

ОЦЕНКА ВЫРАЖЕННОСТИ ПОЛИОРГАННОЙ ДИСФУНКЦИИ У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ ПО УРОВНЮ РАСТВОРИМОГО РЕЦЕПТОРА ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ P55.

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»,
ГУ «Республиканский научно-практический центр
трансфузиологии и медицинских биотехнологий»

Исследована информативность растворимого рецептора фактора некроза опухолей как маркера тяжести полиорганной дисфункции у недоношенных новорожденных. Установлены его пороговые значения и оптимальные сроки проведения исследования.

Ключевые слова: новорожд денный, фактор некроза опухолей- α , полиорганная дис-функция.

Y.A. Ustinovich, S.T. Akalovich

MULTIPLY ORGAN DYSFUNCTION EVALUATION IN PREMATURE NEWBORNS BY SOLUBLE TUMOR NECROSIS FACTOR- α RECEPTOR P55 LEVEL.

The authors investigated the levels of soluble tumor necrosis factor- α receptor p55 as a marker of multiply organ dysfunction severity in premature newborns. The diagnostic levels of soluble tumor necrosis factor- α receptor p55 and optimal time of evaluation had been defined

Key words: newborn, tumor necrosis factor- α , multiply organ dysfunction.

Универсальной защитной реакцией на повреждение, выработанной в процессе многовекового развития живых организмов, является воспаление. Воспалительная реакция сопровождает все расстройствa жизненно важных функций организма, будь то травма, асфиксия или инфекционная инвазия. На появившуюся «проблему» организм реагирует стереотипно, так, как его научила «природа». Происходит выброс медиаторов воспаления, призванных обеспечить адекватный ответ на повреждение. Организм начинает реагировать путем синтеза белков острой фазы воспаления, мобилизации лейкоцитов из костного мозга, перераспределением кровотока в пользу обеспечения условий для реализации воспалительного ответа и т.д.

Особенностью организма новорожденного ребенка является преобладание общих реакций над местными, что привносит определенные трудности в постановке диагноза и выборе корректной терапии. Преждевременное рождение вынуждает незрелого ребенка пытаться адаптироваться к новым условиям существования, к которым они ещё не готов. Морфологическая и функциональная незрелость предопределяют развитие полиорганной дисфункции, которую, в силу взаимосвязанности физиологических процессов, происходящих при участии многих органов, корректнее называть мультисистемной. Воспалительная реакция в тяжелых случаях не ограничивается локальным процессом и приобретает характер синдрома системного воспали-

тельного ответа (ССВО).

Мультисистемная дисфункция сопровождается взаимосвязанным расстройством работы органов дыхания, кровообращения, выделения, пищеварения и др. В такой ситуации раннее определение степени тяжести патофизиологических изменений может и должно являться сигналом к активной тактике лечения. Первоначально синдром полиорганной дисфункции расценивался как результат непосредственного прямого поражения конкретного органа (органов), позже механизмы его развития стали описывать в контексте ССВО.

Иммунокомпетентные клетки вырабатывают ряд веществ, которые инициируют воспалительный ответ, мобилизуют другие клетки, участвующие в воспалительном ответе, элиминирующие продукты деструкции тканей и создающие плацдарм для регенерации. Эти вещества относятся к различным классам. Эйкозаноиды имеют липидную природу, являясь продуктами окисления арахидоновой кислоты. К ним относятся простагландины, лейкотриены, тромбоксаны и липоксины, фактор активации тромбоцитов. Цитокины – вещества пептидной природы, представлены интерлейкинами, интерферонами, факторами некроза опухолей, хемокинами и колонийстимулирующими факторами. Помимо цитокинов и эйкозаноидов, вырабатываются белки острой фазы воспаления, вазоактивные амины, нейрпептиды и монооксид азота.

Оригинальные научные публикации

ФНО- α – (фактор некроза опухолей- α) продуцируется мононуклеарными фагоцитами, оказывает провоспалительное (стимуляция выработки интерлейкина-1 и интерлейкина-6) и противовоспалительное действие, усиливает иммунный ответ. Влияет на очень большое количество процессов, индуцирует противоопухолевой иммунный ответ, экспрессию молекул адгезии, активирует нейтрофилы, усиливает фагоцитарную активность, вызывает сосудистые тромбозы и некроз опухолей, индуцирует апоптоз многих клеток, вторичную продукцию цитокинов клетками стромы. В процессе воспалительного ответа синтезируется одним из первых и служит пусковым фактором для продукции других цитокинов. ФНО- α является важным медиатором, играющим роль в патогенезе сепсиса и септического шока. В процессе внутриутробного развития продукция ФНО- α резко (в 4-5 раз) возрастает к 7-10 неделям гестации. Исследователи объясняют этот феномен предстоящей плацентацией и развитием лимфоидно-макрофагальной системы плода, клетки которой являются основными его продуцентами [5, 6]. В последующие недели внутриутробного развития уровень ФНО- α снижается и остается относительно стабильным до окончания срока беременности и в последующие месяцы жизни. Таким образом в норме уровень ФНО- α примерно одинаков как у недоношенных новорожденных, так и у доношенных и у здоровых грудных детей. С началом воспалительного ответа уровень ФНО- α повышается одним из первых.

Большой проблемой обследования новорожденных детей, особенно недоношенных, с очень и чрезвычайно низкой массой тела при рождении, является малый объем циркулирующей крови. Забор крови для анализов провоцирует анемию. Перспективной альтернативой при диагностике ССВО у новорожденных является определение маркеров воспаления и их рецепторов в моче. Этому способствует особенность функции почек новорожденного ребенка, заключающаяся в относительно стабильном (пусть и сниженном) уровне гломерулярной фильтрации и крайне низкая концентрационная способность. Эти особенности определяют устойчивую корреляцию между концентрациями экскретируемых веществ в плазме крови и в моче.

Цель исследования заключалась в оценке информативности определения концентрации растворимого рецептора ФНО- α р55 в динамике раннего неонатального периода как маркера ССВО и тяжести мультисистемной дисфункции.

Материалы и методы. Проведено комплексное клиническое и лабораторное обследование 78 недоношенных новорожденных, родившихся в сроке гестации менее 239 дней (не более 34 недель включительно). Масса тела при рождении этих детей составила 605-2430г. Обследование начиналось в момент рождения в родильном зале или операционной (при рождении путем операции кесарева сечения) и динамически продолжалось до выписки из стационара домой. Дети родились в Республиканском научно-практическом центре «Мать и дитя», после рождения находились на лечении в отделении анестезиологии и реанимации с палатами интенсивной терапии для новорожденных. После рождения все обследованные дети имели признаки дыхательной недостаточности, получили сурфактантную терапию, после которой различное время продолжали оставаться на искус-

ственной вентиляции легких (ИВЛ). У всех детей рентгенологически был верифицирован диагноз респираторного дистресс-синдрома (РДС).

Забор мочи для определения концентрации рецептора р55 проводился в 1-е сутки по-сле рождения, затем на 2-3 сутки и на 5-7 сутки жизни.

Определение концентрации рецептора р55 в образцах мочи новорожденных проводилось с помощью «сандвич»-ИФА на основе моноклональных антител по методикам, разработанным ранее в лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии ГУ «РНПЦ гематологии и трансфузиологии» под руководством д.м.н. Н.Н. Войтенка [9]. Моноклональные антитела (МКА) В5, специфичные к растворимому рецептору ФНО- α р55, сорбировали на твердой фазе в концентрации 5 мкг/мл в 0,1 М карбонатном буфере, рН 9,6, в течение 12-18 часов при +4°C. В лунки вносили двукратные разведения растворимого р55 в качестве стандарта и разведения образцов биологических жидкостей в 10 мМ фосфатно-солевом буфере, рН 7,4, содержащем 0,05% Твин-20 и 0,5% бычьего сывороточного альбумина (ФСБ-Т-БСА), и инкубировали при 18-20°C в течение 50 мин при встряхивании. Биотинилированные МКА А11, специфичные к растворимому рецептору ФНО- α р55, а затем и конъюгат стрептавидин-полипероксидазы хрена («Zymed») в ФСБ-Т-БСА вносили и инкубировали в течение 30-40 мин аналогично предыдущему этапу. После каждого этапа инкубации планшеты промывали три раза 10 мМ фосфатно-солевым буфером, рН 7,4, содержащим 0,05% Твин-20 (ФСБ-Т). Ферментативную активность пероксидазы измеряли в присутствии тетраметилбензидина при длине волны 450 нм.

Результаты и обсуждение.

В зависимости от концентрации рецептора р55 в моче в каждой из динамик дети делились на 2 группы. В первую входили недоношенные новорожденные у которых концентрация рецептора р55 в моче не превышала 28,9 нг/мл. Этот уровень был взят в качестве порогового на основании результатов предыдущих исследований [2, 3, 4].

Наиболее значимые результаты получены при анализе содержания рецептора р55 во второй динамике – в моче, взятой на исследование на 2-3 сутки постнатальной жизни. У 35 недоношенных новорожденных уровень этого маркера не превышал 28,9 нг/мл (1-я группа), а у 43 младенцев он был выше (2-я группа). Статистический анализ установил, что гестационный возраст и масса тела при рождении не имели достоверных различий при межгрупповом сравнении ($p=0,31$ и $p=0,11$ соответственно). Основным клиническим диагнозом в обеих группах был РДС. Степень тяжести РДС от I до IV оценивалась на основании рентгенологической картины легких [1]. Врожденная пневмония, врожденный сепсис встречались у новорожденных обеих групп, достоверных различий по частоте встречаемости этих диагнозов в группах не было ($p=0,53$).

Сурфактантная терапия всем детям проводилась препаратом порактант альфа. Доза препарата (фосфолипидов), введенная пациентам первой группы составила 146 ± 37 мг/кг и статистически достоверно не отличалась от дозы сурфактанта, полу-

Таблица 1. Динамика состояния обследованных детей и длительность потребовавшейся респираторной терапии, Ме (25; 75 перцентили).

	Группа 1 ($p55 \leq 28,9$ нг/мл)	Группа 2 ($p55 > 28,9$ нг/мл)	P=
Крайне тяжелое состояние, сутки	3,0 (2,0; 6,0)	6,5 (3,0; 16,0)	0,004
Суммарно тяжелое состояние, сутки	29 (18; 40)	38 (27; 54)	0,041
Длительность ОИТР, сутки	11 (4; 23)	21 (8; 33)	0,010
Длительности ИВЛ, часов	24 (9; 48)	57 (19; 144)	0,019
Длительность кислородотерапии, сутки	4 (1; 8)	7 (4; 23)	0,010

ченной детьми второй группы: 156 ± 47 мг/кг ($p=0,32$). Кратность потребованной сурфактантной терапии составила от 1 до 3 раз и также достоверно не отличалась между группами ($p=0,67$). В то же время тяжесть клинического состояния, его динамика и лечебные мероприятия имели значимые отличия между группами.

Дети из второй обследованной группы дольше находились в крайне тяжелом состоянии. Общая длительность периода, когда состояние расценивалось как крайне тяжелое, очень тяжелое и тяжелое во второй группе также была выше. Эти дети достоверно дольше нуждались в лечении в условиях отделения интенсивной терапии и реанимации (ОИТР), позже переводились на второй этап выхаживания. Данные приведены в таблице 1.

Длительность лечения до выписки домой достоверно не отличалась, но этому имеется объяснение. Недоношенный ребенок выписывается из отделения второго этапа выхаживания после того, как он достигнет определенной морфофункциональной зрелости, позволяющей ему находиться дома, наберет массу тела ближе к 2500 г (цифра приблизительная). Но если относительно большую часть времени пациент проводит не в ОИТР, а в отделении выхаживания, это существенно снижает стоимость лечения.

Данные таблицы 1 также демонстрируют, что дети из первой группы достоверно меньше времени нуждались в ИВЛ и в кислородотерапии. В итоге частота развития бронхолегочной дисплазии (БЛД) у пациентов первой группы оказалась ниже, чем у детей из второй группы ($p=0,047$).

БЛД на сегодняшний день рассматривается как полиэтиологическое заболевание, в развитии которого принимают участие многие факторы, тесно переплетающиеся между собой. Каскад воспалительного повреждения незрелых легких при РДС усугубляется инфекционным фактором и вынужденно проводимой респираторной терапией. Со стороны респираторной терапии имеет место баротравма, волюмотравма и токсическое воздействие повышенных концентраций кислорода во вдыхаемой смеси газов. Инвазивность респираторной поддержки продиктована тяжестью поражения легких, для оценки которого предложено множество показателей. Достижение адекватной оксигенации крови возможно несколькими путями. С одной стороны можно использовать высокие концентрации кислорода. С другой стороны, возможно использование более высоких уровней давления на вдохе и выдохе, большей частоты дыхания при меньших концентрациях кислорода. Одним из показателей, отражающих тяжесть поражения легких и, при этом учитывающих совокупность факторов, является индекс оксигенации (ИО) [1]. ИО является мерой оксигенации с учетом давления в дыхательных путях и фракции вдыхаемого кислорода. ИО рассчитывается как произведение среднего давления в дыхательных путях (mmHg) X процент кислорода во вдыхаемой смеси / парциальное напряжение кислорода в крови.

Для здоровых легких ИО составляет 1,0. Легкое нарушение сопровождается подъемом ИО до 2,5, при среднетяжелом поражении легких ИО возрастает до 15,0. Тяжелое поражение легких проявляется ростом ИО до 30,0.

Анализ ИО в группах обследованных детей в динамике раннего неонатального периода представлен на рисунке 1. Данные рисунка 1 констатируют, что у детей с высокими уровнями рецептора р55 в моче на 2-3 сутки жизни имеет место более выраженное расстройство легочного газообмена на протяжении всего раннего неонатального периода.

Дети с высокими концентрациями рецептора р55 нуждались в достоверно большем количестве гемотрансфузий для коррекции гемической гипоксии ($p=0,0223$).

Величина концентрации рецептора р55 в моче на 2-3 сутки жизни позволяет судить о тяжести мультисистемной дисфункции, прогнозировать особенности течения постнатального периода и, соответственно, объемы лечебных мероприятий. Известно, что в тяжелом состоянии организм мобилизует внутренние ресурсы на обеспечение в первую очередь наиболее жизненно важных, так называемых приоритарных органов. Кишечник таковым не является и его функция страдает одной из первых. На рисунке 2 представлены данные о динамике энтеральной нагрузки у детей обследованных групп.

Данные на рисунке 2 демонстрируют, что дети первой группы лучше усваивали энтеральное питание, что позволяло быстрее его наращивать. Эти данные необходимо учитывать при планировании режима кормления недоношенного новорожденного. На практике нередко возникает ситуация, когда на каком-то этапе, после очередного увеличения энтеральной нагрузки, происходит срыв функции желудочно-кишечного тракта. В процессе лечения недоношенного ребенка следует помнить о его морфофункциональной незрелости, полиорганной дисфункции, обусловленной как недоношенностью, так и основным заболеванием. Кишечник, как неприоритарный орган, оказывается весьма уязвимым к завышенным нагрузкам и, после очередного увеличения объема кормления, может не справиться с поставленной задачей. Знание интенсивности ССВО позволяет прогнозировать толерантность к пище. Данные рисунка 1 позволяют планировать программу кормления. Основываясь на концентрации растворимого рецептора р55 в моче на 2-3 сутки жизни по рисунку 2 можно определить величину калорической нагрузки и темп ее ежедневного увеличения, превышать который не следует из-за опасности срыва энтерального кормления.

Исследование концентрации рецептора р55 в моче в первые сутки после рождения не показало высокой информативности этого показателя. Дети с уровнем $p55 \leq 28,9$ нг/мл имели тенденцию к более низким показателям ИО, но достоверные различия ($p=0,048$) были отмечены только на второй день респираторной терапии/жизни. Меньшую информативность теста в первые сутки можно объяснить следующим. После рождения легкие раскрываются и начинают дышать. Этот процесс запускает каскад воспалительной реакции, но уровни медиаторов воспаления и, в частности, ФНО- α нарастают постепенно. Для достижения диагностически значимых концентраций необходимо время. Это относится не только к ФНО- α , но и ко многим другим маркерам, таким как интерлейкин-8, прокальцитонин, С-реактивный белок и др. [4, 7, 8]. Концентрация цитокинов в биологических средах после достижения пиковых величин относительно быстро уменьшается. К 5-7 суткам жизни количество детей с уровнем р55 более 29 нг/мл уменьшилось на треть и его диагностическая и прогностическая ценность не получила статистически достоверного подтверждения. Высокие концентрации рецептора р55 на 5-7 сутки жизни в моче недоношенных новорожденных достоверно ($p=0,037$) указывали только на большую длительность предстоящей антибактериальной терапии: в первой группе она составила $35,9 \pm 14,9$ суток, а во второй 44,2 \pm 15,2 дня.

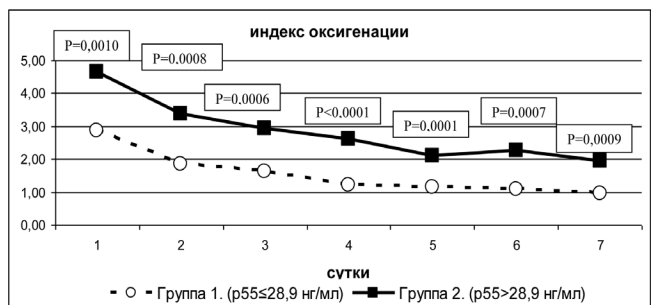


Рисунок 1. Величина индекса оксигенации у обследованных детей.



Рисунок 2. Динамика энтеральной нагрузки у детей обследованных групп.

■ Оригинальные научные публикации

Выводы

1. Наиболее информативным маркером мультисистемной дисфункции у недоношенных новорожденных растворимый рецептор ФНО- α p55 в моче служит при его определении на 2-3 сутки после рождения.

2. Концентрация растворимого рецептора ФНО- α p55 в моче у недоношенных новорожденных 29 нг/мл и более сопровождается достоверно более выраженными проявлениями мультисистемной дисфункции, что проявляется большей длительностью кислородотерапии и нахождения на ИВЛ, необходимостью в более жестких параметрах вентиляции, низкой толерантностью к энтеральной нагрузке. Такие пациенты чаще нуждаются в гемотрансфузиях и имеют более высокий риск формирования БЛД.

Литература

1. Вауэр, Р. Сурфактант в неонатологии. Профилактика и лечение респираторного дистресс-синдрома новорожденных: пер. с нем. / Р. Вауэр.- М.: Мед. лит., 2011.- 96 с.

2. Диагностическая значимость определения растворимого рецептора фактора некроза опухолей p55 в моче недоношенных новорожденных при оценке тяжести патологического течения раннего неонатального периода / Г.А. Шишко (и др.) // Сборник материалов Республиканской научно-

практической конференции «Современные медицинские технологии, обеспечивающие здоровье матери и ребенка» 2009г.- с.186-189.

3. Прогнозирование риска реализации и тяжести течения внутриутробного инфицирования у новорожденных: пособие для врачей/ Г.А. Шишко, Ю.А. Устинович, И.М. Крастелева (и др.) // Минск: Зималетто, 2010.- 20 с.

4. Устинович, Ю.А. Неинвазивная диагностика синдрома системного воспалительного ответа и полиорганной дисфункции у недоношенных новорожденных / Ю.А. Устинович, И.М. Крастелева, Ю.В. Котлинская // Укр. мед. журнал.- 2011.- с. 1-3, 10 мая (электронная публикация).

5. Феррокинетика и цитокины в раннем онтогенезе человека / Т.В. Казюкова (и др.) // Педиатрия.- 2008.- Т. 87, №1.- С. 7-17.

6. Piccinni, M.P. T-cell cytokines in the maintenance of pregnancy / M.P. Piccinni, E. Maggi, S. Romagnani // Biochem. Soc. Trans.- 2000.- Vol. 28.- P. 212–215.

7. Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects/ P. Dandona [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab.- 1994.- Vol. 79.- P. 605-608.

8. Silveira, R.C. Evaluation of interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta for early diagnosis of neonatal sepsis / R.C. Silveira, R.S. Procianoy // Acta Paediatrica.- 1999.- Vol. 88.- P. 647-650.

9. TNF receptor p55 and IL-872 and IL-877 isoforms: blood and urine levels in breast cancer patients / Shichkin V.P., Lon A.D., Yuginova L.G., Grinevich Y.A., Belova O.B., Berezhnaya N.M., Akalovich S., Pashkova O., Voitenok N.N. // Journal of Immunotoxicology. – 2009. – Vol. 6. – P. 235-242.

Поступила 31.08.2012