

# Провоспалительный цитокиновый профиль у детей с неонатальным сепсисом

Х.С. Хаертынов<sup>1</sup>, В.А. Анохин<sup>1</sup>, А.А. Ризванов<sup>2</sup>, Е.В. Мартынова<sup>2</sup>, С.А. Любин<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Казань;

<sup>2</sup>ФГАОУВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства образования РФ, Казань;

<sup>3</sup>ГАУЗ «Городская детская больница № 1», Казань, Россия

## Proinflammatory cytokine profile in children with neonatal sepsis

Kh.S. Khaertynov<sup>1</sup>, V.A. Anokhin<sup>1</sup>, A.A. Rizvanov<sup>2</sup>, E.V. Martynova<sup>2</sup>, S.A. Lubin<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Kazan State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Kazan;

<sup>2</sup>Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia;

<sup>3</sup>City Children's Hospital No.1, Kazan, Russia

**Цель.** Оценка воспалительной активности крови новорожденных при различных формах бактериальных инфекционных заболеваний с определением диагностической значимости различных маркеров воспаления.

**Материал и методы.** В исследование включены 50 новорожденных детей с различными формами инфекционных заболеваний: 31 новорожденный ребенок с неонатальным сепсисом (1-я группа) и 19 новорожденных с локализованными вариантами бактериальной инфекции. Выраженность воспалительной активности оценивалась по уровню С-реактивного белка, количеству лейкоцитов периферической крови, уровню цитокинов – фактора некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ), интерлейкинов ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, интерферона- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ).

**Результаты.** В группе детей с неонатальным сепсисом первые 2 дня заболевания протекают на фоне повышения концентрации в крови ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-8 и ИФН- $\gamma$ , показатели которых достоверно отличались ( $p < 0,05$ ) от таковых контрольной группы. Значимыми маркерами воспаления были высокие концентрации в крови С-реактивного белка (RR 3,7; ДИ 1,7–8,1), ИЛ-6 (RR 2,0; ДИ 1,4–3,0) и ИЛ-8 (RR 1,5; ДИ 1,1–2,2).

В группе детей с локализованными формами бактериальной инфекции первые 2 дня заболевания сопровождались повышением концентрации в крови ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6 и ИФН- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ). При этом степень повышения концентрации ИЛ-6 была менее выраженной, чем в 1-й группе ( $p = 0,007$ ), а медиана ИЛ-8 не отличалась от показателей контрольной группы ( $p = 0,7$ ).

**Заключение.** Иммунный ответ при неонатальном сепсисе и локализованных формах бактериальной инфекции характеризуется повышением в крови уровня провоспалительных цитокинов. Надежными маркерами воспаления при сепсисе являются ИЛ-6, ИЛ-8 и С-реактивный белок, значения которых были достоверно высокими в группе детей с неонатальным сепсисом.

**Ключевые слова:** дети, неонатальный сепсис, воспаление, цитокины.

**Для цитирования:** Хаертынов Х.С., Анохин В.А., Ризванов А.А., Мартынова Е.В., Любин С.А. Провоспалительный цитокиновый профиль у детей с неонатальным сепсисом. Рос вестн перинатол и педиатр 2017; 62:(5): 93–100. DOI: 10.21508/1027-4065-2017-62-5-93-100

**Research objective.** Evaluation of inflammatory activity of the blood of newborns with various forms of bacterial infectious diseases with the determination of the diagnostic significance of various inflammatory markers.

**Materials and methods.** The study includes 50 newborns with various forms of infectious diseases: 31 newborns with neonatal sepsis (group 1) and 19 newborns with localized variants of bacterial infection. The severity of inflammatory activity was assessed by the level of C-reactive protein, the number of peripheral blood leukocytes, the level of cytokines-tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukins IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF).

**Results.** In the group of children with neonatal sepsis, the first 2 days of the disease occur against the background of an increase in the concentration of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 and IFN- $\gamma$  in the blood, the indices of which differed significantly ( $p < 0.05$ ) from the control group. Significant markers of inflammation were high concentrations in the blood of the C-reactive protein (RR-3.7, CI 1.7-8.1), IL-6 (RR-2.0, CI 1.4-3.0), and IL-8 (RR-1.5, CI 1.1-2.2).

In the group of children with localized forms of bacterial infection, the first 2 days of the disease were accompanied by an increase in the concentration in the blood of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IFN- $\gamma$  ( $p < 0.05$ ). Moreover, the degree of increase of IL-6 was less pronounced than in the 1st group ( $p = 0.007$ ), and the median IL-8 did not differ from the control group ( $p = 0,7$ ).

**Conclusion.** The immune response for neonatal sepsis and localized forms of bacterial infection is characterized by an increase in the level of proinflammatory cytokines in the blood. Reliable markers of inflammation in sepsis are IL-6, IL-8 and C-reactive protein, the values of which were significantly high in the group of children with neonatal sepsis.

**Key words:** children, neonatal sepsis, inflammation, cytokines.

**For citation:** Khaertynov Kh.S., Anokhin V.A., Rizvanov A.A., Martynova E.V., Lubin S.A. Proinflammatory cytokine profile in children with neonatal sepsis. Ros Vestn Perinatol i PEDIATR 2017; 62:(5): 93–100 (in Russ). DOI: 10.21508/1027-4065-2017-62-5-93-100

© Коллектив авторов, 2017

**Адрес для корреспонденции:** Хаертынов Халит Саубанович – к.м.н., доц. кафедры детских инфекций Казанского государственного медицинского университета, ORCID – 0000-0002-9013-4402

Анохин Владимир Алексеевич – д.м.н., проф., зав. кафедрой детских Казанского государственного медицинского университета, ORCID – 0000-0003-1050-9081

420012 Казань, ул. Булгерова, д. 49

Ризванов Альберт Анатольевич – д.б.н., проф. кафедры генетики Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) феде-

рального университета, ORCID – 0000-0002-9427-5739

Мартынова Екатерина Владимировна – научн. сотр. Open Lab «Генные и клеточные технологии» Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, ORCID – 0000-0003-1537-3099

420021 Казань, ул. Парижской коммуны, д. 9

Сергей Анатольевич Любин – зав. отделением реанимации новорожденных городской детской больницы № 1, ORCID – 0000-0002-1322-2601  
420034 Казань, ул. Декабристов, д. 125а

**Н**еонатальный сепсис – актуальная инфекционная патология новорожденных [1, 2]. Риск его развития, как правило, ассоциируется с недоношенностью и низкой массой тела при рождении, что связывают с незрелостью иммунной системы новорожденного ребенка [3–5]. Неонатальный сепсис, к сожалению, неспецифичен в своих проявлениях, что затрудняет его своевременную диагностику. Как следует из описаний клинической картины, он может проявляться как повышением температуры тела, так и гипотермией, разного рода респираторными расстройствами, угнетением сознания либо возбуждением, тахи- или брадикардией, «мраморностью» кожи, напряжением мышц живота, плохим аппетитом и т.п. [6].

Основным лабораторным критерием диагноза является обнаружение микроорганизма в крови [7]. Однако вероятность получения такого результата, даже при достаточно очевидной клинике сепсиса, к сожалению, невысока. Это объясняется множеством факторов: и корректной техникой забора материала, и наличием пренатальной антибиотикотерапии, и массивностью бактериемии, и возможностями, а главное, опытом персонала лаборатории и т.п. [2]. Практика показывает, что примерно 60–70% детей с сепсисом имеют низкий уровень бактериемии, поэтому чувствительность бактериологического метода исследования (даже при соблюдении всех других условий) «оставляет желать лучшего» [8]. Более того, нужно не менее 48 ч для получения результатов бактериологического исследования крови [8], что в условиях очевидного лимита времени в работе с этой патологией – непростительно много. Поэтому «опорой» ранней диагностики неонатального сепсиса становятся другие лабораторные показатели.

Начальная стадия сепсиса (первые 2–3 дня заболевания), как известно, сопровождается мощной активацией клеток иммунной системы и синтезом преимущественно провоспалительных цитокинов – фактора некроза опухоли- (ФНО-), интерлейкинов ИЛ-1 $\beta$ , 2, 6, 8, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), С-реактивного белка, прокальцитонина [9, 10]. Результат этих процессов – развитие синдрома системного воспалительного ответа, являющегося одной из «составляющих» диагноза «сепсис» [11, 12]. Установлено, что ранняя диагностика сепсиса по показателям синдрома системного воспалительного ответа и соответственно своевременно предоставленная помощь снижают риск развития септического шока и увеличивают выживаемость пациентов [13]. Однако до сих пор не найден тот «идеальный» маркер сепсиса, который отличался бы одновременно и высокой чувствительностью, и специфичностью.

Несмотря на то, что ФНО-, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ГМ-КСФ объединяет провоспалительный эффект, функции этих цитокинов существенно шире.

С ИЛ-8, к примеру, ассоциируется миграция нейтрофилов в очаг воспаления, с ИЛ-2 – пролиферация и дифференцировка активированных Т-лимфоцитов, с ГМ-КСФ – пролиферация предшественников гранулоцитов и макрофагов [14]. Поэтому увеличение их концентрации в крови отражает не только выраженность воспалительной реакции, но и эффективность адаптации всех органов иммунной системы к складывающейся ситуации.

**Цель исследования:** оценка воспалительной активности крови новорожденных при различных формах бактериальных инфекционных заболеваний с определением диагностической значимости различных маркеров воспаления.

#### Характеристика детей и методы исследования

В исследование включены 50 новорожденных детей с различными формами инфекционных заболеваний. В 1-ю группу вошел 31 новорожденный ребенок с неонатальным сепсисом, находившийся на стационарном лечении в отделении интенсивной терапии новорожденных Городской детской больницы №1 г. Казани. Из них 19 (61%) детей родились недоношенными, в том числе 10 детей с очень низкой массой тела. Большинство (70%) пациентов этой группы – мальчики. Диагноз «сепсис» устанавливался на основании клинико-лабораторных данных: наличие одного или нескольких очагов инфекции, развитие синдрома системного воспалительного ответа с повышением уровня С-реактивного белка в крови более 1,5 мг/дл, а также выделение микроорганизма из венозной крови. Бактериemia зарегистрирована у 13 (42%) детей: у 9 – из крови была выделена *Klebsiella pneumoniae* (в 8 случаях бактерии продуцировали  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра действия), у 3 – *Staphylococcus epidermidis*, у одного ребенка – *Streptococcus agalactae*. Раннее развитие неонатального сепсиса отмечалось у 5 (16%) детей, у остальных 26 (84%) детей – позднее начало болезни. Очаги инфекции клинически и лабораторно подтверждены у 29 детей. У 12 (38,7%) детей неонатальный сепсис протекал с явлениями пневмонии, у 5 (16,2%) развился некротический энтероколит, у 9 (29%) наблюдалось одновременное развитие пневмонии и некротического энтероколита, у 3-х (9,7%) диагностирован гнойный менингит. В 2 (6,4%) случаях заболевание протекало в форме септицемии. Трое детей погибли (непосредственная причина смерти – полиорганная недостаточность). Подробная характеристика пациентов представлена в табл. 1.

Во 2-ю группу вошли 19 новорожденных с локализованными формами бактериальной инфекции – пиодермией. Половина из них – мальчики. Пять (26%) детей родились недоношенными.

Контрольную группу составили 12 здоровых детей аналогичного возраста, 5 (42%) из которых родились недоношенными.

Периферическую кровь детей сепарировали после ее забора и в объеме 100 мкл замораживали при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  для последующего использования. Образцы собирали в течение первых 2 дней от начала клинических и лабораторных проявлений заболевания и затем повторно через 7 дней.

Уровень сывороточных цитокинов измеряли на анализаторе Luminex 200 (Austin, TX) с использованием реагентов Millipore Human Milliplex<sub>MAPS</sub>-ingle-Plexcytokinekits (Millipore, Billerica, MA, США). Уровень TNF-, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, интерферона- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ) и ГМ-КСФ определяли в соответствии с инструкцией производителя.

Количественное определение С-реактивного белка в крови проводилось иммунотурбидиметрическим методом [15] на анализаторе «Cobas Integra 800» с использованием набора реагентов компании Roche (Швейцария), согласно инструкции производителя.

Статистический анализ выполняли с помощью непараметрических методов Манна–Уитни, Вилкоксона и Крускала–Уалиса (Statistica for Windows 6,1 (Statsoft, Tulsa, OK, США)). Достоверность различий устанавливалась при значении  $<0,05$ . Корреляционный анализ осуществлен методом Спирмана. Для оценки диагностической значимости показателей С-реактивного белка, лейкоцитов и цитокинов установлены пороги отсечения изучаемых показателей, построены ROC-кривые (receiver operating characteristic) с определением площади под ними. Рассчитаны основные операционные характеристики каждого из лабораторных тестов: чувствительность и специфичность, отношение правдоподобия и прогностическое значение как положительного, так и отрицательного результатов теста, относительный риск развития оцениваемой патологии.

## Результаты

Установлено, что в группе детей с неонатальным сепсисом начальный период заболевания (первые 2 дня) протекает на фоне достоверного роста концентрации провоспалительных цитокинов в крови – ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-8 и ИФН- $\gamma$  ( $p < 0,05$  по сравнению с контролем, табл. 2). Наибольшие изменения выявлены в показателях ИЛ-6 и ИЛ-8, значения которых превышали контрольные в 10 раз и более.

Динамика уровня ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$  на этих сроках была однонаправленной и в целом сходной ( $r = 0,18$ ;  $p = 0,0007$ ). Корреляционный анализ уровня изучаемых цитокинов и классических маркеров воспаления (лейкоцитов, нейтрофилов и С-реактивного белка) выявил отрицательную связь ИЛ-8 с С-реактивным белком ( $r = -0,39$ ,  $p = 0,03$ ). Медиана значений ГМ-КСФ и ИЛ-2 не отличалась от таковой в контроле ( $p > 0,05$ ). Сравнение показателей с учетом гестационного возраста выявило различие только по одному цитокину – ИФН- $\gamma$ , медиана которого у недоношенных детей была достоверно низкой ( $p = 0,04$ ).

Поскольку у большинства (58%) детей с неона-

тальным сепсисом этиология заболевания не была подтверждена микробиологически, мы провели сравнение изучаемых показателей у детей с «доказанным» и «предполагаемым» сепсисом (т.е. у пациентов с положительным и отрицательным результатами посева крови соответственно). Значения ФНО- $\alpha$ , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИФН- $\gamma$  и ГМ-КСФ в обеих сравниваемых группах достоверно не различались ( $p > 0,05$ ; табл. 3).

Учитывая тот факт, что ГМ-КСФ и ИЛ-2 являются индукторами пролиферации и дифференцировки различных популяций лейкоцитов, нами проведены сравнения уровня этих цитокинов с числом нейтрофилов и лимфоцитов периферической крови. Достоверной корреляционной связи значений ИЛ-2 с лимфоцитами ( $r = 0,13$ ;  $p = 0,5$ ), а также ГМ-КСФ с нейтрофилами ( $r = -0,09$ ;  $p = 0,6$ ) не установлено.

Исследования в динамике течения неонатального сепсиса на фоне антибактериальной терапии выявило значимое снижение медианы большинства провоспалительных цитокинов: ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-8 ( $p < 0,05$ ; табл. 4).

Мы оценили значимость различных маркеров воспаления в диагностике неонатального сепсиса. Операционные характеристики тестов, выбранных в качестве прогностических, отражены в табл. 5. Наиболее значимыми были высокие показатели С-реактивного белка (RR 3,7; ДИ 1,7–8,1), ИЛ-6 (RR 2,0; ДИ 1,4–3,0) и ИЛ-8 (RR 1,5; ДИ 1,1–2,2).

Сравнительное изучение цитокинов в группах выживших и умерших пациентов выявило существенное повышение уровня ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ-8 в начальном периоде сепсиса у погибших детей. Однако эти различия не были статистически значимыми ( $p > 0,05$ ).

Во 2-й группе детей с локализованными формами бактериальной инфекции, как и в 1-й группе с неонатальным сепсисом, острый период заболевания сопровождался повышением концентрации в крови ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6 и ИФН- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ). При этом прирост активности ИЛ-6 был меньшим ( $p = 0,007$  по сравнению с 1-й группой).

## Обсуждение

Согласно современным представлениям, важную роль в реализации иммунного ответа организма на ранних сроках инфекционных заболеваний играет врожденный иммунитет [9, 14]. У новорожденных детей реакция врожденного иммунитета является не только основной, но и единственной формой иммунного ответа из-за практически полного отсутствия адаптивных реакций [4, 16]. Результатом такого рода активации является, как известно, синтез информационных молекул (цитокинов), выполняющих различные функции. Благодаря им, в частности, обеспечивается миграция клеток иммунной системы в очаг инфекции, что имеет решающее значение в локализации инфекционного процесса [4, 14, 17].

В нашем исследовании высокий уровень цитокинов крови в первые дни болезни наблюдали как при локализованных формах бактериальной инфекции, так и при неонатальном сепсисе. При этом значения ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6 и ИФН- $\gamma$  в обеих группах значительно отличались от контроля ( $p < 0,05$ ). В то же время развитие септического процесса сопровождалось значимым ростом уровня ИЛ-6 и ИЛ-8, отличавшимся от показателей контрольной группы и детей с локализованными формами инфекции ( $p < 0,05$ ). Медиана значений этих цитокинов была в 10 раз выше, чем в контрольной группе. Если учесть, что интерлейкины призваны обеспечивать короткодистантное межклеточное взаимодействие в зоне воспаления, то сам факт увеличения уровня в кровотоке с очевидностью свидетельствует об отсутствии эффективного контроля инфекционного процесса в организме. В нашем исследовании значения уровня в крови ИЛ-6 прямо коррелировали с уровнем ФНО- $\alpha$ , что указывает на тесное взаимодействие этих цитокинов в реализации воспалительного ответа.

Другой провоспалительный цитокин – ИЛ-8 является мощным хемоаттрактантом и индуцирует активацию нейтрофилов [9, 18]. На высокую диагностическую ценность повышенных величин ИЛ-6 и ИЛ-8 указывается в проведенных метаанализах по оценке роли этих цитокинов в диагностике неонатального сепсиса [19, 20]: высокие значения уровня ИЛ-8 ассоциируются с рисками развития не только самого сепсиса, но и в целом неблагоприятного исхода заболевания [21]. В исследованиях Н. Wong и соавт. показано, что уровень ИЛ-8 в крови менее 220 пг/мл – предиктор благоприятного исхода у детей с септическим шоком [21]. В нашем исследовании у двоих умерших детей уровень ИЛ-8 превышал 220 пг/мл, причем в обоих случаях диагноз был подтвержден выделением микроорганизмов из крови.

Несколько необычным нам показалось повышение в крови наших пациентов уровня ИФН- $\gamma$ . Причем рост его концентрации отмечали в острый период локализованных форм инфекции и неонатального сепсиса. Как известно, с ним ассоциируется противовирусная активность иммунной системы [22]. Однако в литературе появились публикации с сообщением о повышении уровня ИФН- $\gamma$  и при сепсисе у взрослых [23]. По мнению авторов, этот феномен связан с восстановлением функции макрофагов при так называемом «сепсис-индуцированном иммунопараличе» [24]. Однако не исключено, что рост показателя ИФН- $\gamma$  в нашем случае связан с сопутствующей внутриутробной вирусной инфекцией.

Показатели двух провоспалительных цитокинов – ИЛ-2 и ГМ-КСФ ни при локализованных формах бактериальной инфекции, ни при неонатальном сепсисе не продемонстрировали заметного изменения. Отсутствие реакции со стороны ИЛ-2 связано, вероятно, с тем, что основным источником синтеза этого

цитокина являются клетки адаптивного иммунитета, функциональная активность которого у детей периода новорожденности еще сравнительно невысока [25].

На выраженность и эффективность иммунного ответа существенное влияние оказывает не только инфекционный процесс, но и зрелость родившегося ребенка [26, 27]. Мы не установили достоверных различий в концентрации большинства цитокинов и С-реактивного белка у доношенных детей и недоношенных с гестационным возрастом менее 32 нед.

Как было отмечено выше, раннее выявление сепсиса по высокому уровню провоспалительных цитокинов и других маркеров воспаления имеет принципиальное диагностическое и прогностическое значения, особенно для детей периода новорожденности. Повышение концентрации в крови провоспалительных цитокинов при сепсисе наблюдается уже в первые 12 ч заболевания [28], тогда как рост уровня С-реактивного белка – классического и наиболее доступного в практике маркера, происходит только к концу 1-х суток [9, 28].

Наши сравнительные расчеты показали, что наибольшую диагностическую значимость при неонатальном сепсисе представляют высокие показатели С-реактивного белка, ИЛ-6 и ИЛ-8 (см. табл. 5). Прогностическое значение положительного результата для ИЛ-6 с порогом отсечения 73,5 пг/мл составило 93%, для ИЛ-8 (с уровнем более 70 пг/мл) – 88%, для С-реактивного белка выше 1,5 мг/дл – 89%.

Как показывают расчеты, NPV (прогностическое значение отрицательного результата теста) для ИЛ-6 и ИЛ-8, к сожалению, невелики – 54 и 40%, что не позволяет использовать их низкие показатели для исключения сепсиса. Оценивая полезность в работе обсуждаемых тестов, мы рассчитали показатель LR (отношение правдоподобия). ИЛ-6 в концентрации более 73,5 пг/мл имеет наибольшее значения LR+, равное 5,2, что позволяет рассматривать его как надежный. В то же время отношение правдоподобия отрицательного результата теста подтвердило мнение о том, что для исключения искомого диагноза мы можем пользоваться только низкими показателями С-реактивного белка (в нашем случае LR– равно 0,2).

Трудно переоценить значение положительного результата бактериологического исследования в диагностике сепсиса. Поскольку воспалительная реакция напрямую индуцируется продуктами микробного происхождения, можно предположить, что наибольшие показатели воспаления будут характерны для генерализованного бактериального процесса.

Может ли определение в крови маркеров воспаления стать альтернативой проведению бактериологического исследования при диагностике сепсиса? По-видимому, нет. Следует добавить, что частота выделения микроорганизмов из крови при сепсисе редко превышает 45% [10], в нашем исследовании детей с бактериемией было 42%. К сожалению,

сравнения показывают, что медианы значений как С-реактивного белка, так и ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ-8 в группе детей с бактериологически доказанным сепсисом не отличались от аналогичных показателей в группе детей без бактериемии ( $p > 0,05$ ).

Итак, проведенные исследования выявили своеобразный иммунный дисбаланс, проявившийся увеличением концентрации в крови провоспалительных цитокинов (ФНО- $\alpha$ , С-реактивного белка,

ИЛ-6 и ИЛ-8) в отсутствие роста других (ИЛ-2, ГМ-КСФ). Именно последнее замечание требует более детальной проработки этого вопроса и выяснения возможностей стимулирующей терапии с помощью указанных факторов [29].

Основной причиной снижения активности лимфоцитов и нейтрофилов при сепсисе является апоптоз. Показано, что при сепсисе наблюдается активация апоптоза лимфоцитов и именно с этим

Таблица 1. Характеристика обследованных детей

Table 1. Characteristics of the study groups

Параметры	Неонатальный сепсис (n=31)	Локализованные формы инфекции (n=19)	Контрольная группа (n=12)
Гестационный возраст, недель (Me; МКР)	37 (28–38)	38 (37–39)	36 (32–38)
Недоношенные, абс. (%)	19 (61)	5 (26)	5 (42)
Из них с ОНМТ, абс. (%)	10 (32)	0	0
Масса тела при рождении, г (Me; МКР)	2500 (1130–3390)	3340 (2960–3670)	2870 (1630–2930)
Оценка по шкале Апгар, баллы (Me; МКР)	7 (4–8)	8 (7–8)	8 (5–8)
Способ родоразрешения, абс. (%):			
- вагинальное	21 (68)	17 (89)	9 (75)
- кесарево	10 (32)	2 (11)	3 (25)
Пол, абс. (%):			
- мальчики	22 (71)	9 (47)	4 (33)
- девочки	9 (29)	10 (53)	8 (67)
Начало сепсиса, абс. (%):			
- раннее	5 (16)		
- позднее	26 (84)		
Локализация инфекции, абс. (%):			
- менингит	3 (10)		
- пневмония	12 (39)		
- энтероколит	5 (16)		
- пневмония и энтероколит	9 (29)		
- пиодермия			
- септицемия	2 (6)	19 (100)	
С-реактивный белок, мг/дл (Me; МКР)	2,5 (1,5–9,6)	0,3 (0,2–0,7)	0,1 (0,1–0,15)
Лейкоциты крови, $\cdot 10^9$ /л (Me; МКР)	15,4 (10,6–21)	12,4 (9,8–14,7)	8,1 (7,5–13,9)
Лимфоциты крови, $\cdot 10^9$ /л (Me; МКР); < $2 \cdot 10^9$ /л, абс., (%)	3,3 (2,3–5,5) 7 (23)	4,5 (3,7–5,8) 0	6,0 (5,4–6,9) 0
Тромбоциты крови, $\cdot 10^9$ /л (Me; МКР), < $50 \cdot 10^9$ /л, абс. (%)	91 (26,5–209,5) 11 (35)	279 (234–294) 0	344 (256–448) 0

Примечание. ОНМТ – очень низкая масса тела

Таблица 2. Цитокины крови у детей с различными клиническими формами бактериальных инфекций (Me, МКР)

Table 2. Serum cytokines in neonates with different forms of bacterial infections (Me, MQI)

Группа детей	ФНО- $\alpha$	ИЛ-2	ИЛ-6	ИЛ-8	ИФН	ГМФ-КС
Контрольная (n=12)	12 (8–16)	5 (1–26)	1,2 (0,5–3,2)	9,5 (5,1–15,4)	2 (1,6–2,8)	1,5 (0,9–2,4)
Дети с неонатальным сепсисом (n=31)	42 (19–64)	12 (3–21)	73,5 (5,9–340,5)	96 (24,1–410)	3,4 (2,5–9,1)	1,7 (1,3–2,5)
Дети с локализованной инфекцией (n=19)	29 (16–57)	17 (4–25)	12,3 (10,3–18,6)	6 (3,7–59,1)	3,2 (2,4–4,3)	1,7 (1,3–2,3)
$p_{1-2}$	0,0008	0,3	0,00002	0,0001	0,003	0,8
$p_{1-3}$	0,05	0,3	0,001	0,7	0,007	0,5
$p_{2-3}$	0,1	0,4	0,007	0,002	0,7	0,7

Примечание. Определение достоверности различий между группами проводилось методом Вилкоксона.

феноменом ассоциируется низкое количество и активность CD4+ и CD8+ лимфоцитов периферической крови [30, 31]. Явления апоптоза лимфоцитов зарегистрированы при иммуногистохимических исследованиях в различных тканях взрослых и детей, умерших от сепсиса [32–34]. Более чем в 70% случаях летальность при сепсисе опосредована не столько особыми патогенными свойствами возбудителя, сколько иммуносупрессией и вторичными нозокомиальными инфекциями [35].

Абсолютная лимфопения в отсутствие значимого повышения уровня ИЛ-2 в периферической крови отмечалась в нашем исследовании у 23 детей. Исследо-

ваниями М.В. Дегтяревой и соавт. показано, что применение рекомбинантного ИЛ-2 при лечении детей с неонатальным сепсисом способствует восстановлению числа лимфоцитов крови и снижению 28-дневной летальности [36]. Перспективным может стать также использование ИЛ-7 и ИЛ-15. Применение ИЛ-7 у мышей с индуцированным сепсисом восстанавливало функциональную активность Т-лимфоцитов, снижало выраженность их апоптоза и увеличивало выживаемость животных [37–39]. Подобное применение ИЛ-15 у мышей также уменьшало выраженность сепсис-индуцированного апоптоза NK-клеток, CD8+ лимфоцитов и дендритных клеток и улучшало выживаемость [40].

**Таблица 3. Цитокины крови у детей с доказанным и предполагаемым неонатальным сепсисом (Me; МКР)**

**Table 3. Serum cytokines in infants with proven and suspected neonatal sepsis (Me, MQI)**

Больные дети	ФНО-α	ИЛ-2	ИЛ-6	ИЛ-8	ИФН	ГМФ-КС
Предполагаемый неонатальный сепсис (n=19)	33 (16–77)	13 (03–21)	38,3 (2,7–288,8)	96 (10,8–649,5)	3,4 (2,4–8,6)	1,5 (0,7–1,9)
Доказанный неонатальный сепсис (n=12)	43 (26–54)	9 (2–29)	92,4 (10,1–387,5)	90 (28,5–410)	3,4 (2,7–9,3)	1,8 (1,4–2,6)
<i>p</i> <sub>1–2</sub>	0,8	0,7	0,5	0,9	0,8	0,3

*Примечание.* Определение достоверности различий между группами проводилось методом Манна–Уитни.

**Таблица 4. Показатели цитокинов в сыворотке крови у детей с неонатальным сепсисом в динамике заболевания (Me, МКР)**

**Table 4. Serum cytokines in neonates with sepsis in the dynamics of the disease (Me, MQI)**

Период заболевания	ФНО-α	ИЛ-2	ИЛ-6	ИЛ-8	ИФН	ГМФ-КС
Первые 2 дня заболевания	4,2 (1,9–6,4)	1,2 (0,3–2,1)	73,5 (5,9–340,5)	96 (24,1–410)	3,4 (2,5–9,1)	1,7 (1,3–2,5)
2 Через 7 дней от начала заболевания	1,8 (1,3–3,7)	2,5 (0,8–3,5)	5,1 (2,3–39)	7,6 (2,3–68)	3,2 (2,3–11,9)	1,7 (1,5–2,4)
<i>p</i> <sub>1–2</sub>	0,01	0,08	0,02	0,0006	0,7	0,8

*Примечание.* Определение достоверности различий проводилось методом Крускалла–Уитни.

**Таблица 5. Роль маркеров воспаления как предикторов развития неонатального сепсиса**

**Table 5. The role of markers of inflammation as predictors of the development of neonatal sepsis**

Показатель	Точка отсечения	Se	Sp	LR+	LR-	PPV	NPV	RR; 95 CI	Площадь под ROC-кривой	<i>p</i>
СРБ, пг/дл	> 1,5	83	84	5,2	0,2	89	76	3,7; 1,7–8,1	0,880	< 0,01
ФНО-α, пг/дл	> 4,2	48	68	1,5	0,7	71	44	1,2; 0,8–1,9	0,388	> 0,05
ИЛ-6, пг/мл	> 73	50	94	8,3	0,5	93	54	2; 1,4–3,0	0,718	< 0,01
ИЛ-8, пг/мл	> 70	55	82	3,0	0,5	88	40	1,5; 1,1–2,2	0,765	< 0,05
ИФН-γ, пг/мл	> 3,4	41	54	0,9	1,0	70	26	0,9; 0,6–1,4	0,563	> 0,05
Лейкоциты крови, ·10 <sup>9</sup> /л	> 20	25	84	1,5	0,9	72	41	1,2; 0,8–1,9	0,363	> 0,05

*Примечание.* RR – относительный риск; PPV – прогностическое значение положительного результата теста; Se – чувствительность теста; NPV – прогностическое значение отрицательного результата теста; Sp – специфичность теста; LR+ – отношение правдоподобия положительного результата теста; LR– – отношение правдоподобия отрицательного результата теста; *p* – достоверность различия показателей.

Среди иммуностимулирующих препаратов, увеличивающих функциональную активность клеток врожденного иммунитета, следует отметить ГМ-КСФ и ИФН- $\gamma$ . Показано, что использование в лечении больных с сепсисом ГМ-КСФ сопровождалось восстановлением активности моноцитов крови и способствовало сниже-

нию времени пребывания пациентов в отделениях интенсивной терапии [41]. Применение рекомбинантного ИФН- $\gamma$  у пациентов с сепсисом, имевших сниженную экспрессию HLA-DR моноцитов, приводило к восстановлению функциональной активности макрофагов и увеличивало выживаемость пациентов [42].

## ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Verma P., Berwal P.K., Nagaraj N., Swami S., Jivaji P., Narayan S. Neonatal sepsis: epidemiology, clinical spectrum, recent antimicrobial agents and their antibiotic susceptibility pattern. *Int J Contemp Pediatr* 2015; 2: 176–180. DOI: 10.18203/2349-3291.ijcp20150523
2. Camacho-Gonzales A., Spearman P.W., Stoll B. J. Neonatal infectious diseases: evaluation of neonatal sepsis. *Pediatr Clin North A* 2013; 60: 367–389. DOI: 10.1016/j.pcl.2012.12.003
3. Cortese F., Scicchitano P., Gesualdo M., Filaninno A., De Giorgi E. Early and Late Infections in Newborns: Where Do We Stand? A Review. *Pediatr Neonatol* 2016; 57: 265–273. DOI: 10.1016/j.pedneo.2015.09.007
4. Cuenca A.G., Wynn J.L., Moldawer L.L., Levy O. Role of Innate Immunity in Neonatal Infection. *Am J Perinatol* 2013; 30 (2): 105–112. DOI: 10.1055/s-0032-1333412
5. Самсыгина Г.А. Неонатальный сепсис. М: ПедиатрЪ 2014; 173 [Samsygina G.A. Neonatal sepsis. Moscow: PEDIATR 2014; 173. (in Russ)]
6. Rossi P., Botgros R., Shane T., Nadel S., Manzoni P., Arenas-Lopez S. Report on the Expert Meeting on Neonatal and Paediatric Sepsis. London: European Medicines Agency 2010. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Report/2010/12/WC500100199.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2010/12/WC500100199.pdf)
7. Goldstein B., Giroir B., Randolph A. International Consensus Conference on Pediatric Sepsis. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 2005; 6: 2–8. DOI: 10.1097/01.PCC.0000149131.72248.E6
8. Hornik C.P., Benjamin D.K., Becker K.C., Benjamin D.K.Jr., Li J., Clark R.H. et al. Use of the complete blood cell count in early-onset neonatal sepsis. *Pediatr Infect Dis J* 2012; 31: 799–802. DOI: 10.1097/INF.0b013e318256905c.
9. Shah B.A., Padbury J.F. Neonatal sepsis: an old problem with new insights. *Virulence* 2014; 54: 449–457. DOI: 10.4161/viru.26906
10. Reinhart K., Bauer M., Riedemann N.C., Hartog C.S. New Approaches to Sepsis: Molecular Diagnostics and Biomarkers. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25 (4): 609–634. DOI: 10.1128/CMR.00016-12
11. Hotchkiss R.S., Karl I.E. The pathophysiology and treatment of sepsis. *New Engl J Med* 2003; 348 (2): 138–150. DOI: 10.1056/NEJMr021333
12. Сепсис: классификация, клинко-диагностическая концепция и лечение. Под ред. В.А. Савельева, Б.П. Гельфанда. М: Медицинское информационное агентство 2013; 353 [Sepsis: classification, clinical-diagnostic concept and treatment. V.A. Saveliev, B.R. Gelfand (eds). Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo 2013; 353. (in Russ)]
13. Torsvik M., Gustad L.T., Mehl A., Bangstad I.L., Vinje L.J., Damas J. K. et al. Early identification of sepsis in hospital inpatients by ward nurses increases 30-day survival. *Critical Care* 2016; 20: 244. DOI: 10.1186/s13054-016-1423-1.
14. Schulte W., Bernhagen J., Bucala R. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets—An Updated View. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 165974. DOI: 10.1155/2013/165974
15. Медицинские лабораторные технологии. Руководство по клинической лабораторной диагностике. 3-е издание. Под ред. А.И. Карпищенко. М: ГЭОТАР-Медиа 2013; 353. [Medical laboratory technologies. A guide to clinical laboratory diagnostics. 3rd ed. A.I. Karpishchenko (ed.). Moscow: GEOTAR-Media 2013; 353. (in Russ)]
16. Melville J.M., Moss T.J.M. The immune consequences of preterm birth. *Front Neurosci* 2013; 7: DOI: 10.3389/fnins.2013.00079
17. Chaudhry H., Zhou J., Zhong Y., Ali M.M., McGuire F., Nagarkatti P.S. et al. Role of Cytokines as a Double-edged Sword in Sepsis. *In vivo* 2013; 27: 669–684.
18. Lanzotti V.S., Povoas P., Soares M., Silva J.R.L., Barbosa A.P., Salluh J.I.F. Use of biomarkers in pediatric sepsis: literature review. *Rev Bras Ter Intensiva* 2016; 28 (4): 472–482. DOI: 10.5935/0103-507X.20160080
19. Hou T., Huang D., Zeng R., Ye Z., Zhang Y. Accuracy of serum interleukin (IL)-6 in sepsis diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8 (9): 15238–15245.
20. Zhou M., Cheng S., Yu J., Lu Q. Interleukin-8 for Diagnosis of Neonatal Sepsis: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* 2015; 10 (5): e0127170. DOI: 10.1371/journal.pone.0127170
21. Wong H.R., Cvijanovich N., Wheeler D.S., Bigham M.T., Monaco M., Odoms K. et al. Interleukin-8 as a stratification tool for interventional trials involving pediatric septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178 (3): 276–282. DOI: 10.1164/rccm.200801-1310C.
22. Schoenborn J.R., Wilson C.B. Regulation of interferon gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 2007; 96: 41–101. DOI: 10.1016/S0065-2776(07)96002-2
23. Romero C.R., Herzig D.S., Etogo A., Nunez J., Mahmoudizad R., Fang G. et al. The role of interferon-gamma in the pathogenesis of acute intraabdominal sepsis. *J Leuk Biol* 2010; 88 (4): 725–735. DOI: 10.1189/jlb.0509307.
24. Leentjens J., Kox M., Koch R.M., Preijers F., Joosten L.A.B., van der Hoeven J.G. et al. Reversal of immunoparalysis in humans in vivo: a double-blind, placebo-controlled, randomized pilot study. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186 (9): 838–845. DOI: 10.1164/rccm.201204-0645OC.
25. Walker J.C., Smolders M.A., Gemen E.F., Antonius T.A., Leuvenink J., de Vries E. Development of lymphocyte subpopulations in preterm infants. *Scand J Immunol* 2011; 73: 53–58. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2010.02473.x
26. Tatad A.M.F., Nesin M., Peoples J., Cheung S., Lin H., Sison C. et al. Cytokine expression in response to bacterial antigens in preterm and term infant cord blood monocytes. *Neonatology* 2008; 94: 8–15. DOI: 10.1159/000112541
27. Lusyati S., Hulzebos C.V., Zandvoort J., Sauer P. Levels of 25 cytokines in the first seven days of life in newborn infants. *BMC Research Notes* 2013; 6: 547. DOI: 10.1186/1756-0500-6-547
28. Bhandari V. Effective Biomarkers for Diagnosis of Neonatal Sepsis. *J Pediatr Infect Dis Soc* 2014; 3 (3): 234–245. DOI: 10.1093/jpids/piu063
29. Patil N.K., Bohannon J.K., Sterwood E.R. Immunotherapy: a promising approach to reverse sepsis-induced immunosuppression. *Pharmacol Res* 2016; 111: 688–702. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.07.019.

30. Hotchkiss R.S., Osmon S.B., Chang K.C., Wagner T.H., Coopersmith C.M., Karl I.E. Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. *J Immunol* 2005, 174: 5110–5118. DOI: 10.4049/jimmunol.174.8.5110
31. Хаертынов Х.С., Анохин В.А., Мустафин И.Г., Бойчук С.В., Сатрутдинов М.А., Андреева А.А. и др. Особенности иммунитета у новорожденных детей с локализованными и генерализованными формами бактериальных инфекций. *Рос вестн перинатол и педиатр* 2015; 60 (5): 168–173. [Khaertynov H.S., Anohin V.A., Mustafin I.G., Boychuk S.V., Satrutdinov M.A., Andreeva A.A. et al. Features of immunity in newborn children with localized and generalized forms of bacterial infections. *Ros vestrn perinatol i pediatri* 2015; 60 (5): 168–173. (in Russ)]
32. Felmet K.A., Hall M. W., Clark R. S., Jaffe R., Carcillo J.A. Prolonged lymphopenia, lymphoid depletion, and hypoprolactinemia in children with nosocomial sepsis and multiple organ failure. *J Immunol* 2005; 174: 3765–3772. DOI: 10.4049/jimmunol.174.6.3765
33. Hotchkiss R.S., Swanson P.E., Freeman B.D., Tinsley K.W., Cobb J.P., Matuschak G.M. et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999; 27: 1230–1251. DOI: 10.1097/00003246-199907000-00002
34. Toti P., De Felice C., Occhini R., Schuerfeld K., Stumpo M., Epistolato M.C. et al. Spleen depletion in neonatal sepsis and chorioamnionitis. *Am J Clin Pathol* 2004; 122: 765–771. DOI: 10.1309/RV6E-9BMC-9954-A2WU
35. Otto G.P., Sossdorf M., Claus R.A., Rodel J., Menge K., Reinhard K. et al. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit Care* 2011; 15 (4): R183. DOI: 10.1186/cc10332.
36. Дегтярева М.В., Байбарина Е.Н., Солдатова И.Г., Ашиткова Н.В. Интерлейкин-2: опыт клинического применения в неонатологии. Санкт-Петербург: УльтраПринт 2016; 40. [Degtyareva M.V., Baibarina E.N., Soldatova I.G., Ashitkova N.V. Interleukin-2: clinical experience in neonatology. St. Petersburg: ULTRA PRINT 2016; 40. (in Russ)]
37. Venet F., Foray A.P., Villars-Méchin A., Malcus C., Poitevin-Later F., Lepape A. et al. IL-7 Restores Lymphocyte Functions in Septic Patients. *J Immunol* 2012; 189 (10): 5073–5081. DOI: 10.4049/jimmunol.1202062
38. Unsinger J., Burnham C.A., McDonough J., Morre M., Prakash P.S., Caldwell C.C., Dunne W.M. Jr., Hotchkiss R.S. Interleukin-7 Ameliorates Immune Dysfunction and Improves Survival in a 2-Hit Model of Fungal Sepsis. *J Infect Dis* 2012; 206: 606–616. DOI: 10.1093/infdis/jis383.
39. Shindo Y., Fuchs A.G., Davis C.G., Eitas T., Unsinger J., Burnham C.D. et al. Interleukin 7 immunotherapy improves host immunity and survival in a two-hit model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Leukoc Biol* 2017 Feb; 101(2):543–554. DOI: 10.1189/jlb.4A1215-581R.
40. Innoue S., Unsinger J., Davis C.G., Muenzer J.T., Ferguson T.A., Chang K. et al. IL-15 prevent apoptosis, revers innate and adaptive immune dysfunction, and improves survival in sepsis. *J Immunol* 2010; 184 (3): 1401–1409. DOI: 10.4049/jimmunol.0902307.
41. Meisel C., Schefold J.C., Pischowski R., Baumann T., Hetzger K., Gregor J. et al. Granulocyte-macrophage colonostimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180: 640–648. DOI: 10.1164/rccm.200903-0363OC.
42. Nalos M., Santer-Nanan B., Parnell G., Tang B., McLean A.S., Nanan R. Immune effects of interferon gamma in persistent staphylococcal sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185 (1): 110–112. DOI: 10.1164/ajrccm.185.1.110

Поступила 15.08.17

Received on 2017.08.15

**Сведения о финансировании**

Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета. Работа частично выполнена на оборудовании Междисциплинарного центра коллективного пользования и Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

**Конфликт интересов:**

Авторы декларируют об отсутствии иного возможного конфликта интересов.

**Information on funding**

The work was carried out within the framework of the program to enhance the competitiveness of the Kazan Federal University.

The work was partially performed on the equipment of the Interdisciplinary Center for Collective Use and the Scientific and Educational Center for Pharmaceuticals of the Kazan (Privolzhsky) Federal University.

**Conflict of interest:**

The authors declare that there is no other possible conflict of interest.