В.Е. Мухин<sup>1</sup>, Д.А. Праулова<sup>1</sup>, Л.Л. Панкратьева<sup>1</sup>, О.И. Милева<sup>2</sup>, А.Г. Румянцев<sup>1</sup>, Н.Н. Володин<sup>1</sup>

- <sup>1</sup> ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва, Москва, Российская Федерация
- <sup>2</sup> Городская больница № 24 (Филиал № 2), Москва, Российская Федерация

# Экспрессия Fc-gamma рецепторов нейтрофилов у недоношенных детей различного гестационного возраста

#### Контактная информация:

Мухин Владимир Евгеньевич, младший научный сотрудник отдела неонатологии ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва **Адрес:** 117997, Москва, ул. Саморы Машела, д. 1, **e-mail:** muhin.vldmr@gmail.com **Статья поступила:** 19.05.2016 г., принята к печати: 27.06.2016 г.

Недоношенные дети отличаются высоким риском развития бактериальных инфекций, чему способствует незрелость их иммунной системы. Цель исследования: изучить экспрессию нейтрофилами Fc-gamma рецепторов и возможность ее модуляции у недоношенных новорожденных (с низкой, НМТ, очень низкой, ОНМТ, и экстремально низкой, ЭНМТ, массой тела) с бактериальной инфекцией. Методы: исследовали образцы пуповинной крови, а также периферической венозной крови новорожденных, взятые на 28-30-е сут жизни. Методом проточной цитофлуориметрии определяли уровень поверхностной экспрессии нейтрофилами Fc-gamma рецепторов (CD64, CD32, CD16), фагоцитарную активность и кислородный взрыв гранулоцитов, стимулированных флуоресцентно меченными Escherichia coli. Результаты: исследованы образцы крови 10 доношенных, 20 недоношенных с НМТ, 18 недоношенных с ЭНМТ и ОНМТ. Экспрессия СD64 у недоношенных при рождении была выше, чем у доношенных детей, и составила 6,0 (5,3;9,8), 7,1 (5,1;11,5) и 4,27 (2,4;5,8) MFI соответственно (p=0,013). Экспрессия CD16 у недоношенных, напротив, была ниже: 99,7 (71,3; 126,0) и 80,9 (58,7; 114,8) и 125,3 (95,5; 144,1) MFI соответственно (p=0,021). К концу 1-го мес жизни у недоношенных новорожденных экспрессия СD16 нейтрофилами периферической крови увеличилась до 126,6 (110,1; 129,0) MFI у детей с ОНТ и до 118,5 (99,5; 132,2) MFI — у детей с ОНМТ/ЭНМТ. Экспрессия CD32 в сравниваемых группах не различалась. Установлена корреляция между интенсивностью кислородного взрыва нейтрофилов и гестационным возрастом (r = 0,67; p < 0,001). Культивирование нейтрофилов недоношенных в присутствии гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) приводит к 2,4-5-кратному повышению экспрессии CD16. CD32 и усилению кислородного взрыва. Заключение: недоношенные новорожденные характеризуются дисрегуляцией экспрессии Fc-gamma рецепторов и функциональной недостаточностью нейтрофилов. Г-КСФ модулирует экспрессию CD16 и CD32 на поверхности нейтрофилов и усиливает кислородный взрыв в них.

**Ключевые слова:** недоношенные, Fc-gamma рецепторы, фагоцитоз, кислородный взрыв, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор.

(**Для цитирования:** Мухин В. Е., Праулова Д. А., Панкратьева Л. Л., Милева О. И., Румянцев А. Г., Володин Н. Н. Экспрессия Fc-gamma рецепторов нейтрофилов у недоношенных детей различного гестационного возраста. *Вопросы современной педиатрии*. 2016; 15 (3): 273–278. doi: 10.15690/vsp.v15i3.1565)

Vladimir E. Mukhin<sup>1</sup>, Daria A. Praulova<sup>1</sup>, Lyudmila L. Pankratyeva<sup>1</sup>, Olga I. Mileva<sup>2</sup>, Alexander G. Rumyantsev<sup>1</sup>, Nikolay N. Volodin<sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Dmitry Rogachev Federal Research and Clinical Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation
- <sup>2</sup> Municipal Hospital No. 24 (Branch No. 2), Moscow, Russian Federation

## **Expression of Fc-Gamma Receptors of Neutrophils in Preterm Infants of Different Gestational Age**

Background: Premature infants have a high risk of bacterial infections facilitated by the immaturity of their immune system. Objective: Our aim was to study the expression of Fc-gamma receptors of neutrophils and the possibility of its modulation in preterm infants (with a low, LBW, very low, VLBW and extremely low, ELBW, birth weight) with bacterial infection. Methods: We examined cord blood samples, as well as peripheral venous blood samples of newborns taken at 28–30th day of life. The flow cytofluorometry method was used to determine the level of surface expression of Fc-gamma receptors by neutrophils (CD64, CD32, CD16), phagocytic activity and oxygen burst of granulocytes stimulated with fluorescently labelled Escherichia coli. Results: We examined blood samples of 10 full-term infants, 20 preterm infants with LBW, 18 preterm infants with VLBW and ELBW. CD64 expression in preterm infants at birth was higher than in full-term children and made 6.0 (5.3; 9.8), 7.1 (5.1; 11.5), and 4.27 (2.4; 5.8) MFI respectively (p = 0.013). CD16 expression in preterm infants, in contrast, was lower: 99.7 (71.3; 126.0) and 80.9 (58.7; 114.8), and 125.3 (95.5; 144.1) MFI respectively (p = 0.021). By the end of the 1st month of life, CD16 expression of peripheral blood neutrophils in preterm infants increased to 126.6 (110.1; 129.0) MFI in children with LBW and to 118.5 (99.5; 132.2) MFI — in children with VLBW/ELBW. CD32 expression in compared groups did not differ. A correlation between the intensity of the oxygen burst of neutrophils and gestational age was established (r = 0.67; p < 0.001). Neutrophil culture of preterm infants in the presence of granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) results in a 2.4-5-fold increase in CD16, CD32 expression and enhancement of oxygen burst. Conclusion: Preterm infants are characterized by deregulated expression of Fc-gamma receptors and functional impairment of neutrophils. G-CSF modulates the expression of CD16 and CD32 on the surface of neutrophils and enhances the oxygen burst in them.

Key words: preterm infants, Fc-gamma receptors, phagocytosis, oxygen burst, granulocyte colony stimulating factor.

(**For citation:** Mukhin Vladimir E., Praulova Daria A., Pankratyeva Lyudmila L., Mileva Olga I., Rumyantsev Alexander G., Volodin Nikolay N. Expression of Fc-Gamma Receptors of Neutrophils in Preterm Infants of Different Gestational Age. *Voprosy sovremennoi pediatrii* — *Current Pediatrics*. 2016; 15 (3): 273–278. doi: 10.15690/vsp.v15i3.1565)

273

#### **ОБОСНОВАНИЕ**

Риск развития тяжелых бактериальных инфекций у глубоконедоношенных детей значительно выше по сравнению с более зрелыми по сроку гестации новорожденными [1]. В то же время незрелость иммунной системы у детей с очень низкой (ОНМТ) и экстремально низкой массой тела (ЭНМТ) может быть фактором, определяющим неэффективность подходов к профилактике и терапии неонатального сепсиса, применяемых у доношенных детей [2]. Снижение частоты развития септических осложнений у детей с ОНМТ и ЭНМТ приобретает особую важность, учитывая высокую вероятность развития инвалидизирующих состояний, ассоциированных с неонатальной инфекцией [3, 4].

Состояние системы иммунобиологического надзора организма предполагает согласованную работу огромного числа ее компонентов, включая иммуноглобулины, систему комплемента и функциональные цитотоксические фагоциты. Результаты ограниченного числа исследований свидетельствуют о том, что большая часть составляющих указанной выше системы неактивна у детей с ОНМТ и ЭНМТ в той же степени, что и у доношенных новорожденных, детей младшего и старшего возраста и взрослых [5–7].

Иммуноглобулины являются ключевыми молекулами, обеспечивающими защиту от микробной инфекции [8]. Связывание иммуноглобулинов с поверхностными клеточными рецепторами улучшает элиминацию бактерий функционально активными полиморфноядерными лейкоцитами [9]. Участок антитела Fc взаимодействует с различными Fc-рецепторами и лигандами, которые опосредуют эффекторные функции клеток иммунной системы. Это семейство рецепторов объединяет Fc-gamma RI (CD64), включающий изоформы Fc-gamma Rla, Fc-gamma RIb и Fc-gamma RIc; Fc-gamma RII (CD32), включающий изоформы Fc-gamma RIIa, Fc-gamma RIIb (в т.ч. Fc-gamma RIIb-1 и Fc-gamma RIIb-2) и Fc-gamma RIIc; и Fc-gamma RIII (CD16), включающий изоформы Fc-gamma RIIIa и Fc-gamma RIIIb [10]. Известно, что Fc-gamma рецепторы имеют внеклеточный домен, опосредующий взаимодействие с Fc, мембраносвязанным участком и внутриклеточным доменом, который может опосредовать некоторые сигнальные события внутри клетки. Эти рецепторы экспрессируются в различных иммунных клетках, в т.ч. в моноцитах, макрофагах, нейтрофилах, дендритных клетках, эозинофилах, тучных клетках, тромбоцитах, В клетках, больших гранулярных лимфоцитах, клетках Лангерганса, натуральных киллерах (NK) и T клетках. Образование комплекса Fc/Fc-gamma-R обеспечивает взаимодействие этих эффекторных клеток с антигенами, что обычно приводит к проведению сигнала в клетках и важным последующим иммунным реакциям, таким как высвобождение медиаторов воспаления, активация В клеток, эндоцитоз, фагоцитоз и антителозависимая клеточная цитотоксичность. Способность опосредовать фаготоксическую эффекторную функцию служит потенциальным механизмом, при помощи которого антитела реализуют противоинфекционную защиту [10].

Различные подклассы IgG обладают разным сродством к Fc-gamma рецепторам. Обычно  $IgG_1$  и  $IgG_3$  связываются с рецепторами значительно лучше, чем  $IgG_2$  и  $IgG_4$ . Внеклеточные домены Fc-gamma RIIIa и Fc-gamma RIIIb идентичны на 96%, однако Fc-gamma RIIIb не имеет внутриклеточного сигнального домена. Кроме того, поскольку Fc-gamma RI, Fc-gamma RIIa/с и Fc-gamma RIIIa являются положительными регуляторами активации, запускаемой иммунным комплексом, они характе-

ризуются наличием внутриклеточного домена, в состав которого входит иммунорецепторный тирозинзависимый активационный мотив (ITAM), Fc-gamma RIIb имеет в своем составе иммунорецепторный тирозинзависимый ингибиторный мотив (ITIM) и поэтому является ингибитором. Таким образом, первые рецепторы относятся к активирующим рецепторам, а Fc-gamma RIIb — к ингибирующим [11].

Известно, что в неонатологической практике применение препаратов иммуноглобулинов для внутривенного введения (ИГВВ) показало высокую эффективность как в качестве стратегии профилактики, так и адъювантной терапии неонатального сепсиса [1]. Однако исследование эффективности препаратов ИГВВ среди недоношенных новорожденных с ОНМТ и ЭНМТ не продемонстрировало статистически значимых различий в частоте развития нозокомиального сепсиса в сравнении с контрольной группой [12, 13].

Таким образом, дисрегуляция экспрессии Fc-gamma рецепторов на нейтрофилах недоношенных новорожденных может быть ключевым фактором, определяющим неэффективность адъювантной терапии бактериальной инфекции.

Целью нашего исследования было изучить экспрессию нейтрофилами Fc-gamma рецепторов и возможность ее модуляции у детей различного гестационного возраста с высоким риском развития бактериальной инфекции.

#### **МЕТОДЫ**

#### Условия проведения

Исследование выполнено в отделе неонатологии ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва на базе родильного дома Городской больницы № 24 (Филиал № 2) г. Москвы. Период проведения исследования — с ноября 2015 по март 2016 г.

#### Критерии соответствия

Роженицам, поступившим с началом родовой деятельности либо после стимуляции, было предложено принять участие в исследовании. В качестве *критериев включения* в исследование были определены преждевременные роды через естественные родовые пути (гестационный возраст 25-37 нед), отсутствие системных заболеваний у матери. Критериями включения в контрольную группу были одноплодная доношенная беременность, роды через естественные родовые пути, оценка по шкале APGAR  $\geq$  8 баллов на 1-й и 5-й мин жизни. В зависимости от значения массы тела при рождении недоношенные новорожденные были разделены на группы родившихся с низкой (НМТ, масса от 1500 до 2500 г), очень низкой (ОНМТ, масса от 1000 до 1500 г) и экстремально низкой массой тела (ЭНМТ, масса < 1000 г).

*Критерии невключения*: наличие аномалий развития плода.

#### Взятие образцов крови

Взятие пуповинной крови выполняли до отделения последа пункционным методом в стерильные вакуумные пробирки, содержащие гепарин в качестве антикоагулянта. Минимальный объем пуповинной крови для исследования составлял 6 мл. Взятие периферической венозной крови у новорожденных выполняли на 28–30-е сут жизни. Взятие периферической крови осуществляли у недоношенных новорожденных, находившихся в отделении реанимации 1-го и 2-го этапа, из венозного катетера одновременно с образцами для клинических анализов. Биоматериал собирали в микропробирки с антикоагулянтом (ЭДТА). Объем пробы периферической крови состав-

лял не более 500 мкл. Все исследования выполнены не позднее 8 ч после взятия биоматериала в лаборатории ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва.

#### Культуральные исследования

Нейтрофильные гранулоциты выделяли из образцов пуповинной крови методом центрифугирования в двойном градиенте плотности фиколла ( $\rho$  = 1,077 и 1,093 г/л). Выделенную фракцию нейтрофильных гранулоцитов переносили в стерильные центрифужные пробирки и трижды отмывали от градиента фосфатным солевым буфером путем центрифугирования. После отмывки клетки ресуспендировали в культуральной среде RPMI-1640, содержащей 10% инактивированной фетальной телячьей сыворотки, 2mM L-глутамина, 50 ед/мл пенициллина (Sigma, США). Клетки переносили в 96-луночные планшеты, культивировали в присутствии гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) в СО<sub>2</sub>-инкубаторе. Анализ уровня экспрессии клеточных рецепторов и интенсивности кислородного взрыва выполняли перед добавлением Г-КСФ, а также спустя 12 и 24 ч культивирования с Г-КСФ.

#### Оценка поверхностной экспрессии Fc-gamma рецепторов

Для определения уровня экспрессии клеточных рецепторов использовали метод многоцветной проточной цитометрии. Оценку интенсивности экспрессии маркеров производили в соответствии с протоколом, разработанным производителем набора антител (Beckman & Coulter, США). В состав набора входили следующие антитела: анти-CD45, меченные PacificBlue (используются для корректного гейтирования исследуемых популяций клеток), анти-CD64 (FcyRI), меченные PE, анти-CD16 (FcyRIII), меченные РС7, анти-CD32 (FcyRII), меченные РС5, а также соответствующие им изотипические контрольные образцы для исключения эффекта аутофлуоресценции (IgG<sub>1</sub> или IgG<sub>2</sub>). Для сбора данных использовали проточный цитофлуориметр Navios (Beckman & Coulter, США). Анализ данных производили с помощью программного обеспечения Kaluza (Beckman & Coulter, США). Результаты цитометрического анализа выражали как средние значения интенсивности флуоресценции (mean fluorescence intensity, MFI).

### Оценка фагоцитарной активности и кислородного взрыва

Фагоцитарную активность и кислородный взрыв оценивали только в образцах пуповинной крови. Количественную оценку фагоцитарной активности гранулоцитов в образцах гепаринизированной крови выполняли методом проточной цитофлуориметрии с использованием флуоресцентно меченных Escherichia coli (IngoFlowEx Kit, EXBIO Praha, Чешская Республика). Бактерии, используемые

в тесте, были преопсонизированы антителами человеческой плазмы крови. Результаты представлены как процент фагоцитирующих гранулоцитов (поглощение одной или более флуоресцентно меченных бактерий одной клеткой).

Кислородный взрыв оценивали методом проточной цитометрии (набор FagoFlowEx Kit, EXBIO Praha, Чешская Республика). Тест основан на оценке интенсивности окислительного взрыва в гранулоцитах после стимуляции E. coli. После поглощения бактерии в фагоците активируется NADPH-оксидаза, которая опосредует продукцию активных форм кислорода. Последние внутри фагоцита окисляют дигидрородамин 123 (DHR123) и превращают его в флуоресцентный родамин 123. который детектируется на проточном цитофлуориметре. В качестве положительного контроля использовали форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА), который инициирует кислородный взрыв без адгезии и поглощения патогена фагоцитом. В качестве отрицательного контроля применяли образцы, прошедшие полный цикл пробоподготовки, но без стимуляции E. coli. Результаты оценивали путем расчета индекса стимуляции (Stimulation Index, SI) как отношения средней интенсивности флуоресценции активированных гранулоцитов стимулированных образцов и отрицательных контролей.

#### Этическая экспертиза

Исследование согласовано с Локальным этическим комитетом ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва (протокол № 119 от 28.09.2015 г.).

#### Статистический анализ

Объем выборки предварительно не рассчитывали. Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ STATISTICA v. 9.1 (StatSoft Inc., США). Количественные данные представлены в виде медианы (25-го; 75-го процентилей). Значимость различий оценивали при помощи непараметрического U-критерия Манна—Уитни. Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при p < 0,05.

#### **РЕЗУЛЬТАТЫ**

#### Участники исследования

Всего были исследованы образцы крови 48 новорожденных, из них 10 — доношенные (1-я группа), 18 — недоношенные с ЭНМТ и ОНМТ (2-я группа), 20 — недоношенные с НМТ (3-я группа). Описание групп представлено в табл. 1.

#### Экспрессия нейтрофилами Fc-gamma рецепторов

По результатам иммунофенотипического исследования поверхностных рецепторов нейтрофильных гра-

Таблица 1. Характеристика детей с разным гестационным возрастом, включенных в исследование

Показатель	<b>1</b> -я группа ( <i>n</i> = <b>1</b> 0)	2-я группа (n = 18)	3-я группа ( <i>n</i> = 20)	
Гестационный возраст, нед	39 (38; 40)	27 (26; 28)	34 (32; 36)	
Масса при рождении, г	3390 (2440; 3680)	1050 (910; 1230)	2075 (1850; 2420)	
Локализованный инфекционный процесс, абс. (%)	-	14 (78)	11 (55)	
Генерализованная инфекция, абс. (%)	-	3 (17)	1 (5)	

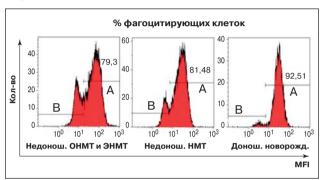
Примечание (здесь и в табл. 2). 1-я группа — доношенные новорожденные, 2-я группа — недоношенные новорожденные с ОНМТ/ЭНМТ, 3-я группа — недоношенные новорожденные с НМТ.

**Таблица 2.** Экспрессия Fc-gamma рецепторов нейтрофилов у детей с различным гестационным возрастом

Показатель	1-я группа (пуповинная кровь)	2-я і	группа	3-я группа		
		Пуповинная кровь	Венозная кровь (28-30-е сут жизни)	Пуповинная кровь	Венозная кровь (28-30-е сут жизни)	
FcγRI (CD64), MFI	4,27 (2,4; 5,8)	7,1 (5,1; 11,5)**	5,3 (3,8; 6,5)	6,0 (5,3; 9,8)**	4,9 (3,2; 6,3)	
FcγRII (CD32), MFI	11,1 (8,5; 15,4)	13,1 (8,1; 17,5)	11,4 (8,7; 13,7)	15,6 (8,0; 18,1)	12,0 (8,4; 16,3)	
FcγRIII (CD16), MFI	125,3 (95,5; 144,1)	80,9 (58,7; 114,8)*	118,5 (99,5; 132,2)	99,7 (71,3; 126,0)*	126,6 (110,1; 129,0)	

Примечание. \*-p < 0.05, \*\*-p < 0.01— при сравнении с показателем у детей 1-й группы.

**Рис. 1.** Доля фагоцитирующих нейтрофилов недоношенных и доношенных новорожденных на примере отдельных пациентов



Примечание. А — область фагоцитирующих нейтрофилов (поглощение одной или более флуоресцентно меченной бактерии одной клеткой); В — нейтрофилы, не проявляющие фагоцитарной активности.

нулоцитов было установлено, что экспрессия  $Fc\gamma RI$  (CD64) повышена у недоношенных детей при рождении по сравнению с доношенными новорожденными (p=0,005). К концу 1-го мес жизни экспрессия CD64 у недоношенных детей приближается к показателям экспрессии у доношенных детей (табл. 2). Показано, что течение инфекционного процесса у недоношенных детей с генерализацией инфекции сопровождается увеличением экспрессии CD64 на поверхности полиморфноядерных нейтрофилов до 10,6 (7,9; 13,8) MFI (p=0,045).

Оценка экспрессии  $Fc\gamma RII$  (CD32) в исследуемых группах продемонстрировала, что ее уровень не зависит от гестационного возраста новорожденного (p=0.082; см. табл. 2). Исключение составили дети с генерализацией инфекционного процесса: для этих пациентов медиана экспрессии CD32 составила 6,0 (3,7; 7,0) MFI.

Анализ экспрессии  $Fc\gamma RIII$  (CD16) показал относительно низкий уровень интенсивности экспрессии маркера на поверхности гранулоцитов недоношенных детей по сравнению с доношенными новорожденными. У обеих групп недоношенных новорожденных наблюдалось увеличение экспрессии CD16 к концу 1-го мес жизни (см. табл. 2).

#### Фагоцитарная активность нейтрофилов

Изучение фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов в образцах пуповинной крови позволило установить, что у недоношенных новорожденных они характеризуются сниженной способностью к фагоцитозу в сравнении с доношенными детьми, и чем меньше гестационный возраст ребенка, тем более выражена функциональная недостаточность нейтрофилов. Доля фагоцитирующих клеток в группе недоношенных новорожденных с ОНМТ и ЭНМТ составила 79,3% (72,9; 83,5), в группе недоношенных новорожденных с НМТ — 81,5% (76,3; 86,5); у доношенных новорожденных этот показатель составил 92,5% (89,6; 94,1) (рис. 1).

#### Параметры кислородного взрыва нейтрофилов

Показатель кислородного взрыва нейтрофильных гранулоцитов недоношенных новорожденных также снижен в сравнении с доношенными детьми. Индекс стимуляции (SI) в группе недоношенных с ОНМТ и ЭНМТ составил 11,5 (10,2; 14,0), в группе недоношенных новорожденных с НМТ — 24,9 (21,9; 31,9); для доношенных новорожденных данный показатель был равен 37,8 (30,1; 50,9).

Далее был проведен корреляционный анализ интенсивности кислородного взрыва нейтрофилов и гестационного возраста новорожденных (табл. 3). Показана статистически значимая корреляция средней силы (r=0,67; p<0,001). Кроме того, установлена зависимость активности фагоцитоза (r=0,42; p=0,027) и интенсивности кислородного взрыва (r=0,48; p=0,038) от уровня экспрессии CD16 (см. табл. 3).

**Таблица 3.** Матрица корреляционного анализа количественных признаков

Показатели	ГВ, нед	CD16, MFI	CD32, MFI	CD64, MFI	Фагоцитоз, %	SI
ГВ, нед.	1,00	0,51	-0,32	-0,51	0,53	0,67
CD16, MFI	0,51	1,00	-0,09	-0,25	0,42	0,48
CD32, MFI	-0,32	-0,09	1,00	0,31	-0,41	0,28
CD64, MFI	-0,51	-0,25	0,31	1,00	-0,38	0,24
Фагоцитоз, %	0,53	0,42	-0,41	-0,38	1,00	0,52
SI	0,67	0,48	0,28	0,24	0,52	1,00

*Примечание*. ГВ — гестационный возраст; SI — индекс стимуляции. Жирным выделены статистически значимые (при p < 0.05) значения коэффициента корреляции r.

#### Влияние Г-КСФ на экспрессию Fc-gamma рецепторов и параметры кислородного взрыва нейтрофилов

Оценка модулирующего действия Г-КСФ на нейтрофилы в условиях *in vitro* продемонстрировала, что их культивирование в присутствии Г-КСФ приводит к 2,4–5-кратному повышению интенсивности экспрессии CD16 и CD32 рецепторов, а также более чем к 3-кратному увеличению интенсивности кислородного взрыва (рис. 2).

#### ОБСУЖДЕНИЕ

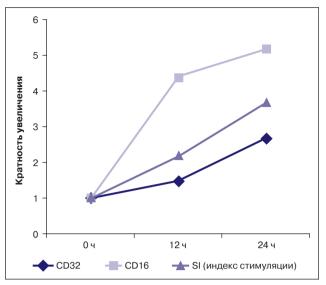
#### Резюме основного результата исследования

Недоношенные новорожденные характеризуются сниженной способностью нейтрофилов к фагоцитозу и кислородному взрыву в сравнении с доношенными новорожденными, и чем меньше гестационный возраст ребенка, тем более выражена функциональная недостаточность указанных процессов. Экспрессия СD64 нейтрофилами значимо повышена у недоношенных детей при рождении, и к концу 1-го мес жизни сравнивается с показателями экспрессии у доношенных детей при отсутствии признаков генерализации инфекционного процесса. Экспрессия CD32 не зависит от гестационного возраста новорожденного, однако снижена в группе детей с генерализацией инфекционного процесса. Экспрессия CD16 существенно снижена на поверхности нейтрофилов недоношенных детей по сравнению с доношенными новорожденными и при отсутствии факта генерализации инфекционного процесса достигает уровня доношенных новорожденных в течение первых 4 нед постнатальной жизни. Г-КСФ в условиях *in vitro* увеличивает экспрессию CD16 и CD32 на поверхности нейтрофилов и усиливает кислородный взрыв в них.

#### Обсуждение результатов исследования

Профилактика и лечение сепсиса препаратами иммуноглобулинов могут обеспечивать значительное уменьшение степени выраженности клинических проявлений инфекционного процесса, принимая во внимание тот факт, что связывание антител со специфичным лигандом запускает серию последовательных процессов, приводящих к элиминации патогенного микроорганизма [14]. Ключевыми поверхностными клеточными рецепторами, ответственными за связывание иммуноглобулинов, являются Fc-gamma RI (CD64), Fc-gamma RII (CD32) и Fc-gamma RIII (CD16) [10]. Нами продемонстрировано, что экспрессия указанных рецепторов на поверхности нейтрофилов — первой линии защиты у новорожденных различного гестационного возраста — имеет свои уникальные для данного возраста особенности и кардинально меняется в случае развития инфекционного процесса. Так, экспрессия СD64 нейтрофилами значимо повышена у недоношенных детей при рождении, и к концу 1-го мес жизни сравнивается с показателями их экспрессии у доношенных детей при отсутствии факта генерализации инфекционного процесса. Показано, что генерализация инфекции у недоношенных детей, а именно возникновение двух и более очагов инфекции, синдрома системной воспалительной реакции и органной недостаточности, сопровождается увеличением экспрессии CD64 на поверхности нейтрофилов. Чем меньше гестационный возраст, тем более выражено это увеличение. При этом увеличение экспрессии данного рецептора на клетках недоношенных детей не обеспечивает этим лейкоцитам повышения их опсонофагоцитарной активности. Более того, нами продемонстрировано, что данный рецептор экспрес-

**Рис. 2.** Экспрессия  $Fc\gamma RIII$  (CD16) и  $Fc\gamma RII$  (CD32) рецепторов на нейтрофилах и интенсивность кислородного взрыва после их культивирования с  $\Gamma$ -КСФ



сируется постоянно на поверхности нейтрофилов как доношенных, так и недоношенных новорожденных, в то время как его экспрессия на поверхности нейтрофилов у взрослых крайне низкая и увеличивается только при наличии синдрома системной воспалительной реакции [15]. Экспрессия СD32 не зависит от гестационного возраста новорожденного. Исключение составляют дети с генерализацией инфекционного процесса, сопровождаемого абсолютной нейтропенией. Учитывая регуляторную активность данного рецептора, можно предположить его участие в контроле апоптоза нейтрофилов при лигандрецепторном взаимодействии с молекулой иммуноглобулина.

Экспрессия CD16 нейтрофилами существенно снижена на поверхности гранулоцитов недоношенных детей и увеличивается до уровня экспрессии доношенных новорожденных в течение первых 4 нед постнатальной жизни. Интересен тот факт, что у недоношенных новорожденных функциональная активность именно этого рецептора отвечает за опсонофагоцитарные реакции (а не CD64, как у взрослых), т.к. повышение интенсивности экспрессии CD16 на поверхности нейтрофилов приводит к стимуляции фагоцитоза [5]. Именно поэтому даже при наличии необходимого количества патогенспецифичных иммуноглобулинов и их связывании с поверхностью клеточной стенки бактерий сниженная экспрессия CD16 рецептора на эффекторных клетках у недоношенных детей может определять недостаточность опсонофагоцитоза и клиническую неэффективность терапии препаратами ИГВВ.

В качестве костимулятора иммуноглобулинопосредованной опсонизации и фагоцитоза нами предложен гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ). Г-КСФ влияет на гранулоцитарный росток кроветворения, стимулирует деление и дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток, регулирует образование функционально активных нейтрофилов и их выход в кровь из костного мозга. Г-КСФ также способен усиливать фагоцитарную активность нейтрофилов [16]. Нами продемонстрировано, что воздействие Г-КСФ на клетки с законченной дифференцировкой в условиях *in vitro* повышает экспрессию CD16-рецептора на нейтрофилах, приводит к стимуляции опсонофагоцитарных реакций

и усилению кислородного взрыва в них. Кроме того, Г-КСФ увеличивает и экспрессию CD32, что может препятствовать чрезмерно преждевременному апоптозу нейтрофилов и развитию абсолютной нейтропении.

#### Ограничения исследования

Ввиду того, что риск развития генерализованных бактериальных инфекций у глубоконедоношенных детей значительно выше по сравнению с более зрелыми по сроку гестации новорожденными, анализируемые группы являются неоднородными по частоте встречаемости инфекционных осложнений. В связи с этим обнаруженные различия могут быть связаны не только с гестационным возрастом, но и с частотой развития инфекционных осложнений в сравниваемых группах.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Известно, что система противобактериального иммунитета у детей с ОНМТ и ЭНМТ активна в меньшей степени, чем у доношенных новорожденных, детей младшего и старшего возраста и взрослых. В то же время незрелость системы иммунобиологического надзора организма недоношенных новорожденных является основным фактором, определяющим неэффективность подходов к профилактике и терапии неонатального сепсиса, применяемых у доношенных детей. Так, успешно используемые в неонатологической практике препараты иммуноглобулинов для внутривенного введения не показали эффективности у недоношенных новорожденных с ОНМТ и ЭНМТ. Нами было продемонстрировано, что экспрессия рецепторов, ответственных за связывание иммуногло-

булинов на поверхности нейтрофилов, имеет свои уникальные для данного возраста особенности. Показана сниженная способность этого пула лейкоцитов недоношенных новорожденных к опсонизации, фагоцитозу и кислородному взрыву. При этом выявлена взаимосвязь функциональной активности нейтрофилов и экспрессии ими Fc-gamma рецепторов. Таким образом, дисрегуляция экспрессии Fc-gamma рецепторов на нейтрофилах недоношенных новорожденных может быть ключевым фактором, определяющим неэффективность адъювантной терапии бактериальной инфекции у них.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет средств бюджетного финансирования.

#### **КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ**

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

#### **SCOPUS AUTHOR ID**

- **В.Е. Мухин** https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorld=56175609800
- **Л.Л. Панкратьева** https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorld=56087861300
- **О.И. Милева** https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorld=56175448800
- **А.Г. Румянцев** https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorld=7004956629
- **H.H. Володин** https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorld=7006567545

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Дегтярёва М.В., Бирюкова Т.В., Володин Н.Н., и др. Клиниколабораторные особенности раннего неонатального сепсиса у детей различного гестационного возраста и оценка эффективности иммунозаместительной терапии Пентаглобином // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2008. Т. 87. № 1 С. 32–40. [Degtyareva MV, Biryukova TV, Volodin NN, et al. Clinical and laboratory peculiarities of early neonatal sepsis in children with different gestation age and estimation of efficacy of immunosubstitutive therapy by Pentaglobin. Pediatriia. 2008;87(1):32–40. (In Russ).]
- 2. Mussi-Pinhata MM, Rego MA. Immunological peculiarities of extremely preterm infants: a challenge for the prevention of nosocomial sepsis. *J Pediatr (Rio J)*. 2005;81(1 Suppl):59–68. doi: 10.2223/jped.1301.
- 3. Adams-Chapman I, Stoll BJ. Neonatal infection and long-term neurodevelopmental outcome in the preterm infant. *Curr Opin Infect Dis.* 2006;19(3):290–297. doi: 10.1097/01.qco.0000224825. 57976.87.
- 4. Wilson-Costello D, Friedman H, Minich N, et al. Improved neurodevelopmental outcomes for extremely low birth weight infants in 2000–2002. *Pediatrics*. 2007;119(1):37–45. doi: 10.1542/peds.2006-1416.
- 5. Kallman J, Schollin J, Schalen C, et al. Impaired phagocytosis and opsonisation towards group B streptococci in preterm neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1998;78(1):F46–F50. doi: 10.1136/fn.78.1.f46.
- 6. Wolach B, Dolfin T, Regev R, et al. The development of the complement system after 28 weeks' gestation. *Acta Paediatr.* 1997;86(5):523–527. doi: 10.1111/j.1651-2227.1997.tb08924.x.
- 7. Cates KL, Goetz C, Rosenberg N, et al. Longitudinal development of specific and functional antibody in very low birth weight premature infants. *Pediatr Res.* 1988;23(1):14–22. doi: 10.1203/00006450-198801000-00005.

- 8. Negi VS, Elluru S, Siberil S, et al. Intravenous immunoglobulin: an update on the clinical use and mechanisms of action. *J Clin Immunol.* 2007;27(3):233–245. doi: 10.1007/s10875-007-9088-9.
- 9. Maeda M, van Schie RC, Yuksel B, et al. Differential expression of Fc receptors for IgG by monocytes and granulocytes from neonates and adults. *Clin Exp Immunol.* 1996;103(2):343–347. doi: 10.1046/j.1365-2249.1996.d01-615.x.
- 10. Nagelkerke S, Kuijpers T. Immunomodulation by IVIg and the role of Fc gamma receptors: classic mechanisms of action after all? *Front Immunol.* 2015;5:00674. doi: 10.3389/fimmu.2014.00674.
- 11. Haridan U, Mokhtar U, Machado L. A comparison of assays for accurate copy number measurement of the low-affinity Fc gamma receptor genes FCGR3A and FCGR3B. *PLoS One*. 2015; 10(1):e0116791. doi: 10.1371/journal.pone.0116791.
- 12. Fanaroff AA, Korones SB, Wright LL, et al. A controlled trial of intravenous immune globulin to reduce nosocomial infections in very-low-birth-weight infants. *N Engl J Med.* 1994;330(16):1107–1113. doi: 10.1056/nejm199404213301602.
- 13. Christensen RD, Hardman T, Thornton J, Hill HR. A randomized, double-blind, placebo-controlled investigation of the safety of intravenous immune globulin administration to preterm neonates. *J Perinatol.* 1989;9(2):126–130.
- 14. Kliegman R, Clapp D, Berger M. Targeted immunoglobulin therapy for the prevention of neonatal infections. *Clin Infect Dis.* 1990;12(Suppl 4):443–456. doi: 10.1093/clinids/12.supplement\_4.s443.
- 15. Hoffmann J. Neutrophil CD64: a diagnostic marker for infection and sepsis. *Clin Chem Lab Med*. 2009;47(8):903–916. doi: 10.1515/cclm.2009.224.
- 16. Pitrak D. Effects of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the bactericidal functions of neutrophils. *Curr Opin Hematol.* 1997;4(3):183–190. doi: 10.1097/00062752-199704030-00005.