

49

На правах рукописи



Ашиткова Наталья Вячеславовна

**ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ
ЗНАЧЕНИЕ ЛИМФОПЕНИИ
ПРИ НЕОНАТАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЯХ**

14.00.09- педиатрия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

12 MAR 2009

Москва, 2009

Работа выполнена на кафедре неонатологии факультета усовершенствования врачей Государственного Образовательного Учреждения Высшего Профессионального Образования «Российский Государственный Медицинский Университет» Росздрава.

Научные руководители:

Академик РАМН, доктор медицинских наук,
профессор
Доктор медицинских наук, профессор

Володин Николай Николаевич
Дегтярева Марина Васильевна

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор
Доктор медицинских наук, профессор

Байбарина Елена Николаевна
Финогенова Наталья Анатольевна

Ведущее учреждение: ГОУ ДПО «Российская Медицинская Академия Последипломного Образования» Росздрава.

Защита состоится «__» _____ 2009 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.050.01. в ФГУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии» Росздрава по адресу: 119571, Москва, Ленинский проспект, 117, корп. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ ФНКЦ гематологии, онкологии и иммунологии Росздрава и на сайте www.niidg.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2009 года

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Чернов Вениамин Михайлович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы.

Гнойно-воспалительные заболевания занимают существенное место в структуре заболеваемости и смертности новорожденных и недоношенных детей, как в России, так и за рубежом, поэтому проблема оптимизации лечения тяжёлых инфекций у новорожденных детей не теряет своей актуальности во всех странах мира.

Несмотря на широкое применение антибактериальной терапии, в последние годы отмечается тенденция к росту числа детей, больных сепсисом, в первую очередь, среди недоношенных детей с экстремально низкой массой тела (ЭНМТ) при рождении. Помимо перинатальных факторов риска развития внутриутробной инфекции и раннего неонатального сепсиса важную роль играют длительное пребывание в отделении реанимации и интенсивной терапии, необходимость применения инвазивных методов лечения (ИВЛ, катетеризация кровеносных сосудов и мочевого пузыря, зондирование желудка), что может послужить причиной развития позднего неонатального сепсиса.

В последние годы во всем мире пристальное внимание исследователей и практических врачей уделяется комплексу проблем, связанных с изучением онтогенеза иммунной системы в норме и функционированием её при патологических состояниях, особенно при тяжелых инфекциях в перинатальном периоде и в раннем детском возрасте. Иммунные механизмы участвуют в патогенезе основных заболеваний перинатального периода и во многом обуславливают исход и возможность полноценной реабилитации заболевшего ребенка.

В клинической практике одним из наиболее информативных методов, позволяющим подтвердить наличие бактериальной инфекции, является общий анализ крови. Известно, что маркерами воспалительной реакции являются лейкоцитоз или лейкопения, нейтрофилез или нейтропения, сдвиг лейкоцитарной формулы до юных форм гранулоцитов. В то же время отсутствуют систематизированные факты статистического анализа клинических наблюдений, характеризующие роль лимфоцитов в иммунной защите новорожденных детей различного гестационного возраста (ГВ) при физиологическом и осложненном течении неонатального периода, изменение их количества в динамике генерализованных и локализованных инфекций, диагностическую и прогностическую роль лимфопенических состояний. При этом имеются доказательства неблагоприятной прогностической значимости лимфопении, как правило, сопровождающей гипозергическое течение сепсиса и тяжелых инфекций (Шабалов Н.П., Иванов Д.О., 2001).

Изучение диагностической и прогностической роли абсолютной лимфопении становится особенно актуальным в связи с появлением в арсенале врачей новых особо чистых и безопасных генно-инженерных препаратов, относящихся к медиаторам иммунной системы. Мы предположили, что некоторые из них могут явиться эффективным средством для коррекции

абсолютной лимфопении у новорожденных детей и тем самым улучшить прогноз при тяжелых неонатальных инфекциях. Для решения вышеуказанных проблем и было предпринято настоящее исследование.

Цель исследования: Установить диагностическое и прогностическое значение абсолютной лимфопении в патогенезе неонатальных инфекций и оценить клиническую эффективность иммунотерапии препаратом рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Ронколейкин®).

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Установить частоту встречаемости и клиническое значение лимфопении у новорожденных детей при различной патологии.
2. Установить прогностическое значение абсолютной лимфопении при неонатальных инфекционных заболеваниях.
3. Оценить взаимосвязь между количеством лимфоцитов и другими лабораторными показателями у новорожденных детей различного ГВ с осложненным течением неонатального периода.
4. Изучить особенности фенотипа лимфоцитов у новорожденных детей различного ГВ при неонатальных инфекциях, сопровождающихся развитием лимфопении.
5. Обосновать клинико-лабораторные показания к проведению иммунокоррекции лимфопенических состояний и оценить клиническую эффективность терапии Ронколейкином при неонатальных инфекциях у детей различного ГВ.

Научная новизна

Было впервые установлено, что развитие абсолютной лимфопении может отмечаться у новорожденных детей любого гестационного и постнатального возраста, чаще регистрируется при инфекционной патологии (неонатальный сепсис) и на первой неделе жизни детей, но не взаимосвязано с результатами посева крови на стерильность и с природой высеваемого возбудителя. Было доказано, что при раннем неонатальном сепсисе у недоношенных детей абсолютная лимфопения развивается значимо чаще, чем нейтропения. Развитие стойкой лимфопении у детей в отделениях реанимации и интенсивной терапии новорожденных является неблагоприятным прогностическим признаком и свидетельствует о высоком риске летального исхода. Проведена разработка направленной иммунокоррекции при неонатальных инфекциях, сопровождающихся лимфопенией, что позволило снизить показатель летальности новорожденных детей с 20% до 8,2% (в 2,4 раза) и повысить эффективность лечения в стационаре.

Научно-практическое значение

В результате исследования было показано, что при интерпретации результатов общего анализа крови у новорожденных детей с осложненным течением неонатального периода наряду с

оценкой процентного содержания лимфоцитов в лейкоцитарной формуле крови необходимо производить расчет абсолютного количества лимфоцитов.

При выявлении абсолютной лимфопении (менее $2 \times 10^9/\text{л}$) у детей, страдающих тяжелыми неонатальными инфекциями, показано включение в комплексную терапию Ронколейкина, что является патогенетически обоснованным, безопасным и эффективным. О высокой клинической эффективности Ронколейкина свидетельствуют нормализация клинического состояния детей, показателей гемограммы и иммунного статуса, уменьшение интенсивности системного воспалительного ответа, сокращение длительности санации локализованных очагов инфекции и крови, и снижение летальности у детей с осложненным течением неонатального периода.

Внедрение результатов работы

Выработанные в результате исследования практические рекомендации внедрены в практику отделений реанимации и интенсивной терапии новорожденных Городской Больницы №8 г. Москвы, неонатального центра, отделения общей реанимации, отделения патологии новорожденных, отделения хирургии новорожденных ДГКБ №13 им. Н.Ф.Филатова г. Москвы. Результаты данной научной работы используются в учебном процессе, проводимом для врачей-педиатров, неонатологов из различных регионов России на кафедре неонатологии ФУВ РГМУ.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на Ежегодном конгрессе Российской ассоциации специалистов перинатальной медицины «Новые технологии в перинатологии» (Москва, 21 ноября 2006 г.), на VIII Конгрессе РААКИ «Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии», (Москва, 27 июня 2007 г.), на XII Конгрессе педиатров России «Актуальные вопросы педиатрии» (Москва, 21 февраля 2008 г.), на Национальной конференции «Аллергология и клиническая иммунология – междисциплинарные проблемы» (Москва, 26 февраля 2008г.), на круглом столе «Септические состояния в педиатрической практике. Возможности иммуотропных вмешательств» (Екатеринбург, 14 мая 2008 г.), на 1-ом Объединенном научно-практическом форуме детских врачей (Орел, 23 мая 2008 г.), на научно-практической конференции с международным участием «Роль вирусных и бактериальных инфекций в формировании перинатальной соматической патологии у детей» (Хабаровск, 11 июня 2008 г.), на 2-ом Объединенном иммунологическом Форуме (Санкт-Петербург, 4 июля 2008 г.), на V Дальневосточном конгрессе «Человек и лекарство» (Владивосток, 18 сентября 2008 г.), на региональном форуме «Здоровье матери и ребенка» (Пермь, 13 ноября 2008 г.).

Работа апробирована 29 апреля 2008 года на объединенной научно-практической конференции сотрудников кафедры неонатологии ФУВ РГМУ, кафедры детских болезней №2 РГМУ, кафедры хирургических болезней детского возраста с курсами эндоскопической хирургии

и детской урологии-андрологии ФУВ РГМУ и сотрудников ДГКБ №13 им. Н.Ф.Филатова Департамента здравоохранения г. Москвы.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 научных работ.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 140 страницах и состоит из 9 глав: введения, обзора литературы, 5 глав, в которых представлены результаты собственных наблюдений, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций и библиографического указателя. Текст диссертации содержит 34 таблицы и 8 рисунков. Указатель литературы включает в себя 191 источник, из них 43 работы отечественных авторов и 148 работ зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена на кафедре неонатологии ФУВ РГМУ (заведующий кафедрой – академик РАМН, д.м.н., профессор Володин Н.Н) за период с октября 2005 года по апрель 2008 года.

Наблюдение за новорождёнными детьми проводилось на базе неонатального центра (зав. отд. – к.м.н. Эверстова Т.Н.), отделения общей реанимации (зав. отд. – к.м.н. Беляева И.Д.), отделения хирургии новорожденных (зав. отд. – к.м.н. Голоденко Н.В.) и патологии новорожденных (зав. отд. – Кыштымов М.В.) Детской городской клинической больницы № 13 им. Н.Ф. Филатова (главный врач – д.м.н. Попов В.В.), а также на базе отделений реанимации и интенсивной терапии новорожденных детей № 1 (зав. отд. – к.м.н. Воронцова Ю.Н.) и № 2 (зав. отд. – к.м.н. Бабак О.А.) Городской Больницы № 8 Департамента здравоохранения г. Москвы (главный врач – Дуленков А.Б.).

Критерием абсолютной лимфопении у новорожденных детей является количество лимфоцитов в периферической крови менее $3 \times 10^9/\text{л}$ на первой неделе жизни и менее $2 \times 10^9/\text{л}$ после 7-ых суток жизни (Avery G.B., 1999; Behrman R.E., 2004).

Объем и методы исследования. С целью изучения распространенности абсолютной лимфопении при осложненном течении неонатального периода мы провели **ретроспективный анализ** 279 историй болезни всех подряд новорожденных и детей первых месяцев жизни, находившихся на лечении в ДГКБ №13 им. Н.Ф.Филатова за период с января 2003 по сентябрь 2005 года. Возраст детей в данной группе составил от 1 суток жизни до 224 суток жизни. Мальчиков - 158, девочек - 121. Доношенных детей было 134, со сроком гестации от 32 до 37 недель - 96 детей, 49 детей имели срок гестации менее 31 недели.

Далее нами проводилось собственное проспективное клиническое наблюдение и лабораторное обследование 138 новорожденных детей различного ГВ с осложненным течением неонатального периода, получавших лечение в ДГКБ №13 им. Н.Ф.Филатова за период с октября 2005 по февраль 2008 года. Из них мальчиков было 80, девочек - 58, двоен было 11. Доношенных

детей было 48 из 138 (34,8%), детей 32-37 недель гестации – 56 из 138 (40,6%) детей со сроком гестации менее 31 недели – 34 ребенка из 138 (24,6%). Средняя масса по группе ($M \pm m$ (min-max)) составила 2429 ± 900 граммов (от 750 г до 4330 г), длина тела – 46 ± 6 см (от 31 см до 56 см). Оценка по Апгар на 1 минуте жизни составила $6 \pm 1,7$ (1 - 8) баллов, оценка по Апгар на 5 минуте жизни – $7 \pm 1,3$ (3 - 9) баллов.

Кроме того, были обследованы 79 детей с ранним неонатальным сепсисом, находившихся на лечении в отделениях реанимации №1 и №2 ГБ №8 г. Москвы. В этой группе было 6 доношенных и 73 недоношенных новорожденных. Вес детей при рождении составил от 750 г до 4420 г, длина от 32 до 55 см. По гестационному возрасту дети распределились следующим образом: 25-31 неделя – 46 детей, 32–37 недель – 27 детей, 38-41 неделя – 6 детей. Оценка по шкале Апгар на 1 минуте жизни составляла 5 баллов (от 1 до 8) и на 5 минуте жизни – 6 баллов (от 3 до 8). Мальчиков было 45, девочек - 34. Двоен было 4.

Согласно предложенному рабочей группой Российской ассоциации специалистов перинатальной медицины (РАСПИМ) Протоколу диагностики неонатального сепсиса, надёжным критерием сепсиса является сочетание наличия очага бактериальной инфекции (одного или более), полиорганной недостаточности и признаков системного воспалительного ответа (Антонов А.Г. и соавт., 2005). Бактериemia не является обязательным критерием сепсиса, поскольку выявление возбудителей в крови больных новорожденных детей зависит от фоновой антибактериальной терапии, степени микробной обсемененности крови, объема крови, который технически удалось получить для посева (особенно в случаях малой концентрации микроорганизмов в крови). На основании этих критериев и устанавливался диагноз «неонатальный сепсис» у новорожденных детей в рамках данной работы.

В то же время нами разрабатывались способы иммунокоррекции лимфопении у 145 новорожденных детей, страдающих неонатальным сепсисом и тяжелыми локализованными инфекциями бактериальной и смешанной этиологии. Для этого мы изучали клиническую эффективность препарата рекомбинантного человеческого интерлейкина-2 (Ронколейкин[®], ООО «Биотех», г. Санкт-Петербург). Все 145 детей были разделены на 2 группы по факту получения Ронколейкина. В основную группу включено 85 детей с осложненным течением неонатального периода, развивших абсолютную лимфопению, и получавшие помимо базисной терапии иммуномодулирующую терапию Ронколейкином. Группу сравнения составили 60 новорожденных детей с осложненным течением неонатального периода, сопровождавшимся абсолютной лимфопенией, получавшие только базисную комплексную терапию без дополнительной иммунокоррекции.

Нами был проведен тщательный сбор акушерско-гинекологического и соматического анамнеза матерей наблюдаемых детей. Осуществлялось динамическое общеклиническое наблюдение за новорожденными детьми, базисное лабораторное обследование, в том числе общий

анализ крови и мочи, биохимическое исследование крови, микроскопическое исследование спинномозговой жидкости, микробиологическое исследование посевов крови, ликвора, аспирата из трахеи, мочи. При постановке клинического диагноза учитывали также данные инструментальных методов исследования (рентгенография грудной клетки и брюшной полости, электрокардиография, ультразвуковое исследование органов брюшной полости и головного мозга).

Для решения поставленных задач осуществлялось комплексное лабораторное обследование детей. Забор крови проводился в динамике в трех точках: непосредственно в день обнаружения лимфопении при общем анализе крови (1 точка), через 5-7 суток (2 точка) и через 29 суток после регистрации абсолютной лимфопении (3 точка) для исследования показателей гемограммы, уровней С-реактивного белка методом иммунотурбидиметрии на биохимическом анализаторе Architect-8000 (Abbott, США) по стандартной методике, С₃ и С₄ – компонентов комплемента в сыворотке крови и иммунного статуса. Определяли абсолютное количество лимфоцитов CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4/CD8, CD16⁺/CD56⁺, CD19⁺ методом проточной цитофлюорометрии на аппарате FACScan (Beckton Dickinson, США), уровни IgG, IgA, IgM в сыворотке крови на биохимическом анализаторе Architect-8000 в иммунологической лаборатории Детской Городской Клинической Больницы №9 им. Г.Н.Сперанского (руководитель - д.м.н., профессор А.П. Продеус; заведующая лабораторией - Е.В. Галеева, к.м.н. Н.В. Давыдова).

Для определения уровней про- и противовоспалительных цитокинов ИЛ-8, ИЛ-1β, ИЛ-1РА, ИНФ-γ, ИЛ-2, ИЛ-4 в сыворотке крови использовался твёрдофазный иммуноферментный метод с применением в качестве индикаторного фермента пероксидазы хрена. Для определения концентраций ИЛ-8, ИЛ-1β, ИЛ-1РА, ИНФ-γ использовали тест-системы производства ООО «Цитокин» (г. Санкт-Петербург, Россия). Для определения концентраций ИЛ-2 и ИЛ-4 использовали тест-системы производства «Biosource» (Бельгия). Порог чувствительности тест-системы для определения концентрации ИЛ-8 был равен 10 нг/л, для ИЛ-1β - 5 пг/мл, для ИЛ-1РА – 300 пг/мл., для ИНФ-γ - 15 пг/мл, ИЛ-2 -3 пг/мл, ИЛ-4 - 2,5пг/мл. Иммуноферментный анализ проводили в лаборатории иммунофармакологии ФГУП «НИИ особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства России (руководитель – д.м.н., проф. А.С. Симбирцев; с.н.с. - к.б.н. А.Ю. Котов). В ходе работы было проведено 686 определений уровней ИЛ-8 в сыворотке крови, 182 определения уровней ИЛ-1β в сыворотке крови, 53 определения уровней ИЛ-1РА в сыворотке крови, 372 определения уровней ИНФ-γ в сыворотке крови, 240 определений уровней ИЛ-2 в сыворотке крови, 240 определений уровней ИЛ-4 в сыворотке крови.

Статистическая обработка данных выполнялась с использованием ППП «Statistica 6.0» (Stat. Soft, Inc., США). Количественные признаки, имевшие нормальное распределение, описывались средними и среднеквадратическими отклонениями (M±s); не имевшие нормального распределения, описывались медианами и квартилями (Me [LQ; UQ]). Качественные признаки

описывались абсолютными и относительными частотами их значений. Соответствие распределений количественных признаков нормальному закону исследовалось с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для количественных признаков сравнение несвязанных групп проводилось с использованием непараметрического теста Манна-Уитни (U-test). Для сравнения частот значений признаков в группах применялся двухсторонний точный критерий Фишера (ТКФ). Корреляционный анализ с расчётом коэффициента корреляции (r) проводился с использованием критерия Спирмана. Различия считались статистически значимыми при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При ретроспективном анализе историй болезни детей, находившихся на лечении в ДГКБ №13 им. Н.Ф.Филатова, случаи абсолютной лимфопении по общему анализу крови были зафиксированы у 168 из 279 детей (60,2%). При этом у 90 из 168 (53,6%) детей лимфопения отмечалась лишь один раз за время наблюдения, а у 78 из 168 (46,4%) детей отмечены повторные эпизоды абсолютной лимфопении. Результаты ретроспективного анализа позволили охарактеризовать частоту встречаемости абсолютной лимфопении при различных заболеваниях периода новорожденности, которая представлена на рис. 1.

Частота абсолютной лимфопении при основных патологических состояниях неонатального периода.

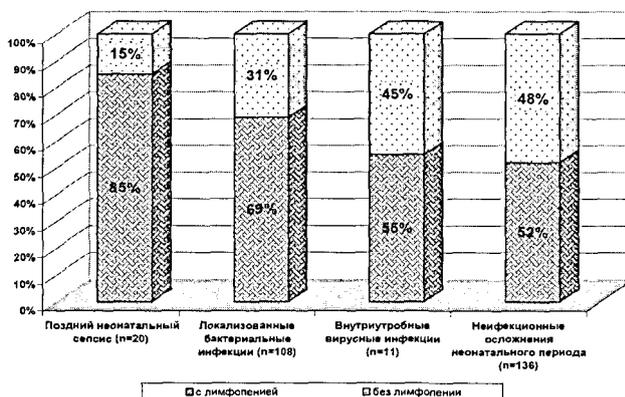


Рисунок 1. Частота абсолютной лимфопении при основных патологических состояниях неонатального периода у детей, находившихся на стационарном лечении в ДГКБ №13 имени Н.Ф.Филатова с 2003 по 2005 гг

В табл. 1 отражены результаты статистического сопоставления частот развития абсолютной лимфопении при основных заболеваниях неонатального периода.

Таблица 1. Частота абсолютной лимфопении при различных патологических состояниях периода новорожденности (по результатам ретроспективного анализа архивных историй болезни новорожденных детей за 2003 - 2005 гг)

| Частота абсолютной лимфопении | | р (ТФК) |
|--|--|---------|
| При неонатальном сепсисе 17 из 20 (85%) | При локализованных бактериальных инфекциях - 75 из 108 (69%) | 0,27 |
| При неонатальном сепсисе 17 из 20 (85%) | При внутриутробных герпесвирусных инфекциях - 6 из 11 (55%) | 0,095 |
| При неонатальном сепсисе 17 из 20 (85%) | При неинфекционной патологии 70 из 136 (52%) | 0,004 |
| При локализованных бактериальных инфекциях - 75 из 108 (69%) | При неинфекционной патологии 70 из 136 (52%) | 0,003 |
| При инфекционной патологии 98 из 139 (71%) | При неинфекционной патологии 70 из 136 (52%) | <0,001 |

Таким образом, как при генерализованных, так и при локализованных бактериальных инфекционных заболеваниях абсолютная лимфопения встречалась статистически значимо чаще, чем при неинфекционной патологии. При сепсисе абсолютная лимфопения развивалась чаще, чем при локализованных бактериальных инфекциях или врожденных герпесвирусных инфекциях, однако различия не достигали статистической значимости.

Нами был проведен ретроспективный анализ частоты абсолютной лимфопении у новорожденных детей с осложненным течением неонатального периода в зависимости от гестационного возраста (табл. 2).

Таблица 2. Частота абсолютной лимфопении при основных патологических состояниях неонатального периода у детей различного гестационного возраста

| Гестационный возраст. | Неонатальный сепсис | Локализованные формы бактериальной инфекции | Тяжелые поражения ЦНС | Внутриутробные вирусные инфекции | Без инфекции | Всего |
|-----------------------|---------------------|---|-----------------------|----------------------------------|---------------|-------|
| 38-41 неделя | 9 (10,5%) | 23 (26,7%) | 9 (10,5%) | 3 (3,5%) | 42 (48,8%) | 86 |
| 32-37 неделя | 4 (7,3%) | 21 (38,2%) | 6 (10,9%) | 2 (3,6%) | 22 (40%) | 55 |
| 31 и менее неделя | 4 (14,8%) | 9 (33,3%) | 7 (25,9%) | 1 (3,7%) | 6 (22,3%) | 27 |
| Всего детей | 17 (10,1%) | 53 (31,6%) | 22 (13,1%) | 6 (3,6%) | 70 (41,6%) | 168 |

Абсолютная лимфопения была зарегистрирована у больных новорожденных детей различного ГВ, включая не только доношенных, но и глубоконедоношенных с ЭНМТ при рождении. Статистически значимых различий (ТКФ) частот лимфопении при основных патологических состояниях у новорожденных детей различного ГВ выявлено не было, что подтвердилось и при обследовании детей, находившихся под нашим собственным наблюдением. При каждом патологическом состоянии у новорожденных детей частота лимфопении не была ассоциирована с гестационным возрастом (ТКФ).

В течение последнего десятилетия в медицинской литературе широко дискутируется вопрос о частоте и неблагоприятной прогностической значимости феномена абсолютной нейтропении при тяжелых неонатальных инфекциях. По данным литературы, за критерий абсолютной нейтропении в периоде новорожденности принимают количество нейтрофилов менее $1,5 \times 10^9/\text{л}$; для недоношенных детей на первой неделе жизни ряд авторов считает применимым порог менее $1,75 \times 10^9/\text{л}$. Многочисленные работы указывают на неблагоприятную прогностическую значимость возникновения абсолютной нейтропении при неонатальном сепсисе, поскольку при нейтропении увеличивается риск летального исхода. Мы провели сравнительный анализ частоты встречаемости нейтропении и лимфопении при раннем неонатальном сепсисе на однородной выборке из 79 детей, находившихся на лечении в отделениях реанимации Городской больницы №8. Ранний неонатальный сепсис был документирован у всех 79 детей в возрасте 48-72 часов жизни на основании критериев РАСПМ.

В возрасте 48-72 часов жизни в группе из 6 доношенных детей с ранним неонатальным сепсисом ни абсолютной лимфопении, ни абсолютной нейтропении на 3-4 сутки жизни зарегистрировано не было. В группе из 27 детей со сроком гестации 32-37 недель в возрасте 48-72 часов жизни были выявлены 6 детей с абсолютной лимфопенией (22%) и 1 ребенок (4%) с абсолютной нейтропенией. Среди 46 глубоко недоношенных детей со сроком гестации менее 31 недели в возрасте 48-72 были выявлены 9 детей с абсолютной лимфопенией (20%) и 2 ребенка (4%) с абсолютной нейтропенией.

Таким образом, абсолютная лимфопения $<2,0 \times 10^9/\text{л}$ отмечалась у 15 детей с ранним неонатальным сепсисом из 79 (19% (от 12 до 29%)), а абсолютная нейтропения $<1,8 \times 10^9/\text{л}$ - у 3 детей из 79 (3,8% (от 0,8 до 11%)). Частота развития лимфопении и нейтропении не ассоциирована с ГВ, однако лимфопения развивается статистически значимо чаще, чем нейтропения, на 3-4 сутки жизни детей с ранним неонатальным сепсисом ($p=0,002$, ТКФ).

Таблица 3. Частота абсолютной лимфопении у новорожденных детей различного постнатального возраста при осложненном течении неонатального периода (по результатам ретроспективного анализа архивных историй болезни новорожденных детей за 2003-2005 гг.)

| Частота лимфопении | | р (ТКФ) |
|--|---|------------------|
| На 1-ой неделе жизни 111 из 229 (48,5%) | На 2-ой неделе жизни 67 из 185 (36,2%) | 0,013 |
| На 1-ой неделе жизни 111 из 229 (48,5%) | На 3-ей неделе жизни 31 из 149 (20,8%) | 0,003 |
| На 2-ой неделе жизни 67 из 185 (36,2%) | На 3-ей неделе жизни 31 из 149 (20,8%) | <0,001 |

Чтобы изучить возможную взаимосвязь развития абсолютной лимфопении и постнатального возраста, мы ретроспективно проанализировали все общие анализы крови больных детей в динамике. Были получены статистически значимые различия частот лимфопении

между разными возрастными группами новорожденных детей (табл. 3). Лимфопенические состояния встречались в течение всего неонатального периода; однако на 1-ой неделе жизни абсолютная лимфопения регистрировалась чаще, чем на 2-ой и 3-ей неделях жизни.

Ретроспективный анализ показал, что в большинстве случаев абсолютная лимфопения в неонатальном периоде является однократной, не требует специфической коррекции и самопроизвольно купируется на фоне адекватной комплексной этиотропной и посиндромной терапии. Особую клиническую значимость представляют случаи стойкой и повторяющейся более двух раз лимфопении, которая, по нашим данным, регистрировалась в 12-19% всех случаев абсолютной лимфопении у новорожденных детей. Статистически значимых различий частот стойкой лимфопении на разных неделях периода новорожденности не было выявлено.

Нами был проведен ретроспективный анализ частоты лимфопении у больных новорожденных детей при различных исходах заболевания. Из 279 детей у 268 (96,1%) детей отмечался благоприятный исход болезни, и дети были выписаны домой в удовлетворительном состоянии. Развитие абсолютной лимфопении при благоприятном исходе заболевания регистрировалось в 157 из 268 случаев (58,6%).

Несмотря на проводимую комплексную терапию состояние 11 детей из 279 (3,9%) расценивалось как крайне тяжелое. У всех детей отмечалась тяжелая инфекционная патология (сепсис) как основное заболевание или тяжелые инфекционные осложнения послеоперационного периода (двухсторонняя пневмония, НЭК, генерализованный кандидоз) и был констатирован летальный исход. Среди 11 умерших детей 5 детей (46%) были доношенными, 2 ребенка (18%) – 32-37 недель гестации, 4 ребенка (36%) были глубоконедошенными (менее 31 недели гестации). Абсолютная лимфопения в данной группе детей развивалась в 100% [95% ДИ, 72%-100%] случаев, причем во всех случаях она регистрировалась два и более раз. Различия частот лимфопении в группах детей с выздоровлением и летальным исходом заболевания были статистически значимыми ($p=0,004$, ТКФ).

Было установлено, что за время наших собственных наблюдений однократные эпизоды лимфопении отмечались у 64 из 105 детей с лимфопеническими состояниями (61%), при этом 6 из них умерли (летальность в группе детей с однократным эпизодом лимфопении - 9,4%). В группе детей со стойкой лимфопенией, зарегистрированной в нескольких анализах крови в динамике, из 41 (39% от всех детей с абсолютной лимфопенией) умерло 12 детей. Таким образом, показатель летальности в группе новорожденных детей с повторяющейся (стойкой) лимфопенией составил 29,3% и был статистически значимо выше, чем у детей с однократным эпизодом лимфопении (9,4%); ($p=0,02$, ТКФ).

При формировании подгрупп детей в зависимости от минимального количества лимфоцитов, нами было выявлено, что в группе больных новорожденных, имевших хотя бы однократно в периферической крови количество лимфоцитов $<3,0 \times 10^9/л$, показатель летальности

составил 18,4%. В группе детей с количеством лимфоцитов $<2,5 \times 10^9/\text{л}$ показатель летальности составил 20,2%. В группе детей с количеством лимфоцитов $<2,0 \times 10^9/\text{л}$ показатель летальности составил 20,3%. В группах новорожденных детей с количеством лимфоцитов $<1,5 \times 10^9/\text{л}$ и $<1,0 \times 10^9/\text{л}$ показатель летальности достигал 23,3% и 25%, соответственно. Следовательно, малое абсолютное количество лимфоцитов ассоциировано с более высоким показателем летальности.

Повторяющаяся (стойкая) лимфопения была зарегистрирована у 14 из 18 умерших детей (77,8%) и у 32 из 120 выживших детей (26,7%); ($p < 0,001$, ТКФ). Это может указывать на непосредственную взаимосвязь между развитием лимфопении как проявлением иммунной недостаточности и смертельным исходом, а также на особо неблагоприятную прогностическую значимость феномена стойкой абсолютной лимфопении.

Чтобы изучить возможную взаимосвязь абсолютной лимфопении с природой возбудителей инфекционных заболеваний в неонатальном периоде, нами было проанализировано 403 посева крови, сделанных наблюдаемым 138 детям за время пребывания их в стационаре. Из 403 посевов крови отрицательный результат дали 276 посевов (68,5%), положительных посевов крови было 127 (31,5%). Было установлено, что частота абсолютной лимфопении не различалась в группах больных с положительными (50/276; 18,1%) или отрицательными (25/127; 19,7%) результатами посевов крови на стерильность ($p = 0,78$, ТКФ). Не удалось выявить взаимосвязь между частотой абсолютной лимфопении и различными видами возбудителей (Грамположительных или Грамотрицательных бактерий, грибов рода *Candida*), высеваемых из крови новорожденных при положительных результатах гемокультуры ($p = 0,12$, ТКФ). Следовательно, частота абсолютной лимфопении не ассоциирована с результатом посева крови (с фактом бактериемии), а также не зависит от природы возбудителя.

В проспективном лонгитудинальном исследовании мы изучали особенности других показателей гемограммы у новорожденных детей с осложненным течением неонатального периода, развивших абсолютную лимфопению. Нами было отмечено, что абсолютная лимфопения встречается как при лейкопении, так и нормальном количестве лейкоцитов в периферической крови, а также при лейкоцитозе. Из 118 случаев регистрации абсолютной лимфопении только в 17 случаях (14,4%) она имела место на фоне лейкопении ниже $5 \times 10^9/\text{л}$, при этом относительное количество лимфоцитов колебалось в пределах от 11% до 60%. В 74 случаях (62,7%) абсолютная лимфопения выявлялась при нормальном количестве лейкоцитов по общему анализу крови (от 5 до $10 \times 10^9/\text{л}$), при этом доля лимфоцитов составляла от 8% до 37%. В 27 случаях (22,9%) абсолютная лимфопения документировалась на фоне лейкоцитоза выше $10 \times 10^9/\text{л}$; доля лимфоцитов составляла от 4% до 18%. То есть только при лейкоцитозе одновременно регистрировались как абсолютная, так и относительная лимфопения (менее 20%). В то же время при нормальном количестве лейкоцитов или лейкопении возрастало количество проб крови, в которых абсолютная лимфопения была замаскирована нормальным процентным содержанием

лимфоцитов в лейкоцитарной формуле. Таким образом, в клинической практике не следует ориентироваться на процентное содержание лимфоцитов в лейкоцитарной формуле крови, а необходимо вычислять их абсолютное значение, исходя из общего количества лейкоцитов.

При разделении всех проб крови новорожденных детей на 2 группы в зависимости от наличия или отсутствия абсолютной лимфопении нами было установлено, что в пробах крови с абсолютной лимфопенией были выше процент нейтрофилов, палочкоядерных и юных форм гранулоцитов, сегментоядерных нейтрофилов; то есть абсолютной лимфопении сопутствовало перераспределение лейкоцитарной формулы по воспалительному типу. В то же время абсолютное число лейкоцитов, нейтрофилов, сегментоядерных гранулоцитов и моноцитов было статистически значимо меньше в пробах крови, характеризующихся абсолютной лимфопенией, по сравнению с пробами крови с нормальным количеством лимфоцитов. Это свидетельствует о возможной взаимосвязи развития абсолютной лимфопении со снижением интенсивности лейкопоэза, в целом (табл. 4).

Таблица 4. Лабораторные показатели у новорожденных детей с осложненным течением неонатального периода при абсолютной лимфопении и без лимфопении

| Параметр | Количество лимфоцитов менее $2 \times 10^9 / \text{л}$ | | Количество лимфоцитов более $2 \times 10^9 / \text{л}$ | | P (U-test) |
|---|--|-----|--|-----|------------|
| | Me [LQ; UQ] | n | Me [LQ; UQ] | n | |
| ИЛ-1РА (нг/мл) | 660 [267; 1487] | 14 | 1453 [1027; 7493] | 18 | 0,03 |
| Лейкоциты ($\times 10^9 / \text{л}$) | 7,2 [5,7; 9,3] | 151 | 11,2 [8,9; 16,3] | 324 | <0,001 |
| Нейтрофилы (%) | 67 [59; 75] | 151 | 55 [46; 65] | 324 | <0,001 |
| Нейтрофилы ($\times 10^9 / \text{л}$) | 4,62 [3,3; 6,6] | 151 | 6,37 [4,02; 10,1] | 324 | <0,001 |
| Палочкоядерные нейтрофилы (%) | 4 [2; 9] | 151 | 3 [1; 6] | 324 | 0,002 |
| Все юные нейтрофилы (%) | 4 [2; 10] | 151 | 3 [1; 6] | 324 | 0,003 |
| Сегментоядерные нейтрофилы (%) | 60 [52; 69] | 151 | 50 [41; 58,5] | 324 | <0,001 |
| Сегментоядерные нейтрофилы ($\times 10^9 / \text{л}$) | 4,2 [2,8; 6,1] | 151 | 5,8 [3,7; 8,8] | 324 | <0,001 |
| Лимфоциты (%) | 20 [14; 26] | 151 | 32 [24; 40] | 324 | <0,001 |
| Лимфоциты ($\times 10^9 / \text{л}$) | 1,5 [1,1; 1,8] | 151 | 3,5 [2,8; 4,6] | 324 | <0,001 |
| Моноциты ($\times 10^9 / \text{л}$) | 0,86 [0,52; 1,2] | 151 | 1,2 [0,83; 1,8] | 324 | <0,001 |

Для выявления возможных механизмов развития лимфопении мы провели корреляционный анализ относительного и абсолютного количества лимфоцитов с другими показателями общего анализа крови и с уровнями цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-8, ИЛ-1РА, ИФН- γ , ИЛ-1 β) в сыворотке крови. Статистически значимые корреляционные связи относительного количества лимфоцитов с показателями гемограммы представлены в табл. 5. Из табл. 5 следует, что наиболее сильные

обратные корреляционные связи имеются между относительным количеством лимфоцитов и такими показателями гемограммы, как абсолютное и относительное количество нейтрофилов, как юных, так и зрелых их форм. Чем выше абсолютное и относительное количество юных и зрелых форм нейтрофилов, тем меньше процент лимфоцитов в гемограмме.

Таблица 5. Корреляция относительного количества лимфоцитов с показателями гемограммы у детей с осложненным течением неонатального периода

| Показатели крови. | n | Коэффициент корреляции Спирмана | p |
|---|-----|---------------------------------|--------|
| Нейтрофилы (%) | 475 | -0,91 | <0,001 |
| Нейтрофилы ($\times 10^9/\text{л}$) | 475 | -0,57 | <0,001 |
| Все юные формы нейтрофилов (%) | 475 | -0,31 | <0,001 |
| Все юные формы нейтрофилов ($\times 10^9/\text{л}$) | 475 | -0,37 | <0,001 |
| Сегментоядерные нейтрофилы (%) | 475 | -0,79 | <0,001 |
| Сегментоядерные нейтрофилы ($\times 10^9/\text{л}$) | 475 | -0,54 | <0,001 |

Данные закономерности свидетельствуют о том, что относительная лимфопения взаимосвязана с развитием воспалительных изменений в общем анализе крови, а именно, с нейтрофилезом и сдвигом лейкоцитарной формулы влево до юных форм гранулоцитов.

Кроме того, нами было установлено наличие обратных корреляционных связей средней силы между абсолютным количеством лимфоцитов и относительным количеством нейтрофилов, в том числе и сегментоядерных гранулоцитов; то есть системный воспалительный ответ играет важную роль в возникновении абсолютной лимфопении (табл. 6).

Таблица 6. Корреляция абсолютного количества лимфоцитов с показателями гемограммы у детей с осложненным течением неонатального периода

| Показатели крови. | n | Коэффициент корреляции Спирмана | p |
|--------------------------------------|-----|---------------------------------|--------|
| Лейкоциты ($\times 10^9/\text{л}$) | 475 | 0,61 | <0,001 |
| Нейтрофилы (%) | 475 | -0,47 | <0,001 |
| Сегментоядерные нейтрофилы (%) | 475 | -0,44 | <0,001 |
| Моноциты ($\times 10^9/\text{л}$) | 475 | 0,45 | <0,001 |

Для изучения влияния основных медиаторов иммунной системы на лабораторные симптомы воспаления мы проанализировали корреляционные связи сывороточных уровней цитокинов между собой, а также с показателями гемограммы и биохимическими маркерами. Статистически значимые различия представлены в табл. 7.

Из табл. 7 следует, что уровень ИЛ-8 в сыворотке крови имеет статистически значимые прямые корреляционные связи средней силы с воспалительными изменениями в гемограмме, а именно с относительным и абсолютным количеством юных форм гранулоцитов и лейкоцитарным индексом И/Г, что объясняется биологической ролью ИЛ-8 как важнейшего хемокина, вызывающего выброс юных форм нейтрофилов из костного мозга, а также направленное перемещение гранулоцитов к очагу инфекции в случае возникновения воспаления. Уровень ИЛ-8 в сыворотке крови имеет сильную прямую корреляционную связь с уровнем СРБ в сыворотке крови и может являться информативным маркером системного воспалительного ответа.

Таблица 7. Корреляция уровня ИЛ-8 в сыворотке крови с показателями гемограммы, уровнем СРБ и уровнями цитокинов у детей с осложненным течением неонатального периода

| Показатели крови. | n | Коэффициент корреляции Спирмана | p |
|---|-----|---------------------------------|--------|
| Все юные формы нейтрофилов (%) | 445 | 0,3 | <0,001 |
| Все юные формы нейтрофилов ($\times 10^9/\text{л}$) | 445 | 0,3 | <0,001 |
| И/Г | 445 | 0,3 | <0,001 |
| СРБ (мг/л) | 51 | 0,51 | <0,001 |
| ИЛ-1РА (нг/мл) | 52 | 0,46 | <0,001 |

Повышение концентрации ИЛ-1РА, однонаправленное с увеличением уровня ИЛ-8, можно объяснить компенсаторным действием ИЛ-1РА как противовоспалительного медиатора иммунной системы, призванного нейтрализовать повреждающее действие избыточных количеств ИЛ-1 и тем самым ограничивать воспаление.

На выборке из 40 детей, находившихся на лечении в отделениях реанимации Городской больницы №8 с диагнозом «Ранний неонатальный сепсис», мы проанализировали различия лабораторных показателей и результатов исследования иммунного статуса в зависимости от наличия у детей данной группы абсолютной лимфопении (менее $3 \times 10^9/\text{л}$) в возрасте 48-72 часов жизни (табл. 8).

Из табл. 8 следует, что в группе детей с абсолютной лимфопенией одновременно отмечается статистически значимое снижение не только общего количества лейкоцитов, абсолютного количества нейтрофилов, сегментоядерных нейтрофилов и моноцитов, но так же абсолютного значения всех основных субпопуляций лимфоцитов ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD16^+CD56^+$).

Таблица 8. Различия лабораторных показателей у детей с ранним неонатальным сепсисом при абсолютной лимфопении и без таковой

| Параметр | Количество лимфоцитов менее $3 \times 10^9/\text{л}$ (n=18) | Количество лимфоцитов более $3 \times 10^9/\text{л}$ (n=22) | p (U-test) |
|--|---|---|------------|
| | Me [LQ; UQ] | Me [LQ; UQ] | |
| Лейкоциты ($\times 10^9/\text{л}$) | 8,6 [6,3; 13,5] | 24 [16,9; 32,4] | <0,001 |
| Палочкоядерные нейтрофилы ($\times 10^9/\text{л}$) | 0,36 [0,19; 0,79] | 1,37 [0,75; 2,26] | <0,001 |
| Сегментоядерные нейтрофилы ($\times 10^9/\text{л}$) | 5,1 [3; 8,8] | 12,2 [7,1; 21] | 0,001 |
| Нейтрофилы ($\times 10^9/\text{л}$) | 5,7 [3,6; 9,4] | 13,4 [8,4; 23,7] | <0,001 |
| Моноциты ($\times 10^9/\text{л}$) | 0,97 [0,61; 1,25] | 2,2 [0,9; 3,4] | 0,002 |
| CD3 ⁺ ($\times 10^9/\text{л}$) | 0,81 [0,59; 1,2] | 1,3 [1,1; 2,6] | 0,004 |
| CD4 ⁺ ($\times 10^9/\text{л}$) | 0,67 [0,44; 0,81] | 0,99 [0,68; 1,66] | 0,013 |
| CD8 ⁺ ($\times 10^9/\text{л}$) | 0,22 [0,18; 0,31] | 0,4 [0,3; 0,6] | 0,007 |
| CD16 ⁺ CD56 ⁺ ($\times 10^9/\text{л}$) | 0,08 [0,05; 0,18] | 0,2 [0,15; 0,25] | 0,002 |

Выявленные закономерности изменения количества лимфоцитов основных субпопуляций при развитии абсолютной лимфопении подтвердились при дальнейшем проведении корреляционного анализа. Было выявлено, что при абсолютной лимфопении одновременно страдает количество всех наиболее важных с функциональной точки зрения субпопуляций лимфоцитов. Была выявлена прямая корреляционная связь средней силы между абсолютным количеством лимфоцитов и числом антителообразующих В-лимфоцитов (CD19⁺) ($r=0,35$; $p=0,028$). При абсолютной лимфопении происходит снижение числа зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺) ($r=0,5$; $p=0,02$), количества цитотоксических лимфоцитов (CD8⁺) ($r=0,52$; $p<0,001$), и естественных киллерных клеток (CD16⁺ CD56⁺) ($r=0,46$; $p=0,03$), которые могут эффективно бороться с вирусами и возбудителями, размножающимися внутриклеточно. Абсолютная лимфопения сопровождается уменьшением числа Т-хелперов (CD4⁺) ($r=0,42$; $p=0,008$), производящих медиаторы иммунной системы, в частности, важнейший фактор роста лимфоцитов ИЛ-2.

Следовательно, абсолютная лимфопения сопровождается изменениями иммунного статуса, является проявлением недостаточности клеточных механизмов врожденного и адаптивного иммунного ответа новорожденных детей, что подчеркивает необходимость разработки патогенетически обоснованных способов иммунокоррекции.

С целью изучения клинической эффективности препарата рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Ронколейкин[®]) при тяжелых инфекционных заболеваниях в неонатальном периоде под нашим наблюдением находилось 145 детей, которые были разделены на 2 группы по факту получения Ронколейкина.

Ронколейкин, являясь полным структурным и функциональным аналогом эндогенного ИЛ-2, обладает тем же спектром функциональной активности. Препарат получают методами генной инженерии из клеток-продуцентов рекомбинантного штамма непатогенных пекарских дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae*, в генетический аппарат которого встроен ген человеческого ИЛ-2. Активная субстанция Ронколейкина – рекомбинантный дрожжевой ИЛ-2 человека – является полипептидом, состоящим из 133 аминокислот с молекулярной массой около 15,4 кДа. Он способен восполнять дефицит ИЛ-2 и воспроизводит его эффекты как одного из ключевых компонентов цитокиновой сети. Препарат прошел все необходимые стадии доклинических и клинических испытаний, был зарегистрирован и разрешён для медицинского применения и промышленного выпуска Приказом Министерства здравоохранения и медицинской промышленности РФ № 249 от 31 августа 1995 года. С 6 февраля 2008 года препарат разрешен к применению в педиатрической практике, в том числе и в неонатологии.

Согласно разработанному протоколу, *клиническим показанием* к применению Ронколейкина являлся неонатальный сепсис и тяжелые неонатальные инфекции бактериальной и смешанной этиологии. *Лабораторным показанием* к включению Ронколейкина в комплексную терапию являлось наличие у ребёнка с сепсисом или другими тяжелыми неонатальными инфекциями абсолютной лимфопении менее $2 \times 10^9/\text{л}$.

Ронколейкин вводили внутривенно капельно с использованием инфузомата в течение 2-3 часов со скоростью не более 6 мл/час 1 раз в сутки двукратно с интервалом 48-72 часа. Доза Ронколейкина для внутривенного введения вычислялась из расчета 50000-100000 МЕ/кг массы тела в сутки. Ронколейкин разводили изотоническим раствором натрия хлорида 0,9%-ным из расчета 5-10 мл/кг в сутки в зависимости от особенностей водно-электролитного обмена ребенка.

В основную группу вошли 85 детей с осложненным течением неонатального периода, развивших абсолютную лимфопению по общему анализу крови, и получавшие помимо базисной терапии иммуномодулирующую терапию Ронколейкином. Группу сравнения составили 60 новорожденных детей с осложненным течением неонатального периода, сопровождавшимся абсолютной лимфопенией, получавшие только базисную комплексную терапию без дополнительной иммунокоррекции.

На момент включения детей в исследование статистически значимых различий по массе и длине тела, ГВ, оценке по шкале Апгар на 1 и 5 минуте жизни (табл. 9), а также по основным клиническим параметрам (количеству очагов инфекции, количеству детей находившихся на полном парентеральном питании и на вспомогательной вентиляционной терапии и т.д.) между основной группой и группой сравнения не выявлялось (ТКФ). При анализе комплексной терапии у детей двух групп было установлено, что в обеих группах не различалась базисная этиотропная и посиндромная терапия, а также другие виды иммунотерапии, разрешенные к применению в

неонатологии (иммуноглобулины для внутривенного введения, в том числе Пентаглобин, и/или Виферон).

Таблица 9. Характеристика групп детей с осложненным течением неонатального периода и абсолютной лимфопенией, получавших и не получавших препарат «Ронколейкин».

| | С Ронколейкином (n = 85) | Без Ронколейкина (n = 60) | p (ТКФ) |
|---|---------------------------------|---------------------------------|------------|
| | Me [LQ; UQ] (min-max) | Me [LQ; UQ] (min-max) | |
| Гестационный возраст (недели) | 33 [30; 39 (25-41) | 33 [30; 37] (26-40) | 0,94 |
| Масса тела (граммы) | 1940 [1360; 2830] (750-4200) | 2000 [1370; 2745] (745-4100) | 0,93 |
| Длина тела (см) | 44 [38; 50] (31-56) | 43 [38,5; 48] (31-55) | 0,74 |
| Оценка по Апгар на 1 минуте жизни (баллы) | 6 [4; 7] (1-8) | 6 [5; 7] (1-8) | 0,93 |
| Оценка по Апгар на 5 минуте жизни (баллы). | 7 [6; 8] (3-9) | 7 [6; 7] (3-9) | 0,13 |

В основной группе было 23 доношенных и 62 недоношенных новорожденных ребенка. Мальчиков было 51, девочек - 34. Двоен было 4. Данные о массе и длине тела, оценке по шкале Апгар на 1-ой и 5-й минутах жизни детей представлены в табл. 9.

Неонатальный сепсис был основным диагнозом у 35 детей (41,2%), генерализованные вирусные инфекции - у 8 детей (9,4%), локализованные бактериальные инфекции были документированы у 42 новорожденных (49,4%). По клинко-лабораторным признакам пневмония была диагностирована у 64 новорожденных детей (75,3%), НЭК - у 36 детей (42,4%), менингоэнцефалит был документирован у 4 детей (4,7%), инфекция мочевыводящих путей отмечалась у 7 детей (8,2%), гнойный конъюнктивит - у 4 детей (4,7%), омфалит и флебит пупочной вены - у 8 детей (9,4%). Кандидоз кожи и слизистых оболочек был выявлен у 13 детей (15,3%). 25 детей (29,4%) из 85 имели абсолютные показания к хирургическому вмешательству и были прооперированы.

Несмотря на проводимую комплексную терапию, состояние детей оставалось тяжелым, и у всех них была отмечена абсолютная лимфопения по общему анализу крови. При этом у 32 детей (37,6%) она отмечалась в одном анализе, а у 53 детей (62,4%) была документирована в нескольких анализах крови в динамике. Всем детям данной группы был назначен Ронколейкин по вышеизложенной схеме. Средний возраст детей данной группы на момент получения первой дозы Ронколейкина составил 21 ± 2 суток жизни.

Группу сравнения составили 14 доношенных и 46 недоношенных детей. Мальчиков было 37, девочек - 23. Данные о массе и длине тела, оценке по шкале Апгар на 1-ой и 5-й минутах жизни детей представлены в табл. 9.

Основным клиническим диагнозом у 25 детей из 60 (41,7%) был неонатальный сепсис, у 8 детей (13,3%) - генерализованные вирусно-бактериальные инфекции, у 27 новорожденных детей (45%) - локализованные бактериальные инфекции. Пневмония была диагностирована у 51 новорожденного ребенка (85%), НЭК – у 27 детей (45%), менингоэнцефалит - у 1 ребенка (1,7%), инфекция мочевыводящих путей - у 5 детей (8,33%), гнойный конъюнктивит - у 6 детей (10%), омфалит и/или флебит пупочной вены - у 6 новорожденных (10%). Кандидоз кожи и слизистых оболочек был документирован у 7 детей данной группы (11,7%). 10 детей из 60 (16,7%), находившихся под нашим наблюдением перенесли оперативные вмешательства.

На фоне проводимой комплексной этиотропной и патогенетической терапии в состоянии детей не было отмечено положительной динамики, и у всех из них была зарегистрирована абсолютная лимфопения по общему анализу крови. Дети включались в группу сравнения сразу же после выявления абсолютной лимфопении. Средний возраст детей 2-ой группы на момент обнаружения абсолютной лимфопении составил 8 ± 1 суток жизни. По нашим данным, основная группа и группа сравнения были сопоставимы по количеству детей, имевших однократную или стойкую абсолютную лимфопению.

В соответствии с международными критериями оценки выживаемости при исследовании эффективности препаратов в клинической практике учитывали летальность в течение 28 суток, следующих за введением Ронколейкина. Показатель летальности в основной группе составил 8% (7/85), а в группе сравнения - 20% (12/60) ($p=0,047$, ТКФ). Среди детей, не имевших показаний к хирургическому лечению, умерли 1 ребенок из 60 получавших Ронколейкин, и 7 из 50 детей группы сравнения (1,7% против 14%, соответственно; $p=0,02$, ТКФ; отношение шансов (Odds Ratio) = 9,6 (1,1 - 218,9); относительный риск (Relative Risk) = 8,4 (1,1 - 184,3).

Было установлено, что все 19 умерших детей (7 умерших детей основной группы и 12 умерших детей группы сравнения) имели стойкую абсолютную лимфопению. Среди детей обеих групп, имевших однократный эпизод абсолютной лимфопении, летальных исходов не отмечалось.

Сразу после завершения курса Ронколейкина (во второй точке) в клиническом состоянии детей основной и контрольной групп были зарегистрированы статистически значимые различия (табл. 10). Из табл. 10 следует, что в основной группе после окончания курса Ронколейкина количество детей, имевших пневмонию, нуждавшихся в проведении ИВЛ и полного парентерального питания, было меньше по сравнению с группой сравнения. Это может свидетельствовать о клинической эффективности адьювантной иммунотерапии Ронколейкином при тяжелых инфекционных заболеваниях у детей, развивших абсолютную лимфопению.

Таблица 10. Сравнение клинических показателей у детей, получивших и не получивших Ронколейкин, во второй точке исследования

| Показатель клинического состояния | Дети, получившие Ронколейкин (n = 83) | | Дети без иммунокоррекции (n = 59) | | p (ТКФ) |
|-----------------------------------|---------------------------------------|------|-----------------------------------|------|---------|
| | n | % | n | % | |
| Пневмония | 31 | 37,3 | 47 | 79,7 | <0,001 |
| ИВЛ | 29 | 34,9 | 38 | 64,4 | <0,001 |
| Полное парентеральное питание | 12 | 14,4 | 18 | 30,5 | 0,03 |
| Полное энтеральное питание | 12 | 14,4 | 2 | 3,4 | 0,04 |

Важно отметить, что до 29-ых суток от момента включения в исследование состояние 41 ребенка (49,4%) из 85 детей, получивших Ронколейкин, стало удовлетворительным, были купированы очаги инфекции, нормализовались лабораторные показатели, и эти дети были выписаны из стационара под наблюдение участкового педиатра. В контрольной группе детей, не получивших терапию Ронколейкином, до 3-ей точки удовлетворительным стало состояние только у 10 детей из 60 (16,7%), у них было констатировано выздоровление, и они были выписаны домой. Различия количества детей основной и контрольной группы, выписанных домой до 29-ых суток от момента включения в исследование, были статистически значимыми (p=0,024, ТКФ). К 29-м суткам от момента включения в исследование в стационаре остались только дети, страдающие тяжелой патологией, требующей длительного лечения. Тем не менее в группе детей, получивших терапию Ронколейкином, по сравнению с детьми контрольной группы отмечаются различия по количеству пневмоний (p=0,009, ТКФ).

Таблица 11. Динамика выявления очагов бактериальной инфекции у детей различного гестационного возраста с осложненным течением неонатального периода в группах детей, получивших и не получивших Ронколейкин

| Параметр | С Ронколейкином | | Без Ронколейкина | | p (U-test) |
|--|-----------------|-------------------------------|------------------|-------------------------------|------------|
| | n | Me [LQ; UQ] | n | Me [LQ; UQ] | |
| Количество очагов инфекции в первой точке | 85 | 1 [1; 2] (min.- 1; max- 5) | 60 | 1 [1; 2] (min.- 1; max- 3) | 0,085 |
| Количество очагов инфекции во второй точке | 83 | 1 [0; 1] (min.- 0; max- 3) | 59 | 1 [1; 2] (min.- 0; max- 3) | <0,001 |
| Количество очагов инфекции в третьей точке | 37 | 0 [0; 1] (min.- 0; max- 2) | 42 | 0 [0; 2] (min.- 0; max- 2) | 0,04 |

Из табл. 11 очевидно, что в течение месяца от включения в исследование локализованные очаги инфекции были купированы эффективнее в группе детей, получивших Ронколейкин, по сравнению с контрольной группой.

Длительность ИВЛ и количество койко-дней в стационаре не различались у детей основной и контрольной групп, поскольку на эти показатели влияют ГВ, масса тела при рождении, наличие бронхолегочной дисплазии, проведение хирургических операций.

Таблица 12. Количество детей, имевших положительный посев крови, в группах новорожденных, получавших и не получавших Ронколейкин

| Количество положительных посевов крови | С Ронколейкином | Без Ронколейкина | p (ТКФ) |
|--|--------------------|--------------------|--------------|
| В первой точке | 33 / 73 (45,2%) | 14 / 56 (25%) | 0,026 |
| Во второй точке | 10 / 60 (16,7%) | 19 / 49 (38,8%) | 0,016 |
| В третьей точке | 2 / 21 (9,5%) | 4 / 20 (20%) | 0,4 |

Из табл. 12 видно, что санация крови быстрее возникла у детей, получивших Ронколейкин, по сравнению с детьми, получавшими только базисную терапию. Более того, в группе сравнения через неделю от включения в исследование отмечалось увеличение количества детей с документированной бактериемией по сравнению с количеством детей контрольной группы, имевших позитивную гемокультуру в первой точке.

При анализе показателей гемограммы во второй точке от момента включения в исследование было выявлено, что у детей, получавших Ронколейкин, количество лимфоцитов становилось более высоким по сравнению с детьми, получавшими базисную терапию. В то же время у детей основной группы отмечалось уменьшение нейтрофилов и доли сегментоядерных гранулоцитов по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует об уменьшении интенсивности воспаления (табл. 13).

Таблица 13. Показатели гемограммы у детей с гнойно-септической патологией, получавших и не получавших Ронколейкин во второй точке.

| Параметр | С Ронколейкином n=83 | Без Ронколейкина n=59 | p (U-test) |
|--------------------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------|
| | Me [LQ; UQ] | Me [LQ; UQ] | |
| Нейтрофилы (%) | 50 [41; 67] | 59 [50; 70] | 0,004 |
| Сегментоядерные гранулоциты (%) | 46 [39; 59] | 55 [45; 64] | 0,007 |
| Лимфоциты (%) | 37 [25; 44] | 25 [16; 32] | <0,001 |
| Лимфоциты ($\times 10^9/\text{л}$) | 3,69 [2,62; 5,49] | 3,12 [1,77; 4,6] | 0,011 |

Об уменьшении интенсивности системного воспалительного ответа после лечения Ронколейкином говорят и различия уровней провоспалительного цитокина ИЛ-8 у детей основной и контрольной групп сразу после окончания курса Ронколейкина. При этом уровень ИЛ-8 оставался статистически значимо более высоким детей в группе сравнения (114 [42; 300] пг/мл),

чем у детей основной группы (34,8 [18,9; 94,8] пг/мл) ($p=0,002$, U-test), что может свидетельствовать о поддержании у первых системной воспалительной реакции на фоне сохраняющихся очагов локализованной инфекции и бактериемии.

Таблица 14. Показатели иммунограммы у детей с гнойно-септической патологией, получавших и не получавших Ронколейкина во второй точке.

| Параметр | С Ронколейкином n=18 | Без Ронколейкина n=29 | p (U-test) |
|---|-------------------------|--------------------------|---------------|
| | Me [LQ; UQ] | Me [LQ; UQ] | |
| CD3 % | 63 [61; 70] | 54 [46; 61] | 0,006 |
| CD8 % | 22 [16; 28] | 15 [10; 18] | 0,002 |
| CD16 ⁺ CD56 ⁺ % | 12 [5; 17] | 4 [3; 6] | <0,001 |
| CD16 ⁺ CD56 ⁺ ($\times 10^9$ /л) | 0,31 [0,18; 0,81] | 0,16 [0,08; 0,32] | <0,001 |

При анализе показателей иммунограммы во второй точке исследования было установлено, что после лечения Ронколейкином статистически значимо были выше относительные количества зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8⁺), относительные и абсолютные количества естественных киллерных клеток (CD16⁺ CD56⁺) у детей основной группы по сравнению с таковыми в контрольной группе (табл. 14). Все эти субпопуляции лимфоцитов играют важную роль в развитии врожденных и адаптивных механизмов иммунного ответа и элиминации возбудителей инфекций.

Ни в одном случае не было зарегистрировано побочных эффектов от введения Ронколейкина ни в виде гемодинамических нарушений, ни в виде аллергических или пирогенных реакций.

На основании полученных результатов мы сделали следующие выводы.

ВЫВОДЫ:

1. Абсолютная лимфопения, выявленная у пациентов в неонатальном периоде, свидетельствует о тяжести инфекционного заболевания независимо от гестационного и постнатального возраста детей, результатов посева крови и природы выявленного возбудителя.
2. При раннем неонатальном сепсисе абсолютная лимфопения развивается статистически значимо чаще, чем абсолютная нейтропения (19% против 3,8% соответственно; $p=0,002$, ТКФ).
3. Показатель летальности в группе больных новорожденных с повторяющимися эпизодами лимфопении был статистически значимо выше, чем у детей с однократным эпизодом лимфопении (29,3% против 9,4%, соответственно; $p=0,02$, ТКФ), что может указывать на непосредственную взаимосвязь между развитием лимфопении как проявлением иммунной

недостаточности и смертельным исходом, а также на неблагоприятную прогностическую значимость феномена стойкой абсолютной лимфопении.

4. В возникновении лимфопенических состояний важную патогенетическую роль играет системный воспалительный ответ, обусловленный усилением синтеза провоспалительных цитокинов и сопровождающийся преобладанием в лейкоцитарной формуле нейтрофилов со сдвигом до юных форм.
5. Неблагоприятная прогностическая значимость абсолютной лимфопении объясняется количественным дефицитом всех важнейших функциональных субпопуляций лимфоцитов: зрелых Т-лимфоцитов ($CD3^+$), цитотоксических лимфоцитов ($CD8^+$), естественных киллерных клеток ($CD16^+CD56^+$), Т-лимфоцитов-хелперов ($CD4^+$), производящих интерлейкин-2 как фактор роста лимфоцитов. Это приводит к недостаточности клеточных механизмов врожденного и адаптивного иммунного ответа у новорожденных детей и подчеркивает необходимость применения при регистрации абсолютной лимфопении патогенетически обоснованных способов иммунокоррекции.
6. Включение Ронколейкина в комплексную терапию тяжелых неонатальных инфекций, осложнившихся развитием абсолютной лимфопении, является патогенетически обоснованным, безопасным и эффективным. О высокой клинической эффективности Ронколейкина свидетельствуют снижение показателя летальности, сокращение длительности санации локализованных очагов инфекции и крови, нормализация показателей гемограммы и иммунного статуса, уменьшение интенсивности системного воспалительного ответа у детей, получавших иммунотерапию Ронколейкином, по сравнению с детьми группы сравнения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.

1. При интерпретации результатов общего анализа крови у новорожденных детей с осложненным течением неонатального периода необходимо производить расчет абсолютного количества лимфоцитов.
2. Повторяющаяся в динамике абсолютная лимфопения является прогностическим фактором риска летального исхода, особенно у детей с тяжелой гнойно-септической патологией, перенесших хирургические вмешательства.
3. При выявлении абсолютной лимфопении (менее $2 \times 10^9/\text{л}$) у детей с осложненным течением неонатального периода показано внутривенное капельное введение Ронколейкина в дозе 50000-100000 МЕ/кг массы тела в сутки. Перед введением Ронколейкин необходимо развести 0,9%-ным раствором натрия хлорида из расчета 5-10 мл/кг в сутки в зависимости от особенностей водно-электролитного обмена ребенка. Препарат вводится с использованием инфузомата в течение 2-3 часов со скоростью не более 6 мл/час 1 раз в сутки двукратно с интервалом 48-72 часа.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Володин Н.Н., Дегтярева М.В., Солдатова И.Г., Ашиткова Н.В. «Иммунокоррекция в комплексной терапии неонатальных бактериальных инфекций» // Сборник тезисов симпозиума «Инфекционные осложнения в реаниматологии (этиология, патогенез, патологическая анатомия)», ГУ НИИ общей реаниматологии РАМН, Москва, 18 октября 2004 года, с.8-12.
2. Ашиткова Н.В., Бирюкова Т.В., Гордеева Е.В., Кыштымов М.В., Эверстова Т.Н., Худолеева Е.Б., Синева С.А., Котов А.Ю., Симбирцев А.С., Дегтярева М.В. «Влияние системного воспаления на функции печени у новорожденных детей» // Сборник тезисов 5 съезда РАСПМ. Г.Москва. 14-15 ноября 2005 год, стр.28-29.
3. Дегтярева М.В., Ашиткова Н.В., Бирюкова Т.В., Кыштымов М.В., Эверстова Т.Н., Синева С.А., Котов А.Ю., Симбирцев А.С. «Роль провоспалительных цитокинов в диагностике ранних неонатальных инфекций» // Сборник тезисов 11 Всероссийского съезда сердечно-сосудистых хирургов. Москва. 23-26 октября 2005 года, стр. 12.
4. Солдатова И.Г., Дегтярева М.В., Ашиткова Н.В., Булгакова Н.Т., Попова И.Д., Худолеева Е.Б., Кыштымов М.В. «Применение интерферона-альфа 2b в комплексной терапии неонатальных бактериальных инфекций» // «Вопросы практической педиатрии», 2006. - Том 1, № 1. - Стр.39.
5. Ашиткова Н.В., Солдатова И.Г., Панкова А.Г., Дегтярева М.В. «Распространенность лимфопении у новорожденных детей с осложненным течением неонатального периода» // Материалы Ежегодного конгресса специалистов перинатальной медицины «Новые технологии в перинатологии», Москва, 21-22 ноября 2006 г., стр.9.
6. Бирюкова Т.В., Ашиткова Н.В., Солдатова И.Г., Бабак О.А., Воронцова Ю.Н., Продеус А.П., Котов А.Ю., Симбирцев А.С., Дегтярева М.В. «Особенности диагностики системной воспалительной реакции при бактериальных инфекциях у новорожденных различного гестационного возраста» // Материалы Ежегодного конгресса специалистов перинатальной медицины «Новые технологии в перинатологии», Москва, 21-22 ноября 2006 года, стр.14.
7. Солдатова И.Г., Ашиткова Н.В., Бирюкова Т.В., Котов А.Ю., Симбирцев А.С., Дегтярева М.В. «Роль показателей цитокинового профиля в ранней диагностике неонатальных инфекций» // Материалы Ежегодного конгресса специалистов перинатальной медицины «Новые технологии в перинатологии», Москва, 21-22 ноября 2006 года, стр.58.
8. Солдатова И.Г., Ашиткова Н.В., Булгакова Н.Т., Попова И.Д., Худолеева Е.Б., Кыштымов М.В., Эверстова Т.Н., Дегтярева М.В. «Эффективность препарата «Виферон-1» в комплексной терапии неонатальных бактериальных инфекций» // Материалы Ежегодного конгресса специалистов перинатальной медицины «Новые технологии в перинатологии», Москва, 21-22 ноября 2006 года, стр.59.
9. Володин Н.Н., Дегтярева М.В., Гордеев В.И., Тузанкина И.А., Смирнов М.Н., Бабаченко И.В., Аболина Т.Б., Погорельчук В.В., Авдеева Ж.И., Ашиткова Н.В., Золотарева С.А. «Ронколейкин в терапии гнойно-септических заболеваний у детей» // «Биопрепараты». - Март, 2008, стр.20-26.

10. Володин Н.Н., Дегтярева М.В., Солдатова И.Г., Ашиткова Н.В. «Интерлейкин-2: опыт клинического применения в неонатологии» // Пособие для врачей. «Новая альтернативная полиграфия», Санкт-Петербург, 2008, 18 страниц.
11. Ашиткова Н.В., Солдатова И.Г., Дегтярева М.В., Володин Н.Н. «Оценка клинической эффективности Ронколейкина у новорожденных детей с осложненным течением неонатального периода и абсолютной лимфопенией» // Материалы III Ежегодного конгресса и VI Съезда Российской ассоциации специалистов перинатальной медицины «Современная перинатология: организация, технология и качество», Москва, 29-30 октября 2008 г., стр.9.
12. Ашиткова Н.В., Дегтярева М.В., Володин Н.Н., Солдатова И.Г., Бирюкова Т.В., Беляева И.Д., Эверстова Т.Н., Кыштымов М.В., Милева О.И., Мумрикова М.А. «Диагностическое и прогностическое значение лимфопенических состояний у новорожденных детей с осложненным течением неонатального периода» // «Педиатрия». Журнал имени Г.Н.Сперанского, 2009, № 1, стр. 49-54.
13. Ашиткова Н.В., Володин Н.Н., Дегтярева М.В., Солдатова И.Г., Беляева И.Д., Эверстова Т.Н., Кыштымов М.В., Давыдова Н.В., Продоус А.П., Котов А.Ю., Симбирцев А.С. «Оценка клинической эффективности препарата рекомбинантного интерлейкина-2 человека – Ронколейкина в комплексной терапии неонатального сепсиса и тяжелых неонатальных инфекций, сопровождающихся абсолютной лимфопенией» // «Педиатрия». Журнал имени Г.Н.Сперанского, 2009, № 3

Список использованных сокращений.

| | |
|---------------|---|
| ГВ | - гестационный возраст |
| ДИ | - доверительный интервал |
| ИВЛ | - искусственная вентиляция лёгких |
| ИЛ | - интерлейкин |
| ИЛ-1РА | - рецепторный антагонист ИЛ-1В |
| ИФА | - иммуноферментный анализ |
| ИФН-γ | - интерферон – γ |
| НЭК | - некротизирующий энтероколит |
| СРБ | - С - реактивный белок |
| ТКФ | - точный критерий Фишера |
| ЭНМТ | - экстремально низкая масса тела |
| IT | - Immature/Total (отношение числа юных форм нейтрофилов к общему числу гранулоцитов периферической крови) |
| CD | - кластеры дифференцировки |

Заказ № 115/02/09 Подписано в печать 19.02.2009 Тираж 200 экз. Усл. п.л. 1,5



ООО "Цифровичок", тел. (495) 797-75-76; (495) 649-83-30
www.cfr.ru ; e-mail: info@cfr.ru