7 на 1000 новорожденных в 1990 г. до 14,7‰ в 2001 г. (Володин Н.Н., 2001). Вместе с тем, в структуре неонатальной смертности по-прежнему высоким остаётся процент летальных исходов вследствие бактериальных инфекций. При раннем неонатальном сепсисе летальность достигает 20-50%, при позднем – 15-20% (Seidel Н.М., 2002). Лечение тяжёлых бактериальных инфекций требует проведения комплексной терапии с использованием широкого спектра антибиотиков, длительной госпитализации и больших экономических затрат (Шабалов Н.Н., 2001; Avery G.B., 1987; Stoll B.J., Fanaroff A.A. et al, 2002). Ранняя диагностика сепсиса представляет собой исключительно сложную проблему для неонатологов и иммунологов (Самсыгина Г.А., 1988; Резников Ю.П., 1999; Володин Н.Н., 2000; Harris M.C., 1994; Benitz W.E., 1998).

В настоящее время не подлежит сомнению, что иммунная система играет ведущую роль в патогенезе, клиническом течении и исходе инфекционных заболеваний у новорождённых детей (Самсыгина Г.А., 1993; Дегтярева М.В., 2000; Mrozek J.D., 2000). Очевидно, что наряду с необходимостью проведения инфекционного контроля в отделениях реанимации и интенсивной терапии, рационального использования новейших антибактериальных препаратов, является целесообразным изучение закономерностей функционирования иммунной системы в периоде новорождённости у детей с локализованными и генерализованными формами неонатальных инфекций. Изучение особенностей баланса про- и противовоспалительных цитокинов у детей различного гестационного возраста с перинатальной гипоксией и наличием бактериальных инфекций является крайне актуальной задачей для диагностики, прогноза течения и лечения осложнений неонатального периода. В отечественной и зарубежной литературе существует значительное количество работ, посвященных изучению роли медиаторов иммунной системы в патогенезе

сепсиса, однако нет достаточной ясности в вопросах дифференциальной диагностики локализованных и генерализованных форм инфекционных заболеваний бактериальной этиологии у новорождённых детей.

До настоящего времени не определены прогностические критерии развития воспалительного процесса и его исходов у новорождённых детей с генерализованными и локализованными бактериальными инфекциями, что могло бы способствовать своевременной коррекции терапии на самых ранних этапах болезни (Franz A.R., 1999; Phillip A.G., 2000). Несмотря на бурное развитие биотехнологий и появление новых препаратов рекомбинантных цитокинов, не отработаны принципы и схемы иммунокорректирующей терапии у детей с тяжёлыми неонатальными инфекциями (Boyd M.T., 1991; Buck C., 1994; Schibler K.R., 1998; Lauterbach R., 1999; Calhoun D.A., 2000). Всё вышеизложенное явилось основанием для проведения нашего исследования.

Цель исследования: разработать эффективные способы диагностики и патогенетической иммунокорректирующей терапии инфекционных заболеваний бактериальной этиологии у новорожденных детей.

Задачи исследования:

1. Изучить динамику уровней ИЛ-8, ФНО- α , ИЛ-1 α и - β , рецепторного антагониста ИЛ-1 в сыворотке крови у новорожденных детей различного гестационного возраста, перенесших перинатальную гипоксию.
2. Изучить динамику уровней ИЛ-8, ФНО- α , ИЛ-1 α и - β , рецепторного антагониста ИЛ-1 в сыворотке крови у новорожденных детей при локализованных и генерализованных формах бактериальной инфекции.
3. Рассчитать диагностическую информативность (чувствительность, специфичность, эффективность, прогностическую значимость положительного и отрицательного результатов) уровней цитокинов в сыворотке крови для ранней и дифференциальной диагностики локализованных и генерализованных форм бактериальной инфекции у новорождённых детей различного гестационного возраста.

4. Провести сравнение диагностической информативности общепринятых клинико-лабораторных параметров и показателей цитокинового статуса у новорождённых детей с бактериальными инфекциями.
5. Определить прогностическое значение уровней изучаемых цитокинов в сыворотке крови при неонатальном сепсисе.
6. Разработать показания и схему применения препарата рекомбинантного человеческого интерлейкина-2 (Ронколейкина) и оценить его клиническую эффективность при неонатальном сепсисе.

Научная новизна. Впервые установлено, что в периоде новорождённости уровень провоспалительных цитокинов в сыворотке крови зависит от гестационного возраста детей, степени тяжести перенесённой перинатальной гипоксии, наличия локализованного или генерализованного инфекционного заболевания бактериальной этиологии.

Впервые выявлено, что тяжёлая перинатальная гипоксия вызывает активацию клеток моноцитарно-макрофагального звена и повышение уровней ИЛ-1 β в сыворотке крови новорождённых детей в раннем периоде адаптации по сравнению с таковыми у детей, перенесших лёгкую перинатальную гипоксию.

Впервые доказано, что при врождённой пневмонии и раннем неонатальном сепсисе диагностически значимыми являются высокие уровни ИЛ-8 (≥ 70 пг/мл), ФНО- α (≥ 70 пг/мл) и низкие концентрации ИЛ-1 β (≤ 20 пг/мл) в сыворотке крови по сравнению с таковыми у детей, перенесших перинатальную гипоксию и не имевших инфекционных осложнений неонатального периода.

Впервые установлено, что неонатальный сепсис сопровождается абсолютной лимфопенией и низкими концентрациями ИЛ-1 β в сыворотке периферической крови по сравнению с таковыми при локализованной бактериальной инфекции. Низкие концентрации ИЛ-1 β в сочетании с высокими концентрациями ИЛ-1РА в сыворотке крови больных новорождённых детей являются прогностически неблагоприятными критериями.

Впервые дано научное обоснование для назначения патогенетической иммунокорректирующей терапии препаратом рекомбинантного человеческого интерлейкина-2 – Ронколейкином – при неонатальном сепсисе.

Практическая значимость. На основании собственных исследований выявлены наиболее информативные показатели (ИЛ-1 β , ИЛ-1РА, ИЛ-8), установлены их диагностически значимые уровни при перинатальной гипоксии, локализованных и генерализованных формах бактериальной инфекции. Полученные данные позволяют объективно решать вопрос дифференциальной диагностики и прогноза течения бактериальных инфекций у новорождённых детей.

Впервые разработаны показания, схема применения и дана оценка клинической эффективности препарата рекомбинантного человеческого интерлейкина-2 (Ронколейкина) в комплексной терапии неонатального сепсиса.

Разработка диагностических и прогностических критериев неонатального сепсиса, внедрение и своевременное проведение иммунокорректирующей терапии Ронколейкином позволили в короткие сроки купировать лабораторные и клинические признаки системного воспаления, сократить длительность антибактериальной терапии, продолжительность пребывания детей в стационаре и снизить показатель смертности в 3,7 раза (с 30,4% до 8,3%).

Внедрение результатов в практическое здравоохранение. Способы диагностики, прогнозирования и иммунотерапии, явившиеся результатом данного исследования, внедрены в практику отделений патологии и реанимации новорождённых ДКБ №13 им.Н.Ф.Филатова г.Москвы.

Результаты данной научной работы используются в учебном процессе, проводимом для врачей-педиатров, неонатологов, клинических иммунологов из различных регионов России на кафедре неонатологии ФУВ РГМУ, на кафедре неонатологии Российской Медицинской Академии Последипломного Образования, кафедре клинической иммунологии медико-биологического факультета РГМУ.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на I-ом Конгрессе детских инфекционистов России (г.Москва,

2002); VIII и IX Российских Национальных Конгрессах "Человек и лекарство" (г.Москва, 2001, 2002); на 4-ом Российском научном форуме «Охрана здоровья матери и ребёнка - 2002» (г.Москва, 2002), на Всероссийской Школе «Лабораторная диагностика в перинатологии и педиатрии» (г.Москва, 2002), на Международной конференции «Цитокины. Воспаление. Иммунитет» (г.Санкт-Петербург, 2002), на 4-ом Съезде Российской Ассоциации Специалистов Перинатальной Медицины (г.Москва, 2002), на Всемирном Конгрессе по иммунопатологии (Сингапур, 2002).

Работа апробирована 19 декабря 2002 года на объединенной научно-практической конференции сотрудников кафедры неонатологии ФУВ РГМУ, кафедры детских болезней №2 педиатрического факультета РГМУ, кафедры клинической иммунологии медико-биологического факультета РГМУ, врачей ДКБ №13 им.Н.Ф.Филатова и сотрудников ГНЦ-НИИ особо чистых биопрепаратов г.Санкт-Петербурга.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 3 статьи в центральной печати, 1 методические рекомендации.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на _____ страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объёма клинических наблюдений и методов исследования, 4-х глав, посвященных результатам собственных наблюдений, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций и библиографического указателя литературы, включающего _____ источников отечественных и _____ зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована _____ таблицами и _____ диаграммами.

Работа выполнена на кафедре неонатологии ФУВ РГМУ (заведующий кафедрой – член-корреспондент РАМН, д.м.н., профессор Н.Н.Володин). Наблюдение за новорожденными детьми проводилось на базе неонатального центра и отделения патологии новорожденных детей ДГКБ №13 им. Н.Ф.Филатова г.Москвы (главный врач – к.м.н. В.В.Попов).

Исследование проведено в период с октября 1998 г. по октябрь 2002 г.

ОБЪЁМ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

В работе представлен анализ результатов динамического наблюдения, лабораторно-инструментального обследования и лечения 191 новорождённого ребёнка различного гестационного возраста с осложненным течением перинатального периода. Распределение на клинические группы осуществлялось следующим образом.

I группа – 66 новорождённых детей с перинатальным поражением центральной нервной системы гипоксического генеза различной степени тяжести, у которых в неонатальном периоде не отмечалось развития бактериальных инфекций. Гестационный возраст 43 детей составил 38-40 недель, 15 детей - 33-37 недель, 8 детей - 28-32 недель

С целью выявления взаимосвязи между тяжестью перенесённой гипоксии и состоянием иммунной системы все дети I группы были разделены на 2 подгруппы: **IA подгруппа** - 24 ребёнка, перенесших лёгкую перинатальную гипоксию, и **IB подгруппа** – 42 ребёнка, перенесших среднетяжёлую и тяжёлую перинатальную гипоксию.

В группу детей, перенесших лёгкую перинатальную гипоксию (IA подгруппа), мы отнесли детей с оценкой по шкале Апгар на 1-ой минуте жизни 6-7 баллов; в раннем периоде адаптации у них отмечалась умеренная дыхательная недостаточность, которая не требовала проведения ИВЛ и купировалась к концу первой недели жизни.

В группу детей со среднетяжёлой и тяжёлой перинатальной гипоксией (IB подгруппа) мы включали новорождённых детей, которые имели оценку по шкале Апгар на 1-ой минуте жизни 5 и менее баллов. Всем детям с первых суток жизни проводилась искусственная вентиляция лёгких.

Все дети данной группы получали комплексное базисное лечение, включавшее дыхательную, антибактериальную, инфузионную, посиндромную терапию. В то же время несмотря на тяжесть состояния при рождении, необходимость проведения ИВЛ и выполнения других инвазивных манипуляций ни у одного из них в неонатальном периоде не было зафиксировано развития бактериальных инфекционных заболеваний.

II группа – 78 новорождённых детей, перенесших в неонатальном периоде бактериальную пневмонию, что было подтверждено рентгенологически. Среди них было 24 доношенных, 34 – недоношенных со сроком 33-37 недель гестации и 20 глубоконедоношенных детей со сроком гестации 28-32 недели. У 8 детей клинико-лабораторные данные свидетельствовали о развитии внутриутробной пневмонии, у 70 детей развилась постнатальная пневмония. Все дети данной группы получали комплексную респираторную, антибактериальную, инфузионную, психиатрическую терапию.

III группу составили 47 новорождённых детей, у которых на основании результатов клинико-лабораторного и инструментального обследования было верифицировано наличие неонатального сепсиса. В группу вошли 16 доношенных детей, 31 недоношенный ребёнок, из которых 18 детей имели гестационный возраст 28-32 недели, 13 детей – 33-37 недель. 10 детей этой группы умерли в возрасте от 8 до 28 суток жизни от основного заболевания.

Учитывая сложность и неоднозначность подхода к постановке диагноза сепсис, исходя из обобщённых данных отечественной и зарубежной литературы, нами были приняты следующие критерии сепсиса:

- *бактериemia и один или более очагов бактериальной инфекции с симптомами системной воспалительной реакции и признаками полиорганной недостаточности;*

- *два и более очага бактериальной инфекции с симптомами системной воспалительной реакции и признаками полиорганной недостаточности.*

Все дети данной группы получали комплексную этиотропную и патогенетическую терапию. 12 новорождённых детей с неонатальным сепсисом наряду с базисной комплексной терапией по клинико-иммунологическим показаниям получали **патогенетическую терапию рекомбинантным человеческим интерлейкином-2 («Ронколейкином»)**.

По средним показателям гестационного возраста, массе тела при рождении и оценке по Апгар группы были сопоставимы между собой (Табл. 1).

Таблица 1. Основные характеристики исследуемых групп детей.

Название группы	Количество наблюдений	Гестационный возраст (нед.)	Масса при рождении (г.)	Оценка по Апгар на 1 минуте	Оценка по Апгар на 5 минуте
I группа	66	37,5±0,4	2926,6±113,2	6,07±0,23	7,4±0,15
II группа	78	34,9±0,4	2439,8±108,7	5,8±0,2	7,2±0,17
III группа	47	34,7±0,6	2280±126,9	4,83±0,28	6,43±0,22

Нами был проведен тщательный сбор акушерско-гинекологического и соматического анамнеза матерей наблюдаемых детей. Осуществлялось динамическое общеклиническое наблюдение за новорождёнными детьми, базисное лабораторно-инструментальное обследование, в том числе клинический анализ крови, рентгенография грудной клетки, посев крови на стерильность, по показаниям - люмбальная пункция с микроскопическим и микробиологическим исследованием ликвора.

С целью реализации поставленных задач осуществлялась **комплексная программа иммунологического обследования**, в ходе которой было проведено динамическое исследование концентраций цитокинов в периферической крови всех наблюдаемых детей на 2-4, 12-16 и 28-30 сутки жизни.

Исследование концентраций цитокинов в сыворотке крови проведено методом твёрдофазного иммуноферментного анализа в системе бидетерминантного определения антигена с применением пероксидазы хрена в качестве индикаторного фермента (Котов А.Ю., 1999). Работа выполнена совместно с сотрудниками лаборатории иммунофармакологии Государственного НИИ особо чистых биопрепаратов (г.С.-Петербург) (Руководитель лаборатории - д.м.н., профессор А.С.Симбирцев). Для определения концентраций ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , рецепторного антагониста ИЛ-1 (ИЛ-1РА), ФНО- α , ИЛ-8 использовали тест-системы производства ООО "Цитокин" (г. С-Петербург) с порогом чувствительности для ИЛ-1 α 78 пг/мл, ИЛ-1 β - 5 пг/мл, ИЛ-1РА - 300 пг/мл, ФНО- α - 20 пг/мл, ИЛ-8 - 10 пг/мл. Оптическую плотность определяли на спектрофотометре "Multiscan" (длина волны 450 нм), по результатам которой строили калибровочную кривую.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась при помощи компьютерной программы Microsoft Excel 7,0 (Windows 2000) методом вариационной статистики и корреляционно-регрессионного анализа. Уровень достоверности различий цифровых параметров определялся по критерию Стьюдента (t) (Лакин Ф.Г., 1990; Маймулов В.Г. и соавт., 1996).

Для оценки информативности лабораторных тестов с позиций доказательной медицины были рассчитаны диагностическая чувствительность (ДЧ), диагностическая специфичность (ДС), диагностическая эффективность (ДЭ), прогностическая значимость положительного (ПЗ+) и отрицательного (ПЗ-) результатов (Меньшиков В.В., 1982; Флетчер Р., 1998; Липагина А.А., 2000).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Изучение *соматического анамнеза* матерей показало, что здоровыми считались 34 женщины (51,5%) I группы; 34 женщины (43,6%) II группы и 17 (36,2%) женщин III группы. *Гинекологический анамнез* был отягощен у большинства женщин во всех трех группах. Среди женщин II и III групп чаще встречались гормональные нарушения в виде *дисфункции яичников* и *хронический сальпингооофорит* ($p < 0,05$).

Осложненное течение данной беременности чаще встречалось среди женщин, дети которых в последующем развили инфекционные заболевания. В I триместре чаще встречались *инфекционные кольпиты* различной этиологии (17% в III группе против 7,5% в I группе; $p < 0,05$). Во II триместре у женщин III группы по сравнению с матерями I и II групп достоверно чаще были зафиксированы *угроза прерывания беременности* ($p < 0,01$) и *повышение артериального давления в сочетании с отечным синдромом* ($p < 0,05$), в III триместре - *гестоз* (87,2% в III группе против 37,9% в I группе; $p < 0,01$), *обострение хронического пиелонефрита* (23,4% в III группе против 5,1% во II группе; $p < 0,01$) и *инфекционные кольпиты* (10,6% в III группе против 4,5% в I группе; $p < 0,01$). *Хроническая фетоплацентарная недостаточность* в III триместре беременности чаще отмечалась у матерей детей с бактериальными инфекциями (17,9% во II и III группах по сравнению с 4,5% в I группе; $p < 0,01$).

Осложненное течение интранатального периода отмечено у большинства детей; в III группе роды были патологическими почти во всех случаях (95,7%). *Полная и частичная отслойка* нормально расположенной плаценты чаще встречалась у беременных II и III групп по сравнению с I ($p<0,05$), что определило большее число родоразрешений путем кесарева сечения. По *длительности безводного промежутка* достоверных различий между группами выявлено не было.

Факторы риска развития инфекционных заболеваний достоверно чаще встречались во II и III группах по сравнению с I группой. Так, у каждой 5-ой роженицы III группы (21,3%) ($p<0,01$) и у каждой 10-ой женщины II группы (7,7%) ($p<0,05$) был выявлен *хориоамнионит*, при этом данная патология встречалась у женщин I группы только в 3%. Причем у матерей III группы данная патология встречалась достоверно чаще, чем у матерей II группы.

Анализ периода ранней постнатальной адаптации показал, что во II и III группах практически все дети (91,1% и 100%, соответственно) родились в среднетяжёлом или тяжёлом состоянии. В первые сутки жизни почти все дети II и III групп (83,3% и 97,9%, соответственно) были переведены на ИВЛ в связи с наличием дыхательной недостаточности. Впоследствии у детей III группы достоверно чаще по сравнению с детьми I и II групп развилась бронхо-лёгочная дисплазия.

Перинатальное поражение ЦНС имело место у детей всех 3-х групп. В большинстве случаев оно носило гипоксически-ишемический характер (68,1%, 61,5% и 57,4%, соответственно). Гипоксически-геморрагическое поражение ЦНС также встречалось с сопоставимой частотой. В клинической картине во всех группах преобладал синдром угнетения безусловно-рефлекторной деятельности. Неонатальные судороги развились у 19,1% детей III группы, у 16,7% детей II группы и только у 6% детей I группы.

Было установлено, что в первые 96 часов жизни показатели гемограммы достоверно не различались между детьми I группы и 16 новорождёнными детьми II и III групп, развившими врождённую пневмонию и ранний неонатальный сепсис.

Посев крови был положительным у 20,5% детей II группы и у 85,1% детей III группы. Несмотря на положительные посевы крови у детей с бактериальной пневмонией, ни одному ребёнку не был выставлен диагноз неонатального сепсиса, так как у этих детей не было признаков полиорганной недостаточности при наличии или отсутствии симптомов СВР, и данные случаи были расценены как транзиторная бактериемия.

Анализ данных об особенностях течения неонатального периода показал, что дети с инфекционными заболеваниями (II и III группы) по сравнению с детьми I группы нуждались в более длительном проведении ИВЛ и пребывании в отделении реанимации ($p < 0,05$), более длительной антибактериальной терапии, частых введениях свежемороженой плазмы, альбумина, эритроцитарной массы, назначении кортикостероидов ($p < 0,05$). Дети I группы были выписаны из стационара домой достоверно в более ранние сроки. Вместе с тем, не было выявлено достоверных различий по длительности проведения ИВЛ и пребыванию в отделении реанимации между группами детей с неонатальным сепсисом (III) и бактериальной пневмонией (II).

Несмотря на достоверные различия по частоте встречаемости факторов перинатального риска в изучаемых группах, нам не удалось выявить объективные, надёжные критерии развития неонатальных бактериальных инфекций. С целью поиска дифференциально диагностических и прогностических критериев неонатальных бактериальных инфекций, мы сочли необходимым провести изучение цитокинового статуса новорождённых детей.

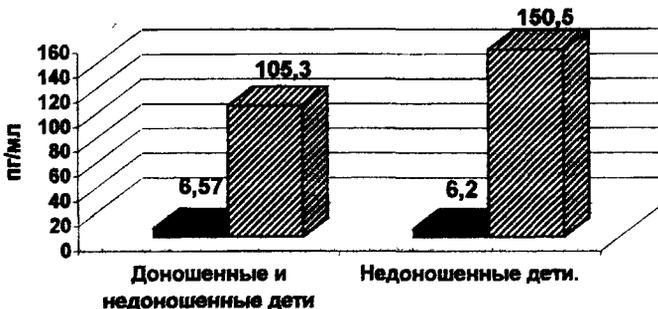
Особенности цитокинового статуса новорождённых детей, перенесших перинатальную гипоксию.

Нами было установлено, что у новорождённых детей, перенесших лёгкую перинатальную гипоксию, концентрации цитокинов в сыворотке крови не отличались от возрастных норм, приведённых в литературе для здоровых доношенных детей (De Bont E.S., 1993; Berner R., 1998). Цитокиновый профиль новорождённых детей, перенесших среднетяжёлую и тяжёлую гипоксию, характеризовался наличием высоких уровней ИЛ-1 β в сыворотке крови на 2-4

сутки жизни по сравнению с таковыми у детей, перенесших лёгкую перинатальную гипоксию ($p < 0,05$) (Диаграмма 1).

Диаграмма 1.

Концентрации ИЛ-1бета в сыворотке крови новорождённых детей, перенесших перинатальную гипоксию, на 2-4 сутки жизни.



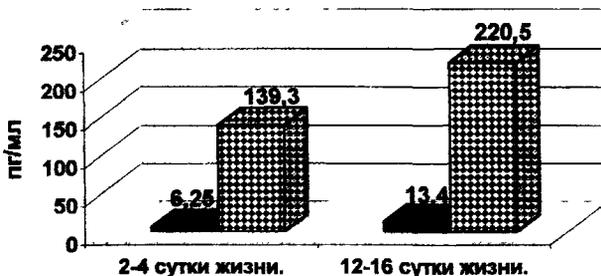
■ Лёгкая степень перинатальной гипоксии.

▨ Среднетяжёлая и тяжёлая степень перинатальной гипоксии.

Повышение уровня ИЛ-1β в сыворотке крови вследствие перенесённой тяжёлой и среднетяжёлой перинатальной гипоксии было более выраженным у недоношенных детей (Диаграмма 2).

Диаграмма 2.

Концентрации ИЛ-1 бета на 2-4 и 12-16 сутки жизни у доношенных и недоношенных детей с тяжёлой перинатальной гипоксией.



■ Доношенные дети

▨ Недоношенные дети

Это обусловило высокую диагностическую информативность теста по определению уровня ИЛ-1β в сыворотке крови именно в группе недоношенных

детей, перенесших тяжёлую и среднетяжёлую гипоксию (ДЧ=75%; ДС=100%; ДЭ=80% при уровне ИЛ-1 β в сыворотке крови более 10 пг/мл).

Особенности цитокинового статуса новорождённых детей с локализованными и генерализованными формами бактериальных инфекций.

При проведении дифференциальной диагностики между детьми с бактериальными инфекциями и детьми с неинфекционной патологией было установлено, что в первые 96 часов жизни показатели гемограммы достоверно не различались между детьми I группы и 16 новорождёнными детьми II и III групп, развившими врождённую пневмонию и ранний неонатальный сепсис. В то же время некоторые показатели цитокинового статуса у детей данных групп имели достоверные различия (Таблица 2).

Таблица 2. Концентрации цитокинов в сыворотке крови новорождённых детей, перенесших перинатальную гипоксию, и детей с врождёнными пневмониями и ранним неонатальным сепсисом на 2-4 сутки жизни.

Цитокины (пг/мл)	Врождённая пневмония и ранний неонатальный сепсис (n=16)	Перинатальная гипоксия (n=66).	Достоверность (p)
ИЛ-1β	15,2 \pm 9,1	81,5 \pm 21,7	<0.05
ИЛ-8	182,9 \pm 47,1	39,8 \pm 13,8	<0.05
ФНО- α	121,9 \pm 30,2	39,9 \pm 8,6	<0.05

Максимальной диагностической информативностью обладали следующие показатели цитокинового профиля (Таблица 3).

Таблица 3. Информативность уровней цитокинов в сыворотке крови на 2-4 сутки жизни при дифференциальной диагностике между ранними бактериальными инфекциями (II и III группы) и перинатальной гипоксией (I группа).

Показатель	ДЧ%	ДС%	ПЗ+%	ПЗ-%	ДЭ%
ИЛ-1β \leq20 пг/мл	92,3	34,5	38,7	90,9	52,4
ИЛ-8 \geq70 пг/мл	78,6	90	78,6	90	86,4
ФНО-α \geq70 пг/мл	60	85,2	69,2	79,3	76,2

При проведении дифференциальной диагностики между локализованными и генерализованными формами бактериальных инфекций в раннем неонатальном периоде были сопоставлены лабораторные показатели 8 детей с врождёнными пневмониями и 8 детей с ранним неонатальным сепсисом. При этом не было выявлено различий между параметрами гемограммы и уровнями цитокинов в сыворотке крови детей II и III групп. Однако на 2-4 сутки жизни абсолютное количество лимфоцитов у детей с ранним неонатальным сепсисом было достоверно ниже по сравнению с таковым у детей с врождённой пневмонией ($1889,3 \pm 241,6$ лимфоцитов в 1 мкл при сепсисе против 3181 ± 533 лимфоцитов в 1 мкл при пневмонии; $p < 0,05$).

Концентрации ИЛ-8 и ФНО-альфа в сыворотке крови детей с бактериальными инфекциями и перинатальной гипоксией на 12-16 сутки жизни.

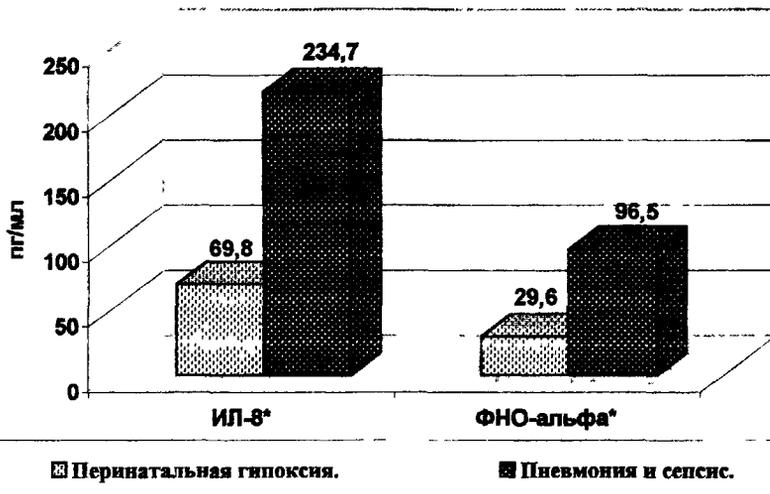


Диаграмма 3.

На 12-16 сутки жизни дети с постнатальной пневмонией и поздним неонатальным сепсисом имели достоверно более высокие концентрации ИЛ-8 и ФНО- α по сравнению с детьми I группы без инфекционной патологии (Диаграмма 3), что совпадает с данными литературы. Кроме того, нами было установлено, что у детей с бактериальными инфекциями в разгаре заболевания одновременно с возрастанием концентраций провоспалительных цитокинов

достоверно повышается уровень ИЛ-1РА в сыворотке крови по сравнению с детьми I группы ($2138,9 \pm 179,3$ пг/мл при позднем неонатальном сепсисе и постнатальных пневмониях против $947,7 \pm 171,3$ пг/мл при неинфекционной патологии; $p < 0,05$). Данная закономерность стойко прослеживалась как у доношенных, так и у недоношенных детей.

Представлялось важным уточнить роль показателей сывороточных концентраций цитокинов в дифференциальной диагностике локализованных и генерализованных форм неонатальных бактериальных инфекций. Нами было установлено, что во всех гестационных группах для позднего неонатального сепсиса характерно статистически значимое снижение концентрации ИЛ-1 β в сыворотке крови и повышенные концентрации ИЛ-1РА в разгаре заболевания на 12-16 сутки жизни по сравнению с таковыми при постнатальной пневмонии (Таблица 4).

Таблица 4. Уровни цитокинов в сыворотке крови детей с постнатальной пневмонией и поздним неонатальным сепсисом на 12-16 сутки жизни.

Цитокины (пг/мл)	Поздний неонатальный сепсис (n=39).	Постнатальная пневмония (n=70).	Достовер- ность (p).
ИЛ-1β	85,1 \pm 28,6	191,7 \pm 41,8	<0.05
ИЛ-1РА	3161,2 \pm 387,6	1635 \pm 147,5	<0.01
ИЛ-8	412,6 \pm 89,6	152 \pm 73,5	<0.05

С целью уточнения возможной прогностической роли показателей цитокинового профиля мы сопоставили данные параметры у выживших и умерших новорождённых детей с пневмонией и неонатальным сепсисом. При этом было выявлено, что прогностически неблагоприятными критериями с точки зрения вероятного летального исхода при бактериальной пневмонии и неонатальном сепсисе являются низкие сывороточные концентрации ИЛ-1 β (<20 пг/мл) и крайне высокие концентрации ИЛ-1РА (≥ 2000 пг/мл) на фоне тяжёлого состояния новорождённого ребёнка и выраженности признаков инфекционного токсикоза.

Выделение бактерий из кровотока считается «золотым» стандартом и наиболее специфичным тестом в диагностике неонатального сепсиса, однако

оно требует больших временных затрат. Это обуславливает необходимость поиска дополнительных тестов, которые позволят увеличить точность диагностики неонатального сепсиса до получения результатов посева крови

Поскольку сепсис является заболеванием, угрожающим жизни детей, идеальный диагностический тест должен иметь максимальную чувствительность и наибольшую прогностическую значимость отрицательного результата. При этом каждый ребёнок с неонатальным сепсисом будет иметь патологический результат лабораторного исследования (ДЧ=100%), а нормальный результат теста будет полностью исключать наличие сепсиса у данного ребёнка (ПЗ- =100%).

Таблица 5. Информативность лабораторных показателей на 12-16 сутки жизни новорождённых детей при дифференциальной диагностике позднего неонатального сепсиса и постнатальной бактериальной пневмонии.

Показатель.	ДЧ%	ДС%	ПЗ+%	ПЗ-%	ДЭ%
Бактериемия.	82,1	82,4	84,2	80	82,2
ИЛ-1РА\geq1500 пг/мл	92,3	51,9	48	93,3	65
ИЛ-8\geq70 пг/мл	85,7	61,9	42,8	92,9	67,9
ИЛ-1$\beta$$\leq$100 пг/мл	85,7	47,3	37,5	90	57,7
ФНО-$\alpha$$\geq$90 пг/мл	71,4	38,1	27,8	80	46,4
Л/Г \geq0,1	69,2	84,3	71,1	83,1	78,9
Количество нейтрофилов в 1 мкл крови \geq5000	64,1	67,1	52,1	77	66,1
ИЛ-1$\alpha$$\geq$300 пг/мл	62,1	32,2	31	63,3	42,1
Количество юных нейтрофилов в 1 мкл крови \geq750	56,4	88,6	73,3	78,5	77,1
Количество лимфоцитов в 1 мкл крови \leq2500	56,4	68,6	50	73,8	64,2
Количество лейкоцитов в 1 мкл крови \geq10000	46,2	62,9	40,9	68	56,9
Количество нейтрофилов в 1 мкл крови \leq5000	35,9	32,9	23	47,9	33,9
Количество лейкоцитов в 1 мкл крови \leq7000	23,1	84,3	45	66,3	62,4

Нами были рассчитаны пороговые уровни показателей гемограммы и сывороточных уровней цитокинов при неонатальных бактериальных инфекциях в разгаре заболевания (Таблица 5). Определение порогового уровня проводилось на основании выбора наиболее оптимального соотношения ДЧ, ДС и ПЗ- при различных величинах исследуемых параметров. Из таблицы 5 видно, что при дифференциальной диагностике локализованных и генерализованных форм бактериальной инфекции у новорождённых детей, показатели цитокинового статуса более информативны, чем гемограмма.

Оценка клинической эффективности Ронколейкина в комплексной терапии неонатального сепсиса.

Из данных литературы и приведённых выше результатов собственного исследования следует, что неонатальный сепсис характеризуется дисбалансом показателей цитокинового статуса, формированием абсолютной лимфопении. Кроме того, сложность лечения сепсиса обусловлена возможностью развития резистентности возбудителей к определённым группам антибиотиков. Это диктует необходимость разработки новых способов иммунотерапии сепсиса.

Ронколейкин (ООО «Биотех», г.Санкт-Петербург, Россия) является полным структурным и функциональным аналогом аутокринного фактора роста лимфоцитов – интерлейкина-2. В настоящее время Ронколейкин получил разрешение Фармкомитета Российской Федерации на прохождение клинических испытаний в неонатологии. Патогенетическим обоснованием целесообразности применения Ронколейкина в терапии неонатального сепсиса является его потенциальная способность усиливать активацию, пролиферацию и дифференцировку различных субпопуляций лимфоцитов, способствовать становлению адаптивного иммунного ответа на антигены возбудителей заболевания, урегулировать баланс про- и противовоспалительных цитокинов в ходе иммунного ответа.

Согласно разработанному протоколу, клиническим показанием к применению препарата Ронколейкин является *неонатальный сепсис*.

Дополнительным лабораторным показанием к включению Ронколейкина в комплексную терапию неонатального сепсиса являлось

наличие у ребёнка с сепсисом *абсолютной лимфопении* в гемограмме (менее 2000 лимфоцитов в 1 мкл).

По строгим клиничко-лабораторным показаниям мы применяли Ронколейкин в лечении неонатального сепсиса на фоне лимфопении у 12 новорождённых детей различного гестационного возраста. **Контрольную группу** составили 23 ребёнка с неонатальным сепсисом, сопровождавшимся лимфопенией, получавших базисную комплексную антибактериальную, посиндромную, инфузионную терапию без иммунокорректирующей терапии. Лабораторный контроль проводили перед началом терапии Ронколейкином и после окончания курса иммунотерапии.

Новорождённым детям Ронколейкин вводили внутривенно по 250 тыс.МЕ в сутки в физиологическом растворе хлорида натрия (5-10 мл/кг в сутки). Учитывая быструю скорость полураспада молекулы ИЛ-2 в кровотоке (по данным литературы, от 4 до 20 минут), введение указанного объёма проводили со скоростью не более 6 мл/час, так чтобы общее время инфузии составляло не менее 2-3 часов. Для предотвращения потери биологической активности интерлейкина-2 к раствору препарата добавляли 10% раствор альбумина в количестве 2-4 мл при введении 250 000 МЕ рИЛ-2. Ронколейкин вводили двукратно с интервалом 72 часа.

Таблица 6. Клиническая эффективность применения препарата Ронколейкин у детей с неонатальным сепсисом.

Показатели (количество дней).	Дети, получавшие Ронколейкин.	Дети, не получавшие Ронколейкин.	Достовер ность (р)
Длительность инфузионной терапии.	26,7±2,7	43±6,7	<0,05
Длительность антибактериальной терапии	26,7±2,7	40,8±6,7	<0,05
Длительность пребывания в стационаре	33±1,9	46±4,3	<0,05
Начало стабильной прибавки массы тела.	23,4±2,8	51±3,7	<0,05
Начало усвоения энтерального питания.	12,3±4,1	38,2±5,7	<0,05

У детей, получавших Ронколейкин, клинически отмечалось укорочение периода инфекционного токсикоза, ускорение санации очагов бактериальной инфекции (санация ликвора, отрицательные посевы крови, рентгенологическое разрешение пневмонии) и, как следствие, уменьшение длительности инфузионной и антибактериальной терапии; сокращение длительности пребывания в стационаре (Таблица 6). После применения Ронколейкина в основной группе отмечалась нормализация формулы крови, достоверное увеличение содержания лимфоцитов по сравнению с контрольной группой.

При повторном исследовании цитокинового статуса через 3-5 дней после окончания терапии Ронколейкином отмечалась нормализация уровней про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови (Таблицы 7, 8), уменьшение интенсивности системной воспалительной реакции, о чём свидетельствуют достоверное снижение уровня ИЛ-8 как мощного хемоаттрактанта для нейтрофилов и снижение уровня ФНО- α .

Таблица 7. Динамика концентраций цитокинов в сыворотке крови новорождённых детей до и после применения Ронколейкина.

Цитокины (пг/мл)	До начала терапии Ронколейкином.	После окончания терапии Ронколейкином	Достовер- ность (p)
ИЛ-1β	5,5 \pm 0,5	56,3 \pm 16,5	<0,05
ИЛ-8	252 \pm 29,2	91 \pm 9,8	<0,05
ФНО- α	133 \pm 32,5	34 \pm 19,8	<0,05

Увеличение концентрации ИЛ-1 β в сыворотке крови после терапии Ронколейкином является, по-видимому, благоприятным прогностическим фактором.

Таблица 8. Уровни цитокинов в сыворотке крови новорождённых детей с неонатальным сепсисом после применения Ронколейкина.

Цитокины (пг/мл)	Дети после лечения Ронколейкином	Дети, не получавшие Ронколейкин.	Достовер- ность (p)
ИЛ-1β	56,3 \pm 16,5	21,5 \pm 4,3	-
ИЛ-8	91 \pm 9,8	287,6 \pm 27,1	<0,05
ФНО- α	34 \pm 19,8	114,4 \pm 23,7	<0,05

Несмотря на проведение полного комплекса терапии, в обеих группах были летальные исходы. В группе детей с сепсисом, пролеченных Ронколейкином, из 12 детей умер 1 ребёнок (летальность составила 8,3%), в контрольной группе умерло 7 детей из 23 (уровень летальности равнялся 30,4%). При патологоанатомическом исследовании было установлено, что причиной смерти всех детей явилась генерализованная бактериальная инфекция с такими очагами, как менингит, вентикулит, энтероколит, абсцедирующая пневмония, осложнившаяся ДВС-синдромом и полиорганной недостаточностью.

Таким образом, проведение курса иммунокорректирующей терапии препаратом Ронколейкин в комплексном лечении неонатального сепсиса, сопровождающегося абсолютной лимфопенией, способствует благоприятному течению заболевания, обеспечивает купирование лабораторных и клинических признаков системного воспаления, восстанавливает нормальный баланс про- и противовоспалительных цитокинов в более короткие сроки, позволяет снизить уровень смертности в 3,7 раза (с 30,4% до 8,3%).

ВЫВОДЫ

1. В неонатальном периоде уровни провоспалительных цитокинов в сыворотке периферической крови зависят от степени тяжести перенесённой перинатальной гипоксии, гестационного возраста детей, наличия локализованного или генерализованного инфекционного заболевания бактериальной этиологии.
2. Тяжёлая перинатальная гипоксия сопровождается высокими уровнями ИЛ-1 β в сыворотке крови детей в раннем периоде постнатальной адаптации по сравнению с таковыми у детей, перенесших лёгкую перинатальную гипоксию.
3. При локализованных и генерализованных формах бактериальных инфекций у новорождённых детей различного гестационного возраста диагностически значимыми являются высокие сывороточные концентрации ИЛ-8, ФНО- α и рецепторного антагониста ИЛ-1 по сравнению с таковыми у детей,

перенесших перинатальную гипоксию и не имевших инфекционных осложнений неонатального периода.

4. Неонатальный сепсис сопровождается крайне низкими концентрациями ИЛ-1 β в сыворотке крови по сравнению с таковыми при пневмонии. При неонатальном сепсисе и тяжёлых бактериальных пневмониях прогностически неблагоприятными критериями являются низкие уровни ИЛ-1 β в сочетании с высокими концентрациями ИЛ-1РА в сыворотке крови больных новорождённых детей.
5. Включение препарата рекомбинантного человеческого интерлейкина-2 (Ронколейкина) в комплексную терапию неонатального сепсиса, сопровождающегося абсолютной лимфопенией, способствует благоприятному течению заболевания, обеспечивает купирование лабораторных и клинических признаков системного воспаления, восстановление нормального баланса про- и противовоспалительных цитокинов в более короткие сроки, позволяет снизить уровень смертности в 3,7 раза (с 30,4% до 8,3%).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные данные по концентрациям про- и противовоспалительных цитокинов, измеренных иммуноферментным методом, рекомендуется использовать в комплексной дифференциальной диагностике и прогнозировании течения локализованных и генерализованных инфекционных заболеваний бактериальной этиологии у новорождённых детей и определении показаний к иммунокоррекции в отделениях реанимации и интенсивной терапии, а также отделениях патологии новорождённых детей.
2. С целью повышения эффективности лечения генерализованных неонатальных инфекций бактериальной этиологии показано проведение иммунокорректирующей терапии Ронколейкином в дозе 250000 МЕ в сутки внутривенно капельно со скоростью введения не более 6 мл/час. Кратность введения препарата определяется динамикой клинико-лабораторных показателей.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Дегтярева М.В., Солдатова И.Г., Володин Н.Н., Кривцунова Л.Н., Долгова Н.Н., Ганковская Л.В., Ковальчук Л.В. "Патогенетические основы для иммунокоррекции при поствентиляционных пневмониях у новорожденных детей". // В сборнике материалов 6-ого Конгресса Педиатров России "Неотложные состояния у детей" 6-9 февраля 2000 года, стр.99. Москва, 2000.
2. Дегтярева М.В., Володин Н.Н., Бахтиян К.К., Солдатова И.Г., Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Кривцунова Л.Н. "Особенности продукции цитокинов, субпопуляционного состава лимфоцитов и функционального состояния нейтрофилов при неонатальных пневмониях и способы иммунокоррекции". // "Медицинская иммунология", 2000, том 2, №1, стр.69-75.
3. Володин Н.Н., Дегтярева М.В., Симбирцев А.С., Котов А.Ю., Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Долгов В.В., Липагина А.А., Асмолова Г.А., Бахтиян К.К., Карачунская Е.М., Солдатова И.Г., Полякова О.В. "Роль про- и противовоспалительных цитокинов в иммунной адаптации новорожденных детей". // International Journal on Immunorehabilitation, April 2000, vol.2, №1, pp.175-185.
4. Володин Н.Н., Дегтярёва М.В., Полякова О.В., Солдатова И.Г., Симбирцев А.С., Котов А.Ю. Рецепторный антагонист интерлейкина-1 (ИЛ-1РА) как прогностический маркёр при неонатальных бактериальных инфекциях и полиорганной недостаточности. // Материалы 9-ого Съезда педиатров России «Детское здравоохранение России: стратегии развития», 19-22 февраля 2001 года, стр.127.
5. Дегтярёва М.В., Володин Н.Н., Солдатова И.Г. Оценка эффективности иммуномодуляции Липопидом в комплексном лечении пневмоний у недоношенных новорождённых. // Тезисы докладов 8-ого Национального Конгресса "Человек и лекарство". 2001, стр.129.
6. Дегтярева М.В., Володин Н.Н., Бояджан М.Б., Солдатова И.Г., Леснякова Ю.Н. Опыт применения Ронколейкина у детей с хроническими инфекционно-воспалительными заболеваниями мочевой системы. // Тезисы докладов IX Российского Национального Конгресса «Человек и лекарство». Москва, 8-12 апреля 2002 года. Стр.127.
7. Володин Н.Н., Дегтярёва М.В., Солдатова И.Г., Воронцова Ю.Н. Влияние виферона на апоптоз лимфоцитов при неонатальных инфекциях. //

Материалы 4-ого Российского Форума «Мать и дитя», часть 2, г.Москва, 21-25 октября 2002 года, стр.543.

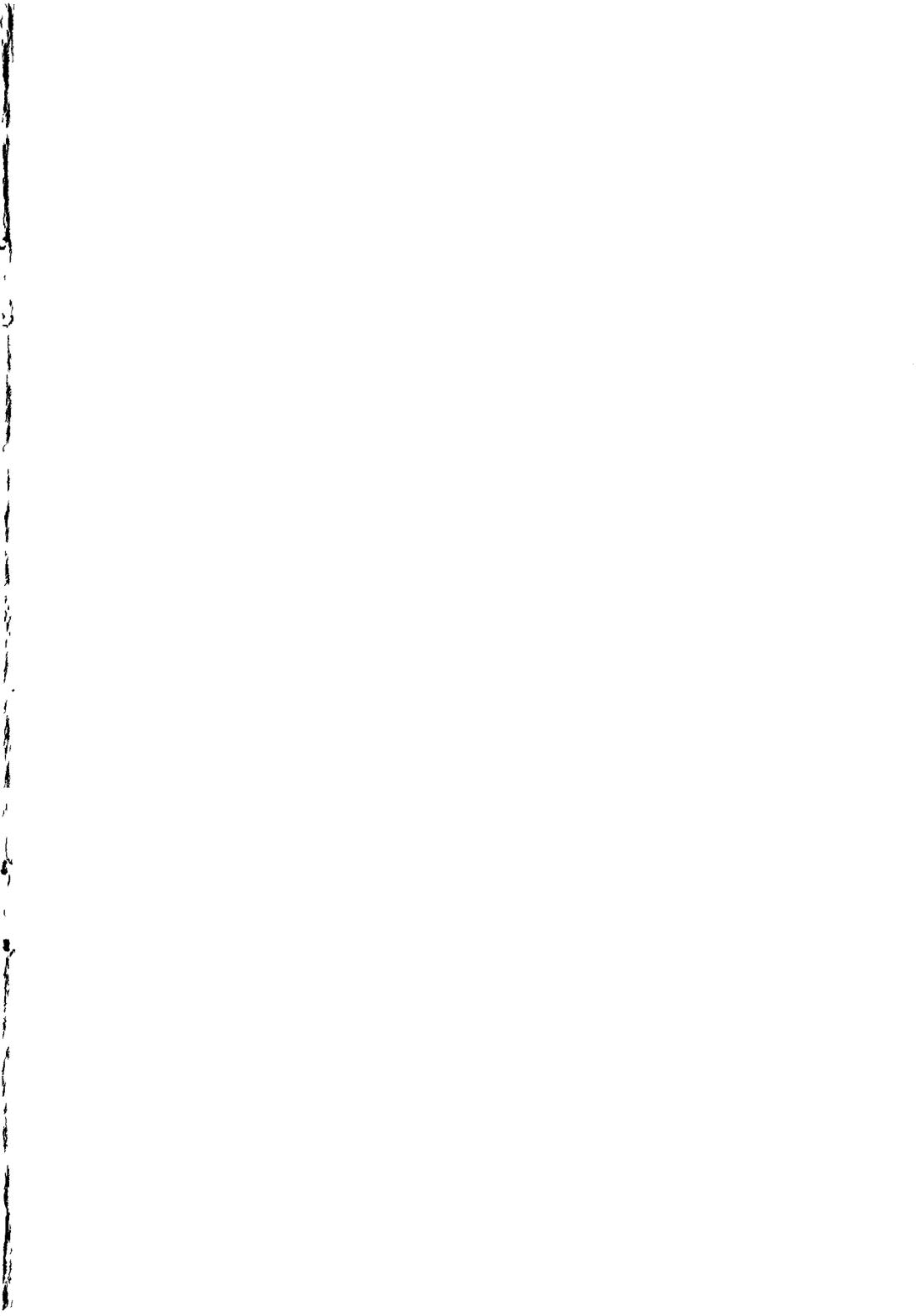
- 8 Володин Н.Н., Дегтярёва М.В., Солдатова И.Г., Воронцова Ю.Н., Симбирцев А.С. Диагностическая и прогностическая роль цитокинов при сепсисе у глубококондоношенных детей. // Материалы 4-ого Российского Форума «Мать и дитя», часть 2, г.Москва, 21-25 октября 2002 года, стр.544.
9. Солдатова И.Г., Лесникова Ю.Н., Дегтярёва М.В. Применение иммуномодулирующих препаратов (Ронколейкин) в педиатрии. // В сб. докладов 5-ой Международной конференции «Здоровье, труд, отдых в XXI веке». (Профилактика, лечение, реабилитация в различные периоды жизни человека). Москва, 2002, стр.72-73.
10. Володин Н.Н., Дегтярёва М.В., Солдатова И.Г., Гордеева Е.А., Симбирцев А.С., Ищенко А.М., Жахов А.В., Синёва С.А. Применение ронколейкина в комплексной терапии неонатального сепсиса. // Вопросы гематологии, иммунологии и онкологии в педиатрии. Москва, 2003, том 2, №1, стр.65-68.
11. Дегтярёва М.В., Володин Н.Н., Солдатова И.Г., Гордеева Е.А., Симбирцев А.С., Ищенко А.М., Жахов А.В., Синева С.А. Патогенетическое обоснование перспективных способов иммунокоррекции при неонатальном сепсисе // Тезисы докладов X Российского Национального Конгресса «Человек и лекарство». Москва, 7-11 апреля 2003 года.
12. Дегтярёва М.В., Володин Н.Н., Солдатова И.Г., Воронцова Ю.Н. Применение препарата Виферон-1 в комплексной терапии неонатальных бактериальных пневмоний. // Тезисы докладов X Российского Национального Конгресса «Человек и лекарство». Москва, 7-11 апреля 2003 года.
13. Володин Н.Н., Дегтярёва М.В., Солдатова И.Г., Гордеева Е.А., Симбирцев А.С., Ищенко А.М., Жахов А.В., Синева С.А. Иммуномодулирующая терапия ронколейкином в комплексном лечении неонатального сепсиса. // Тезисы докладов X Российского Национального Конгресса «Человек и лекарство». Москва, 7-11 апреля 2003 года.
14. Красовская Т.В., Кобзева Т.Н., Володин Н.Н., Дегтярёва М.В., Солдатова И.Г. Иммунотерапия при неонатальном сепсисе. // Методические рекомендации: «Диагностика и интенсивная терапия в хирургии новорождённых». Москва, 2003 год. – 70 стр.

Список используемых сокращений.

ГВ	- гестационный возраст
ДС	- диагностическая специфичность
ДЧ	- диагностическая чувствительность
ДЭ	- диагностическая эффективность
ИВЛ	- искусственная вентиляция лёгких
ИЛ-1β	- интерлейкин-1 β
ИЛ-1α	- интерлейкин-1 α
ИЛ-1РА	- рецепторный антагонист интерлейкина-1
ИЛ-2	- интерлейкин-2
ИЛ-8	- интерлейкин-8
ПЗ+	- прогностическая значимость положительного результата
ПЗ-	- прогностическая значимость отрицательного результата
СВР	- системная воспалительная реакция
ФНО-α	- фактор некроза опухоли - α
ЦНС	- центральная нервная система
И/Т	- Immature/Total (отношение количества юных форм нейтрофилов к общему количеству гранулоцитов периферической крови).

Подписано к печати 24.03.03. Заказ 87 Тираж 100 экз.

Издательский центр МГАПИ



РНБ Русский фонд

2006-4

25048

