

DOI: <https://doi.org/10.17816/psaic960>

Стратегия профилактики бактериальных осложнений ингаляционным оксидом азота у новорожденных

© М.Г. Пухтинская, В.В. Эстрин

Научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии Ростовского государственного медицинского университета, Ростов-на-Дону, Россия

Актуальность. Молекула оксида азота представляет собой один из важнейших факторов противoinфекционной резистентности иммунной системы организма.

Цель. Повышение эффективности профилактики бактериальных осложнений путем применения ингаляций оксида азота в составе традиционной интенсивной терапии.

Материалы и методы. В контролируемое рандомизированное слепое клиническое исследование включено 97 новорожденных. Помимо традиционной терапии пациенты основной группы получали ингаляционный оксид азота (iNO). Пациенты контрольной группы iNO не получали. На 1, 3, 20-е сутки (в исходе) у пациентов определяли плазменную концентрацию IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , G-CSF, sFas, FGF, NO (ИФА = ELISA); иммунофенотипирование: CD3⁺CD19⁻, CD3⁻CD19⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD69⁺, CD71⁺, CD95⁺, CD3⁺HLA-DR⁺, CD14⁺, CD3⁻CD56⁺, Аннексин-V⁺/FITC; PI⁺/PE.

Результаты. Развитие сепсиса зафиксировано: в основной группе — 4 пациента, в контрольной — 13 ($p_1 = 0,04$; $p_2 = 0,005$). Летальные исходы: в основной группе — 6 пациентов, в контрольной — 10 ($p_1 = 0,37$; $p_2 = 0,59$). Медиана длительности искусственной вентиляции легких: основная группа — 5 сут, контрольная — 10 ($p = 0,00007$). Пребывание в отделении реанимации и интенсивной терапии: основная группа — 11 сут, контрольная — 15 ($p = 0,026$). На третьи сутки у пациентов основной группы относительно контрольной: снижение ($p < 0,05$) TNF- α , IL-8 и IL-6, CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD95⁺, лимфоцитов в апоптозе; повышение ($p < 0,05$) G-CSF, sFas, FGF, NO; CD14⁺, CD3⁺CD19⁻.

Выводы. iNO в составе интенсивной терапии снижает частоту развития сепсиса, длительность искусственной вентиляции легких, госпитализации в реанимации, обеспечивает тенденцию снижения частоты летальных исходов; снижает цитокиновую агрессию, ингибирует апоптоз лимфоцитов, активизирует моноцитарно-макрофагальное звено иммунитета и пролиферативные процессы.

Ключевые слова: ингаляционный оксид азота; новорожденный; бактериальные осложнения; апоптоз; цитокины; новорожденные.

Как цитировать:

Пухтинская М.Г., Эстрин В.В. Стратегия профилактики бактериальных осложнений ингаляционным оксидом азота у новорожденных // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. 2021. Т. 11, № 2. С. 141–150. DOI: <https://doi.org/10.17816/psaic960>

DOI: <https://doi.org/10.17816/psaic960>

Strategy for the prevention of bacterial complications with inhaled nitrogen oxide in newborns

© Marina G. Pukhtinskaya, Vladimir V. Estrin

Scientifically Research Institute of Obstetrics and Pediatrics, State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

BACKGROUND: The nitrogen oxide molecule (NO) is a one of the most important factors in the anti-infectious resistance of the body's immune system.

AIM: This study aims to improve the effectiveness of preventing bacterial complications by including nitric oxide inhalations as part of traditional intensive care.

MATERIALS AND METHODS: Ninety-seven full-term newborns without signs of bacterial complications were included in a controlled, randomized, blind clinical trial. The main group ($n = 44$) received inhaled nitrogen oxide (iNO). The control group ($n = 53$) did not receive iNO. On days 1, 5, and 20 the plasma concentrations of IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , G-CSF, sFas, FGF, and NO were determined by capture ELISA; CD3⁺CD19⁻, CD3⁻CD19⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD69⁺, CD71⁺, CD95⁺, CD3⁺HLA-DR⁺, CD14⁺, CD3⁻CD56⁺, Annexin-V⁺/FITC; PI⁺/PE — immunophenotype analysis.

RESULTS: In the main group, sepsis developed in 4 patients and 13 controls ($p_1 = 0.04$; $p_2 = 0.005$). Fatalities occurred in 6 patients, and 10 controls ($p_1 = 0.37$; $p_2 = 0.59$) in the main group. The median duration of the IVL in the main group was 5 days, and 10 days for controls ($p = 0.00007$). Stays in ORIT were main — 11 days for patients in the main group, and 15 days for controls ($p = 0.026$). On day 3, when compared with controls, patients in the main group had significantly reduced ($p < 0.05$) of TNF- α , IL-8 and IL-6, CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD95⁺, lymphocytes in apoptosis, increasing ($p < 0.05$) G-CSF, sFas, FGF, NO; CD14⁺, CD3⁺CD19⁻.

CONCLUSIONS: iNO used as a part of intensive care decreases the frequency of sepsis development, the duration of mechanical ventilation, and hospitalization. iNO also tends to decrease the lethal outcome frequency, reduces cytokine aggression, inhibits lymphocyte apoptosis, activates the monocyte-macrophage immunity and proliferative processes. It is appropriate to continue research.

Keywords: inhaled nitrogen oxide; newborn; bacterial complications; apoptosis; cytokines; newborns.

To cite this article:

Pukhtinskaya MG, Estrin VV. Strategy for the prevention of bacterial complications with inhaled nitrogen oxide in newborns. *Russian Journal of Pediatric Surgery, Anesthesia and Intensive Care*. 2021;11(2):141–150. DOI: <https://doi.org/10.17816/psaic960>

ВВЕДЕНИЕ

Опубликованные результаты ряда научных, в том числе собственных, исследований подтверждают, что молекула оксида азота (NO) представляет собой один из важнейших факторов противоинфекционной резистентности иммунной системы организма [1–5].

В частности, доказано, что эндогенный NO участвует в реакциях пролиферации, апоптозе лимфоцитов и моноцитов, фагоцитозе, активации системы комплемента, изменяет плазменную концентрацию провоспалительных, ростовых, пролиферативных цитокинов [6–12].

Наиболее уязвимым контингентом для развития бактериальных осложнений остаются новорожденные с респираторной патологией и необходимостью продленного протезирования функции дыхания методом аппаратной искусственной вентиляции легких (ИВЛ) [13, 14]. Незменно высокий уровень летальности среди этих пациентов при развитии сепсиса подтверждает обоснованность сомнений в эффективности традиционных профилактических и терапевтических стратегий.

В течение нескольких десятилетий ингаляционный оксид азота (iNO) занимает особое место в терапии респираторной патологии новорожденных, учитывая его эффективность и безопасность, подтвержденную многими исследованиями [15–25].

С клинической точки зрения значимость молекулы NO в патогенезе ряда иммунных процессов внушает осторожный оптимизм относительно возможности профилактики развития бактериальных осложнений у новорожденных, находящихся на ИВЛ, ингаляционным NO. Отсутствие в современной научной литературе указаний на проведение подобных исследований определяют его актуальность.

Цель — повышение эффективности профилактики бактериальных осложнений у новорожденных с респираторной патологией, находящихся на искусственной вентиляции легких, путем применения ингаляций оксида азота в составе традиционной интенсивной терапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В период с 2018 по 2019 г. в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных (ОРИТН) Научно-исследовательского института акушерства и педиатрии ФГБОУ «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России (НИИАП ФГБОУ ВО РостГМУ МЗ РФ) было обследовано 97 доношенных новорожденных с респираторной патологией, поступивших на ИВЛ из родильных домов города и области. Все пациенты были включены в исследование.

Проведение представляемых контролируемых рандомизированных клинических исследований было одобрено локальным комитетом по этическим вопросам и биоэтике НИИАП (протокол № 18/1 от 26.11.2018 и № 20/1 от 14.01.2019).

Пациентов включали в исследование с письменного разрешения родителей или иных законных представителей. Текст разрешения и протокол исследования сформулированы в соответствии с Хельсинкской декларацией 1975 г. с поправками от 2005 г.; Федеральным законом № 323-ФЗ от 21.11.2011 «Об основах охраны здоровья граждан в РФ»; основами законодательства Российской Федерации «Об охране здоровья граждан, правил проведения клинической практики в РФ» (приказ МЗ РФ № 266 от 19.07.2003, приказ Росздравнадзора № 2325-Пр/06 от 17.10.2006).

На рисунке приведена схема результатов представляемого рандомизированного клинического исследования.

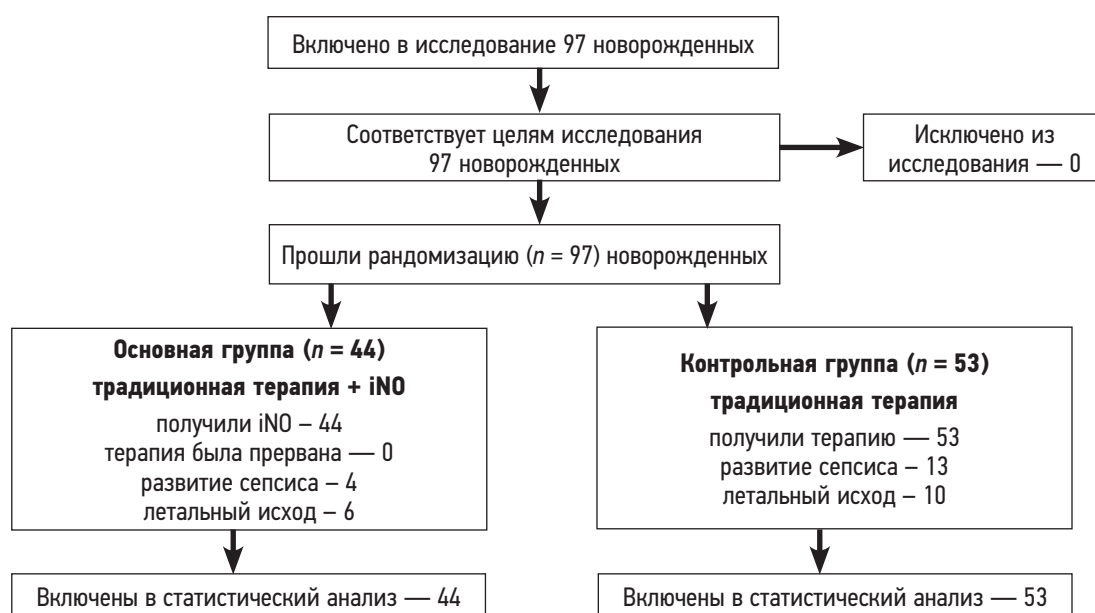


Рисунок. Схема результатов рандомизированного клинического исследования (CONSORT 2010). iNO — ингаляционный оксид азота
Figure. Diagram of results from a randomized clinical trial (CONSORT 2010). iNO — inhaled nitrogen oxide

Критерии включения в исследование:

- поступление в ОРПН на ИВЛ не позднее 2 сут жизни;
 - отсутствие при поступлении клинических признаков бактериального инфицирования;
 - наличие респираторной патологии (мекониально-аспирационный синдром, дыхательные расстройства неуточненные, вторичные ателектазы легких);
 - срок гестации при рождении свыше 37 нед.;
 - масса тела при рождении более 2500 г.
- Пациенты не включались в исследование в случае:
- подозреваемых или подтвержденных врожденных аномалий дыхательных путей или легких;
 - подтвержденного сложного врожденного порока сердца;
 - тяжелой дисфункции левого желудочка;
 - пневмоторакса;
 - подозреваемой или подтвержденной хромосомной аномалии или генетической аберрации.

Метод, использованный для генерации рандомизированного порядка распределения

Рандомизацией методом «конвертов» пациенты, включенные в исследование, были распределены на две группы: основную ($n = 44$) и контрольную ($n = 53$).

Детали вмешательства. Пациенты обеих групп получали традиционную интенсивную терапию. Помимо традиционной интенсивной терапии пациенты основной группы получали iNO в концентрации 10 ppm в течение 48 ч; с последующим поэтапным снижением дозы до 5 ppm за 5 ч с шагом в 1 ppm; в дозе 1 ppm iNO подавали в течение 1 ч с последующей отменой при динамическом контроле витальных функций и содержания метгемоглобина в крови. Контрольную группу составили новорожденные, получавшие только стандартную интенсивную терапию.

В нашем исследовании доза iNO и продолжительность ингаляции были определены в соответствии с научными литературными данными, существующими клиническими рекомендациями и результатами собственных исследований [16–19].

Выбор относительно низкой дозы iNO и непродолжительной экспозиции осуществлен с учетом дуалистических свойств этого газового трансмиттера в зависимости от концентрации и научных данных о том, что небольшие дозы ингаляционного оксида азота по силе некоторых положительных эффектов не уступают дозам в 40 ppm и выше [20–23]. В связи с off-label статусом iNO в России, его ингаляции назначались пациентам при оформлении всей необходимой документации.

В нашем исследовании ингаляции NO проводили на фоне высокочастотной искусственной вентиляции легких или традиционной искусственной вентиляции легких путем подачи газа в контур пациента через коннектор аппаратом для дозированной и контролируемой подачи

оксида азота Pulmonox mini (Messer II NO Therapeutics, Австрия). В помещении для проведения терапии ингаляционным оксидом азота контролировали концентрацию NO и NO₂, не превышавшую по NO 10 ppm и по NO₂ — 5 ppm. Для ингаляций использовали газовую смесь NO в азоте с концентрацией 1000 ppm ОАО «Линде Газ Рус». Во время проведения ингаляций NO фиксировали все изменения состояния пациентов: легкие (любые отклонения состояния) и тяжелые (продление госпитализации в реанимации, угроза жизни).

Основные конечные точки нашего исследования: частота развития бактериальных осложнений и неблагоприятного исхода заболевания; продолжительность искусственной вентиляции легких и госпитализации в реанимации. Изменение плазменной концентрации цитокинов, эндогенного оксида азота, популяционного состава лимфоцитов и относительного содержания лимфоцитов в апоптозе в динамике заболевания были отнесены к дополнительным критериям оценки.

Клиническое исследование проводили с рабочей гипотезой, что iNO в составе стандартной интенсивной терапии снизит частоту развития сепсиса, летальных исходов, длительность аппаратного протезирования дыхания и продолжительность госпитализации в отделении реанимации.

Критериями назначения ингаляционного оксида азота служили:

- подтверждение, полученное в результате рандомизации;
 - наличие письменного согласия родителей ребенка. Противопоказаниями к назначению iNO являлись:
 - метгемоглобинемия (врожденная и приобретенная);
 - гипокоагуляция, подтвержденная лабораторно;
 - тромбоцитопения менее $50,0 \cdot 10^9$ /л;
 - внутрижелудочковые кровоизлияния III–IV степени.
- Критерии досрочного прекращения терапии iNO:
- увеличение уровня метгемоглобина крови свыше 2,5 %;
 - любое изменение состояния, представляющее собой угрозу жизни для пациента или приводящее к продлению госпитализации.

МЕТОДЫ ОБСЛЕДОВАНИЯ

Иммунологические методы

При поступлении, на 3-и и 20-е сутки госпитализации (или в исходе заболевания), помимо стандартного клинико-лабораторного обследования, пациентам обеих групп определяли:

- плазменную концентрацию цитокинов [интерлейкинов (IL-1 β , IL-6, IL-8), фактора некроза опухоли (TNF- α), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), растворимого фас-лиганда (sFas), фактора роста фибробластов (FGF)] и концентрацию эндогенного NO методом твердофазного иммунофер-

ментного анализа (ИФА = ELISA, индикаторный фермент — пероксидаза хрена), используя тест-системы Biosource (США), Bender Medsystems (Австрия), R&D Systems (США) на компьютерном счетчике Multilabel Counter Victor-21420 (Финляндия);

- методом иммунофенотипирования относительное содержание Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻): CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD69⁺, CD71⁺, CD95⁺, HLA-DR⁺, В-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺); моноцитов-макрофагов (CD14⁺); естественных киллеров (CD3⁺CD56⁺); лимфоцитов с экспрессией AnnexinV-FITC⁺PI⁻, AnnexinV-FITC⁺PI⁺ (Becton Culter Epics, США-XL).

Статистические методы

Цифровые результаты всех 97 пациентов были включены в статистический анализ.

Анализ мощности представляемого исследования проведен в среде пакета прикладных программ Statistica-6 при условии, что $p < 0,05$, а мощность выборки — не менее 80 %. Чтобы исследование достигало мощности 80 % (минимальный допустимый уровень), объем выборки должен был составлять не менее 38 пациентов. Таким образом, мощность представляемого исследования в 86,85 % признана адекватной.

Цифровые данные оценивали методами вариационной статистики с определением выборочного среднего, стандартного отклонения, средней квадратичной ошибки, доверительных интервалов, медианы и ошибки медианы.

Для проведения статистического анализа использовали статистические программы: Excel-2007, Statistica-6, пакет R. Статистическую значимость различий выявляли с применением критериев Вилкоксона и Манна-Уитни.

Риск развития неонатального сепсиса и летального исхода анализировали построением четырехпольных таблиц.

Продолжительность протезирования функции дыхания и пребывания в реанимации оценивали как функцию выживания по графикам Каплана-Майера со сравнением результатов критерием Гехана-Вилкоксона. Правильность гипотез изучали тестом Фишера-Ирвина при 5 % уровне значимости в отношении двухсторонней альтернативы.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Терапия ингаляционным NO досрочно не прерывалась ни у одного участника; не зарегистрировано случаев легкого или серьезного неблагоприятного воздействия ингаляционного NO на организм новорожденного пациента.

Летальные исходы у 6 пациентов основной группы не были связаны с проведением ингаляций, что во всех случаях было подтверждено проведением патоморфологического исследования.

В основной группе ($n = 44$) у 4 пациентов сепсис осложнил течение основного заболевания; в контрольной группе ($n = 53$) сепсис диагностировали у 13 детей. Статистическая проверка гипотезы, что в группе детей, получавших iNO, снижалась частота развития сепсиса, была подтверждена точным методом Фишера-Ирвина в отношении двухсторонней альтернативы (Fisher exact, $p_1 = 0,04$; $p_2 = 0,05$).

В основной группе ($n = 44$) у 6 пациентов заболевание закончилось летальным исходом; в контрольной группе ($n = 53$) — у 10. Статистическая проверка гипотезы, что в группе iNO снижалась частота развития летального исхода, не была подтверждена точным методом Фишера-Ирвина (Fisher exact, $p_1 = 0,37$; $p_2 = 0,59$).

Медиана для перевода пациентов на самостоятельное дыхание в контрольной группе составила 10 дней. В основной группе — 5 ($p = 0,00007$, критерий Гехана-Вилкоксона).

Половина пациентов (медиана) в контрольной группе на 15-е сутки были переведены из ОРИТН. В основной группе — на 11-е сутки ($p = 0,02$, критерий Гехана-Вилкоксона).

В табл. 1 представлены цифровые значения концентрации изучаемых цитокинов у пациентов обеих групп в динамике. При поступлении в ОРИТН концентрация цитокинов и эндогенного NO в плазме у пациентов обеих групп статистически значимо не различались. В ходе последующего статистического анализа было подтверждено значимое ($\alpha \leq 0,05$) повышение концентрации эндогенного NO, G-CSF, sFas, FGF и снижение ($\alpha \leq 0,05$) концентрации TNF- α , IL-8 и IL-6 в плазме у пациентов основной группы к третьим суткам относительно контрольной группы. Концентрация IL-1 β у пациентов обеих групп не имела различий. В исходе заболевания у этих детей сохранялось статистически значимое низкое содержание TNF- α при статистически значимом увеличении концентрации FGF и G-CSF относительно пациентов, получавших только стандартную терапию.

В табл. 2 представлены результаты сравнительного анализа суб- и популяционного состава лимфоцитов в динамике. При поступлении в ОРИТН не выявлено статистически значимых различий у пациентов обеих групп. На 3–5-е сутки у пациентов, получивших iNO, повышалось ($\alpha \leq 0,05$) относительное содержание Т-лимфоцитов, Т-хелперов, макрофагов; более низким ($\alpha \leq 0,05$) было относительное содержание лимфоцитов с экспрессией раннего активационного маркера (CD3⁺CD69⁺) и CD3⁺HLA-DR⁺; готовых к вступлению в апоптоз (CD3⁺CD95⁺) и находящихся в апоптозе. Не было выявлено статистически значимых различий по содержанию В-лимфоцитов (CD3⁻CD19⁺), естественных киллеров (CD3⁻CD56⁺), лимфоцитов с активацией рецептора к трансферрину (CD3⁺CD71⁺). В исходе заболевания статистически значимые различия между пациентами обеих групп сохранялись по относительному содержанию CD3⁺CD19⁻, CD3⁺CD4⁺,

Таблица 1. Сравнительная динамика плазменной концентрации цитокинов и оксида азота в обеих группах**Table 1.** Comparative dynamics of the plasma concentration of cytokines and nitrogen oxide in patients of both groups

Показатель	1-е сутки		3-и сутки		20-е сутки	
	основная группа (n = 44)	контроль (n = 53)	основная группа (n = 44)	контроль (n = 53)	основная группа (n = 44)	контроль (n = 53)
TNF- α , пг/мл	159,5	163,43	76,55*	114,88	32,48*	86,31
Kv25-75 %	138,3-180,7	147,6-79,2	65,1-87,9	95,2-134,4	11,7-53,2	72,1-100,5
IL-8, пг/мл	355,0	355,8	532,5*	924,2	177,8	211,4
Kv25-75 %	335,1-374,9	327,3-384,1	505,3-559,4	904,4-943,8	124,1-231,4	138,8-284,0
IL-6, пг/мл	17,7	18,2	176,9*	316,4	64,9	68,9
Kv25-75 %	16,7-18,6	17,1-19,2	121,1-192,7	258,0-374,8	59,4-70,5	64,4-73,4
IL-1 β , пг/мл	4,7	4,8	8,0	8,5	3,8	4,0
Kv25-75 %	4,4-4,8	4,7-5,0	7,1-9,1	7,4-9,6	2,7-4,9	3,7-4,4
G-CSF, пг/мл	1,7	1,7	2,7*	1,5	1,8*	1,5
Kv25-75 %	1,6-1,8	1,6-1,8	2,4-3,0	1,3-1,6	1,6-2,0	1,4-1,6
sFas, пг/мл	6580,6	6576,6	7350,9*	5028,6	5056,8	5186,7
Kv25 %	5846,0	6153,2	6543,3	4605,2	4191,6	4512,5
Kv75 %	7315,2	7000,1	8158,6	5452,0	5922,0	5860,9
FGF, пг/мл	45,1	45,3	76,1*	59,1	126,8*	73,7
Kv25-75 %	41,2-48,9	42,3-48,2	71,1-83,1	55,1-63,1	116,9-136,6	62,6-84,9
NO, мкмоль/л	8,7	9,00	40,6*	29,6	21,6	21,6
Kv25-75 %	7,2-9,2	8,1-9,6	39,3-42,1	28,3-32,1	21,2-22,1	20,2-22,7

Статистическое различие показателей обосновано ($p < 0,05$; критерий Манна-Уитни). The statistical difference in the indicators is justified ($p < 0.05$; Mann-Whitney test).**Таблица 2.** Сравнительная динамика результатов иммунофенотипирования лимфоцитов у пациентов обеих групп**Table 2.** Comparative dynamics of the lymphocytes immunophenotyping results in patients of both groups

Показатель	1-е сутки		3-и сутки		20-е сутки	
	основная группа (n = 44)	контроль (n = 53)	основная группа (n = 44)	контроль (n = 53)	основная группа (n = 44)	контроль (n = 53)
CD3 ⁺ CD19 ⁻	56,99	57,94	51,93*	44,32	55,90*	67,5
Kv25-75 %	56,22-57,66	56,43-58,45	50,90-52,12	43,12-45,21	53,70-57,16	64,3-70,61
CD3 ⁺ CD4 ⁺	41,66	42,11	44,17*	37,92	44,13*	37,2
Kv25-75 %	40,32-42,99	40,11-43,12	40,97-47,57	36,43-39,31	42,67-45,84	35,1-39,3
CD3 ⁺ CD8 ⁺	12,98	12,91	8,85	8,81	18,28*	10,03
Kv25-75 %	12,63-13,23	12,30-13,52	7,90-9,76	8,42-9,25	17,65-18,91	9,19-10,45
CD14 ⁺	5,36	5,23	9,36*	5,34	7,71	8,21
Kv25-75 %	5,20-5,45	4,97-5,37	8,57-10,34	5,11-5,59	7,20-8,34	7,70-8,87
CD3 ⁺ CD19 ⁺	4,74	4,96	4,25	4,04	5,86	5,04
Kv25-75 %	4,32-5,73	4,73-5,17	3,98-4,57	3,97-4,29	5,61-6,13	4,61-5,45
CD3 ⁺ CD56 ⁺	2,79	2,75	3,95	3,62	2,78	2,80
Kv25-75 %	2,59-2,92	2,64-2,83	3,72-4,10	3,55-3,69	2,61-2,90	2,68-2,92
CD3 ⁺ CD95 ⁺	8,50	8,47	8,97*	11,23	2,43*	3,39
Kv25-75 %	8,40-8,59	8,41-8,54	8,14-9,80	11,13-12,10	1,40-3,46	2,73-4,05
CD3 ⁺ CD69 ⁺	2,73	2,72	1,00*	4,82	1,45*	2,41
Kv25-75 %	2,30-3,16	2,29-3,09	0,87-1,25	3,77-5,86	1,13-1,77	1,90-2,92
CD3 ⁺ CD71 ⁺	3,72	3,68	4,24	4,77	4,26	4,59
Kv25-75 %	3,64-3,90	3,82-3,94	4,04-4,47	4,17-5,37	4,11-4,41	4,73-5,01
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	9,61	9,80	18,79*	16,26	15,24*	16,81
Kv25-75 %	9,31-9,91	9,40-10,00	18,10-19,58	15,41-17,03	14,60-15,88	16,00-17,54
AnnexinV-FITC*PI ⁻	11,06	11,09	6,08*	17,94	5,03*	9,94
Kv25-75 %	10,76-11,44	10,62-11,46	5,59-6,60	16,00-18,88	4,66-5,51	8,02-10,86
AnnexinV-FITC*PI ⁺	0,9	0,95	0,34*	1,16	0,49*	0,93
Kv25-75 %	0,61-1,19	0,77-1,23	0,24-0,45	1,02-1,35	0,36-0,62	0,78-1,08

Статистическое различие показателей обосновано ($p < 0,05$; критерий Манна-Уитни). The statistical difference in the indicators is justified ($p < 0.05$; Mann-Whitney test).

CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD95⁺, CD3⁺CD69⁺, лимфоцитов в состоянии апоптоза.

Результаты анализа финансовых затрат подтвердили, что ингаляции NO увеличивали суточную стоимость лечения в ОРПН во время проведения курса терапии iNO, снижая при этом общие финансовые затраты на лечение в 1,5 раза.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты подтвердили статистически значимое снижение частоты развития сепсиса, продолжительности аппаратного протезирования дыхания и длительности госпитализации в ОРПН в группе пациентов, получавших iNO.

Не смотря на то что летальный исход заболевания в этой группе регистрировали в 1,66 раза реже, можно было говорить лишь о стойкой тенденции снижения частоты неблагоприятных исходов. Полученные нами данные совпадали с многочисленными данными клинических исследований [24–26].

Отсутствие статистически значимых различий у пациентов обеих групп по всем изучаемым иммунологическим показателям при поступлении в ОРПН подтверждало однородность изучаемой популяции.

Дальнейший анализ полученных данных выявил повышение концентрации эндогенного NO ($\alpha < 0,05$) в плазме у пациентов, получавших iNO, к третьим суткам, с последующим снижением. Обращало на себя внимание, что у новорожденных с респираторной патологией, находящихся на ИВЛ, при поступлении в ОРПН определяли крайне низкую плазменную концентрацию эндогенного NO относительно пуповинной крови здоровых новорожденных, что согласовывалось с результатами предыдущих исследований [27]. Научные литературные данные утверждают, что дефицит NO является основной причиной эндотелиальной дисфункции, артериальной гипертензии, атеросклероза, диабетической ангиопатии, инфаркта миокарда, стенокардии, атеротромбоза, преэклампсии [28–31]. Результаты нашего исследования не исключают значимость низкой плазменной концентрации эндогенного NO в развитии бактериальных осложнений у новорожденных. Для прояснения этого вопроса необходимо проведение дальнейших исследований.

Сравнительный анализ динамики концентрации изучаемых цитокинов у пациентов обеих групп выявил, что к третьим суткам, после курса ингаляций NO, происходило статистически значимое повышение концентрации цитокинов с пролиферативной и антиапоптотической активностью (sFas, FGF, G-CSF) и снижение концентрации «классических» провоспалительных цитокинов и цитокинов с проапоптотической активностью (TNF- α , IL-6, IL-8). На концентрацию IL-1 ингаляции NO не оказывали значимого влияния. С нашей точки

зрения, суммарной результирующей взаимодействия перечисленных цитокинов и эндогенного NO, присутствующих в плазме в необходимой и достаточной концентрации, являлось формирование повышенной активности иммунной системы, способной противостоять развитию септической инфекции, по сравнению с пациентами, получавшими только стандартную интенсивную терапию.

Известно, что цитокиновое окружение в определенной мере обуславливает путь, который выбирает клетка — апоптоз или пролиферация. Дефицит ростовых и пролиферативных факторов при высокой концентрации TNF- α , согласно существующим научным данным, рассматривается, как возможный сюжет активации программы апоптоза [32].

Результаты сравнительного анализа динамики относительного содержания популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов, моноцитов, естественных киллеров, показали, что на фоне ингаляций NO в указанной концентрации и временной экспозиции у пациентов увеличивалось относительное содержание миеломоноцитов/макрофагов при снижении доли лимфоцитов с экспрессией раннего активационного маркера, коммитированных к апоптозу и находящихся в апоптозе. У пациентов, получавших только стандартную терапию, процесс альтерации иммунокомпетентных клеток превалировал над пролиферацией, что, по всей видимости, определяло высокую вероятность развития бактериальных осложнений.

Относительно полученных результатов фармакоэкономического анализа о снижении финансовых затрат на лечение в основной группе в 1,5 раза, не смотря на достаточно высокую стоимость оксида азота: с нашей точки зрения, это было обусловлено значимым снижением длительности проведения ИВЛ и госпитализации в ОРПН.

ВЫВОДЫ

У новорожденных с респираторной патологией, находящихся на искусственной вентиляции легких, ингаляционный NO в указанной концентрации и временной экспозиции, назначаемый в составе традиционной интенсивной терапии, эффективно и безопасно снижает частоту развития сепсиса, длительность проведения ИВЛ, продолжительность госпитализации в ОРПН, стоимость терапии; обеспечивает стойкую тенденцию снижения частоты летальных исходов; снижает цитокиновую агрессию, ингибирует апоптоз лимфоцитов, активирует моноцитарно-макрофагальное звено иммунитета и пролиферативные процессы.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / DISCLAIMERS

Информация о вкладе авторов. Все представленные авторы внесли существенный вклад в концепцию и дизайн исследования, получение, анализ данных и их интерпретацию; принимали участие в написании статьи или существенной переработке ее важного научного и интеллектуального содержания; окончательном утверждении версии для публикации.

Все представленные авторы согласны нести ответственность за все аспекты работы и гарантировать соответствующее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью всех частей работы.

Author contribution. All authors presented contributed significantly to the concept and design of the study, acquisition, analysis and interpretation of the data; participated in the writing of the article or a substantial revision of its important scientific and intellectual content; Final version approval for publication.

All contributors agree to be responsible for all aspects of the work and to ensure that the accuracy and integrity of all parts of the work are adequately addressed and resolved.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) // JAMA. 2016. Vol. 315, No. 8. P. 801–810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287
2. Gotts J.E., Matthay M.A. Sepsis: pathophysiology and clinical management // BMJ 2016. Vol. 353. P. i1585. DOI: 10.1136/bmj.i1585
3. Fleischmann C., Scherag A., Adhikari N.K. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations // Am J Respir Crit Care Med. 2016. Vol. 193, No. 3. P. 259–272. DOI: 10.1164/rccm.201504-0781OC
4. Fleischmann C., Goldfarb D.M., Schlattmann P., et al. The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review // The Lancet Respiratory medicine. 2018. Vol. 6, No. 3. P. 223–230. DOI: 10.1016/S2213-2600(18)30063-8
5. Neonatal Inhaled Nitric Oxide Study Group (NINOS). Inhaled nitric oxide in full-term and nearly full-term infants with hypoxic respiratory failure // N Engl J Med. 1997. Vol. 336. P. 597–604. DOI: 10.1056/NEJM199702273360901
6. Банкалари Э. Легкие новорожденных. Под ред. Полина Р., пер. с англ.; под ред. Д.Ю. Овсянникова. М.: Логосфера, 2015. С. 342–354.
7. Hajishengallis G., Chavakis T., Hajishengallis E., Lambris J.D. Neutrophil homeostasis and inflammation: novel paradigms from studying periodontitis // J Leukoc Biol. 2015. Vol. 98, No. 4. P. 539–548. DOI: 10.1189/jlb.3VMR1014-468R
8. Савченко А.А., Борисов А.Г., Здзитовецкий Д.Е., Гвоздев И.И. Цитокиновая регуляция респираторного всплеска в нейтрофилах крови для прогнозирования абдоминального сепсиса у больных с расширенным гнойным перитонитом // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 5. С. 475–482. DOI: 10.15789/1563-0625-2016-5-475-482
9. Puhtinskaya M.G., Estrin V.V. Effect of inhaled nitric oxide on apoptosis of lymphocytes in newborns in critical states // Critical Care. 2014. Vol. 18, No. 1. P. 288. DOI: 10.1186/cc13478
10. Сосунов А.А. Оксид азота как межклеточный медиатор // Соросовский просветительский журнал. 2000. Т. 6, № 12. С. 27–34
11. Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Аюшинов Н.И. Экспрессия маркеров апоптоза при развитии процесса адгезии в брюшной полости в эксперименте // Журнал РАМН. 2014. Т. 69, № 5–6. С. 29–33.
12. 38th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine // Critical Care. 2018. Vol. 22 Suppl 1. P. P018. DOI: 10.1186/s13054-018-1973-5
13. Youn Y.A. The role of cytokines in seizures: interleukin (IL)-1 β , IL-1Ra, IL-8, and IL-10 // Korean J Pediatr. 2013. Vol. 56, No. 7. P. 271–274. DOI: 10.3345/kjp.2013.56.7.271
14. Соловьева А.Г., Кузнецова В.Л., Перетягин С.П., и др. Роль оксида азота в процессах свободнорадикального окисления // Вестник Российской военно-медицинской академии. 2016. № 1–53. С. 228–233.
15. Новиков В.Е., Левченко О.С., Пожилова Е.В. Митохондриальная синтаза оксида азота и ее роль в механизмах адаптации клеток к гипоксии // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2016. Т. 14, № 2. С. 38–46. DOI: 10.17816/RCF14238-46
16. Буров А.А. Терапия оксидом азота в неонатологии // Неонатология; 2014. № 4. С. 45–51.
17. Буров А.А., Гребенников В.А., Крычко Д.С. Проект клинического протокола диагностики и терапии персистирующей легочной гипертензии у новорожденных // Неонатология: новости, мнения, обучение. 2014. Т. 1, № 3. С. 145–161.
18. Bellamy T.C., Wood J., Garthwaite J. On the activation of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide // Proc Natl Acad Sci USA. 2002. Vol. 99, No. 1. P. 507–510. DOI: 10.1073/pnas.012368499
19. Field D. Neonatal Ventilation with Inhaled Nitric Oxide Versus Ventilatory Support Without Inhaled Nitric Oxide for Preterm Infants with Severe Respiratory Failure: The INNOVO Multicentre Randomised Controlled Trial (ISRCTN 17821339) // Pediatrics. 2005. Vol. 115, No. 4. P. 926–936. DOI: 10.1542/peds.2004-1209
20. Finer N.N., Barrington K.J. Nitric oxide for respiratory failure in infants born at or near term // Cochrane Database Syst Rev. 2001. No. 4. P. CD0000399. DOI: 10.1002/14651858.CD0000399
21. Ballard R.A., Truog W.E., Snaa A. Inhaled nitric oxide in preterm infants undergoing mechanical ventilation // N Engl J Med. 2006. Vol. 355, No. 4. P. 343–353. DOI: 10.1056/NEJMoA061088
22. De Nadai C., Sestili P., Cantoni O., et al. Nitric oxide inhibits

tumor necrosis factor- α -induced apoptosis by reducing the generation of ceramide // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000. Vol. 97, No. 10. P. 5480–5485. DOI: 10.1073/pnas.070062397

23. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Косицин Н.С. Проблемы оксида азота и цикличности в биологии и медицине // *Успехи современной биологии*. 2005. Т. 125, № 1. С. 41–65.

24. Kinsella J.P., Cutter G.R., Walsh W. Early inhaled nitric oxide therapy in premature newborns with respiratory failure // *N Engl J Med*. 2006. Vol. 355, No. 4. P. 354–364. DOI: 10.1056/NEJMoa0624011

25. Kinsella J.P., Neish S.R., Shaffer E. Low dose inhalational nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn // *Lancet*. 1992. Vol. 340, No. 8823. P. 819–820. DOI: 10.1056/NEJMoa060442

26. Штабницкий В.А., Чучалин А.Г. Ингаляционный оксид азота: возможности улучшения оксигенации при остром респираторном дистресс-синдроме // *Пульмонология*. 2015. Т. 25, № 2. С. 180–186. DOI: 10.18093/0869-0189-2015-25-2-180-186

27. Пухтинская М.Г., Эстрин В.В. Профилактика бактериальных осложнений коррекцией апоптоза Т-лимфоцитов крови у новорожденных с респираторной патологией // *Медицинский вестник Юга России*. 2013. № 4. С. 134–138.

28. Мовчан Э.А. Дисфункция эндотелия и тромбоцитов при хронической болезни почек: новый взгляд на старую проблему нарушений в системе гемостаза у пациентов с гломерулонефритом // *Бюллетень сибирской медицины*. 2008. Приложение 2. С. 88–96.

29. Алексеева С.Н., Иванова О.Н. Влияние курения беременных на антропометрические показатели новорожденных // *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2013. Т. 117, № 2. С. 81–84.

30. Александрович С.А., Визиснов К.В. Острый респираторный дистресс-синдром в детской практике // *Вестник интенсивной терапии*. 2014. № 3. С. 23–29.

31. Бойцов Е.В., Бялашова М.А., Овсянников Д.У. Современное понимание интерстициальных заболеваний легких у детей // *Журнал РАМН*. 2015. Т. 70, 2. С. 227–236. DOI: 10.15690/vramn.v70i2.1317

32. Пухтинская М.Г., Эстрин В.В., Гулова Е.С. Клинико-диагностическое значение апоптоза в патогенезе нейтропении и бактериальных осложнений у новорожденных с респираторным дистресс-синдромом // *Цитокины и воспаление*. 2011. Т. 10, № 2. С. 66–69.

REFERENCES

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801–810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287

2. Gotts JE, Matthay MA. Sepsis: pathophysiology and clinical management. *BMJ*. 2016;353:i1585. DOI: 10.1136/bmj.i1585

3. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med*; 2016;193(3):259–272. DOI: 10.1164/rccm.201504-0781OC

4. Fleischmann C, Goldfarb DM, Schlattmann P, et al. The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review. *The Lancet Respiratory medicine*. 2018;6(3):223–230. DOI: 10.1016/S2213-2600(18)30063-8

5. Neonatal Inhaled Nitric Oxide Study Group (NINOS). Inhaled nitric oxide in full-term and nearly full-term infants with hypoxic respiratory failure. *N Engl J Med*. 1997;336:597–604. DOI: 10.1056/NEJM199702273360901

6. Bankalari E. Lungs newborns. Problems and contradictions in neonatology. Moscow: Logosfera; 2015. P. 342–354.

7. Hajishengallis G, Chavakis T, Hajishengallis E, Lambris JD. Neutrophil homeostasis and inflammation: novel paradigms from studying periodontitis. *J Leukoc Biol*. 2015;98(4):539–548. DOI: 10.1189/jlb.3VMR1014-468R

8. Savchenko AA, Borisov AG, Zdzitovetsky DE, Gvozdev II. Cytokine regulation of respiratory burst in blood neutrophils for prediction of abdominal sepsis in patients with extended purulent peritonitis. *Medical Immunology*. 2016;18(5):475–482. (In Russ.) DOI:10.15789/1563-0625-2016-5-475-482

9. Pukhtinskaya MG, Estrin VV. Effect of inhaled nitric oxide on apoptosis of lymphocytes in newborns in critical states. *Critical Care*. 2014;18(1):288. DOI: 10.1186/cc13478

10. Sosunov AA. Nitric oxide as an intercellular mediator. *Soros Educational Journal*. 2000;6(12):27–34. (In Russ.)

11. Shurygina IA, Shurygin MG, Ayushinov NI. Expression of apoptosis markers during development of adhesion process in abdominal cavity in experiment. *Journal of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2014;69(5–6):29–33. (In Russ.)

12. 38th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine. *Crit Care*. 2018;22(1):P018. DOI: 10.1186/s13054-018-1973-5

13. Youn YA. The role of cytokines in seizures: interleukin (IL)-1 β , IL-1Ra, IL-8, and IL-10. *Korean J Pediatr*. 2013;56(7):271–274. DOI: 10.3345/kjp.2013.56.7.271

14. Solov'eva AG, Kuznetsova VL, Peretyagin SP, et al. The Role of Nitric Oxide in Free-radical Oxidation Processes. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2016;53(1):228–233. (In Russ.)

15. Novikov VE, Levchenkova OS, Pozhilova EV. Mitochondrial nitric oxide synthase and its role in the mechanisms of cell adaptation to hypoxia. *Reviews of Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2016;14(2):38–46. (In Russ.) DOI: 10.17816/RCF14238-46

16. Burov AA. Nitrogen oxide therapy in neonatology. *Neonatology*. 2014;(4):45–51. (In Russ.)

17. Burov AA, Grebennikov VA, Krychko DS. Project clinical practice guideline for persistent pulmonary hypertension of the newborn: diagnostics and therapy. *Neonatology: News, Opinions, Training*. 2014;1(3):145–161. (In Russ.)

18. Bellamy TC, Wood J, Garthwaite J. On the activation of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(1):507–510. DOI: 10.1073/pnas.012368499

19. Field D. Neonatal Ventilation With Inhaled Nitric Oxide Versus Ventilatory Support Without Inhaled Nitric Oxide for Preterm Infants With Severe Respiratory Failure: The INNOVO Multicentre Randomised Controlled Trial (ISRCTN 17821339). *Pediatrics*; 2005;115(4):926–936. DOI: 10.1542/peds.2004-1209

20. Finer NN, Barrington KJ. Nitric oxide for respiratory failure in infants born at or near term. *Cochrane Database Syst Rev*. 2001;(4):CD0000399. DOI: 10.1002/14651858.CD000399.

- 21.** Ballard RA, Truog WE, Cnaan A. Inhaled nitric oxide in preterm infants undergoing mechanical ventilation. *N Engl J Med.* 2006;355(4):343–353. DOI: 10.1056/NEJMoa061088
- 22.** De Nadai C, Sestili P, Cantoni O, et al. Nitric oxide inhibits tumor necrosis factor- α -induced apoptosis by reducing the generation of ceramide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(10):5480–5485. DOI: 10.1073/pnas.070062397
- 23.** Reutov VP, Sorokina EG, Kositzin NS. Problems of nitric oxide and cyclic recurrence in biology and medicine. *Uspehi sovremennoj biologii.* 2005;125(1):41–65. (In Russ.)
- 24.** Kinsella JP, Cutter GR, Walsh W. Early inhaled nitric oxide therapy in premature newborns with respiratory failure. *N Engl J Med.* 2006;355(4):354–364. DOI: 10.1056/NEJMoa060442
- 25.** Kinsella JP, Neish SR, Shaffer E. Low dose inhalational nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Lancet.* 1992;340(8823):819–820. DOI: 10.1056/NEJMoa060442
- 26.** Stabnitsky VA, Chuchalin AG. Inhalation nitric oxide: opportunities to improve oxygenation in acute respiratory distress syndrome. *Pulmonology.* 2015;25(2):180–186. (In Russ.) DOI: 10.18093/0869-0189-2015-25-2-180-186
- 27.** Pukhtinskaya M.G., Estrin V.V. Prevention of bacterial complications by correction of blood T-lymphocytes apoptosis in newborns with respiratory pathology. *Medical Herald of the South of Russia.* 2013;(4):134–138.
- 28.** Movchan YeA. Endothelium and thrombocyte dysfunction at chronic renal diseases: new look at the old problem of disorders in homeostatic system in glomerulonephritis patients. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2008;Suppl 2:88–96. (In Russ.)
- 29.** Alekseeva SN, Ivanova ON. Effect of pregnant women 's smoking on the anthropometric indicators of newborns. *Siberian Medical Journal (Irkutsk).* 2013;117(2):81–84. (In Russ.)
- 30.** Alexandrovitch US, Vizisnov KV. Acute respiratory distress syndrome in pediatric practice. *Messenger of Intensive Therapy.* 2014;(3):23–29. (In Russ.)
- 31.** Boytsov EV, Bialashova MA, Ovsyannikov DU. Modern insights into interstitial lung diseases in children. *Journal RAMS.* 2015;70(2):227–236. (In Russ.) DOI: 10.15690/vramn.v70i2.1317
- 32.** Pukhtinskaya M.G., Estrin V.V., Gulova E.S. Clinical and diagnostic significance of apoptosis in the pathogenesis of neutropenia and bacterial complications in newborns with respiratory distress syndrome. *Cytokines and inflammation.* 2011;10(2):66–69. (In Russ.)

ОБ АВТОРАХ

***Марина Гаевна Пухтинская**, д-р мед. наук, вед. научн. сотр.;
адрес: Россия, 344012, Ростов-на-Дону, ул. Мечникова, д. 43;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5530-2194>;
eLibrary SPIN: 3120-7069; e-mail: puhmar@mail.ru

Владимир Владимирович Эстрин, д-р мед. наук, профессор;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9201-8333>;
eLibrary SPIN: 8136-4128; e-mail: medinsur@aaanet.ru

AUTHORS INFO

***Marina G. Pukhtinskaya**, Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher;
address: 43 Mechnikova str., Rostov-on-Don, 344012, Russia;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5530-2194>;
e-mail: puhmar@mail.ru

Vladimir V. Estrin, Dr. Sci. (Med.), Professor;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9201-8333>;
e-mail: medinsur@aaanet.ru