

Обоснование назначения человеческого рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора новорожденным с респираторным дистресс-синдромом

М.Г. Пухтинская, В.В. Эстрин

Criteria for the use of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in neonates with respiratory distress syndrome

M.G. Pukhtinskaya, V.V. Estrin

Ростовский НИИ акушерства и педиатрии

Целью исследования стало определение иммунологических критериев назначения человеческого рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора новорожденным с респираторным дистресс-синдромом, находящимся на искусственной вентиляции легких. У 64 новорожденных при поступлении определяли: уровень гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, фактора роста фибробластов, антиапоптогенного фактора, фактора некроза опухоли, интерлейкинов -6, -8, -4, -1, субпопуляционный состав лимфоцитов. Сделан вывод, что критериями для назначения препарата гранулоцитарного колониестимулирующего фактора являются снижение его эндогенного уровня ниже 1556 пкг/мл и увеличение содержания лимфоцитов, находящихся в раннем и позднем апоптозе, более 9,5 и 0,56% соответственно. Необходимо проведение рандомизированных исследований использования у новорожденных человеческого рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора до развития нейтропении.

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

The purpose of the study was to define immunological criteria for the use of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (GCSF) in ventilated newborn babies with respiratory distress syndrome. The levels of GCSF, fibroblast growth factor, anti-apoptogenic factor, tumor necrosis factor, interleukins (IL)-6, IL-8, IL-4, and IL-1, and the subpopulation structure of lymphocytes were determined in 64 neonates on admission. It is concluded that the criteria for the use of GCSF are a less than 1556 pg/ml decrease in its endogenous level and above 9,5 and 0,56% increases in early and late apoptotic lymphocytes, respectively. It is necessary to conduct randomized studies of recombinant human GCSF in the newborn until neutropenia develops.

Key words: neonatal infant, sepsis, neutropenia, cytokines, apoptosis.

Высокий уровень бактериальных осложнений у новорожденных с респираторным дистресс-синдромом, находящихся на искусственной вентиляции легких, определяет необходимость совершенствования методов профилактики и терапии сепсиса [1–3]. Известно, что развитие нейтропении у пациентов с респираторной поддержкой служит ранним симптомом присоединения бактериальных осложнений [4, 5]. В этой связи представляет большой научный и практический интерес использование с целью коррекции нейтропении у новорожденных с респираторным дистресс-синдромом, получающих искусственную вентиляцию легких, человеческого рекомбинантного гранулоцитарного колониести-

мулирующего фактора. О его возможном применении впервые сообщили E. Gillan и соавт. в 1994 г. [6]. В этом исследовании снижение числа заболевших сепсисом было достигнуто благодаря способности данного фактора повышать уровень зрелых активных нейтрофилов в периферической крови.

Анализ результатов опубликованных рандомизированных исследований свидетельствует о безопасности использования указанного фактора у новорожденных с респираторным дистресс-синдромом. Однако некоторые исследователи не подтверждают эффективность этого препарата [7–13]. В представленных исследованиях критерием для его назначения новорожденным служило снижение количества нейтрофилов менее 1500 в 1 мм³ [7–13]. Очевидно, что нейтропения такого уровня может ассоциироваться с полным истощением резервов иммунной системы пациента. В этой ситуации назначение человеческого рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора с целью увеличения количества зрелых активных нейтрофилов может оказаться неэффективным. Кроме того, время ожидания разви-

© М.Г. Пухтинская, В.В. Эстрин, 2010

Ros Vestn Perinatol Pediat 2010; 5:17–20

Адрес для корреспонденции: Пухтинская Марина Гаевна — к.м.н., ст.н.с. отдела анестезиологии и реаниматологии Ростовского НИИ акушерства и педиатрии

Эстрин Владимир Владимирович — д.м.н., проф., рук. отдела анестезиологии и реаниматологии

344012 Ростов-на-Дону, ул. Мечникова, д. 43

тия нейтропении остается безвозвратно потерянным. В связи с этим целью настоящего исследования явилось определение иммунологических критериев назначения данного фактора, основанное на изучении иммунопатогенеза развития нейтропении у новорожденных с респираторным дистресс-синдромом, находящихся на искусственной вентиляции легких.

ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕТЕЙ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С одобрения локального этического комитета и письменного согласия родителей каждого пациента нами было проведено клиническое исследование, в которое вошли 64 новорожденных с респираторным дистресс-синдромом, поступивших в реанимационное отделение в тяжелом состоянии и находившихся на искусственной вентиляции легких. Дети родились в срок гестации $39 \pm 2,1$ нед, массой тела 3700 ± 565 г, с оценкой по шкале Апгар $3,2 \pm 1,6$ балла, от матерей в возрасте $26 \pm 7,4$ года с отягощенным акушерским анамнезом. Тяжесть состояния новорожденных была обусловлена дыхательной недостаточностью: гипоксемия ($pO_2 < 50$ мм рт.ст.), гиперкапния ($pCO_2 > 45$ мм рт.ст.), выраженный ацидоз (рН капиллярной крови $< 7,25$). Все дети были переведены на искусственную вентиляцию легких в родильном зале и транспортированы в отделение реанимации в первые часы жизни ($3 \pm 0,9$ ч).

При поступлении, помимо стандартного обследования, у пациентов определяли плазменный уровень интерлейкинов -6, -8, -4, -1, фактора некроза опухоли, эндогенного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, фактора роста фибробластов, антиапоптогенного фактора методом иммуноферментного анализа на многофункциональном программируемом счетчике для иммунологических исследований с программным обеспечением (Victor, Финляндия). Использовалась тест-система фирмы Cytimmune sciences inc. (США) и Bender MedSystems GmbH (Австрия, Вена). Определяли субпопуляционный состав лимфоцитов крови методом однопараметрического иммунофенотипирования, используя реагенты фирмы Immunotech Beckman Coulter (США). Кроме того, определяли процентное количество лимфоцитов, находящихся в раннем и позднем апоптозе, с помощью антител к аннексину и прокрашивания пропидием йодида, с учетом результатов на проточном цитометре Beckman Coulter Epics XL (США) при использовании стандартных протоколов. Пул лейкоцитов крови выделяли лизирующим раствором OptiLyse C Beckman Coulter (США) по прилагаемому протоколу.

Ретроспективно все пациенты были разделены на две группы. У 30 детей (1-я группа) на 3—4-е сутки пребывания в отделении в гемограмме наблюдалось снижение абсолютного числа нейтрофилов (< 2000 в 1 мм^3).

У 34 новорожденных (2-я группа) количество нейтрофилов в периферической крови не снижалось.

Результаты исследования оценивались методом вариационной статистики. Достоверность различия отдельных выборок определялась с использованием непараметрического критерия Вилкоксона. Абсолютный и относительный риск развития неонатального сепсиса и летального исхода оценивался методом четырехпольных таблиц. Достоверность полученных результатов определялась критерием Гехана—Вилкоксона. Достоверность предположений подтверждена посредством использования точного теста Фишера—Ирвина при 5% уровне значимости в отношении двусторонней альтернативы. Статистическая мощность исследования составила 80% ($\alpha \leq 0,05$). Использовались программы Excel-2000, «Мегастат», Statistica-6.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У 26 из 30 детей с нейтропенией (1-я группа) на 5—6-е сутки пребывания в отделении был диагностирован неонатальный сепсис. Летальный исход в этой группе был зарегистрирован у 11 новорожденных, из них 8 умерли от неонатального сепсиса. Представленные показатели статистически значимо превышали аналогичные во 2-й группе ($p < 0,05$), где только у 5 из 34 новорожденных респираторный дистресс-синдром осложнился развитием сепсиса. Летальный исход во 2-й группе отмечен у 6 детей, 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 с наличием любого гнойно-воспалительного очага, или с положительной гемокультурой, или с наличием клинических симптомов инфекции [14]. У всех пациентов с неонатальным сепсисом в случае летального исхода клинический диагноз был подтвержден при патологоанатомическом исследовании.

У детей с нейтропенией (1-я группа) при поступлении в отделение регистрировался статистически значимо более низкий уровень эндогенного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, фактора роста фибробластов и антиапоптогенного фактора по сравнению с новорожденными без нейтропении (2-я группа). Кроме того, у детей 1-й группы определялось статистически значимое повышение уровня стволовых клеток (CD34) и лимфоцитов, готовых к апоптозу (CD95) и находящихся в раннем и позднем апоптозе (табл. 1). Остальные иммунологические показатели у пациентов обеих групп статистически значимо не различались.

Для каждого из представленных критериев была построена характеристическая ROC*-кривая с опре-

* Receiver Operator Characteristic.

Таблица 1. Иммунологические показатели крови, статистически значимо различающиеся при поступлении у пациентов с развившейся в последующем нейтропенией и без нее

Показатель	1-я группа (медиана) (n=30)	2-я группа (медиана) (n=34)	p
CD34, %	0,3	0,1	0,017794
Г-КСФ, пг/мл	995	1600	0,000000
sFas, пг/мл	5927,1	7319,7	0,004788
ФРФ, пг/мл	20,0	34,9	0,029117
CD95, %	9,2	1,9	0,000482
Лимфоциты с маркерами раннего апоптоза, %	13,5	12,3	0,036122
Лимфоциты с маркерами позднего апоптоза, %	1,99	0,3	0,006958

Примечание.* — Здесь и в табл. 2: Г-КСФ — эндогенный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор; sFas — антиапоптогенный фактор; ФРФ — фактор роста фибробластов.

делением числового значения (точки «cutoff»), позволяющего диагностировать развитие нейтропении с высокой чувствительностью, специфичностью и точностью. В табл. 2 представлены данные расчета диагностической значимости изучаемых тестов. 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) у пациентов 1-й группы не позволяло избежать развития нейтропении. Стволовые клетки не реализовались в зрелые нейтрофилы, возможно, по причине недостаточного синтеза эндогенного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, являющегося физиологическим колониобразующим регулятором нейтрофилов [9, 10]. Не случайно в нашем исследовании уровень данного фактора у пациентов 1-й группы был почти в 2 раза ниже, чем во 2-й группе.

Полученные результаты подтвердили, что у детей с развившейся в последующем нейтропенией уже при поступлении в отделение преобладали процессы альтерации иммунокомпетентных клеток над процессами пролиферации. Так, плазменный уровень антиапоптогенного фактора и пролиферативного фактора роста фибробластов, участвующих в регуляции процесса естественной гибели клеток [12–15], был статистически значимо ниже в данной группе по сравнению со 2-й группой. На этом фоне вполне закономерным было обнаружение у пациентов 1-й группы высокого процента лимфоцитов, находящихся в раннем и позднем апоптозе.

Таким образом, на основании результатов проведенного исследования было сделано заключение, что развитие нейтропении у новорожденных с респираторной патологией обусловлено дефицитом эндогенного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора при достаточном уровне стволовых клеток (CD34) и увеличением числа лимфоцитов, вступивших в ранний и поздний апоптоз. Снижение уровня эндогенного гранулоцитарного колониестимулирующего

Таблица 2. Диагностическая значимость иммунологических критериев, прогнозирующих развитие нейтропении у новорожденных с респираторным дистресс-синдромом, находящихся на искусственной вентиляции легких (в%)

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

Примечание.* — ПЦП — предсказательная ценность положительного результата теста (чувствительность); ПЦО — предсказательная ценность отрицательного результата теста (специфичность); ПЦТ — предсказательная ценность теста.

щего фактора и усиление апоптоза лимфоцитов крови с высокой точностью, чувствительностью и специфичностью прогнозирует развитие нейтропении. Назначать человеческий рекомбинантный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор новорожденным с респираторным дистресс-синдромом, находящимся на искусственной вентиляции легких, следует при снижении плазменного уровня указанно-

го фактора ниже 1556 пг/мл и увеличении содержания лимфоцитов, находящихся в раннем и позднем апоптозе, более 9,5 и 0,56% соответственно. Необходимо проведение рандомизированных исследований по эффективности и безопасности использования данного препарата у новорожденных с респираторным дистресс-синдромом, получающих искусственную вентиляцию легких, до развития у них нейтропении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов А.Г., Володин Н.Н., Гребенников В.А. и др. Принципы ведения новорожденных с респираторным дистресс-синдромом / Метод. рекомендации. М., 2002. С. 14—18.
2. Белушкина Н.Н., Хасан Хамад Али, Северин С.Е. Молекулярные основы апоптоза // Вопр. биол. мед. фарм. химии. 1998. № 4. С. 15—23.
3. Бочоришвили В.Г. Новая иммунологическая концепция сепсиса и ее клиническое значение // Межд. журн. иммунореабилитации. 1997. № 6. С. 42—51.
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. Vol. 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. Pediat. 1979. Vol. 95. P. 89—98.
13. Schibler K., Osborn 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. Исаков Ю.Ф., Белобородова Н.В. Сепсис у детей. М.: Изд. Мокеев, 2001. С. 44—45.
15. 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.

Поступила 21.01.10