

Рецепторный аппарат клеток гранулоцитарно-макрофагальной линии у недоношенных новорожденных: фенотипические и функциональные характеристики. Значение для клинической практики

Л.Л.Панкратьева¹, В.Е.Мухин¹, Д.А.Праулова¹, О.И.Милева², Н.Н.Володин¹, А.Г.Румянцев¹

¹Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва, Российская Федерация;

²Городская клиническая больница №24, Москва, Российская Федерация

Недоношенные дети отличаются высоким риском развития бактериальных инфекций. Способствует этому незрелость иммунной системы.

Цель. Изучить экспрессию нейтрофилами Fc-гамма рецепторов и возможность ее модуляции у недоношенных новорожденных с бактериальной инфекцией.

Пациенты и методы. Исследовали образцы пуповинной крови, а также периферической венозной крови новорожденных, собранные на 28–30-е сутки жизни. Методом проточной цитофлуориметрии определяли уровень поверхностной экспрессии Fc-гамма рецепторов нейтрофилов (CD64, CD32, CD16), фагоцитарную активность и кислородный взрыв гранулоцитов, стимулированных флуоресцентно мечеными *Escherichia coli*.

Результаты. Исследованы образцы крови 48 детей, из них 10 – доношенные новорожденные (1-я группа), 18 – недоношенные новорожденные с ЭНМТ и ОНМТ (2-я группа), 20 – недоношенные новорожденные с НМТ (3-я группа). Экспрессия CD64 у недоношенных детей из 2-й и 3-й группы при рождении составила 7,1 MFI (5,1; 11,5) и 6,0 MFI (5,3; 9,8) соответственно, что статистически значимо выше ($p = 0,013$), чем у детей из 1-й группы (4,27 MFI (2,4; 5,8)). Экспрессия CD16 при рождении снижена ($p = 0,021$) у недоношенных детей (2-я группа: 80,9 MFI (58,7; 114,8); 3-я группа: 99,7 MFI (71,3; 126,0)) по сравнению с доношенными новорожденными (125,3 MFI (95,5; 144,1)) и увеличивается к концу 1 месяца жизни (2-я группа: 118,5 MFI (99,5; 132,2); 3-я группа: 126,6 MFI (110,1; 129,0)). Анализ экспрессии CD32 не показал статистически значимых различий в исследуемых группах. Показана корреляция интенсивности кислородного взрыва нейтрофилов с гестационным возрастом ($R_s = 0,67$; $p = 0,0005$). Культивирование гранулоцитов в присутствии Г-КСФ приводит к 2,4–5-кратному повышению экспрессии CD16, CD32 и усилению кислородного взрыва.

Заключение. Недоношенные новорожденные характеризуются дисрегуляцией экспрессии Fc-гамма рецепторов и функциональной недостаточностью нейтрофилов. Г-КСФ модулирует экспрессию CD16 и CD32 на поверхности нейтрофилов и усиливает кислородный взрыв.

Ключевые слова: иммуномодулирующая терапия, недоношенность, фагоцитоз, Fc-гамма рецепторы

Для цитирования: Панкратьева Л.Л., Мухин В.Е., Праулова Д.А., Милева О.И., Володин Н.Н., Румянцев А.Г. Рецепторный аппарат клеток гранулоцитарно-макрофагальной линии у недоношенных новорожденных: фенотипические и функциональные характеристики. Значение для клинической практики. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2016; 15(4): 13–20. DOI: 10.20953/1726-1708-2016-4-13-20

The receptor apparatus of granulocyte-macrophage line cells in premature newborns: phenotypical and functional characteristics. Significance for clinical practice

L.L.Pankrat'eva¹, V.E.Mukhin¹, D.A.Praulova¹, O.I.Mileva², N.N.Volodin¹, A.G.Rumyantsev¹

¹Dmitry Rogachev Federal Research Centre of Paediatric Haematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

²City Clinical Hospital No 24, Moscow, Russian Federation

Premature children are characterised by a high risk for development of bacterial infections. It is promoted by the immaturity of the immune system.

Для корреспонденции:

Панкратьева Людмила Леонидовна, кандидат медицинских наук, главный научный сотрудник отдела неонатологии Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России

Адрес: 117997, ГСП-7, Москва, улица Саморы Машела, 1

Телефон: (495) 937-5024

E-mail: fdoc@yandex.ru

Статья поступила 10.05.2016 г., принята к печати 22.12.2016 г.

For correspondence:

Lyudmila L. Pankrat'eva, PhD in medicine, chief research fellow at the department of neonatology, Dmitry Rogachev Federal Research Centre of Paediatric Haematology, Oncology and Immunology

Address: 1, ul. Samory Mashela, Moscow, GSP-7, 117997, Russian Federation

Phone: (495) 937-5024

E-mail: fdoc@yandex.ru

The article was received 10.05.2016, accepted for publication 22.12.2016

The objective. To study neutrophil Fc-gamma receptor expression and the possibility of its modulation in premature newborns with bacterial infection.

Patients and methods. We examined samples of umbilical blood and also peripheral venous blood of newborns collected on the 28–30th day of life. The method of flow cytometry was used to detect the level of surface expression of neutrophil Fc-gamma receptors (CD64, CD32, CD16), phagocytic activity and oxidative burst of granulocytes stimulated by fluorescent labelled *Escherichia coli*.

Results. Blood samples of 48 children were examined, of them 10 – full-term newborns (group 1), 18 – premature newborns with ELBW and VLBW (group 2), 20 – premature newborns with LBW (group 3). CD64 expression at birth in premature children from the 2nd and 3rd groups was 7.1 MFI (5.1; 11.5) and 6.0 MFI (5.3; 9.8), respectively, which is significantly higher ($p = 0.013$) than in children from group 1 (4.27 MFI (2.4; 5.8)). CD16 expression at birth was lower ($p = 0.021$) in premature children (group 2: 80.9 MFI (58.7; 114.8); group 3: 99.7 MFI (71.3; 126.0)) as compared with full-term newborns (125.3 MFI (95.5; 144.1)) and increased by the end of the 1st month of life (group 2: 118.5 MFI (99.5; 132.2); group 3: 126.6 MFI (110.1; 129.0)). Analysis of CD32 expression did not show statistically significant differences in the groups of study. A correlation between the intensity of oxidative burst of neutrophils and gestational age has been shown ($R_s = 0.67$; $p = 0.0005$). Granulocyte cultivation in the presence of G-CSF brings about a 2.4–5-fold increase of CD16, CD32 expression and enhanced oxidative burst.

Conclusion. Premature newborns are characterised by dysregulation of Fc-gamma receptor expression and functional deficiency of neutrophils. G-CSF modulates CD16 and CD32 expression on the neutrophil surface and enhances oxidative burst.
Key words: immunomodulating therapy, prematurity, phagocytosis, Fc-gamma receptors

For citation: Pankrat'eva L.L., Mukhin V.E., Praulova D.A., Mileva O.I., Volodin N.N., Rumyantsev A.G. The receptor apparatus of granulocyte-macrophage line cells in premature newborns: phenotypical and functional characteristics. Significance for clinical practice. *Vopr. gematol./onkol. immunopatol. pediatr. (Pediatric Haematology/ Oncology and Immunopathology)*. 2016; 15(4): 13–20. DOI: 10.20953/1726-1708-2016-4-13-20

История клинических исследований, направленных на установление предполагаемой терапевтической эффективности препаратов иммуноглобулинов для внутривенного введения (ИГВВ), насчитывает более 15 лет [1–4]. Мнение, что применение ИГВВ позволяет повысить характерные для недоношенных детей низкие уровни иммуноглобулинов сыворотки крови и оптимизировать функцию иммунной защиты организма, являлось определяющим в глобальной стратегии повышения выживаемости и улучшения клинических исходов пациентов с очень низкой (ОНМТ) и экстремально низкой массой тела (ЭНМТ). Риск развития тяжелых бактериальных инфекций у глубоконедоношенных детей значительно выше по сравнению с более зрелыми по сроку гестации новорожденными, а значит, именно эта группа пациентов может иметь максимальный эффект от проведения превентивных мероприятий и адьювантной терапии при реализации неонатального сепсиса [5]. Снижение частоты развития септических осложнений у детей с ОНМТ и ЭНМТ приобретает особую важность, учитывая высокую вероятность развития инвалидизирующих состояний, ассоциированных с неонатальной инфекцией [6, 7].

В неонатологической практике препараты ИГВВ применяются как в качестве стратегии профилактики, так и адьювантной терапии при реализации раннего и позднего неонатального сепсиса. В первых мета-анализах базы данных Cochrane продемонстрировано снижение показателя летальности в группе новорожденных с подтвержденной тяжелой бактериальной инфекцией, получивших терапию препаратом ИГВВ (RR 0,55 (95% CI 0,31–0,98)) [8]. Однако детальное изучение исследований, использованных для систематического анализа, показало, что дети с ОНМТ и ЭНМТ составляют наименьшую долю от общего числа клинических наблюдений (дети с гестационным возрастом менее 30 нед – 15%, менее 28 нед – 7%). В связи с этим было проведено крупное мультицентровое плацебо-контролируемое двойное-слепое рандомизированное исследование INIS (International neonatal immunotherapy study), в которое вошли новорожденные дети всех гестационных и постнатальных возрастов с предполагаемой или подтвержденной инфекцион-

ной патологией [9, 10]. Однако несмотря на проведенную рандомизацию пациентов по полу, гестационному возрасту и массе тела при рождении, вопрос о клинической эффективности препаратов ИГВВ у недоношенных детей различного гестационного возраста с ранним и поздним неонатальным сепсисом остается открытым.

Клиническая эффективность препаратов ИГВВ была изучена и в профилактике инфекционных осложнений у новорожденных детей. Так, в мета-анализе базы данных Cochrane, включившем в себя результаты обследования и лечения более 4000 недоношенных новорожденных с гестационным возрастом менее 37 нед и массой тела при рождении менее 2500 г, было продемонстрировано умеренное снижение частоты развития сепсиса после профилактического введения препаратов ИГВВ у недоношенных детей ((RR 0,85 (95% CI 0,74–0,98), NNT (number needed to treat) = 33) [11]. Другое крупное проспективное, мультицентровое контролируемое исследование, целью которого явилась оценка эффективности профилактического введения препаратов ИГВВ недоношенным детям с ОНМТ и ЭНМТ (средний гестационный возраст составил 28 нед), не выявило статистически значимых различий в частоте реализации нозокомиального сепсиса [2].

Отсутствие доказанной эффективности ИГВВ в лечении и профилактике неонатальных инфекций привело к тому, что препараты данной группы стали крайне редко применять в комплексном лечении генерализованных инфекций и сепсиса у недоношенных новорожденных, тем самым полностью исключив единственный из существующих на сегодняшний день биологически целесообразный патогенетический компонент терапии.

Безусловно, причинами низкой эффективности применения препаратов ИГВВ для профилактики и лечения неонатального сепсиса могут быть ограничения в дизайне исследования, неадекватная доза препарата, вариации этиологически значимых агентов, низкие уровни патогенспецифичных антител. Однако, с нашей точки зрения, именно незрелость иммунной системы у детей с ОНМТ и ЭНМТ и является основным фактором, определяющим неэффективность применения препаратов ИГВВ у недоношенных детей.

Иммуноглобулины являются ключевыми молекулами, обеспечивающими защиту организма от микробной инфекции [12]. В то же время, состояние иммунокомпетентности организма предполагает согласованную работу огромного числа компонентов иммунной системы, включая иммуноглобулины, систему комплемента и функциональные цитотоксические фагоциты. Результаты ограниченного числа исследований свидетельствуют о том, что большая часть составляющих вышеуказанного комплекса не активна у детей с ОНМТ и ЭНМТ в той же степени, что и у доношенных новорожденных, детей младшего и старшего возраста и взрослых [13–17].

Применение препаратов иммуноглобулинов обогащенных IgM (Пентаглобин) у новорожденных может способствовать улучшению иммунного ответа путем взаимодействия с поверхностными клеточными рецепторами, обеспечения опсофагоцитарных реакций, включая активацию комплемента, стимуляцию антителозависимой клеточной цитотоксичности и праймирование респираторного взрыва гранулоцитов [8, 18]. К дополнительным эффектам препаратов ИГВВ можно отнести ограничение синдрома системной воспалительной реакции, развивающегося вследствие тяжелой инфекции. В то же время существуют опасения, что иммуномодулирующие эффекты препаратов ИГВВ могут в конечном итоге повышать риск фульминантного течения сепсиса у исходно иммунокомпрометированных детей с ОНМТ и ЭНМТ, которые в меньшей степени способны развить адекватный ответ на микробную инвазию. Указанные риски также не способствуют широкому внедрению ИГВВ в неонатологическую практику на фоне отсутствия убедительных данных об эффективности применения препаратов ИГВВ, назначаемых как с профилактической целью, так и для терапии сепсиса у недоношенных пациентов.

Связывание иммуноглобулинов с поверхностными клеточными рецепторами улучшает элиминацию бактерий функционально активными полиморфноядерными лейкоцитами [20]. Участок антитела Fc взаимодействует с различными рецепторами Fc и лигандами, которые сообщают ему множество важных функциональных возможностей, так называемые эффекторные функции. В иммуноглобулинах IgG Fc-участок включает иммуноглобулиновый домен C γ 2 и C γ 3 и N-концевой шарнир, ведущий в C γ 2. Важное семейство рецепторов Fc класса IgG включает гамма-рецепторы Fc (Fc γ Rs). Эти рецепторы осуществляют связь между антителами и клеточными механизмами иммунной системы. Это семейство белков включает Fc γ RI (CD64), включающий изоформы Fc γ RIa, Fc γ RIb и Fc γ RIc; Fc γ RII (CD32), включающий изоформы Fc γ RIIa (включающий аллотипы H131 и R131), Fc γ RIIb (включающий Fc γ RIIb-1 и Fc γ RIIb-2) и Fc γ RIIc; и Fc γ RIII (CD16), включающий изоформы Fc γ RIIIa (включающий аллотипы V158 и F158) и Fc γ RIIIb (включающий аллотипы Fc γ RIIIb-NA1 и Fc γ RIIIb-NA2) [21]. Эти рецепторы обычно имеют внеклеточный домен, который опосредует связывание с Fc, мембраносвязанный участок и внутриклеточный домен, который может опосредовать некоторые сигнальные события внутри клетки. Эти рецепторы экспрессируются в различных иммунных клетках, включающих моноциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, эозинофилы, тучные клетки, тромбоциты, В-клетки, большие зернистые

лимфоциты, клетки Лангерганса, натуральные киллеры (NK) и Т-клетки. Образование комплекса Fc/Fc γ R направляет эти эффекторные клетки к местам связывания антигенов, что обычно приводит к проведению сигнала в клетках и важным последующим иммунным реакциям, таким как высвобождение медиаторов воспаления, активация В-клеток, эндоцитоз, фагоцитоз и антителозависимую клеточную цитотоксичность. Способность опосредовать фаготоксическую эффекторную функцию является потенциальным механизмом, с помощью которого антитела реализуют противoinфекционную защиту [22].

Различные подклассы IgG обладают различным сродством к Fc γ Rs, обычно IgG1 и IgG3 связываются с рецепторами значительно лучше, чем IgG2 и IgG4. Все Fc γ Rs связываются с одним и тем же Fc-участком IgG, но с различным сродством: Fc γ RI, связывающий с самым высоким сродством, имеет Kd для IgG1, равную 10⁻⁸M, тогда как рецепторы с низким сродством, Fc γ RII и Fc γ RIII, связываются при 10⁻⁶M и 10⁻⁵M соответственно. Внеклеточные домены Fc γ RIIIa и Fc γ RIIIb идентичны на 96%, однако Fc γ RIIIb не имеет внутриклеточного сигнального домена. Кроме того, поскольку Fc γ RI, Fc γ RIIa/c и Fc γ RIIIa являются положительными регуляторами активации, запускаемой иммунным комплексом, они характеризуются наличием внутриклеточного домена, в состав которого входит иммунорецепторный тирозин-зависимый активационный мотив (ITAM), Fc γ RIIIb имеет в своем составе иммунорецепторный тирозин-зависимый ингибиторный мотив (ITIM) и поэтому является ингибитором. Таким образом, первые рецепторы относятся к активирующим рецепторам, а Fc γ RIIIb относится к ингибирующим рецепторам.

Таким образом, целью нашей работы явилось прицельное выявление факторов, ограничивающих профилактическую и терапевтическую эффективность Пентаглобина у недоношенных детей и определение стратегии оптимизации эффективности препаратов иммуноглобулинов, обогащенных IgM (Пентаглобин), у недоношенных новорожденных с высоким риском реализации внутриутробной и нозокомиальной инфекции.

Пациенты и методы

Участники исследования

Исследование было выполнено в Отделе неонатологии ФГБУ ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева на базе родильного дома ГБУЗ «Городская больница №24 Филиал №2» г. Москвы. 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, отсутствие аномалий плода. Критерием включения в контрольную группу были: одноплодная доношенная беременность, роды через естественные родовые пути, оценка по шкале Апгар 8 и более баллов на 1-й и 5-й минуте жизни, отсутствие системных заболеваний у матери, которые могли бы однозначно влиять на состояние новорожденных, отсутствие аномалий плода. Объектом исследования

являлась пуповинная кровь (ПК), а также периферическая венозная кровь новорожденных, собранная на 14–16-е сут и 28–30-е сут жизни.

Всего было исследовано 48 образцов ПК, из них 10 получены во время физиологических родов (средний гестационный возраст 38,4 нед, масса при рождении 2440–4100 г, средняя масса 3371 г) и 28 образцов ПК, собранных в результате преждевременных родов, из них:

- 18 образцов ПК недоношенных новорожденных с ОНМТ и ЭНМТ (25–31-я неделя гестации, средний гестационный возраст 27,5 нед, масса при рождении 820–1700 г, средняя масса 1095 г);
- 20 образцов ПК недоношенных новорожденных с НМТ (32–36 нед гестации, средний гестационный возраст 33,7 нед, масса при рождении 1470–2440 г, средняя масса 2055 г).

Пациенты из II и III групп, в зависимости от клинического состояния, были разбиты на подгруппы:

- недоношенные новорожденные с локализованным инфекционным процессом (9 детей с ЭНМТ и ОНМТ и 14 детей с НМТ);
- недоношенные новорожденные с генерализованной инфекцией (2 и более очага инфекции, синдром системного воспалительного ответа, органная недостаточность – 9 детей с ОНМТ и ЭНМТ и 6 детей с НМТ)

Взятие образцов

Сразу после родов осуществляли забор пуповинной крови в стерильные вакуумные пробирки, содержащие гепарин в качестве антикоагулянта. Минимальный объем ПК для исследования составлял 6 мл. Забор периферической крови для исследования выполнялся у недоношенных новорожденных, находящихся в отделении реанимации 1 и 2 этапа, из венозного катетера одновременно с образцами для клинических анализов. Биоматериал собирали в микропробирки с антикоагулянтом. Объем периферической крови составлял не более 500 мкл. Все исследования выполнялись не позднее 8 ч после взятия биоматериала.

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 *E. coli* (IngoFlowEx Kit, EXBIO Praha, a.s. Czech Republic). Бактерии, используемые в тесте, были преопсонизированы антителами человеческой плазмы. Таким образом, наличие опсонин в исследуемом образце крови не оказывало решающего влияния на результаты. Результаты представлены как процент фагоцитирующих гранулоцитов (поглощение одной или более флуоресцентно меченных бактерий одной клеткой).

Окислительный взрыв оценивали методом проточной цитометрии с помощью набора FagoFlowEx Kit (EXBIO Praha, a.s. Czech Republic). Этот тест основан на оценке окислительного взрыва в гранулоцитах после стимуляции *E. coli*. После поглощения бактерии в фагоците активируется NADPH оксидаза, которая опосредует продукцию активных форм кислорода. Продукты кислорода внутри фагоцита окисляют дигидрорадамин 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. Результаты оценивали путем расчета индекса стимуляции (SI): отношение средней интенсивности флуоресценции активированных гранулоцитов стимулированных образцов и отрицательных контролей.

Оценка поверхностной экспрессии FC-gamma рецепторов

Для определения уровня экспрессии клеточных рецепторов в работе использовали метод многоцветной проточной цитометрии. Оценка экспрессии маркеров проводилась в соответствии с протоколом, разработанным производителем набора антител (Beckman Coulter, USA). В состав набора входили следующие антитела: анти-CD45, меченные PacificBlue, анти-CD14, меченные APC, анти-CD64 (FcγRI), меченные PE, анти-CD16 (FcγRIII), меченные PC7, анти-CD32 (FcγRII), меченные PC5, анти-CD11b (C3b), меченные PE, анти-CD11c (ITGAX), меченные FITC, соответствующие им изотипические контроли для исключения аутофлуоресценции образцов (IgG1 или IgG2). Для сбора данных использовали проточный цитофлуориметр Navios (Beckman Coulter, USA). Анализ данных производили с помощью программного обеспечения Kaluza (Beckman Coulter, USA).

Культуральные исследования

Нейтрофильные гранулоциты выделяли из образцов пуповинной крови методом центрифугирования в двойном градиенте плотности фиколла (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-глутамин, 50 ед/мл пенициллина (Sigma, USA). Клетки переносили в 96-луночные планшеты, культивировали в присутствии Г-КСФ в CO₂ инкубаторе в течение 24 ч, после чего отмывали от среды и выполняли цитометрический анализ уровня экспрессии клеточных рецепторов.

Статистический анализ

Статистический анализ полученных результатов проводился с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 9.1 (StatSoft Inc, США). Данные представлены в виде медианы и [нижний; верхний] квартиль. Достоверность отличий оценивали при помощи непараметрического критерия Mann-Whitney U-test. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции Спирмена.

Результаты исследования и их обсуждение

По результатам иммунофенотипического исследования поверхностных рецепторов нейтрофильных гранулоцитов было выявлено, что экспрессия FcγRI (CD64) значимо повышена у недоношенных детей при рождении по сравнению с доношенными новорожденными. В группе недоношенных новорожденных с ОНМТ и ЭНМТ медиана средних значений флуоресценции маркера CD64 составила 7,09 MFI [5,13–11,46]. В группе недоношенных новорожденных с НМТ данный показатель составил 6,01 MFI [5,32–9,77]. В группе до-

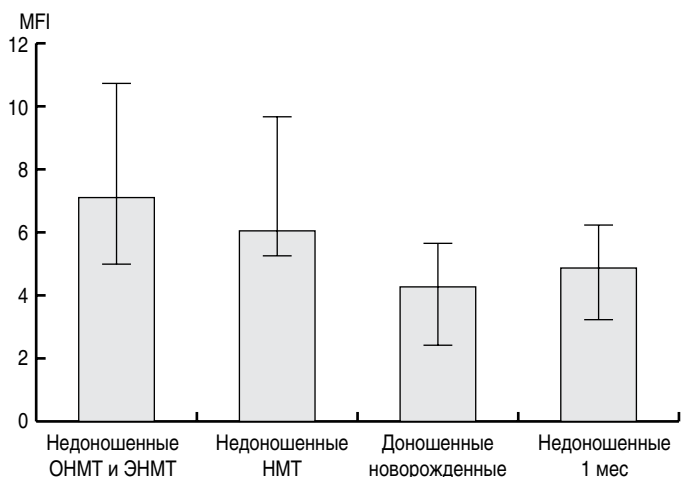


Рис. 1. Экспрессия FcγRI (CD64) у недоношенных детей при рождении и к концу первого месяца жизни в сравнении с доношенными новорожденными.

ношенных новорожденных медиана экспрессии CD64 была равна 4,27 MFI [2,39–5,78]. Также продемонстрировано, что к концу первого месяца жизни экспрессия CD64 у недоношенных детей приближается к показателям экспрессии у доношенных детей при отсутствии факта генерализации инфекционного процесса (4,85 MFI; [3,24–6,27]) (рис. 1). Было показано, что течение инфекционного процесса у недоношенных детей с генерализацией инфекции сопровождается увеличением экспрессии CD64 на поверхности полиморфноядерных нейтрофилов, что позволило предложить CD64 рецептор в качестве дополнительного маркера для диагностики сепсиса. При этом наибольшей диагностической чувствительностью обладает CD64 индекс: отношение величины экспрессии рецептора на поверхности нейтрофилов к аналогичному показателю моноцитов. Проведенный анализ выявил, что CD64-индекс является достоверным ранним маркером сепсиса, с высокой чувствительностью (79%) и специфичностью (87%), AUC 0,856 при cut-off 0,381 (рис. 2).

Определение экспрессии FcγRII (CD32) в исследуемых группах показало, что данный показатель не зависит от гестационного возраста и степени зрелости новорожденного. Для группы недоношенных новорожденных с ОНМТ и ЭНМТ экспрессия была на уровне 13,1 MFI [8,12–17,53], в группе недоношенных новорожденных с НМТ – 15,61 MFI [8,0–18,13], а в группе доношенных новорожденных – 11,1 MFI [8,46–15,44]. Исключение составили дети с генерализацией инфекционного процесса, сопровождающегося абсолютной нейтропенией: для этих пациентов медиана экспрессии CD32 составила 6,0 MFI [3,71–7,03].

Анализ экспрессии FcγRIII (CD16) продемонстрировал снижение экспрессии данного маркера на поверхности гранулоцитов недоношенных детей по сравнению с доношенными новорожденными: для недоношенных новорожденных из групп II и III этот показатель составил 80,86 MFI [58,7–114,76] и 99,73 MFI [71,32–125,98] соответственно, в то время как у доношенных экспрессия данного рецептора находилась на уровне 125,3 MFI [95,45–144,12]. Для обеих групп недоношенных новорожденных наблюдалось увеличение экспрессии CD16 к концу 1 месяца жизни (118,45 MFI [99,45–132,19]) (рис. 3).

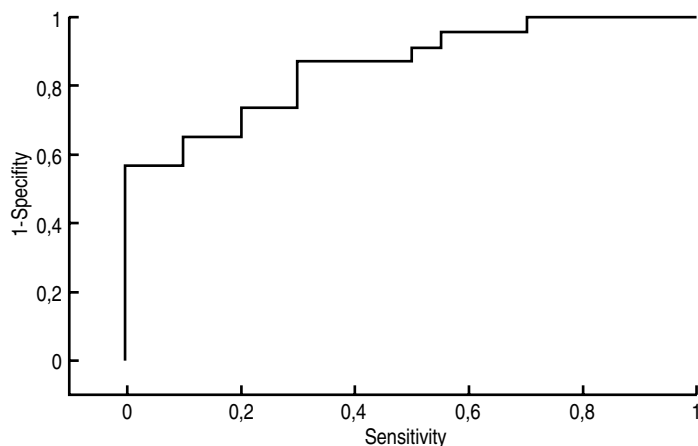


Рис. 2. ROC-кривая для исследуемого лабораторного показателя – CD64-индекса (AUC 0,856; cut-off 0,381).

Изучение функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в образцах пуповинной крови показало, что недоношенные новорожденные характеризуются сниженной способностью полиморфноядерных лейкоцитов к фагоцитозу и респираторному взрыву в сравнении с доношенными новорожденными, и чем меньше гестационный возраст ребенка, тем более выражена функциональная недостаточность указанных процессов. Доля фагоцитирующих клеток в группе недоношенных новорожденных с ОНМТ и ЭНМТ составила 79,3% [72,93–83,51], в группе недоношенных новорожденных с НМТ – 81,48% [76,29–86,51]; для доношенных новорожденных данный показатель составил 92,51% [89,55–94,08] (рис. 4).

Далее был проведен корреляционный анализ интенсивности респираторного взрыва полиморфноядерных лейкоцитов и гестационного возраста новорожденных. Была показана статистически значимая корреляция средней силы ($R_s = 0,67$; $p = 0,0005$) (рис. 5).

Также нами была выполнена оценка модулирующего эффекта Г-КСФ на нейтрофильные гранулоциты в условиях *in vitro*. В данной модели продемонстрировано, что культи-

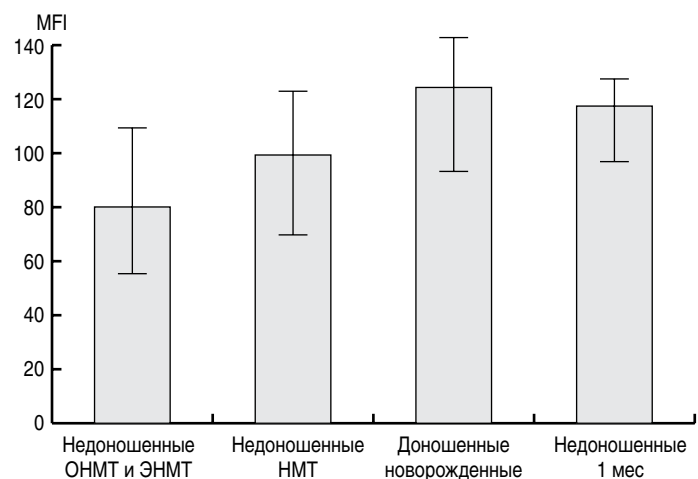


Рис. 3. Экспрессия FcγRIII (CD16) у недоношенных детей при рождении и к концу первого месяца жизни в сравнении с доношенными новорожденными.

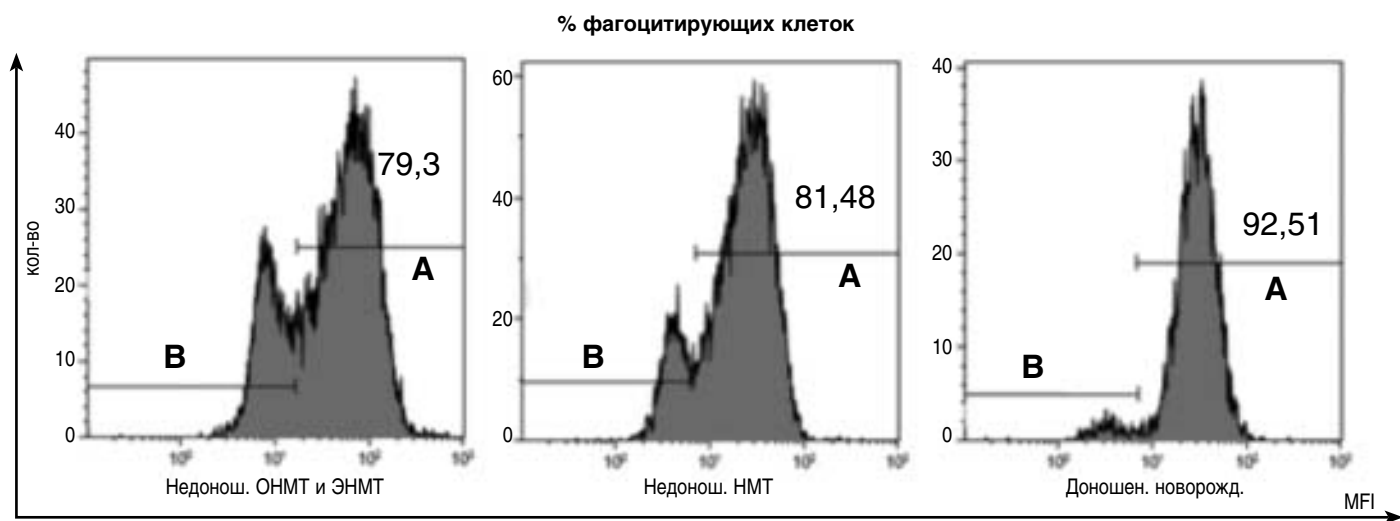


Рис. 4. Доля фагоцитирующих клеток в группах недоношенных и доношенных новорожденных.

вирование гранулоцитов в присутствии Г-КСФ приводит к 2,4-5-кратному повышению экспрессии FcγRIII (CD16) и FcγRII (CD32) рецепторов на этих клетках. Кроме того, кокультивированные с Г-КСФ гранулоциты проявляют значительно большую интенсивность кислородного взрыва (рис. 6).

Профилактика или лечение сепсиса при помощи патоген-специфичных антител может обеспечивать значительное уменьшение выраженности клинических проявлений инфекционного процесса, принимая во внимание тот факт, что связывание иммуноглобулинов со специфичным лигандом запускает серию последовательных процессов, приводящих к элиминации патогенного микроорганизма [14]. Ключевыми поверхностными клеточными рецепторами, ответственными за связывание иммуноглобулинов, являются FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16) [22]. В то же время, экспрессия указанных рецепторов на поверхности полиморфноядерных лейкоцитов – первой линии защиты у новорожденных различного гестационного возраста – имеет свои уникальные для данного возраста особенности и кардинально меняется в случае реализации инфекционного процесса. Так, экспрес-

сия FcγRI (CD64) значимо повышена у недоношенных детей при рождении и к концу первого месяца жизни сравнивается с показателями экспрессии у доношенных детей при отсутствии факта генерализации инфекционного процесса. Было показано, что генерализация инфекции у недоношенных детей, а именно возникновение двух и более очагов инфекции, синдрома системной воспалительной реакции и органной недостаточности (сепсис-синдром в англоязычной литературе), сопровождается 5-кратным увеличением экспрессии FcγRI (CD64) на поверхности полиморфноядерных лейкоцитов, что позволило предложить FcγRI (CD64) рецептор в качестве дополнительного маркера для диагностики сепсиса. Чем меньше гестационный возраст, тем более выражено это увеличение. При этом в отличие от взрослых увеличение экспрессии данного рецептора на клетках недоношенных детей не обеспечивает лучшую опсонно-фагоцитарную активность полиморфноядерным лейкоцитам. Более того, нами продемонстрировано, что данный рецептор экспрессируется постоянно на поверхности полиморфноядерных лейкоцитов как доношенных, так и недоношенных новорожденных, в то время как его экспрессия на поверхности гранулоцитов у

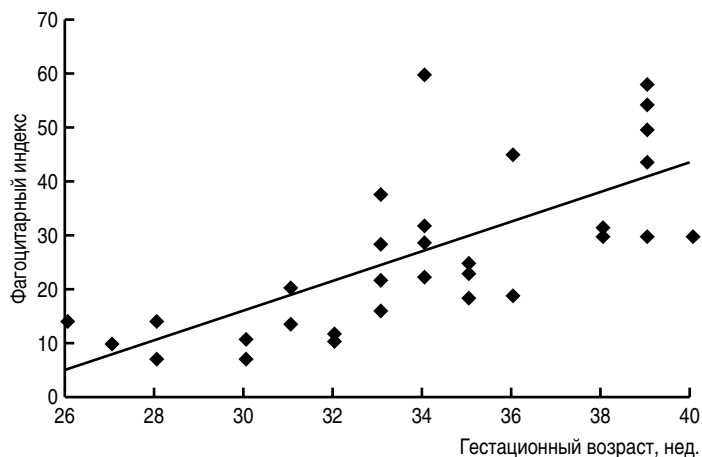


Рис. 5. Корреляционный анализ интенсивности респираторного взрыва полиморфноядерных лейкоцитов гестационного возраста новорожденных ($R_s = 0,67$; $p = 0,0005$).

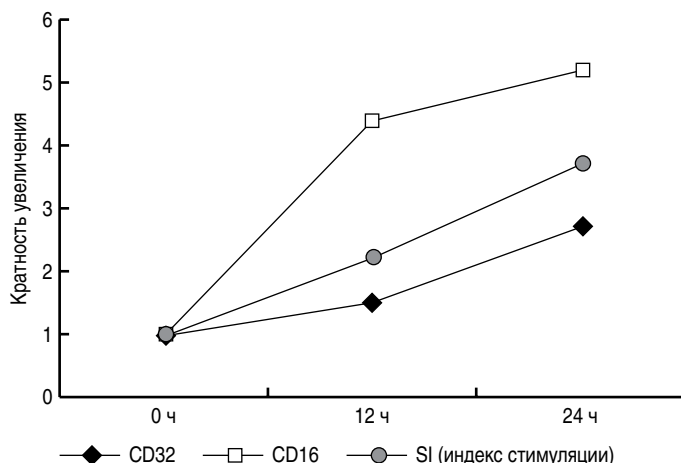


Рис. 6. Повышение экспрессии FcγRIII (CD16) и FcγRII (CD32) рецепторов на гранулоцитах и усиление интенсивности кислородного взрыва после совместного *in vitro* культивирования клеток с Г-КСФ.

взрослых крайне низкая и увеличивается только при наличии синдрома системной воспалительной реакции.

Экспрессия Fc γ RII (CD32) не зависит от гестационного возраста и степени зрелости новорожденного. Исключение составляют дети с генерализацией инфекционного процесса, сопровождающегося абсолютной нейтропенией. Учитывая регуляторную функциональную активность данного рецептора, можно предположить его роль в контроле за апоптозом нейтрофилов при лиганд-рецепторном взаимодействии с молекулой иммуноглобулина. Экспрессия данного рецептора на поверхности полиморфноядерных лейкоцитов также является отличительной особенностью новорожденных различного гестационного возраста (в норме у взрослых данный рецептор на поверхности нейтрофилов отсутствует).

Экспрессия Fc γ RIII (CD16) существенно снижена на поверхности гранулоцитов недоношенных детей по сравнению с доношенными новорожденными и взрослыми и увеличивается до уровня экспрессии у взрослых в течение первых 4 нед постнатальной жизни. Интересен тот факт, что у недоношенных новорожденных функциональная активность именно данного рецептора отвечает за опсонофагоцитарные реакции (а не Fc γ RI (CD64), как у взрослых), так как повышение экспрессии Fc γ RIII (CD16) на поверхности гранулоцитов приводит к стимуляции фагоцитоза.

Известно, что адекватность опсонизации не зависит от количества специфических антител. Поэтому даже при наличии необходимого количества патоген-специфических иммуноглобулинов и их связывании с поверхностью клеточной стенки бактерий, сниженная экспрессия Fc γ RIII (CD16) рецептора на эффекторных клетках у недоношенных детей может определять недостаточность опсонофагоцитоза и клиническую неэффективность терапии препаратами ИГВВ.

Как итог, недоношенные новорожденные характеризуются сниженной способностью полиморфноядерных лейкоцитов к опсонизации, фагоцитозу и респираторному взрыву в сравнении с доношенными новорожденными и взрослыми, и чем меньше гестационный возраст ребенка, тем более выражена функциональная недостаточность указанных процессов. Опсонизация, фагоцитоз и респираторный взрыв также менее выражены у недоношенных детей с генерализованной инфекцией и нейтропенией по сравнению с недоношенными с локализованной инфекцией. Однако даже при нормальном количестве нейтрофилов новорожденных детей характеризуются сниженными по сравнению со взрослыми функциональными характеристиками. К ним относятся хемотаксис, способность к изменению формы клетки, фагоцитоз, экспрессия CD11b-молекулы, адгезия, киллинг бактерий и окислительный метаболизм.

Таким образом, оптимизация эффективности препаратов иммуноглобулинов обогащенных IgM (Пентаглобин) возможна при условии повышения экспрессии Fc γ RIII (CD16) на поверхности гранулоцитов с целью стимуляции опсонофагоцитарных реакций, а также Fc γ RII (CD32) лиганд-специфичного связывания для предупреждения преждевременного интенсивного апоптоза полиморфноядерных лейкоцитов.

В качестве ко-стимулятора иммуноглобулин-опосредованной опсонизации и фагоцитоза нами предложен гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ). Г-КСФ

в основном продуцируется моноцитами- макрофагами, а также фибробластами, эндотелиальными клетками и клетками стромы костного мозга, влияет на гранулоцитарный росток кроветворения, стимулирует деление и дифференцировку стволовых клеток, регулирует образование функционально активных нейтрофилов и их выход в кровь из костного мозга. Г-КСФ также способен усиливать активность нейтрофилов. Как правило, в плазме крови присутствует около 10 пкг/мл эндогенного Г-КСФ, в некоторых случаях (инфекционные процессы, апластическая анемия, нейтропения и др.) его концентрация может быть выше – до 100 пкг/мл. Присутствие в плазме определенного уровня Г-КСФ объясняется его сигнальной функцией для поддержания в циркуляции стационарного уровня нейтрофилов. В клинической практике используются препараты Г-КСФ, полученные с помощью технологии рекомбинантной ДНК в системе клеток *Escherichia coli* (филграстим) или в системе клеток яичников китайских хомячков (СНО) (ленограстим). Г-КСФ человека проявляет свою активность за счет связывания со специфическим трансмембранным рецептором, состоящим из двух цепей – α и β , экспрессированным на различных гемопоэтических клетках, включая стволовые клетки, предшественники мультипотентных клеток, предшественники миелоидных клеток, нейтрофилов и моноцитов. Этот рецептор образует гомо-олигомерные комплексы для связывания лиганда. Эффекты Г-КСФ (рекомбинантного и эндогенного) опосредованы его взаимодействием с рецептором одного класса аффинности. При этом одни и те же механизмы действия лежат в основе проявления биологической активности при мобилизации зрелых нейтрофилов и выхода их в кровяное русло и при ускорении гранулопоэза.

Таким образом, Г-КСФ является крайне важным цитокином для миелопоэза и формирования клеток иммунной системы. Его воздействие на клетки-предшественники заключается не только в запуске механизма образования дифференцированных колоний, но и в активации такой специализированной функции, как фагоцитоз, у клеток с законченной дифференцировкой, в том числе путем повышения экспрессии Fc γ RIII (CD16) рецептора на гранулоцитах. Что интересно, добавление Г-КСФ увеличивает и экспрессию Fc γ RII (CD32), тем самым препятствуя чрезмерному преждевременному апоптозу гранулоцитов и развитию абсолютной нейтропении. Экспрессия рецепторов к гранулоцитарно-макрофагальному колониестимулирующему фактору (ГМ-КСФ) на нейтрофилах новорожденных детей одинакова с таковой у взрослых. В то же время продукция ГМ-КСФ и экспрессия м-РНК к Г-КСФ достоверно снижены у новорожденных детей по сравнению со взрослыми. Принимая во внимание все вышесказанное, комбинация препаратов иммуноглобулинов, обогащенных IgM (Пентаглобин), с колониестимулирующими факторами может обеспечить высокую эффективность Пентаглобина в терапии тяжелых инфекций у новорожденных различного гестационного возраста.

Литература/References

1. Дегтярева МВ, Бирюкова ТВ, Володин НН, Солдатова ИГ, Воронцова ЮН, Бабак ОА и др. Клинико-лабораторные особенности раннего неонатального сепсиса у детей различного гестационного возраста и оценка эффектив-

- ности иммунозаместительной терапии Пентаглобином. Педиатрия. Журнал им. Г.Н.Сперанского. 2008;87(1):32-40. / Degtyareva MV, Biryukova TV, Volodin NN, Soldatova IG, Vorontsova Yul, Babak OA, 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. *Pediatrics. Journal named after G.N.Speransky*. 2008;87(1):32-40. (In Russian).
2. Fanaroff AA, Korones SB, Wright LL, Wright EC, Poland RL, Bauer CB, et al. A controlled trial of intravenous immune globulin to reduce nosocomial infections in very-low-birth-weight infants. National Institute Of Child Health And Human Development Neonatal Research Network. *N Engl J Med*. 1994;330:1107-13.
 3. 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;9:126-30.
 4. Kempf C, Stucki M, Boschetti N. Pathogen inactivation and removal procedures used in the production of intravenous immunoglobulins. *Biologicals*. 2007;35:35-42.
 5. Stoll BJ, Hansen N. Infections in VLBW infants: studies from the NICHD neonatal research network. *Semin Perinatol*. 2003;27:293-301.
 6. Adams-Chapman I, Stoll BJ. Neonatal infection and long-term neurodevelopmental outcome in the preterm infant. *Curr Opin Infect Dis*. 2006;19:290-7.
 7. Wilson-Costello D, Friedman H, Minich N, Siner B, Taylor G, Schluchter M, et al. Improved neurodevelopmental outcomes for extremely low birth weight infants in 2000–2002. *Pediatrics*. 2007;119:37-45.
 8. Ohlsson A, Lacy JB. Intravenous immunoglobulin for suspected or subsequently proven infection in neonates. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004. Issue no. 1. Article no. CD001239.
 9. Ohlsson A, Lacy JB. Intravenous immunoglobulin for suspected or subsequently proven infection in neonates. *Cochrane Database Syst Rev* 2013. Issue no. 7. Article no. CD001239.
 10. The INIS Study. International neonatal immunotherapy study: non-specific intravenous immunoglobulin therapy for suspected or proven neonatal sepsis – an international, placebo controlled, multicentre randomised trial. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2008;8:52.
 11. Ohlsson A, Lacy JB. Intravenous immunoglobulin for preventing infection in preterm and/or low-birth-weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004. Issue no. 1. Article no. CD000361.
 12. Negi VS, Elluru S, Siberil S, Graff-Dubois S, Mouthon L, Kazatchkine MD, et al. Intravenous immunoglobulin: an update on the clinical use and mechanisms of action. *J Clin Immunol*. 2007;27:233-45.
 13. 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:S59-68.
 14. Kallman J, Schollin J, Schalen C, Erlandsson A, Kihlstrom E. Impaired phagocytosis and opsonisation towards group B streptococci in preterm neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1998;78:F46-50.
 15. Wolach B, Dolfin T, Regev R, Gilboa S, Schlesinger M. The development of the complement system after 28 weeks' gestation. *Acta Paediatr*. 1997;86:523-7.
 16. Cates KL, Goetz C, Rosenberg N, Pantschenko A, Rowe JC, Ballow M. Longitudinal development of specific and functional antibody in very low birth weight premature infants. *Pediatr Res*. 1988;23:14-22.
 17. Lewis D, Wilson C. Developmental Immunology and Role of Host Defenses in Fetal and Neonatal Susceptibility to Infection. In: Remington, Klein, Wilson and Baker (eds.) *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. 6th edn Elsevier Saunders: Philadelphia, 2006.
 18. Baley JE. Neonatal sepsis: the potential for immunotherapy. *Clin Perinatol*. 1988;15:755-71.
 19. Shaw CK, Thapalia A, Shaw P, Malla K. Intravenous immunoglobulins and haematopoietic growth factors in the prevention and treatment of neonatal sepsis: ground reality or glorified myths? *Int J Clin Pract*. 2007;61:482-7.
 20. Maeda M, van Schie RC, Yuksel B, Greenough A, Fanger MW, Guyre PM et al. Differential expression of Fc receptors for IgG by monocytes and granulocytes from neonates and adults. *Clin Exp Immunol*. 1996;103:343-7.
 21. Nagelkerke S, Kuijpers T. Immunomodulation by IVIg and the Role of Fc-Gamma Receptors: Classic Mechanisms of Action after all? *Front Immunol*. 2015 Jan 21;5:674.
 22. 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 Jan 16;10(1):e0116791.
-
- Информация о соавторах:**
- Мухин Владимир Евгеньевич, младший научный сотрудник отдела неонатологии Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России
Адрес: 117997, ГСП-7, Москва, улица Саморы Машела, 1
Телефон: (495) 937-5024
- Праулова Дарья Александровна, аспирант Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России
Адрес: 117997, ГСП-7, Москва, улица Саморы Машела, 1
Телефон: (495) 937-5024
- Милева Ольга Ивановна, заведующая отделением реанимации и интенсивной терапии №1 филиала №2 Городской клинической больницы №24
Адрес: Москва, 4-й Вятский пер., 39
Телефон: (495) 613-4509
E-mail: info@8roddom.ru
- Володин Николай Николаевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела неонатологии Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России
Адрес: 117997, ГСП-7, Москва, улица Саморы Машела, 1
Телефон: (495) 937-5024
- Румянцев Александр Григорьевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России
Адрес: 117997, ГСП-7, Москва, улица Саморы Машела, 1
Телефон: (495) 937-5024
E-mail: Alexander.Rumyantsev@fccho-moscow.ru
-
- Information about co-authors:**
- Vladimir E. Mukhin, junior research fellow at the department of neonatology, Dmitry Rogachev Federal Research Centre of Paediatric Haematology, Oncology and Immunology
Address: 1, ul. Samory Mashela, Moscow, GSP-7, 117997, Russian Federation
Phone: (495) 937-5024
- Darya A. Praulova, PhD student at Dmitry Rogachev Federal Research Centre of Paediatric Haematology, Oncology and Immunology
Address: 1, ul. Samory Mashela, Moscow, GSP-7, 117997, Russian Federation
Phone: (495) 937-5024
- Olga I. Mileva, MD, head of resuscitation and intensive care department No 1, branch No 2, City Clinical Hospital No 24
Address: 39, 4-i per. Vyatskii, Moscow, Russian Federation
Phone: (495) 613-4509
E-mail: info@8roddom.ru
- Nikolay N. Volodin, academician of RAS, DSc in medicine, professor, head of the department of neonatology, Dmitry Rogachev Federal Research Centre of Paediatric Haematology, Oncology and Immunology
Address: 1, ul. Samory Mashela, Moscow, GSP-7, 117997, Russian Federation
Phone: (495) 937-5024
- Alexandr G. Rumyantsev, academician of the Russian Academy of Sciences, DSc in medicine, professor, director of Dmitry Rogachev Federal Research Centre of Paediatric Hematology, Oncology and Immunology
Address: 1, Samory Mashela street, Moscow, GSP-7, 117997, Russian Federation
Phone: (495) 937-5024
E-mail: Alexander.Rumyantsev@fccho-moscow.ru