

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр детской  
гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

*На правах рукописи*

**МУХИН ВЛАДИМИР ЕВГЕНЬЕВИЧ**

**Значение фенотипических и функциональных особенностей нейтрофилов  
новорожденных в развитии неонатальных инфекций**

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание учёной степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель  
доктор медицинских наук  
Ярцев Михаил Николаевич

Москва, 2021

## **ОГЛАВЛЕНИЕ**

<b>Список сокращений:</b> .....	<b>4</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	<b>7</b>
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	<b>12</b>
<b>1.1. Особенности иммунной системы плода</b> .....	<b>12</b>
<b>1.2. Фетальный и неонатальный гранулоцитопоз</b> .....	<b>14</b>
<b>1.3. Нейтропения новорожденных</b> .....	<b>17</b>
<b>1.4. Функциональные характеристики нейтрофилов новорожденных</b> .	<b>20</b>
<b>1.5. Нейтрофилы новорожденных и микробиом</b> .....	<b>37</b>
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	<b>42</b>
<b>2.1. Объём клинических наблюдений и характеристика групп</b> .....	<b>42</b>
<b>2.2. Методы исследования и подходы к трактовке полученных результатов</b> .....	<b>44</b>
<b>2.2.1. Анализ клеточных маркеров</b> .....	<b>45</b>
<b>2.2.2. Оценка фагоцитарной активности и кислородного взрыва нейтрофилов</b> .....	<b>46</b>
<b>2.2.3. Культуральные исследования</b> .....	<b>47</b>
<b>2.2.4. Количественная оценка апоптоза</b> .....	<b>48</b>
<b>2.2.5. Статистическая обработка данных</b> .....	<b>49</b>
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	<b>50</b>
<b>3.1. Характеристика пациентов</b> .....	<b>50</b>
<b>3.1.1. Характеристика доношенных новорожденных детей</b> .....	<b>50</b>
<b>3.1.2. Характеристика недоношенных детей с осложненным течением неонатального периода</b> .....	<b>51</b>
<b>3.2. Абсолютная нейтропения новорожденных</b> .....	<b>57</b>

3.3. Изучение экспрессии поверхностных рецепторов нейтрофилов у недоношенных новорожденных разного гестационного возраста.....	61
3.4. Диагностическое значение функциональных и фенотипических характеристик нейтрофилов недоношенных новорожденных в патогенезе инфекционных заболеваний раннего неонатального периода.....	67
3.5. <i>In vitro</i> модуляция экспрессии FcγR рецепторов на поверхности нейтрофилов недоношенных новорожденных.....	71
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>74</b>
4.1. Нейтропения новорожденных как фактор развития неонатальных инфекций .....	74
4.2. Фенотипические и функциональные особенности нейтрофилов новорожденных различного гестационного возраста .....	77
4.3. Роль морфофункциональных особенностей нейтрофилов в развитии неонатальных инфекций.....	83
4.4. Регуляция функции нейтрофилов новорожденных .....	85
4.5. Возможности модуляции функции нейтрофилов недоношенных новорожденных .....	88
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....</b>	<b>92</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>93</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>95</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>97</b>

## **Список сокращений:**

АЗКЦ – антителозависимая клеточная цитотоксичность

АН – абсолютная нейтропения

АФК – активные формы кислорода

ВПГ – вирус простого герпеса

ВУИ – внутриутробная инфекция

ГВ – гестационный возраст

Г-КСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ГСК – гемопоэтическая стволовая клетка

ЗВУР – задержка внутриутробного развития

ИВЛ – искусственная вентиляция легких

ИГВВ – иммуноглобулины для внутривенного введения

ЛПС – липополисахарид

НЭК – некротический энтероколит

ОНМТ – очень низкая масса тела

ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция

ОРДС – острый респираторный дистресс синдром

ОРИТН – отделение реанимации и интенсивной терапии новорожденных детей

ПК – пуповинная кровь

СЗРП – синдром задержки роста плода

ТКФ – точный критерий Фишера

ФМА – форбол-12-миристат-13-ацетат

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

ЦМВ – цитомегаловирус

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

ЭНМТ – экстремально низкая масса тела

А1АТ – альфа-1 антитрипсин

A3ARs – рецепторы аденозина A3

BPI – белок, повышающий проницаемость

CR – рецептор комплемента

DHR123 – дигидроксиродамин-123

EV – внеклеточные везикулы

FcRn – неонатальный Fc-рецептор

FcγR – Fc-гамма рецептор

fMLP – N-формилметионил-лейцил-фенилаланин

HIF – индуцируемые гипоксией факторы

ICAM – молекула клеточной адгезии 1 типа

IFN-γ – интерферон гамма

IL – интерлейкин

LFA-1 – лимфоцитарный функционально-ассоциированный антиген-1

MFI – среднее значение флуоресценции

MPO – миелопероксидаза

MV – бактериальные мембранные везикулы

NET – нейтрофильные внеклеточные ловушки

NF-κB – ядерный фактор κB

nHIF – неонатальный NET-ингибирующий фактор

OLFM-4 – ольфактомедин-4

PAD4 – цитоплазматическая пептидиларгинин деиминаза 4

PMA – фобол-12-миристан-13-ацетат

PR3 – протеиназа 3

Rh – резус-фактор

ROC – операционные характеристики наблюдателя

SCFA – короткоцепочечные жирные кислоты

SI – индекс стимуляции

Th – Т-хелперы

TLR – toll-подобные рецепторы

TNF-α – фактор некроза опухоли альфа

VCAM – сосудистая молекула клеточной адгезии 1 типа

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Несмотря на современные достижения и успехи неонатальной медицины, генерализованные инфекции и сепсис по-прежнему остаются основными причинами инвалидизации и смертности в детских отделениях интенсивной терапии [6,7]. В настоящее время в Российской Федерации наблюдается тенденция к росту частоты встречаемости сепсиса у недоношенных новорожденных, особенно у детей с очень низкой (ОНМТ) и экстремально низкой массой тела при рождении (ЭНМТ), что связано как со снижением нижней границы времени регистрации живорождений с 28 до 22 недель, так и с необходимостью длительного использования у данной группы пациентов инвазивных медицинских манипуляций: оборудования для респираторной терапии, внутрисосудистых и мочевых катетеров, парентерального питания и др. [9]. Проблема сепсиса в педиатрии усугубляется тем, что данные, полученные на взрослом контингенте больных, нельзя экстраполировать на педиатрическую практику. Это обусловлено особенностями иммунологической реактивности новорожденных и детей первых месяцев жизни, что особенно важно учитывать в отношении недоношенных новорожденных, характеризующихся не только периодом иммунологической адаптации к внеутробному образу жизнедеятельности организма, но и их гестационной незрелостью.

В настоящее время считается, что новорожденные подвержены высокому риску развития бактериальных инфекций из-за дисрегуляции иммуноопосредованных реакций [40]. Данная концепция пришла на смену парадигме «иммунологической незрелости», согласно которой новорожденные характеризовались выраженной количественной и функциональной недостаточностью различных звеньев иммунной системы вследствие незавершенности её антенатального развития и отсутствия антигенной стимуляции в утробе матери. И хотя различные эксперименты *in vitro*

демонстрируют сниженную по отношению к взрослым выраженность иммуноопосредованных реакций (в том числе ответственных за противобактериальную защиту), показано, что иммунная система даже глубоко недоношенных новорожденных способна к развитию всех основных механизмов иммунологического ответа на чужеродные антигены [93]. Кроме того, во время беременности иммунные системы как матери, так и плода, должны развивать форму устойчивой иммунологической толерантности по отношению друг к другу [13], так как ненаследуемые антигены могут быть распознаны как чужеродные. Таким образом можно предположить, что снижение выраженности адаптивного иммунного ответа новорожденного в первую очередь необходимо для нормального течения беременности. Поэтому новорожденные в первую очередь должны полагаться на врожденный иммунитет для защиты от ранней инфекции.

Нейтрофилы являются жизненно важным компонентом врожденного иммунитета, поскольку они одними из первых реагируют на инвазию патогенных микроорганизмов и обеспечивают защиту от бактериальных, вирусных и грибковых инфекций. Поскольку существуют значительные различия между физиологией плода и взрослого человека, фенотипические и функциональные характеристики гранулоцитов новорожденных могут иметь жизненно важное значение. Неонатальные нейтрофилы адаптированы к внутриутробным условиям, что позволяет избегать нежелательного запуска провоспалительных реакций [80]. Кроме того, подавление функции нейтрофилов необходимо для создания здорового микробиома в послеродовом периоде, однако может одновременно являться препятствием для развития достаточного ответа при воздействии патогенных организмов. Накопление новых экспериментальных данных и эволюция лабораторных методов за последние 50 лет позволили существенно расширить знания о физиологии нейтрофилов. Нейтрофилы больше не рассматриваются как короткоживущие, неизбирательные фагоциты иммунной системы; вместо этого они являются незаменимыми компонентами иммунной системы, необходимыми для



правильного функционирования В- и Т-клеток, презентации антигена и регенерации тканей [95]. Различия в лабораторных методах и различия в популяции новорожденных во времени могут затруднить сравнение прошлых и настоящих данных и привести к потенциально противоречивым результатам. В то же время, изучение фенотипических и функциональных особенностей нейтрофилов новорожденного с учетом гестационного возраста и особенностей течения беременности может иметь решающее значение в установлении подходов к улучшению терапии неонатальных инфекций.

**ЦЕЛЮ** настоящей работы является определение диагностического значения абсолютной нейтропении, а также функциональных и фенотипических характеристик нейтрофилов в патогенезе инфекционных осложнений недоношенных детей.

#### **Задачи исследования:**

1. Установить частоту встречаемости и клиническое значение абсолютной нейтропении у новорожденных различного гестационного возраста в раннем неонатальном периоде.
2. Установить прогностическое значение абсолютной нейтропении при инфекционных заболеваниях в раннем неонатальном периоде.
3. Произвести сравнительную оценку экспрессии Fcγ рецепторов и функциональной активности нейтрофилов новорожденных различного гестационного возраста.
4. Изучить экспрессию Fcγ рецепторов на нейтрофилах и возможность ее модуляции у недоношенных новорожденных с бактериальной инфекцией и ранним неонатальным сепсисом.
5. Оценить возможность модуляции *in vitro* функционального потенциала нейтрофильных гранулоцитов у недоношенных новорожденных с инфекционными осложнениями неонатального периода.

## Научная новизна

Показано, что абсолютная нейтропения не ассоциирована с повышением частоты случаев летального исхода у недоношенных новорожденных высокой группы риска. Хотя абсолютная нейтропения чаще встречалась у недоношенных новорожденных с ОНМТ и ЭНМТ, частота случаев инфекционных осложнений (локальные бактериальные инфекции, ранний неонатальный сепсис) в группе недоношенных новорожденных с эпизодами абсолютной нейтропении в первые 14 суток жизни не отличалась от таковой в группе недоношенных без нейтропении. Единственным установленным фактором, ассоциированным с абсолютной нейтропенией, является синдром задержки роста плода.

В отличие от доношенных новорожденных, у недоношенных новорожденных в образцах пуповинной крови отмечена более высокая экспрессия нейтрофилами  $Fc\gamma RI$  (CD64) и, напротив, низкая экспрессия CD16 ( $Fc\gamma RIII$ ), а также более низкие значения показателей, отражающих функциональные свойства нейтрофилов, таких как фагоцитарная активность и интенсивность кислородного взрыва. Выявлена статистически значимая отрицательная корреляция между интенсивностью кислородного взрыва нейтрофилов и гестационным возрастом.

Показано значительное увеличение экспрессии CD64 и повышение продукции активных форм кислорода нейтрофилами *in vitro* в ответ на стимуляцию *E.coli* в группе недоношенных детей с ранним неонатальным сепсисом по сравнению с группами новорожденных с локализованным инфекционным процессом и без инфекционного диагноза.

Продемонстрировано, что воздействие Г-КСФ на нейтрофилы недоношенных новорожденных в условиях *in vitro* повышает экспрессию CD16 и CD32, а также их функциональных характеристик.

## Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты вносят большой вклад в понимание особенностей становления и формирования иммунной системы в процессе внутриутробного развития и в раннем постнатальном периоде. Полученные в ходе диссертационного исследования результаты позволяют пересмотреть роль абсолютной нейтропении у недоношенных новорожденных в качестве фактора риска развития нарушений постнатальной адаптации, в том числе инфекционных осложнений.

Продемонстрировано, что именно функциональные особенности нейтрофилов недоношенных новорожденных могут предрасполагать к развитию инфекционных осложнений в раннем неонатальном периоде, что может иметь решающее значение в установлении подходов к улучшению терапии неонатальных инфекций.

В ходе проведения диссертационного исследования показано, что уровни экспрессии CD64 и CD32, а также продукции активных форм кислорода нейтрофилами недоношенных новорожденных ассоциированы с развитием неонатального сепсиса. Рекомендовано определение данных параметров в качестве дополнительных маркеров инфекционных осложнений раннего неонатального периода.

Приведено экспериментальное обоснование эффективности препаратов Г-КСФ за счет модуляции экспрессии FcγR на поверхности нейтрофилов недоношенных новорожденных, что в свою очередь приводит к стимуляции опсонофагоцитарных реакций, а также может препятствовать преждевременному апоптозу нейтрофилов и развитию абсолютной нейтропении.

Предложено использование Г-КСФ с целью модуляции фенотипических и функциональных характеристик нейтрофилов недоношенных новорожденных.

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Особенности иммунной системы плода

Беременность является уникальным состоянием с точки зрения адаптации иммунной системы матери и плода, так как, несмотря на обмен аллоантигенами, в норме между ними не происходит иммунологического конфликта. Хотя эволюция морфологической организации фетоплацентарных взаимодействий у млекопитающих была направлена в сторону минимизации возможных иммунологических контактов, существуют и дополнительные механизмы, реализация которых во время беременности помогает сохранять состояние иммунологической толерантности. В настоящее время можно утверждать, что данное состояние достигается не только за счет иммуносупрессивных механизмов, активирующихся в организме материи, но и особенностями эмбрионального развития иммунной системы плода.

Иммунная система матери должна обеспечивать первичную защиту развивающегося плода от внутриутробных инфекций, а также осуществлять иммунологическую протекцию новорожденного в течение первых месяцев жизни. Эта защита достигается не только за счет плацентарного транспорта материнских иммуноглобулинов в течение последнего триместра беременности [73], но и за счет потребления новорожденным грудного молока, богатого антимикробными белками, олигосахаридами и иммуноглобулинами [5]. Однако такой защиты может оказаться недостаточно, поэтому иммунная система плода и новорожденного должна иметь возможность самостоятельно реагировать в ответ на внутриутробную инфекцию.

Поскольку в норме плод развивается в стерильной среде, адаптивные иммунные реакции новорожденных наивны вследствие отсутствия должного уровня антигенной стимуляции, а также иммуносупрессивных механизмов, сдерживающих ответ на материнские аллоантигены. Поэтому для защиты от инфекций в раннем неонатальном периоде новорожденные должны полагаться

на систему врожденного иммунитета [82, 108]. Нейтрофилы служат жизненно важным компонентом врожденного иммунитета, так как они являются первыми циркулирующими иммунными клетками, которые реагируют и обеспечивают защиту от бактериальных, вирусных и грибковых инфекций. Однако существуют определенные фенотипические и функциональные различия между нейтрофилами новорожденного и взрослого человека [80]. Выраженность этих изменений обратно пропорциональна гестационному возрасту, что свидетельствует о динамическом развитии этих клеток в течение всей беременности – от самых ранних клеток-предшественников гемопоэза в желточном мешке до миелоидных клеток-предшественников в костном мозге на седьмом месяце беременности. Поэтому нельзя исключать, что в том числе с функциональной недостаточностью нейтрофилов недоношенных новорожденных связан крайне высокий риск развития неонатальных инфекций и сепсиса.

Кроме того, факторы иммунологического окружения напрямую влияют на фенотип и функцию нейтрофилов и значительно различаются у плода и новорожденного. Момент родов является ключевым событием для иммунной системы плода, так как новорожденный за короткий период подвергается воздействию огромного количества антигенов различных микроорганизмов, большая часть которых в последствии станет важным компонентом его здорового микробиома [157]. Известно, что способ родоразрешения, прием антибактериальных препаратов в раннем неонатальном периоде, отсутствие возможности грудного вскармливания оказывают влияние на формирование микробиома новорожденного, что в свою очередь негативно сказывается на развитии иммунных клеток и потенциально увеличивает риск воспалительных заболеваний в более позднем возрасте.

До настоящего времени не установлены конкретные механизмы, лежащие в основе нормального перехода функционально ограниченных нейтрофилов плода в полноценное звено иммунологической защиты, способное полноценно

противостоять патогенным микроорганизмам. Разрешение данного вопроса имеет особенное значение для недоношенных новорожденных.

## **1.2. Фетальный и неонатальный гранулоцитопоз**

Фетальный гемопоэз человека является эволюционно консервативным процессом, для которого характерна смена локализации в ряде внезародышевых и зародышевых кроветворных органов. Исходно гемопоэз возникает в экстраэмбриональном желточном мешке примерно на 3 неделе эмбриогенеза, в результате которого появляются популяции первичных эритроидных клеток, макрофагов и мегакариоцитов [136, 140]. Приблизительно на 7-8 неделе беременности гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) начинают заселять печень, тимус и селезенку, где кроветворение продолжается до седьмого месяца беременности [90]. Первые гранулоциты обнаруживаются в крови эмбрионов на 4-й-5-й неделе, лимфоциты — на 6-й неделе, а моноциты и активированные макрофаги — на 8-й неделе. Клетки гранулоцитарного, моноцитарного, лимфоцитарного и мегакариоцитарного рядов малочисленны. Кроветворение во внезародышевых органах прекращается к 9-й неделе. Затем гемопоэз перемещается в костный мозг, и к концу беременности костный мозг становится основным источником клеток крови [90].

Клетки гранулоцитарного ряда впервые появляются в костном мозге на 10–11 неделе развития плода после прекращения кроветворения во внезародышевых органах [124]. Предшественники нейтрофилов обнаруживаются в периферической крови к концу первого триместра, в то время как зрелые клетки появляются к 14–16 неделям развития плода [78]. Гемопоэтические клетки-предшественники нейтрофилов локализуются в специализированных нишах губчатой костной ткани, вблизи эндоста или на границе между костью и костным мозгом [102]. Для выхода из костного мозга нейтрофилы должны преодолеть эндотелий через плотно прилегающие поры с помощью трансцеллюлярной

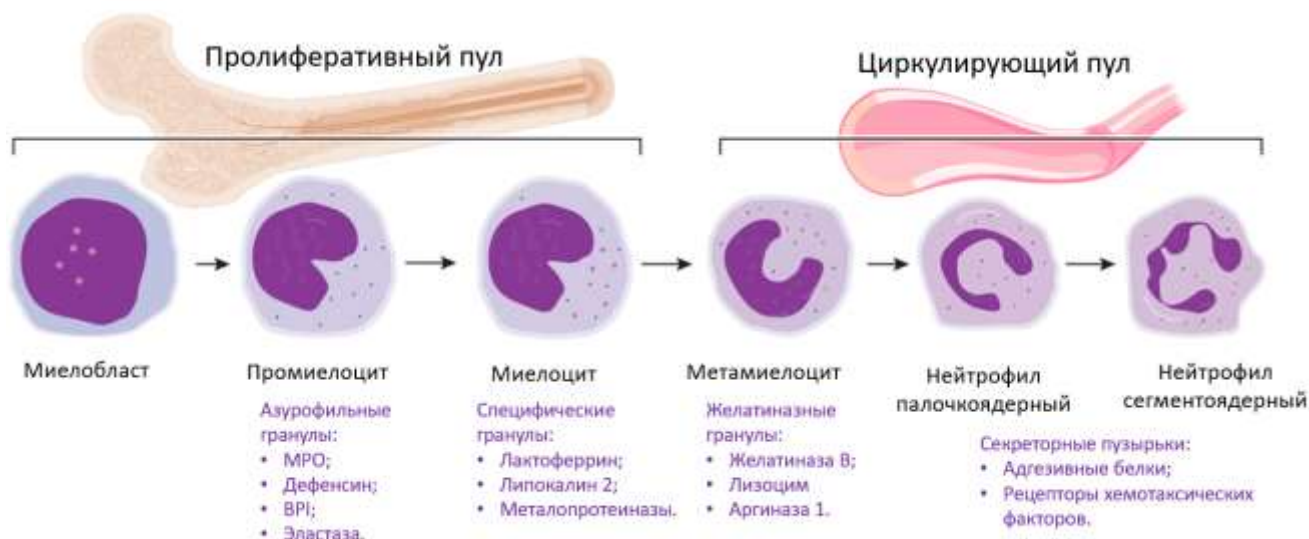
миграции, при которой клетки проходят через клеточные тела эндотелия, а не через межклеточное пространство [21, 130].

Клетки гранулоцитарного ряда локализуются в трех разных пулах: пролиферативном, циркулирующем и маргинальном, причем распределение клеток в каждом из них зависит от стадии развития организма и состояния его здоровья. Тонкий баланс между созреванием нейтрофилов, миграцией из костного мозга, внутрисосудистой маргинализацией и миграцией в периферические ткани регулируется дендритными клетками посредством контролируемой продукции гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) и хемокиновых лигандов CXCL1, CCL2 и CXCL10 [67].

Прролиферативный пул нейтрофилов включает всех митотических предшественников нейтрофилов: миелобласты, промиелоциты и миелоциты, которые сохраняют свою способность к пролиферации для восполнения общего количества нейтрофилов [135] (рисунок 1). По разным оценкам, у взрослых людей пролиферативный пул нейтрофилов составляет от 4 до  $5 \times 10^9$  клеток на кг массы тела [129]. У новорожденных этот пул значительно меньше и составляет около 10% от значений взрослых, при этом более 2/3 клеток находится в активной фазе клеточного цикла, что приводит к быстрому обновлению популяции нейтрофилов [46].

Более зрелые формы нейтрофилов, локализующиеся за пределами пролиферативного пула (метамиелоциты, палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы), находятся в равновесии между свободно циркулирующим пулом и маргинальным пулом, занимающим пристеночное положение кровеносных сосудов [120]. Существенные колебания циркулирующего пула происходят почти у всех новорожденных после рождения из-за скачка числа нейтрофилов в первые 6–24 ч жизни до уровней аномально высоких уровней [121]. У недоношенных новорожденных наблюдается быстрый рост с пиковыми уровнями до  $25\text{--}28 \times 10^3$  кл/мкл [121]. В последующие 72 часа обычно общее число нейтрофилов постепенно снижается приближается к нормальным значениям [121].

Также охарактеризованы различия у новорожденных в составе нейтрофилов циркулирующего пула. Так, у доношенных новорожденных повышено количество незрелых форм нейтрофилов (промиелоцитов, миелоцитов и метамиелоцитов) по сравнению со взрослыми (8,4-12% и <2% соответственно) [79]. Повышенное число незрелых форм нейтрофилов, характеризующихся фенотипической и функциональной незрелостью, может повышать риск развития инфекционных осложнений у новорожденных сразу после рождения, однако может также обеспечивать защиту от нежелательных воспалительных реакций во время формирования собственного микробиома. Поскольку новорожденные характеризуются ограниченным пролиферативным пулом, резкие изменения в количестве циркулирующих нейтрофилов, скорее всего, могут быть объяснены перераспределением из маргинального пула в циркуляцию в рамках связанных с рождением иммунологических реакций новорожденного, хотя и механизм данного перераспределения остается неизвестным.



**Рисунок 1. Последовательные стадии дифференцировки нейтрофилов в процессе гранулопоэза.**

Нейтрофилы одними из первых активируются в ответ на инвазию патогена, в результате чего количество циркулирующих в кровотоке клеток быстро увеличивается [148]. Таким образом, пул зрелых нейтрофилов вне циркуляции в



костном мозге быстро истощается из-за ограниченного резерва, что требует высвобождения незрелых форм гранулоцитов [33]. Поскольку новорожденные (в первую очередь недоношенные новорожденные с ОНМТ и ЭНМТ) обладают ограниченной способностью рекрутировать значительное количество нейтрофилов, у них больше шансов развития абсолютной нейтропении при столкновении с инфекцией, что увеличивает связанную с сепсисом заболеваемость и смертность [32]. Напротив, у взрослых в пролиферативном пуле содержится большое количество покоящихся предшественников нейтрофилов, которые могут быть быстро вовлечены в клеточный цикл при инфекции [90], а также значительный резерв зрелых нейтрофилов в костном мозге, которые могут быть быстро мобилизованы в самом начале иммунного ответа. В конечном счете количество нейтрофилов у доношенных и недоношенных детей возрастает в течение первых нескольких недель жизни, достигая значений для взрослых к 4 неделям [88].

### **1.3. Нейтропения новорожденных**

У недоношенных новорожденных, особенно с очень низкой и экстремально низкой массой тела, наблюдается бóльшая частота снижения абсолютного количества нейтрофилов  $<1500$  клеток/мкл по сравнению с доношенными новорожденными. Нейтропения обычно сохраняется в течение первой недели жизни и ассоциирована с тромбоцитопенией в более чем 60% случаев [29]. Некоторые исследования демонстрируют корреляцию между нейтропенией доношенных новорожденных и преэклампсией, а также связанным с ней плацентарным дефицитом [122]. Предполагается, что нейтропения недоношенных, вероятно, является скорее результатом внутриутробной задержки развития, а не гестоза, поскольку тяжесть нейтропении напрямую связана с количеством циркулирующих ядросодержащих эритроцитов [29]. Именно снижение продукции нейтрофилов, а не ускоренное их разрушение или чрезмерная маргинализация, считается основным механизмом, лежащим в

основе этого явления, поскольку поддерживается нормальное отношение незрелых форм нейтрофилов к их общему количеству [29]. Кроме того, в экспериментальных моделях были обнаружены данные о снижении продукции нейтрофилов из плюрипотентных гемопоэтических предшественников, снижении концентрации гранулоцитарно-макрофагальных предшественников, уменьшении пролиферативного и накопительного пула нейтрофилов в костном мозге [134]. Таким образом, считается, что нарушенная продукция нейтрофилов является результатом подавления пролиферации нейтрофилов из-за высоких концентраций эритропоэтина [86], неадекватной продукции Г-КСФ и, возможно, неизвестного плацентарного ингибитора продукции нейтрофилов, который имеет еще предстоит идентифицировать [29].

Однако большинство исследователей задаются вопросом: все ли случаи неонатальной нейтропении являются клинически значимыми? Имеются противоречивые данные о связанных с абсолютной нейтропенией с риском развития сепсиса и уровнем смертности.

Известно, что недоношенные новорожденные с ОНМТ и ЭНМТ характеризуются повышенным риском развития неонатального сепсиса, а также некротического энтероколита [110]. В то же время, у новорожденных с ОНМТ и ЭНМТ чаще всего выявляется абсолютная нейтропения в сравнении с всеми другими группами новорожденных, при этом причина этого остается неизвестной [30]. В ряде исследований было показано, что длительная и выраженная нейтропения у новорожденных с ОНМТ является фактором риска развития сепсиса и ассоциированной с ним смерти [31, 94]. Позже были опубликованы результаты, согласно которым эта взаимосвязь не была подтверждена [137]. Связь хронической нейтропении, в том числе возникшей на фоне химиотерапии, с высоким риском развития инфекции была показана на примере детей более старшего возраста. Таким образом, отсутствуют убедительные данные, демонстрирующие, что нейтропения у недоношенных новорожденных связана со смертностью в отделении интенсивной терапии.

Испытания, в которых изучалось клиническое применение рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) с целью увеличения абсолютного числа нейтрофилов у недоношенных детей, дали неутешительные результаты (учитывая, что размеры выборки участников исследований были небольшими). Хотя оба препарата увеличивали общее число нейтрофилов у недоношенных детей с подозрением или доказанной системной инфекцией, которые получали одновременную терапию антибиотиками, к 14-му дню от начала терапии Г-КСФ/ГМКСФ никаких различий в смертности не наблюдалось [11, 25]. Многоцентровое рандомизированное контролируемое исследование PROGRAMS, целью которого ставилось оценить профилактическое применение ГМ-КСФ у недоношенных новорожденных для профилактики неонатального сепсиса в раннем неонатальном периоде, также не выявило различий в выживаемости к 14-му дню с момента включения в исследование по сравнению с контрольной группой [23]. В исследовании PROGRAMS ГМ-КСФ был выбран преимущественно из-за его способности индуцировать макрофаги провоспалительного M1-фенотипа, усиливать бактерицидную активность и стимулировать пролиферацию предшественников нейтрофилов [23]. Однако анализ результатов исследования показал, что ранняя послеродовая профилактика ГМ-КСФ увеличивает общее количество нейтрофилов, но не уменьшает риск развития сепсиса, не улучшает выживаемость и краткосрочные результаты у недоношенных новорожденных.

В то же время анализ подгруппы, включающей 97 недоношенных детей, которые страдали как нейтропенией, так и системной инфекцией во время включения в исследование, показал значительное снижение смертности к 14-му дню [23]. Таким образом, для определения эффективности терапии Г-КСФ/ГМКСФ должны быть проведены дальнейшие исследования [27].

## **1.4. Функциональные характеристики нейтрофилов новорожденных**

### **1.4.1. Хемотаксис и миграция**

Нейтрофилы являются первыми циркулирующими клетками, которые реагируют и обеспечивают защиту от бактериальных, вирусных и грибковых инфекций. На самых ранних стадиях развития инфекционного процесса или воспаления хемоаттрактанты, вырабатываемые макроорганизмом (хемокины, цитокины, лейкотриены и др.) или патогеном (например, липополисахариды (ЛПС), N-формилметионил-лейцил-фенилаланин (fMLP) и др.), высвобождаются в кровоток, вызывая стимуляцию и активацию покоящихся нейтрофилов. Хемоаттрактанты создают биохимический градиент, который распознается специализированными рецепторами, связанными с G-белками, и индуцируют внутриклеточные сигнальные каскады, приводящие к поляризации клеток, перестройке цитоскелета и кластеризации молекул адгезии. Эти изменения необходимы для того, чтобы активированные нейтрофилы могли осуществить миграцию к очагу воспаления [38]. Нейтрофилы новорожденных обладают схожей способностью к хемотаксису независимо от гестационного возраста, но уступают в данной характеристике нейтрофилам взрослых [52]. Хотя количество и сродство поверхностных рецепторов клеточной адгезии сопоставимы, дефицит хемотаксиса у новорожденных объясняется снижением мобилизации внутриклеточного кальция, что приводит к абберациям в индуцированной хемоаттрактантом передаче сигналов [147], а также к аномалиям в организации цитоскелета [97]. Кроме того, незрелые формы нейтрофилов, которые не способны к хемотаксису, обнаруживаются у новорожденных в более высоких количествах сразу после рождения по сравнению со взрослыми [93]. Однако, нейтрофилы доношенных новорожденных уже к 4-недельному возрасту достигают схожей с нейтрофилами взрослых способностью к хемотаксису. Напротив, у недоношенных

новорожденных дефицит хемотаксиса нейтрофилов сохраняется до 42 недели постконцептуального развития, причины которого остаются неясными [116].

После того, как циркулирующие нейтрофилы достигают очага воспаления, они должны мигрировать из кровеносного сосуда в ткань. Экстравазация включает последовательное включение следующих механизмов: роллинг, адгезия и проникновение через стенку сосуда (трансмиграция) в ткань. Первоначальный контакт между нейтрофилом и сосудистым эндотелием происходит во время роллинга («качения»), процесс которого зависит от взаимодействия L-селектина нейтрофилов и P-селектина эндотелия [93]. Именно за счет него нейтрофилы способны прочно прикрепляться к эндотелию. После установления начального межклеточного контакта активация специфических хемокиновых рецепторов на поверхности нейтрофилов вызывает конформационные изменения и индукцию экспрессии  $\beta 2$  интегрина и других рецепторов адгезии (LFA-1, CD11b/CD18,  $\alpha M\beta 2$ , MAC-1, CR3) [107]. После установления адгезии с эндотелием «захват» нейтрофилов происходит путем прочного связывания интегринов с белками VCAM и ICAM. Затем начинается финальный этап — трансмиграция [49].

Нейтрофилы новорожденных характеризуются нарушением в роллинге и адгезии к эндотелию. Одной из вероятных причин этой дисфункции является снижение экспрессии нейтрофилами недоношенных L-селектина [72]. Данный рецептор клеточной мембраны впервые начинает экспрессироваться на поверхности нейтрофилов примерно на 21 неделе внутриутробного развития плода, при этом уровень поверхностной экспрессии в течение эмбрионального развития постепенно увеличивается [25]. В то же время, экспрессия L-селектина у доношенных новорожденных остается ниже, чем аналогичный параметр у взрослых, а у недоношенных новорожденных с ГВ < 30 недель отмечается существенный дефицит [25, 100]. Другой причиной недостаточного роллинга и адгезии нейтрофилов новорожденных является сниженная активация рецептора комплемента 3 (CR3) после активации хемоаттрактантом. Уровни экспрессии CR3 у доношенных новорожденных близки к таковым у пациентов с дефицитом

адгезии лейкоцитов 1 типа и соответствуют  $57 \pm 4\%$  от уровня экспрессии CR3 у взрослых [107]. При этом, у недоношенных новорожденных с гестационным возрастом 27 и 36 недель экспрессия CR3 на нейтрофилах соответствовала 10% и 48% от уровня экспрессии у взрослых соответственно [25]. Экспрессия интегрина  $\alpha L\beta 2$  (LFA-1) на мембране нейтрофилов, напротив, не зависит от гестационного возраста новорожденных и соответствует таковым значениям у взрослых [96]. Способность эндотелия сосудов новорожденных усиливать экспрессию молекул адгезии после воздействия ЛПС также значительно снижена в зависимости от гестационного возраста [89]. Соответственно, нейтрофилы новорожденных имеют нарушения трансмиграции через эндотелий сосудов из-за уменьшения количества CR3 и уменьшения высвобождения хемокинов и цитокинов из тканевых нейтрофилов и макрофагов [14]. Таким образом, у новорожденных только около половины нейтрофилов способны к полноценной миграции через эндотелий сосудов в ответ на инфекцию или воспаление по сравнению с нейтрофилами взрослых [25].

Ранее считалось, что нейтрофилы содержат три различных типа гранул: азурофильные (первичные), специфические (вторичные) и желатиновые (третичные) гранулы, а также секреторные везикулы. [49]. Однако недавно был описан четвертый тип нейтрофильных гранул - гранулы, богатые фиколином-1, которые образуются во время перехода от миелоцитов к метамиелоцитам.

Азурофильные гранулы характеризуются значительной неоднородностью размера и формы, которые в свою очередь определяются непосредственно синтезом и упаковкой секреторируемых белков. Азурофильные гранулы содержат кислые гидролазы, антибиотические белки, а также миелопероксидазу (МРО), на долю которой приходится до 5% от общей сухой массы нейтрофилов [112]. В синтезе азурофильных гранул задействованы продукты генов GATA-1 и C/EBP- $\zeta$ . Кроме того, для образования азурофильных гранул необходимо участие транскрипционных факторов AML-1 и c-Myc [112]. В частности, AML-1 и c-Myc контролируют экспрессию МРО и эластазы, а также рецепторов IL-6 и Г-КСФ. В

азурофильных гранулах идентифицированы несколько мембранных белков, в том числе CD63, CD68, пресенилин-1 и H + -АТФаза вакуолярного типа [49].

МРО обычно высвобождается в фаголизосомы, образованные слиянием азурофильных гранул и фагосом, содержащих захваченные микроорганизмы. Фаголизосомы являются жизненно важными органеллами нейтрофилов, поскольку они создают изолированные «камеры» для токсических окислительных реакций, предназначенных для уничтожения патогенов, одновременно защищая ткани хозяина от вредных метаболитов [12]. НАДФН-оксидаза, локализованная на мембране фаголизосомы, опосредует производство АФК. Ускоряя превращение кислорода ( $O_2$ ) в супероксид ( $O_2^-$ ), НАДФН-оксидаза также способствует переносу электронов, образующихся во время этой реакции, во внеклеточное пространство. Затем супероксиддисмутаза опосредует превращение супероксида до перекиси водорода ( $H_2O_2$ ), которая обладает слабым бактерицидным действием, однако вносит значительный вклад в закисление фаголизосом [12]. Чрезмерное подкисление цитозоля и деполяризация плазматической мембраны во время этих реакций предотвращаются потенцированным протонным каналом Hv1/VOSP, который вытесняет протоны, накапливающиеся во время активности НАДФН-оксидазы. Затем миелопероксидаза катализирует реакцию окисления между  $H_2O_2$  и хлоридом ( $Cl^-$ ) с образованием хлорноватистой кислоты ( $HOCl$ ), гидроксильных радикалов ( $\cdot OH$ ) и хлораминов, которые являются сильными окислителями, и дополнительно способствуют микробицидным свойствам нейтрофилов.

МРО представляет собой катионный гликопротеин, который также может связываться с поверхностью нейтрофилов и тромбоцитов посредством электростатических углеводно-зависимых механизмов, тем самым опосредуя провоспалительные реакции. Высвобождение МРО нейтрофилами обычно происходит в результате праймирования лигандами Toll-подобных рецепторов, цитокинами ( $\gamma$ -КСФ,  $TNF-\alpha$ ) а также через сигналы, опосредованные Fc- $\gamma$  рецепторами. Попадая во внеклеточное пространство, МРО может связываться с плазматической мембраной через рецепторы CD11b/CD18, что в свою очередь

приводит к высвобождению содержащегося в азурофильных и специфических гранулах, таких как лактоферрин, лизоцим и нейтрофильная эластаза.

Кроме того, азурофильные гранулы содержат серпроцидины (сериновые протеазы), включая протеиназу 3, катепсин G, эластазу и сериновую протеазу 4 нейтрофилов (NSP4), которые обладают протеолитической ферментативной активностью против компонентов внеклеточного матрикса, таких как эластин, фибронектин, ламинин, и витронектин [49]. Серпроцидины являются мощными противомикробными веществами, которые также могут вызывать активацию эндотелиальных клеток, макрофагов, лимфоцитов и тромбоцитов [49]. Специфические функции эластазы включают антимикробную активность против грамотрицательных бактерий, тогда как катепсин G нацелен на грамположительные микроорганизмы. И эластаза, и катепсин G обладают сильным микробицидным действием против грибковых организмов [138]. Делеция гена ELA2, продуктом которого является эластаза нейтрофилов, приводит к развитию врожденной нейтропении, хотя механизмы участия эластазы в гранулопоэзе остаются неизвестными. В тоже время, ингибирование NSP4 не приводит к значительным изменениям функции нейтрофилов. Серпроцидины, как правило, синтезируются в виде зимогенов или неактивных белков, поэтому для их активации требуются две отдельные стадии: расщепление сигнального пептида катепсином C, что необходимо для активации ферментативной активности, и C-концевой процессинг, который облегчает надлежащую транспортировку белков в гранулярный компартмент [49].

В азурофильных гранулах также содержатся другие важные микробицидные пептиды:  $\alpha$ -дефенсин, азуроцидин и бактерицидный белок, повышающий проницаемость (BPI).  $\alpha$ -Дефенсин, составляющий не менее 5% всех белков нейтрофилов, обладает антимикробной активностью против бактерий, оболочечных вирусов, микроскопических грибов и простейших за счет создания мультимерных трансмембранных пор на внешней [49]. После внеклеточного экзоцитоза  $\alpha$ -дефенсины также индуцируют хемотаксис моноцитов, Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов [153]. Азуроцидин -



антимикробный белок азурофильных гранул, обладающий хемотаксической и антибактериальной активностью. Азуроцидин может увеличивать проницаемость сосудов во время экстравазации нейтрофилов и является эффективным хемоаттрактантом для моноцитов, фибробластов и Т-клеток. ВРІ — это мощное противомикробное вещество, которое нацелено на уничтожение грамотрицательных бактерий [49]. ВРІ имеет высокое сродство к части липида А липополисахарида (LPS), тем самым нейтрализуя его провоспалительные свойства. Действуя как опсонин, ВРІ также усиливает фагоцитоз грамотрицательных бактерий.

Специфические (вторичные) гранулы содержат вещества, участвующие в микробицидной активности нейтрофилов либо при мобилизации с фагосомой, либо посредством высвобождения во внеклеточную среду. Лактоферрин, главный специфический белок гранул, оказывает прямое бактериостатическое и бактерицидное действие против вирусов, грамположительных и грамотрицательных бактерий и микроскопических грибов. Связывая железо, лактоферрин дестабилизирует мембраны микробных клеток. Кроме того, лактоферрин может нарушать продукцию активных форм кислорода и связывать LPS, тем самым предотвращая активацию провоспалительного пути и чрезмерное повреждение тканей [49]. Лактоферрин также модулирует адаптивный иммунный ответ, стимулируя созревание предшественников Т-клеток и усиливая дифференцировку незрелых В-клеток в антигенпрезентирующие клетки. После активации нейтрофилов лактоферрин, высвобождаемый из специфических гранул, усиливает активацию катепсина G и сериновых протеаз, тем самым способствуя запуску каскада реакций врожденного иммунитета во время острого воспаления [41].

К другим белкам специфических гранул также относится липокалин, связанный с желатиназой нейтрофилов (NGAL), резистин, олфактомедин-4 (OLFM-4) а также сигнально-регуляторный белок альфа (SIRP $\alpha$ ). Липокалин, связанный с желатиназой нейтрофилов, реализует противомикробные свойства в координации с лактоферрином, связывая хелаторы железа, вырабатываемые

микроорганизмами вследствие недостатка железа. Продемонстрирована способность липокалина связывать N-формилметионин-лейцил-фениланин (FLMP) *in vitro*; липокалин, возможно, также связывает другие липофильные медиаторы воспаления, такие как фактор активации тромбоцитов и лейкотриен В4. Резистин, провоспалительный цитокин, который также локализуется на клеточной мембране нейтрофилов, ограничивает накопление нейтрофилов в воспаленных участках, подавляя их хемотаксические способности посредством дозозависимой индукции активности NF-κB. Резистин также является хемоаттрактантом для Т-хелперов и подавляет провоспалительные реакции нейтрофилов, снижая интенсивность кислородного взрыва [79]. OLFM-4 ингибирует катепсин С-опосредованную протеазную активность и тем самым ослабляет нейтрофильную гибель *S.aureus* и *E.coli*. Сигнально-регуляторный белок альфа (SIRPα) представляет собой гликопротеин клеточной поверхности с ингибирующими свойствами. SIRPα быстро мобилизуется на поверхность нейтрофильных клеток, а также отвечает за регулирование накопления нейтрофилов в очагах воспаления. В то время как SIRPα преимущественно находится в специфических гранулах, SIRPα также обнаруживается в желатиназных гранулах и секреторных пузырьках [49].

Образование специфических гранул сопровождается снижением уровня экспрессии AML-1 и с-Мус, что в свою очередь ингибирует экспрессию генов белков азурофильных гранул. Врожденная недостаточность специфических гранул нейтрофилов - редкое заболевание, которое характеризуется атипичной структурой и функцией нейтрофилов, а также частыми и тяжелыми бактериальными инфекциями.

Мобилизация желатиназных гранул происходит в момент установления первичного контакта нейтрофила с активированным эндотелием. Эти гранулы содержат ферменты, разрушающие матрикс, а также мембранные рецепторы (CD11b / CD18, CD67, CD177, fMLF-R, SCAMP и VAMP2), которые необходимы на самых ранних этапах активации нейтрофилов и их экстравазации в воспаленные ткани. Аргиназа-1, ключевой белок желатиназных гранул,

метаболизует аргинин, тем самым снижая его доступность в качестве субстрата для синтазы оксида азота (NOS). Эта реакция приводит к снижению синтеза NO, что обычно связано с эндотелиальной дисфункцией. Способствуя выработке орнитина, аргиназа-1 также снижает провоспалительные иммунные реакции и способствует регенерации тканей [131].

Желатиновые гранулы образуются при созревании метамиелоцитов в палочкоядерные нейтрофилы. Когда предшественник нейтрофила дифференцируется в метамиелоцит, он теряет способность пролиферировать, что означает начало терминальной дифференцировки нейтрофилов. Это изменение является результатом репрессии генов AML-1, C/EBP- $\gamma$  и CDP, а также активации антипролиферативных факторов C/EBP- $\delta$  и C/EBP- $\zeta$ . [131].

Белок фиколин-1 синтезируется в созревающих нейтрофилах во время перехода от миелоцитов к метамиелоцитам, однако его упаковка в гранулы осуществляется только на поздних стадиях гранулопоэза. Как и секреторные гранулы, гранулы, богатые фиколином-1 быстро высвобождаются после активации нейтрофилов и в основном содержат сывороточный альбумин человека, CR1, LFA-1, актин и несколько белков, связывающих цитоскелет. Компоненты этих гранул в первую очередь участвуют в адгезии нейтрофилов и трансэндотелиальной миграции [47].

В отличие от описанных выше нейтрофильных гранул, секреторные везикулы представляют собой резервуар мембранно-ассоциированных рецепторов, а также актин-связывающие белков и щелочной фосфатазы, которые необходимы нейтрофилам на самых ранних этапах воспалительных реакций. Секреторные везикулы значительно меньше гранул нейтрофилов. Расположенные по всей цитоплазме клетки, эти органеллы содержат рецепторы клеточной мембраны, которые необходимы для установления прочного контакта с активированным эндотелием сосудов, экстравазации в очаг воспаления и направленной миграции нейтрофила для обнаружения и уничтожения патогенов [47]. Секреторные везикулы и гранулы, богатые фиколином-1, образуются в

сегментоядерных нейтрофилах, после чего клетка полностью завершает процесс созревания.

Способность нейтрофилов к активному высвобождению гранул (дегрануляции) и выбросу медиаторов воспаления у доношенных новорожденных соответствует аналогичному показателю нейтрофилов взрослых, в то время как у недоношенных новорожденных имеются значительные нарушения в высвобождении бактерицидного белка, повышающего проницаемость и эластазы. Кроме того, нейтрофилы здоровых доношенных новорожденных и взрослых содержат одинаковое количество азурофильных гранулярных белков – миелопероксидазы и дефенсина [81]. Содержание лактоферрина в нейтрофилах доношенных новорожденных примерно в два раза ниже чем у взрослых, в то время как у недоношенных детей снижение лактоферрина выражено в еще большей степени [94].

Следует отметить, что у доношенных детей с ранним неонатальным сепсисом уровни ВРІ в плазме крови повышаются до сопоставимых значений по сравнению с детьми старшего возраста и взрослыми с сепсисом [150]. В *in vitro* исследованиях с использованием форбол-12-миристат-13-ацетата (РМА) в качестве стимулятора было показано, что продукция ВРІ нейтрофилами недоношенных новорожденных существенно снижена по сравнению с доношенными новорожденными и взрослыми. Данный факт позволяет сделать вывод, что продукция ВРІ проявляет зависимость от гестационного возраста [81]. ВРІ обладает высоким сродством к липидной части липополисахарида А (эндотоксина грамотрицательных бактерий), тем самым нейтрализуя его провоспалительные свойства. ВРІ также усиливает фагоцитоз грамотрицательных бактерий, действуя как опсонин [105]. Эти факторы могут объяснить, почему недоношенные дети с недостаточной мобилизацией ВРІ с большей вероятностью развивают сепсис, вызванный грамотрицательными бактериями - ведущей причины раннего неонатального сепсиса у недоношенных детей. Продукция другого специфического белка, высвобождаемого из гранул

нейтрофилов и обладающего прямой бактериостатической и бактерицидной активностью – лактоферрина, также существенно снижена у недоношенных [41].

Галектин-3, рецептор лектина S-типа, является мембранным рецептором нейтрофилов с провоспалительным аутокринным и паракринным действием на фагоцитоз микроорганизмов, в частности в отношении грибов рода *Candida* [84]. Этот рецептор распознает и связывается с  $\beta$ -(1-2)-олигосахаридом, что позволяет нейтрофилам различать патогенные и непатогенные грибы [84]. После высвобождения дегранулированными нейтрофилами галектин-3 связывается с клеточной мембраной покоящихся нейтрофилов, что приводит к лигированию CD66a и CD66b, опосредованной интегрином адгезии и усилению фагоцитарной активности [84]. Также было показано, что галектин-3 увеличивает продукцию активных форм кислорода (АФК), усиливает дегрануляцию нейтрофилов и ингибирует апоптоз [50]. Хотя опубликованы противоречивые данные относительно сывороточных уровней галектина-3 у доношенных новорожденных и взрослых [84], у недоношенных новорожденных отмечено снижение уровня данного клеточного рецептора [132]. Также было продемонстрировано, что новорожденных с естественным родоразрешением уровни галектина-3 выше, чем у детей с оперативным родоразрешением, что может быть объяснено разным уровнем обсеменения бактериальной флорой у данных групп новорожденных [132].

#### **1.4.2. Фагоцитарная активность и кислородный взрыв нейтрофилов**

После экстрavasации в тканевой очаг инфекции, нейтрофилы оказываются в условиях кислородной депривации, что в свою очередь стимулирует HIF-зависимую активацию путей выживания в нейтрофилах [123, 133] для усиления их бактерицидной активности [106]. При обнаружении патогенов нейтрофилы осуществляют фагоцитоз, используя для их идентификации рецепторы к компонентам системы комплемента (CR1, CR3) и Fc-домену иммуноглобулинов

класса G, (Fc $\gamma$ RI) [24]. Семейство Fc $\gamma$  рецепторов объединяет Fc- $\gamma$  RI (CD64), включающий изоформы Fc- $\gamma$  RIa, 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 [61]. Известно, что Fc- $\gamma$  рецепторы имеют внеклеточный домен, опосредующий взаимодействие с Fc-доменом, мембраносвязанным участком и внутриклеточным доменом, опосредующем сигнальные события внутри клетки. Образование комплекса Fc/Fc- $\gamma$ -R приводит к проведению сигнала в клетках и запуску последующих реакций, таких как высвобождение медиаторов воспаления, фагоцитоз и антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ). Способность опосредовать фаготоксическую эффекторную функцию служит потенциальным механизмом, при помощи которого антитела реализуют противомикробную защиту [101].

В свою очередь, Fc-домен молекулы иммуноглобулина класса G также обеспечивает значительную гетерогенность его эффекторных функций в зависимости от профиля его модификаций путем гликозилирования. Так, каждый подкласс IgG (IgG1-4) имеет один сайт N-гликозилирования в каждом CH2 домене. Охарактеризовано до 36 возможных профилей гликозилирования антител, которые теоретически могут присутствовать в каждом CH2 домене. Это обеспечивает комбинаторное разнообразие области Fc с различными функциональными состояниями [65]. Кроме того, различные профили гликозилирования Fc-фрагментов антител обладают неодинаковой способностью к трансплацентарному переносу. Например, у здоровых беременных женщин наблюдается сдвиг в сторону галактозилированных антител IgG, которые имеют более высокую аффинность связывания FcRn, более эффективно переносятся через плаценту и усиливают дегрануляцию естественных киллеров (NK) и секрецию хемокинов [66]. Опосредованный профилем гликозилирования Fc-фрагментов трансплацентарный перенос IgG-антител, вероятно, является адаптивным эволюционным механизмом для пассивной передачи наиболее эффективных антител новорожденному. В то же

время еще предстоит установить роль нарушения трансплацентарного переноса антител с различным профилем гликозилирования в развитии перинатальной патологии.

Нейтрофилы доношенных детей способны к опсонизации и фагоцитозу как грамотрицательных [51, 93], так и грамположительных бактерий с эффективностью, эквивалентной для нейтрофилов взрослых [48]. Напротив, у недоношенных новорожденных нейтрофилы характеризуются сниженной способностью к фагоцитозу по сравнению с доношенными новорожденными и взрослыми. Считается, что этот дефицит может быть обусловлен низким уровнем циркулирующих факторов опсонизации, особенно материнских иммуноглобулинов, которые наиболее активно транспортируются через плаценту в последнем триместре беременности. Однако применение иммуноглобулинов для внутривенного введения (ИГВВ) у недоношенных новорожденных не привело к снижению частоты развития неонатального сепсиса и смертности в раннем неонатальном периоде [111].

После фагоцитоза нейтрофилами микроорганизмы захватываются фагосомами, которые сливаются с азурофильными и специфическими гранулами, образуя фаголизосомы, предназначенные для запуска окислительных реакций, необходимых для уничтожения патогенных микроорганизмов. Образование фаголизосом связано с 10–20-кратным увеличением потребления клеткой кислорода, получившее название кислородный (или респираторный) взрыв [12]. НАДФН-оксидаза, локализованная на мембране фаголизосомы, также активируется фагоцитозом и играет важную роль в активации респираторного взрыва посредством восстановления кислорода ( $O_2$ ) с образованием гидропероксильного радикала ( $HO_2$ ) и перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) [12]. Мутации в генах субъединицы НАДФН-оксидазы приводят к развитию хронической гранулематозной болезни, характеризующейся рецидивирующими бактериальными и грибковыми инфекциями, а также гранулемами, являющимися результатом неспособности нейтрофилов полностью уничтожить

патогены как при нормальном фагоцитозе [117]. Сами по себе  $\text{HO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  обладают слабой бактерицидной активностью [115] и приводят к значительному закислению фаголизосомы. Миелопероксидаза, также высвобождаемая из азурофильных гранул, катализирует реакции окисления между  $\text{H}_2\text{O}_2$  и хлоридом ( $\text{Cl}^-$ ) с образованием хлорноватистой кислоты ( $\text{HOCl}$ ), гидроксильных радикалов ( $\bullet\text{OH}$ ) и хлораминов, которые являются мощными окислителями и обладают мощной бактерицидной активностью [115]. В результате химических реакции активных форм кислорода происходит излучение света в видимом спектре, известное как хемилюминесценция [127]. Активные формы кислорода в гранулах нейтрофилов также могут быть обнаружены с помощью НСТ-теста (тест восстановления нитросинего тетразолия), а также реакции восстановления дигидроксиродамина (DHR123) до флуоресцирующего родамина 123.

Была продемонстрирована сопоставимая бактерицидная активность между нейтрофилами доношенных новорожденных и взрослых в отношении *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, разных видов *Pseudomonas* и стрептококков групп А и В, в то время как нейтрофилы у недоношенных новорожденных показали значительное снижение образования активных форм кислорода [141]. Нейтрофилы у новорожденных респираторным дистресс-синдромом также характеризуются подавлением респираторного взрыва [18].

### 1.4.3. Нетоз

Фагоцитоз и секреция антимикробных веществ из гранул — не единственные эффекторные функции нейтрофилов. В 2004 году был открыт еще один механизм борьбы с микробной инвазией: формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET — neutrophil extracellular traps) [20] (рисунок 2). Нетоз нейтрофилов (процесс образования NET) может быть вызван различными индукторами: микроорганизмами, бактериальными компонентами,



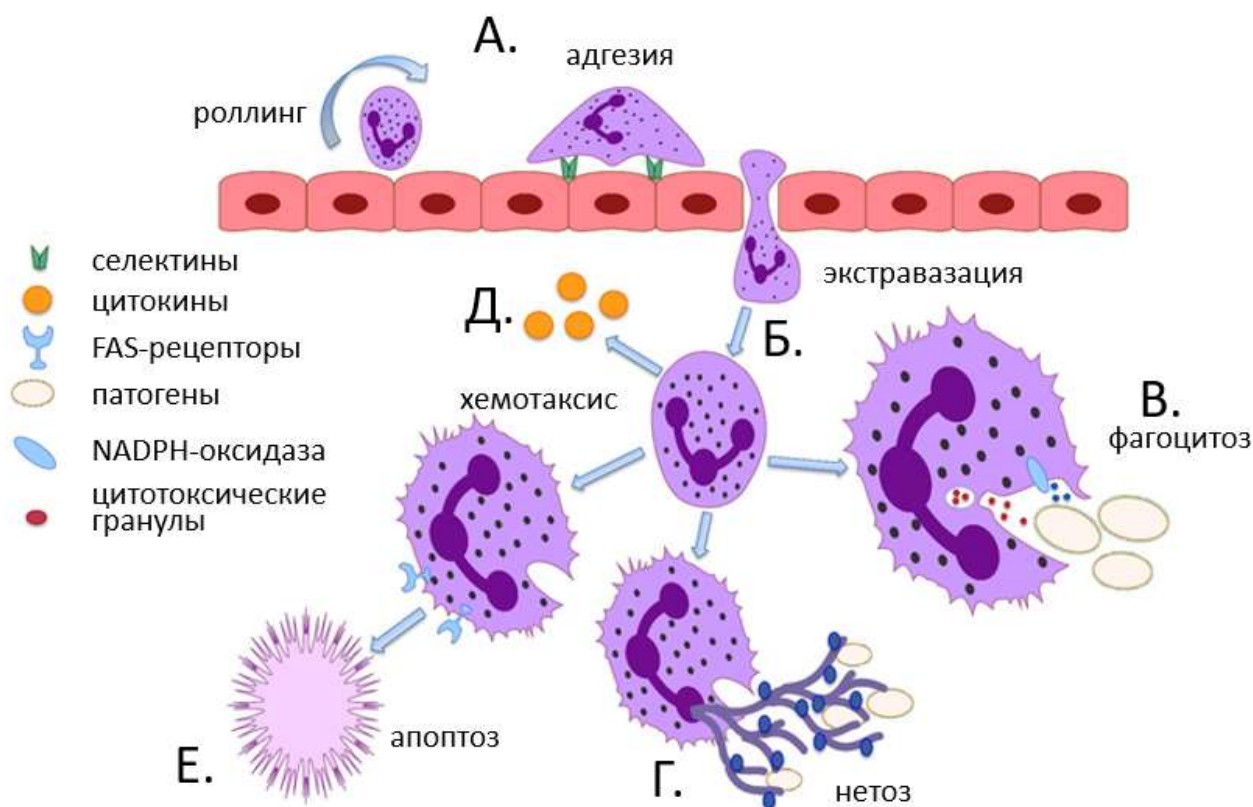
активированными тромбоцитами, комплементарными пептидами, аутоантителами, IL-8, перекисью водорода. После контакта индуктора с рецепторами на мембране нейтрофила активируется молекулярный каскад, который приводит к выходу кальция из эндоплазматического ретикулума, что в свою очередь вызывает повышение активности цитоплазматической пептидиларгинин деиминазы 4 (PAD4). Через некоторое время нейтрофилы теряют гетерохроматическую организацию ядра, в результате чего ядерная оболочка распадается на везикулы, мембраны гранул и митохондрий разрушаются [3], что приводит к смешению цитоплазмы, кариоплазмы и антибактериальных пептидов, включая цитруллинированные гистоны, эластазу, миелопероксидазу, лактоферрин и дефензины. Белки гранул адсорбируются на отрицательно заряженных фибриллах деконденсированного хроматина, который служит скелетом для NET. В конечном итоге клеточная мембрана разрывается, содержимое нейтрофила выбрасывается наружу и разворачивается в пространстве, образуя своеобразную «ловушку».

Выбрасывая такие внеклеточные ловушки нейтрофилы могут нейтрализовать бактерии, микроскопические грибы и простейших [20, 98]. Нейтрофилы могут производить NET двумя различными путями. Первый инициируется в ответ на ЛПС, TNF- $\alpha$  или IL-8 [125] и требует активации НАДФН-оксидазы [112] и индукции каскада RIPK3-MLKL [42]. Нейтрофилы новорожденных (как недоношенных, так и доношенных детей) не могут образовывать NET таким способом, даже в случае ненарушенной активности НАДФН и сохраненной способности к продукции активных форм кислорода [154]. Нейтрофилы новорожденных независимо от их гестационного возраста производят NET через второй, АФК-независимый путь, после воздействия определенных патогенов и в случае активации системой комплемента [156], TLR2 и/или фибронектином [42]. Также было продемонстрировано, что нейтрофилы недоношенных, доношенных новорожденных и взрослых доноров с одинаковой интенсивностью продуцировали NET при воздействии фибронектина и  $\beta$ -глюкана *S.albicans* АФК-независимым образом, но не

образовывали NET при воздействии к фибронектину или  $\beta$ -глюкану по отдельности [22].

В целом нейтрофилы пуповинной крови характеризуются сниженной продукцией NET после стимуляции fMLP, PMA и ЛПС в сравнении с нейтрофилами взрослых. Это может быть связано с неонатальным NET-ингибирующим фактором (nNIF) или nNIF-родственными пептидами, которые, по-видимому, уникальны для новорожденных и функционируют в качестве важных регуляторов воспаления плода и новорожденного [154]. Как было указано выше, деконденсация гетерохроматина нейтрофилов опосредуется PAD4, которая катализирует превращение гистоновых аргининов в цитруллины с последующим ослаблением связывания гистонов с ДНК и раскручиванием нуклеосом. Экспериментально продемонстрировано, что nNIF ингибирует цитруллинирование ядерных гистонов, которое происходит до деконденсации хроматина. Таким образом, можно предположить, что nNIF ингибирует образование NET путем ингибирования активности PAD4.

Кроме того, было показано, что 44-аминокислотный фрагмент расщепления альфа-1 антитрипсина (A1AT) - A1ATm358, который связан с плацентарным матриксом, имеет перекрывающиеся последовательности с nNIF и также способен ингибировать образование NET [155]. По-видимому, образование A1ATm358 опосредовано протеолитическим расщеплением A1AT в плаценте. Кроме того, показано увеличение уровня протеазы HtrA, опосредующей расщепление A1AT на С-конце, в синцитиотрофобластах плаценты человека в третьем триместре беременности [54]. В совокупности эти данные предполагают наличие механизма образования биологически активных фрагментов A1AT в плаценте, уровень которых снижается сразу после родов. Тем не менее, механизм образования nNIF и факторы, контролирующие уровни nNIF в пуповинной крови еще предстоит определить.



**Рисунок 2. Осуществление эффекторной функции нейтрофилов.** Циркулирующие в кровотоке нейтрофилы прикрепляются к сосудистой стенке за счет взаимодействия с селектинами, экспрессия которых активируется в ответ на воспаление (А). После адгезии к эндотелию нейтрофилы мигрируют в воспалительный очаг, где происходит их активация (Б). Активированные нейтрофилы опосредуют свою эффекторную функцию через различные механизмы: фагоцитоз и уничтожение патогенных микроорганизмов с помощью цитотоксических ферментов, содержащихся в их гранулах (В); генерация активных форм кислорода НАДФН-оксидазой; высвобождение внеклеточных ловушек (нетоз) (Г) и выработка цитокинов для стимуляции воспалительной реакции (Д). После реализации эффекторной функции нейтрофилы погибают посредством запуска апоптоза (Е).

Можно предположить, что nNIF в пуповинной крови и A1ATm358 в матриксе плаценты представляют собой регуляторные факторы, которые модулируют образование NET в перинатальный период. Показано, что у женщин с преэклампсией наблюдается образование NET в плаценте [59]. Таким образом, нерегулируемое образование NET может быть ассоциировано с

воспалительными процессами и развитием перинатальной патологии. Чрезмерное образование NET во время родов также может иметь дополнительные негативные последствия, включая долгосрочную неонатальную иммунную дисрегуляцию [10]. Сразу после родов новорожденный подвергается риску NET-опосредованного повреждения сосудов и тромбоза [119], вызванное микробной колонизацией и последующей мобилизацией нейтрофилов. pNIF в плазме новорожденных и родственный пептид A1ATm358 в интерстиции плаценты представляют собой потенциальные ингибиторы, которые выборочно ограничивают образование NET. Показано, что у новорожденных способность к образованию NET восстанавливается в течение первых дней внеутробной жизни, что коррелирует с формированием стабильной резидентной микробиоты и снижением уровня pNIF в крови новорожденных [10], в то время как в образцах крови взрослых pNIF содержится в крайне низких или недетектируемых концентрациях [155]. Эти данные позволяют предположить, что экспрессия pNIF может в значительной степени быть особенностью плода и новорожденного.

Недавно было показано, что маркеры образования NET коррелируют с клиническим течением сепсиса у взрослых [109], однако роль маркеров NET в качестве предикторов сепсиса у новорожденных еще предстоит оценить. Показано, что повышение уровня циркулирующей внеклеточной ДНК в плазме новорожденных было связано с развитием сепсиса и некротического энтероколита [103]. Кроме того, оценка способности нейтрофилов к образованию NET, также могут рассматриваться в качестве потенциального биомаркера сепсиса у новорожденных [144]. Хотя в опубликованном исследовании [128] не было обнаружено значительных различий маркеров NET в образцах пуповинной крови новорожденных, развивших сепсис и контрольной группой, наблюдалась тенденция к повышению внеклеточной ДНК и нейтрофильной эластазы у новорожденных с активным инфекционным процессом. Ввиду ограниченного количества участников пилотного исследования различия между группами могут быть более выраженными при увеличении выборки. Будущие исследования также должны учитывать

различные лабораторные маркеры образования NET, поскольку в настоящее время нет общепринятого диагностического «золотого стандарта».

### **1.5. Нейтрофилы новорожденных и микробиом**

В момент родов, сразу после разрыва плодных оболочек, новорожденный впервые сталкивается с колоссальным количеством микроорганизмов, составляющих нормальную микробиоту матери. Толерантность нейтрофилов новорожденного к антигенам в данный период необходима для предотвращения развития неадекватных провоспалительных реакций. После установления симбиотических отношений между микробиотой и макроорганизмом функция нейтрофилов должна быть снова направлена на обеспечение иммунологической защиты. Вмешательства, которые препятствуют естественному обсеменению новорожденного (такие как кесарево сечение или использование антибиотиков во время родов или в послеродовой период) могут нарушать этот баланс и подвергать ребенка повышенному риску позднего неонатального сепсиса, некротического энтероколита и других инфекционных осложнений [17, 39].

Кроме того, роды через естественные родовые пути сопровождаются высвобождением гормонов, таких как кортизол и катехоламины, которые в свою очередь также оказывают влияние на фенотип и функцию различных клеток иммунной системы, в том числе нейтрофилов, моноцитов и НК-клеток [28, 57]. Чрезмерное использование антибиотиков в неонатальном периоде - еще один пример нарушения микробиома с долгосрочными последствиями, связанный с развитием хронических заболеваний [157]. В частности, известно, что макролидные антибиотики ингибируют нормальную активацию и рекрутинг нейтрофилов [69]. Эти изменения во взаимодействии микробиоты и иммунной системы могут значительно влиять на неонатальную заболеваемость и смертность. У недоношенных новорожденных с ОНМТ изменения в составе микробиома предшествуют возникновению некротического энтероколита (НЭК)

[146]. Изменения в составе кишечного микробиома также рассматривается как фактор, способствующий развитию неонатального сепсиса [43].

На нейтрофилы как на важную часть врожденной иммунной системы влияют различные компоненты и метаболиты как резидентной, так и патогенной микробиоты. Показано, что микрофлора кишечника может влиять на продукцию нейтрофилов посредством модуляции миелопоэза в костном мозге [70]. Кроме того, истощение нормальной микробиоты приводит к повышению восприимчивости к инфекциям у новорожденных предположительно из-за развития нейтропении [68]. Микрофлора индуцирует выработку специфических медиаторов, таких IL-17, IL-7, IL-6 и тромбopoэтин, которые в свою очередь влияют на высвобождение Г-КСФ [64]. Эксперименты на животной модели показали, что микробиота новорожденных мышей индуцирует выработку IL-17 лимфоидными клетками в кишечнике, что увеличивает выработку Г-КСФ и, следовательно, продукцию нейтрофилов [43]. У взрослых мышей это взаимодействие также увеличивает количество зрелых форм нейтрофилов в циркуляторном пуле, характеризующихся повышенным уровнем экспрессии интегрина  $\alpha$ MB2 и более выраженной продукцией NET в условиях воспаления [158]. Кроме того, изменения микробиома, возникающие при диете с высоким содержанием жиров, также оказывают влияние на гемопоэз в целом [159]. Помимо влияния на продукцию нейтрофилов, микробиота также регулирует функцию нейтрофилов. Короткоцепочечные жирные кислоты (SCFA) в качестве метаболитов, происходящих из микробиома кишечника, подавляют миграцию и активацию нейтрофилов [76], а также способствуют разрешению воспаления за счет индукции апоптоза нейтрофилов и эффероцитоза апоптотических клеток макрофагами [143]. Также микробиота кишечника регулирует метаболизм желчных кислот, которые, как было показано, оказывает влияние на функцию клеток иммунной системы [58]. Так, тауроурсодезоксихолат напрямую подавляет активацию нейтрофилов и привлечение их к воспаленной ткани [16].

Перекрестное взаимодействие между микробиотой и иммунными клетками также может осуществляться через экзосомы [36]. Состав бактериальных

мембранных везикул (MV), как и эукариотических внеклеточных везикул (EV), зависит от клеточного компонента, из которого они происходят. Внеклеточные везикулы могут содержать множество компонентов, включая белки, сигнальные молекулы, рецепторы, метаболиты и малые РНК. MV также используются бактериями для межклеточной коммуникации, а также для горизонтальной передачи генов (например, генов устойчивости к антибиотикам). В свою очередь, бактериальные MV микробиоты могут оказывать влияние и на клетки хозяина. Показано, что малые РНК в составе MV *P.aeruginosa* могут способствовать снижению иммунного ответа, снижая ЛПС-индуцированную секрецию IL-8 культивированными первичными эпителиальными клетками дыхательных путей человека, а также активацию нейтрофилов в легких мыши [75]. MV из *S.aureus* оказывают провоспалительное действие на эндотелиальные клетки, повышая экспрессию E-селектина, VCAM-1, ICAM-1 и IL-6 [71].

Ввиду доказанного прямого влияния микробиоты на функцию нейтрофилов, пре- или пробиотики могут рассматриваться в качестве иммуномодуляторов (особенно у недоношенных детей, которые подвержены большому риску нарушения микрофлоры кишечника). Использование пре- и пробиотиков в неонатальной практике уже неоднократно обсуждался как возможный способ улучшения состава микробиоты и иммунологической регуляции [133]. В рамках рандомизированного двойного слепого клинического исследования влияния *B.longum* BB536 (BB536) на состав кишечной микробиоты и иммунный ответ у доношенных детей (n=256) было показано увеличение количества IFN- $\gamma$ - секретирующих клеток и соотношения IFN- $\gamma$ /IL-4, а также более высокие значения отношения бифидобактерий/энтеробактерий, что, по-видимому, связано с усилением Th1-ответа [151]. На взрослой популяции было показано, что пробиотики улучшают функцию нейтрофилов и цитокиновый ответ у пациентов с алкогольным циррозом печени [126]. В животной модели продемонстрировано, что *Lactobacillus rhamnosus* подавляют образование NET у мышей [145]. Однако конкретных сообщений о влиянии пробиотиков на нейтрофилы у новорожденных нет.

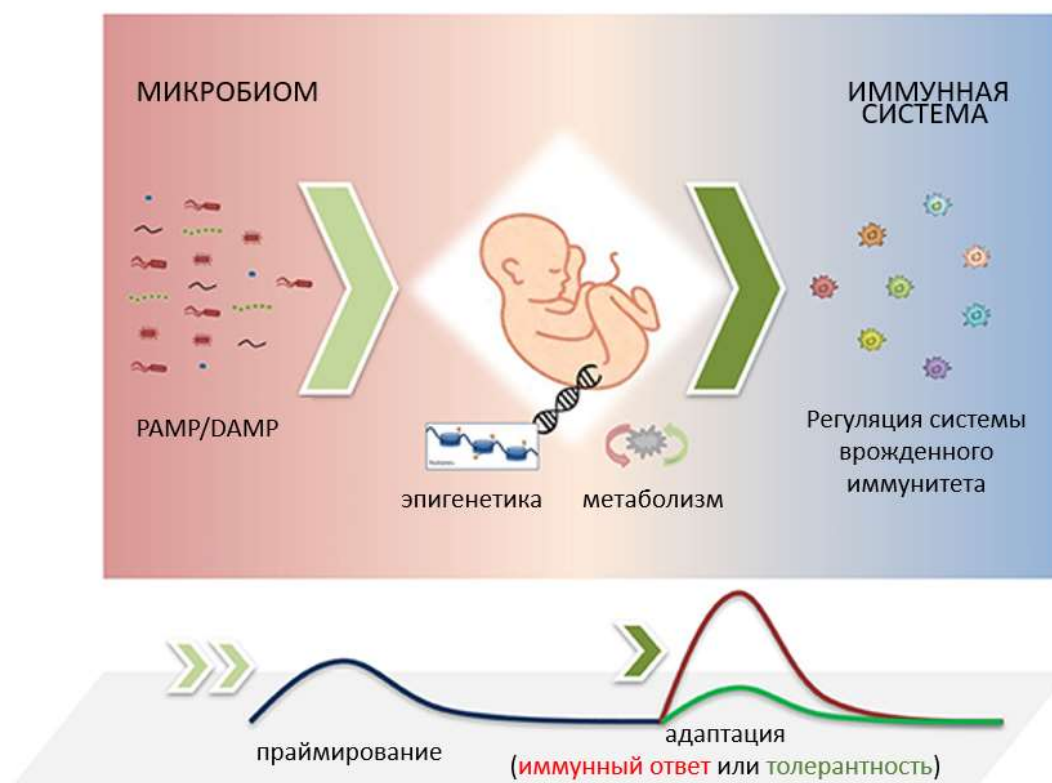
Анализ EV, полученных из пробиотических штаммов, показал, что они также обладают противовоспалительным действием и способствуют иммунологической регуляции [47]. Таким образом, преимущество клинического применения EV перед непосредственным использованием пробиотических микроорганизмов заключается в их лучшей биобезопасности, а также стандартизации при производстве и менее требовательных условий хранения. Однако до настоящего времени в данном направлении не проводилось клинических испытаний.

Недавно была введена новая концепция «микробиологической памяти», цель которой – объяснить роль микробиома в эпигенетической регуляции клеток иммунной системы [44]. Несмотря на короткое время жизни зрелых нейтрофилов, эпигенетическая регуляция может быть реализована через ГСК и миелоидные клетки-предшественники в костном мозге. Кроме того, на животной модели было показано, что введение  $\beta$ -глюкана мышам индуцировало в миелоидных ГСК повышенную транскрипцию генов, связанных с клеточным циклом и дифференцировкой, что было связано с усилением передачи сигналов медиаторами врожденного иммунитета, такими как IL-1 $\beta$ , GM-CSF, а также с адаптацией метаболизма глюкозы и биосинтеза холестерина [99].

Данная стимуляция миелопоэза усиливала ответ на вторичную стимуляцию ЛПС и снижала эффект индуцированной химиотерапией миелосупрессии [99]. Кроме того, было обнаружено, что данные эффекты тесно связаны с метаболическими изменениями, которые обычно обусловлены эпигенетическими перестройками. Известно, что сепсис сопровождается метаболическими нарушениями в сторону аэробного гликолиза [56]. В тоже время, продукты промежуточного метаболизма могут способствовать как индукции иммунного ответа, так и развитию иммунологической толерантности, таким образом оказывая влияние на ключевые функции нейтрофилов [15, 45]. Таким образом, праймирование миелоидных предшественников в костном мозге является неотъемлемым компонентом развития врожденного иммунитета,



который до настоящего времени считался связанным исключительно с функциональными изменениями зрелых миелоидных клеток на периферии. В данном аспекте микробиоту можно рассматривать в качестве ключевого праймера, так как она непрерывно оказывает воздействие на все звенья врожденного иммунитета (рисунок 3).



**Рисунок 3. Схематическое изображение механизмов прайминга системы врожденного иммунитета в перинатальный период**

Воздействие патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (РАМР) на систему врожденного иммунитета способствует эпигенетическим изменениям и метаболическому перепрограммированию, что в свою очередь приводит к развитию длительной адаптации, проявляющийся в повышении или понижении реактивности иммунных клеток.

Накопление новых экспериментальных данных и эволюция лабораторных методов за последние 50 лет позволили существенно расширить знания о

физиологии нейтрофилов. Нейтрофилы больше не рассматриваются как короткоживущие, неизбирательные фагоциты иммунной системы; вместо этого они являются незаменимыми компонентами иммунной системы, необходимыми для правильного функционирования В- и Т-клеток, презентации антигена и регенерации тканей [95]. Различия в лабораторных методах и различия в популяции новорожденных во времени могут затруднить сравнение прошлых и настоящих данных и привести к потенциально противоречивым результатам. В то же время, изучение фенотипических и функциональных особенностей нейтрофилов новорожденного с учетом гестационного возраста и особенностей течения беременности может иметь решающее значение в установлении подходов к улучшению терапии неонатальных инфекций.

## **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1. Объём клинических наблюдений и характеристика групп**

Все протоколы исследования были одобрены Этическим Комитетом и Ученым советом ФГБУ НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России. В исследование включали новорожденных, родившихся в родильном доме Городской больницы №24, филиал No 2 (г. Москва). Наблюдение детей осуществляли в реанимационном отделении этого же стационара. Роженицам, поступившим с началом родовой деятельности либо после стимуляции, было предложено принять участие в исследовании.

Под наблюдением находилось 132 новорожденных ребенка: 30 доношенных новорожденных с физиологическим течением неонатального периода (контрольная группа) и 102 недоношенных ребенка различного

гестационного возраста с осложненным течением неонатального периода, потребовавших проведения интенсивной терапии по совокупности клинико-анамнестических, лабораторных и инструментальных данных.

Критерии включения (группа недоношенных новорожденных): роды через естественные родовые пути, гестационный возраст 25–36 нед, оценка по шкале APGAR < 8 баллов на 1-й и 5-й мин жизни.

Критерии включения (группа доношенных новорожденных): одноплодная доношенная беременность (гестационный возраст  $\geq 37$  нед), роды через естественные родовые пути, оценка по шкале APGAR  $\geq 8$  баллов на 1-й и 5-й мин жизни.

Критерии невключения (для всех новорожденных): генетические заболевания и врожденные пороки развития у детей, аутоиммунное заболевание у матери.

Характеристики обследуемых приведены в таблице 1.

**Таблица 1. Характеристика исследуемых групп пациентов**

<b>Показатели</b>	<b>Недоношенные новорожденные, n=102</b>	<b>Доношенные новорожденные, n=30</b>
Пол ребенка (мужской), абс. (%)	50 (49)	14 (47)
Гестационный возраст, нед min – max	31 (28; 33) 25 – 36	39 (38; 39) 38 – 41
Масса тела, г min – max	1410 (1130; 1720) 690 – 2670	3395 (3230; 3667) 2430 – 3910
APGAR на 1 мин, баллы min – max	6 (5; 6) 4 – 7	8 (8; 8) 8 – 8
APGAR на 5 мин, баллы min – max	7 (7; 7) 6 – 7	9 (9; 9) 8 – 9

Всем детям, включенным в исследование, проводился мониторинг жизненно важных функций, включавший измерение частоты дыхания и сердечных

сокращений, артериального давления, контроль газового состава крови и показателей сатурации, оценку параметров вентиляции. Комплексное клинико-лабораторное обследование включало общеклинические анализы крови, мочи, биохимическое исследование крови, микробиологическое исследование трахеобронхиальных аспиратов, кала, мочи, люмбальные пункции по показаниям. Всем недоношенным детям осуществляли стандартизированную комплексную терапию перинатальной патологии.

## ***2.2. Методы исследования и подходы к трактовке полученных результатов***

С целью определения частоты встречаемости и клинического/прогностического значения абсолютной нейтропении у новорожденных различного гестационного возраста в раннем неонатальном периоде была проанализирована частота развития абсолютной нейтропении (АН) у недоношенных новорожденных в течение первых 2 недель постнатального периода. Взятие периферической венозной крови у недоношенных новорожденных для определения количества нейтрофилов выполняли в отделении реанимации первого и второго этапа выхаживания. Взятие крови осуществляли из венозного катетера каждые 1–2 сут в микропробирки Microtainer (BD, США) с К2-ЭДТА. Объем пробы периферической крови составлял не более 500 мкл. Абсолютное число нейтрофилов в образцах периферической крови новорожденных определяли с помощью автоматического 5-DIFF гематологического анализатора (Sysmex, Япония).

С целью изучения экспрессии Fc $\gamma$  рецепторов на гранулоцитах и возможность ее модуляции у недоношенных новорожденных с бактериальной инфекцией и ранним неонатальным сепсисом была проведена оценка фенотипических и функциональных характеристик нейтрофилов новорожденных различного гестационного возраста. Были исследованы образцы

пуповинной крови (ПК), а также периферической крови на 7, 14 и 30 сутки жизни недоношенных новорожденных из исследуемых групп. В зависимости от гестационного возраста, недоношенные новорожденные были разделены на группы: в I группу вошли новорожденные с ГВ 25-31 нед. (n=58), во II группу – 32-37 нед. (n=44). Доношенные новорожденные с физиологическим течением беременности составили III группу (n=30).

### ***2.2.1. Анализ клеточных маркеров***

Фенотипические (Fc-γ рецепторы CD64, CD16, CD32) характеристики нейтрофилов определяли в образцах пуповинной крови, взятых в родильном зале до отделения последа пункционным методом в стерильные вакуумные пробирки Vacutainer (BD, США) с гепарином (15 МЕ/мл). Объем образцов пуповинной крови составлял не менее 6 мл. Взятие периферической крови для исследования выполнялось 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 часов после взятия биоматериала. Определение фенотипических характеристик нейтрофилов осуществляли методом многоцветной проточной цитофлуорометрии. 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 аутофлюоресценции образцов (IgG1 или IgG2). Для гейтирования нейтрофилов, в т.ч. с целью исключения моноцитов при оценке фагоцитоза и респираторного взрыва, определяли экспрессию CD45, CD14 и CD11b. Для каждого образца крови регистрировали не менее 30 тыс. клеток. Для

сбора данных использовали проточный цитофлуориметр Navios (Beckman Coulter, USA). Анализ данных производили с помощью программного обеспечения Kaluza (Beckman Coulter, USA).

### **2.2.2. Оценка фагоцитарной активности и кислородного взрыва нейтрофилов**

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 FITC-меченых *E.coli*. (IngoFlowEx Kit, EXBIO Praha, a.s. Czech Republic). Для этого в образцы цельной пуповинной крови объемом 50 мкл добавляли 10 мкл суспензии флуоресцентно меченых *E. coli* и инкубировали при 37 °С в водяной бане в течение 10 мин. Затем осуществляли лизис эритроцитов добавлением 2 мл фиксирующего/лизирующего реагента и инкубацией при комнатной температуре (20 °С) в течение 20 мин. Сразу после осуществляли цитометрический анализ. Одновременно с каждой реакцией проводили контроль посредством анализа образцов без добавления *E.coli* для различения фагоцитирующих и не фагоцитирующих клеток. Бактерии, используемые в тесте, были преопсонизированы антителами человеческой плазмы. Таким образом, наличие опсопинов (главном образом иммуноглобулинов) в исследуемом образце крови не оказывало решающего влияния на результаты. Одновременно с каждой реакцией проводили контроль посредством анализа образцов без добавления *E.coli* для различения фагоцитирующих и нефагоцитирующих клеток. Результаты представляли как процент фагоцитирующих гранулоцитов (поглощение одной или более флуоресцентно меченых бактерий одной клеткой).

Количественную оценку кислородного взрыва *in vitro* проводили с использованием набора реагентов FagoFlowEx Kit (EXBIO Praha, Чешская

Республика). Этот тест основан на оценке окислительного взрыва в гранулоцитах после стимуляции *E.coli*. После поглощения бактерий в нейтрофилах активируется НАДФН оксидаза, которая опосредует продукцию активных форм кислорода. Для этого осуществляли стимуляцию нейтрофилов в образцах цельной пуповинной крови объемом 50 мкл путем добавления 10 мкл суспензии *E. coli*, после чего образцы инкубировали с 5 mM дигидроксиродамином 123 (DHR123) в течении 20 мин при 37 °C в водяной бане. В процессе окисления DHR123 образуется флуоресцентный родамин 123, который регистрируется проточным цитометром Navios (Beckman Coulter, США). 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 (образцы без стимуляции *E.coli*).

Оценка фенотипа и функциональных характеристик нейтрофилов выполнялись не позднее 8 ч после взятия биоматериала в лаборатории ФГБУ НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва. Хранение и транспортировка образцов осуществлялись при комнатной температуре (18-25 °C) с сохранением холодной цепи.

### **2.2.3. Культуральные исследования**

Нейтрофильные гранулоциты выделяли из образцов пуповинной крови методом центрифугирования в двойном градиенте плотности фиколла (1,077 г/л и 1,093 г/л), после чего осуществляли удаление оставшихся эритроцитов с помощью лизирующего буфера на основе хлорида аммония. 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 пеницилина (Sigma, USA). Анализ чистоты выделения клеток осуществляли с помощью проточной цитометрии, используя флуоресцентно меченные антитела к поверхностным маркерам нейтрофилов (анти-CD45, меченные PacificBlue, а также анти-CD66b, меченные FITC). Жизнеспособность определяли с помощью окрашивая клеточной суспензии йодидом пропидия (PI). Клетки использовали, если их чистота выделения и жизнеспособность составляли >90% и >95% соответственно.

Клетки в концентрации  $1 \times 10^6$ /мл переносили в 96-луночные полипропиленовые круглодонные планшеты из расчета 200 мкл среды на лунку и культивировали в присутствии Г-КСФ (5 нг/мл) в CO<sub>2</sub> инкубаторе в течение 12 и 24 часов. После стимуляции клетки собирали для проточного цитометрического анализа поверхностной экспрессии Fc-γ рецепторов (CD64, CD16, CD32), а также их функциональной активности (оценка фагоцитоза и кислородного взрыва).

#### ***2.2.4. Количественная оценка апоптоза***

Спонтанный апоптоз нейтрофилов количественно определяли с помощью проточной цитометрии. Появление остатков фосфатидилсерина (PS) (обычно скрытых внутри плазматической мембраны) на поверхности клетки является ранним событием апоптоза. Аннексин V способен высокоселективно связываться с фосфатидилсерином, вследствие чего может быть использован в качестве поверхностного зонда для обнаружения апоптотических клеток. Само по себе связывание аннексина V не может отличить апоптотические клетки от некротических, поэтому дополнительно может быть выполнено окрашивание с помощью флуоресцентных красителей нуклеиновых кислот (7AAD, йодид пропидия).



Нейтрофилы ( $1 \times 10^5$  клеток) отмывали в фосфатно-солевом буфере, после чего ресуспендировали в 500 мкл буфера для связывания. Затем добавляли 5 мкл аннексина-V, меченного FITC, и 2 мкл йодида пропидия (PI), после чего инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 мин. Для каждого образца регистрировали не менее 10 тыс. клеток. Для сбора данных использовали проточный цитофлуориметр Navios (Beckman Coulter, USA). Анализ данных производили с помощью программного обеспечения Kaluza (Beckman Coulter, USA). К апоптотическим клеткам относили нейтрофилы, положительные по аннексину-V, но отрицательные по PI.

### ***2.2.5. Статистическая обработка данных***

Расчет размера выборки производился в соответствии с методическими рекомендациями по оценке качества статистического анализа в клинических исследованиях (Омельяновский В.В., 2017) с учетом ранее опубликованных данных о частоте встречаемости абсолютной нейтропении у новорожденных детей. Разницу считали статистически значимой при  $p < 0,05$  и заданной мощности критерия 85 %.

Анализ полученных данных выполнялся с использованием пакета прикладных программ «Statistica 9.1» (StatSoft Inc., США). Количественные признаки описывались медианами и квартилями (Me [LQ; UQ]). Качественные признаки описывались абсолютными и относительными частотами их значений. Для количественных признаков сравнение несвязанных групп проводилось с использованием непараметрических тестов Манна-Уитни (U-test) и Крускала-Уоллиса (K-W ANOVA), сравнение связанных групп проводилось с использованием непараметрического теста Вилкоксона (W-test). Для сравнения частот значений признаков в группах применялся двухсторонний точный критерий Фишера (ТКФ). Анализ зависимостей между изучаемыми признаками проводили с использованием метода ранговой корреляции Спирмена. Различия

считались статистически значимыми при достигнутом уровне значимости  $p < 0,05$  (Флетчер Р., 1998; Гланц С., 1999; Реброва О.Ю., 2006).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1. Характеристика пациентов

#### 3.1.1. Характеристика доношенных новорожденных детей

Возраст матерей ( $n=30$ ) обследованных детей составил от 19 до 46 лет. Акушерско-гинекологический анамнез был отягощен у 13 (43%) женщин: медицинские аборт – 6 (49%), самопроизвольные выкидыши – 1 (7%), сальпингоофорит – 3 (26%), хронический аднексит – 2 (14%), эрозия шейки матки – 7 (52%), дисфункция яичников – 2 (15%).

У 6 (21%) из 30 рожениц при исследовании влагалищного мазка методом ПЦР были верифицированы прямые маркеры следующих инфекций: *Ureaplasma urealyticum* (23%), *Mycoplasma hominis* (17%), *Chlamidia trachomatis* (52%), цитомегаловирус (ЦМВ) (47%), вирус простого герпеса (ВПГ) (23%). Сифилис в анамнезе отмечался у 2 женщин.

В 17 (56%) случаях у матерей была диагностирована экстрагенитальная патология (хронический пиелонефрит или цистит, хронический тонзиллит, варикозная болезнь, бронхиальная астма, пролапс митрального клапана).

Данная беременность была первой у 16 (54%) женщин, повторной – у 14 (46%). Течение беременности было патологическим у 9 (31%) женщин. Угроза прерывания была отмечена у 2 (28%) матерей. Во время данной беременности 6 (67%) женщин перенесли ОРВИ. Многоводие отмечалось в 1 (12%) случае, маловодие не выявлялось.

Роды были самостоятельными у всех женщин. Беременность наступила в результате экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) у 8% женщин.

Длительный безводный промежуток (от 12 часов до 10 суток) отмечался в 2% случаев, околоплодные воды были мутные - в 3% случаев.

Гестационный возраст детей данной группы составил 38-41 недель, масса тела при рождении от 2430 – 3910 г.

Состояние при рождении было удовлетворительным у 28 (93%) детей, средней тяжести у 2 (7%). Тяжесть состояния в 2 случаях была обусловлена дыхательной недостаточностью на фоне синдрома мекониальной аспирации.

Конъюгационная желтуха отмечалась у 2 детей. В одном случае диагностирована гемолитическая болезнь новорожденных по Rh-фактору, которая не потребовала проведения операции заменного переливания крови. Кожно-геморрагический синдром в виде кровоизлияний выявлен у 1 ребенка.

Все дети получали энтеральное питание с первых суток жизни. В 2 случаях были отмечены симптомы дискинезии желудочно-кишечного тракта.

В связи с признаками инфекционного токсикоза, а также ввиду наличия факторов риска реализации внутриутробной инфекции в анамнезе матери проведения антибактериальной терапии потребовали 2 детей.

На 3-5 сутки жизни 28 детей были выписаны домой в удовлетворительном состоянии под наблюдение участкового педиатра, 2 новорожденных детей были переведены на 2-й этап выхаживания по причинам, связанным с их клиническим состоянием.

### ***3.1.2. Характеристика недоношенных детей с осложненным течением неонатального периода***

Возраст матерей (n=102) обследованных детей составил от 20 до 43 лет.

Акушерско-гинекологический анамнез был отягощенным в 97 (95%) случаях (табл. 2).

**Таблица 2. Особенности акушерского и гинекологического анамнеза матерей (n=102)**

<b>Анамнестические данные</b>	<b>Частота встречаемости (%)</b>
Медицинские аборты	51
Самопроизвольные выкидыши или замершие беременности	29
Сальпингоофорит	36
Хронический аднексит	16
Эрозия шейки матки	67
Бесплодие	29
Дисфункция яичников	12
Кандидозный кольпит	38
Урогенитальные инфекции	51

У 49 (48%) из 102 рожениц при исследовании влагалищного мазка методом ПЦР были верифицированы прямые маркеры следующих инфекций: *Ureaplasma urealyticum* (31%), *Chlamidia trachomatis* (17%), *Mycoplasma hominis* (8%), *Gardnerella spp.* (10%), цитомегаловирус (ЦМВ) (24%), вирус простого герпеса (ВПГ) (15%), вирус папилломы человека (13%).

В 78 (76%) случаях у матерей была диагностирована экстрагенитальная патология (хронический тонзиллит, варикозная болезнь, бронхиальная астма, atopический дерматит, пролапс митрального клапана, холецистит, хронический пиелонефрит или цистит, гипертоническая болезнь и др.).

Особенности течения беременности у включенных в исследования матерей представлены в таблице 3.

**Таблица 3. Особенности течения беременности (n=102)**

<b>Анамнестические данные</b>	<b>Частота встречаемости (%)</b>
Синдром задержки роста плода	16
Гестоз	23
Острые респираторные инфекции	27
Обострение хронических инфекций	75
Урогенитальные инфекции	48
Угроза прерывания	83
Длительный безводный промежуток	34
Воды мекониального характера	24

Течение беременности у всех матерей было патологическим. Угроза прерывания была отмечена у 83% женщин. Швы на шейку матки наложены 19% матерей. Во время данной беременности 27% женщин перенесли ОРВИ. В 47% беременностей у женщин были диагностированы урогенитальные инфекции. Антибактериальную терапию во время беременности получили 15% женщин. Пренатальная профилактика дексаметазоном по схеме, утвержденной Российской Ассоциацией Специалистов Перинатальной Медицины (РАСПМ), проводилась 32% женщин. Многоводие отмечалось в 16% всех беременностей, маловодие – в 28%. Поздний гестоз был диагностирован у 23% женщин.

Роды были самостоятельными у 88 (86%) женщин, путем операции кесарева сечения – у 14 (14%) женщин. Беременность наступила в результате экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) у 18% женщин. Длительный безводный промежуток (от 12 часов до 27 суток) отмечался в 34% случаев,

околоплодные воды были мутные, с запахом, гноевидные - в 24% случаев. Синдром задержки роста плода отмечалась у 16% из всех обследованных детей.

По массе тела и ГВ дети распределились следующим образом: 28 детей имели ГВ 25-28 недель и массу тела от 700 до 1300 г.; 30 детей имели ГВ 29-31 недель и массу тела от 690 до 1830г., 44 новорожденных с ГВ 32-37 недель родились с массой тела от 1180 до 2670 г (табл. 4).

**Таблица 4. Характеристика исследуемых групп недоношенных новорожденных (n=102)**

ГВ (недели)	Масса тела (г) Me [Q1; Q3] (min-max)	Рост (см) Me [Q1; Q3] (min-max)	Оценка по шкале Апгар Me [Q1; Q3] (min-max)	
			на 1 мин. жизни	на 5 мин. жизни
25-28 (n=28)	1120 [870;1190] (700 - 1300)	33 [32; 37] (31-38)	5 [5; 6] (3 - 7)	7 [6; 7] (5 - 7)
29-31 (n=30)	1410 [1130;1640] (690 - 1830)	36 [36; 38] (30-42)	6 [5;6] (4- 7)	7 [7;7] (6 – 8)
32-37 (n=44)	1770 [1580;2090] (1180 - 2670)	40 [37; 47] (36-49)	6 [6;7] (5 - 7)	7 [7;7] (6 - 8)

Все дети, вошедшие в исследование, родились в тяжелом состоянии и нуждались в проведении интенсивной терапии и респираторной поддержки в условиях ОРИТН с рождения. Ведущими патологическими симптомами после рождения у всех детей являлись клинические признаки дыхательной недостаточности, нарушения кровообращения и неврологические нарушения в виде синдрома угнетения безусловно-рефлекторной деятельности.

Заместительную сурфактантную терапию в первые сутки жизни препаратом Poractant Alfa («Куросурф®», Nycomed/Chiesi Farmaceutica, Италия) получили 68 (67%) детей.

Респираторная терапия методом ИВЛ проводилась 52 (51%) детям, СРАР через биназальные канюли - 50 (49%) детям. Из 52 детей, потребовавших

проведения ИВЛ, в 36 (70%) случаях ИВЛ проводилась с рождения, а 49 (30%) детей переведены на ИВЛ с биназального СРАР в возрасте старше 1 суток жизни. После экстубации все дети переводились на биназальный СРАР, после биназального СРАР получали респираторную терапию с помощью кислородной палатки (КП). Повторный перевод с КП на биназальный СРАР по поводу нарастания дыхательной недостаточности потребовался 14% детей.

Всем детям, включенным в исследование, проводился мониторинг жизненно важных функций, включавший измерение частоты дыхания и сердечных сокращений, артериального давления, контроль газового состава крови и показателей сатурации, оценку показателей механики дыхания и параметров вентиляции. Комплексное клинико-лабораторное обследование включало общеклинические анализы крови, мочи, биохимическое исследование крови, микробиологическое исследование трахеобронхиальных аспиратов и мочи, люмбальные пункции по показаниям. В рамках инструментального обследования проводились ЭХО-КГ, НСГ, УЗИ органов грудной и брюшной полости, рентгенографическое исследование грудной клетки.

Комплексная интенсивная посиндромная терапия включала инфузионную, антибактериальную, кардиотоническую, седативную, а также противосудорожную терапию по показаниям.

По клинико-лабораторным и инструментальным признакам пневмония была диагностирована у 63 новорожденных детей (62%), некротизирующий энтероколит (НЭК) – у 39 детей (38%), гнойный менингит был документирован у 8 детей (8%), инфекция мочевыводящих путей отмечалась у 29 детей (28%), омфалит и флебит пупочной вены - у 5 детей (5%). Кандидоз кожи и слизистых оболочек был выявлен у 26 детей (25%). Диагноз «сепсис» был выставлен 15 (15%) детям. Септический шок развили 3 детей.

Недостаточность кровообращения отмечалась у 45 детей (45%). У 22 (22%) детей зафиксирован функционирующий артериальный проток (ФАП). Геморрагический синдром развился у 45 (45%) новорожденных (легочное,

желудочное кровотечение, кожно-геморрагический синдром). Ишемическая нефропатия I-III выявлена у 27 (27%) детей.

В ходе проведения нейросонографии (НСГ) у 35 (35%) детей были диагностированы геморрагические поражения ЦНС: внутрижелудочковые кровоизлияния (ВЖК) I степени – у 15 (45%) детей, ВЖК II степени - у 11 (31%) детей, ВЖК III степени - у 7 (20%) детей, ВЖК IV степени - у 2 (4%) детей. У 20 (20%) детей диагностирована перивентрикулярная лейкомаляция (ПВЛ). Судорожный синдром отмечался у 17 (17%) детей.

Бронхолегочная дисплазия (БЛД) была диагностирована у 32 (32%) детей.

При исследовании методом ПЦР ДНК цитомегаловируса обнаружена в крови, моче, слюне или спинномозговой жидкости 17 (17%) детей, ДНК вируса простого герпеса 1, 2 типа – у 9 (9%) пациентов. В аспирате из трахеи у 22 (22%) обследованных детей обнаружены прямые маркеры Ureaplasma Urealyticum методом ПЦР-диагностики.

После улучшения и стабилизации состояния дети переводились из ОРИТН на второй этап выхаживания в отделения патологии недоношенных новорожденных, 3 пациентов транспортировались из ОРИТН в хирургический стационар для лечения острой хирургической патологии.

Несмотря на проводимые терапевтические мероприятия, летальный исход в возрасте до 36 недель постконцептуального возраста имел место у 10 (10%) детей, старше 36 недель постконцептуального возраста – у 1 (1%) детей вследствие осложнения основного заболевания и/или сопутствующей патологии (табл. 5).

**Таблица 5. Основной посмертный диагноз у умерших детей**

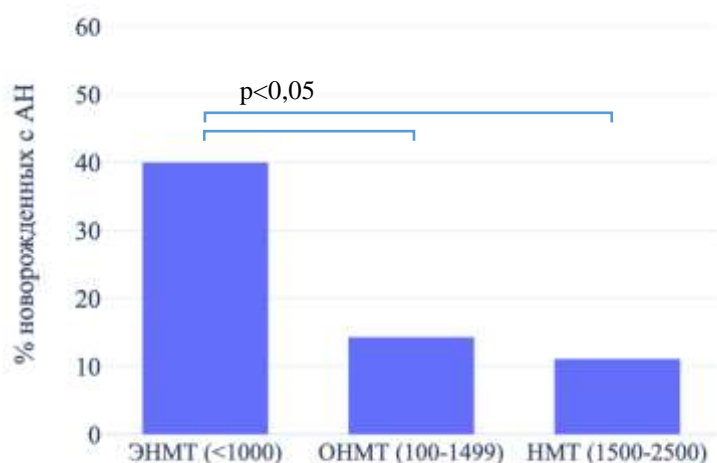
<b>Основной посмертный диагноз</b>	<b>Количество детей (n=11)</b>
ВУИ, генерализованная форма, сепсис	8
Пневмония на фоне БЛД	1
ВЖК 3 ст	1



Перитонит	1
-----------	---

### 3.2. Абсолютная нейтропения новорожденных

На первом этапе исследования была проанализирована частота развития абсолютной нейтропении (АН) у недоношенных новорожденных в течение первых 2 недель постнатального периода. Из 102 недоношенных новорожденных детей, включенных в это исследование, у 17 (16,7%) в первые 2 недели жизни был отмечен хотя бы один эпизод абсолютной АН. У детей с АН была более низкая средняя масса тела при рождении и средняя оценка по шкале Апгар на 1 мин жизни, чем у новорожденных без АН. Кроме того, АН значительно чаще встречалась у младенцев мужского пола (64,7%). При анализе связи АН и массы при рождении обнаружено, что АН встречалась чаще только у недоношенных новорожденных с ЭНМТ (40%, 6/15); в группах детей с ОНМТ и НМТ частота развития АН не отличалась (14,3% (6/42) и 11,1% (5/45) соответственно) (рисунок 4). Оценка взаимосвязи гестационного возраста и факта развития АН методом ранговой корреляции Спирмена показала слабую обратную связь ( $r_s = -0,193$ ,  $p = 0,147$ ). Не было обнаружено статистически значимой разницы в летальности недоношенных новорожденных, развивших АН (таблица 6).



**Рисунок 4. Частота встречаемости АН у недоношенных новорожденных в зависимости от массы тела при рождении.**

По анамнестическим данным у большинства матерей обследуемых недоношенных детей отмечалось неблагоприятное течение беременности. АН чаще развивалась у новорожденных с синдромом задержки роста плода (41,2%) (таблица 6). В то же время, не выявлено различий по частоте встречаемости таких патологических состояний течения беременности, как гестоз, инфекции (острые реиспираторные инфекции, обострение хронических очагов инфекций, урогенитальные инфекции), маловодие, многоводие и угроза прерывания беременности. Дети с АН имели более низкие показатели массы тела при рождении и оценки по шкале APGAR на 1-й мин жизни, чем новорожденные без абсолютной нейтропении.

Частота встречаемости основных интранатальных характеристик (способ родоразрешения, характер околоплодных вод, длительность безводного промежутка) была сопоставимой в группах сравнения.

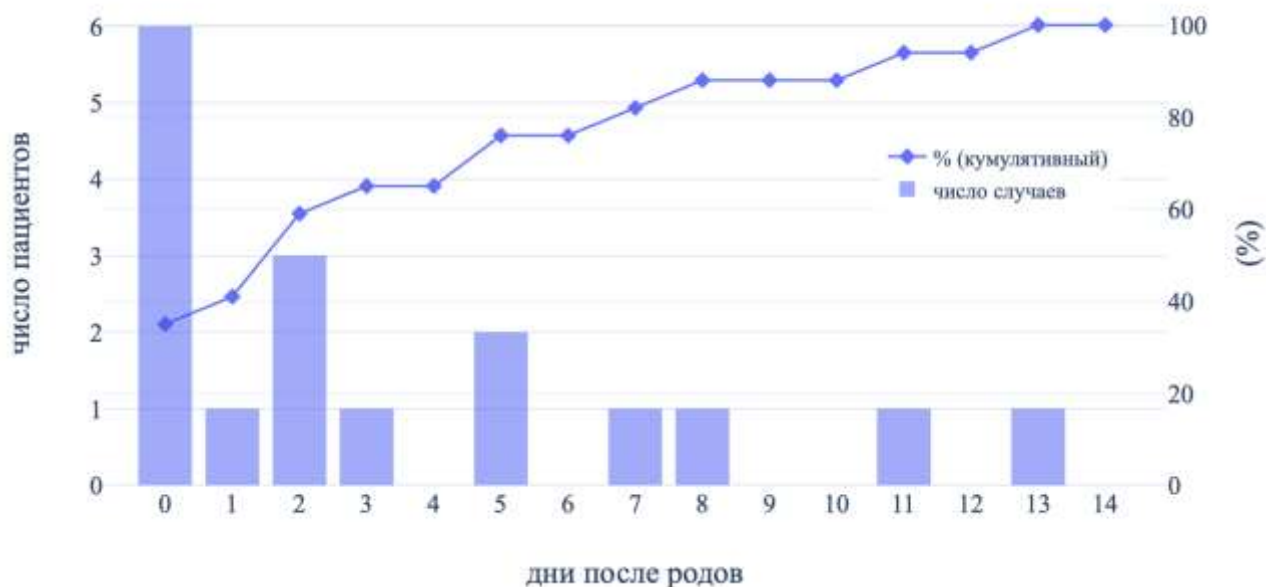
**Таблица 6. Характеристика исследуемых групп недоношенных новорожденных**

Параметр	АН(-), n=85	АН(+), n=17	p
Пол ребенка (мужской), абс. (%)	39 (46)	11 (65)	0,189
Масса при рождении, г	1420 (1180; 1760)	1150 (910; 1670)	<b>0,028</b>
Гестационный возраст, нед	31 (29; 33)	29 (28; 31)	0,309
APGAR на 1 мин жизни, баллы	6 (5; 7)	6 (5; 6)	<b>0,047</b>
APGAR на 5 мин жизни, баллы	7 (7; 7)	7 (6; 7)	0,252
Синдром задержки роста плода, абс. (%)	9 (11)	7 (41)	<b>0,005</b>
У матери во время беременности, абс. (%)			
– преэклампсия	18 (21)	5 (29)	0,526
– ОРИ	22 (26)	6 (35)	0,552
– обострение хронических инфекций	63 (74)	13 (76)	0,999
– урогенитальные инфекции	38 (45)	10 (59)	0,303

– угроза прерывания	70 (82)	15 (88)	0,730
Длительный безводный промежуток (> 12 ч), абс. (%)	31 (36)	4 (24)	0,406
Воды мекониального характера, абс. (%)	19 (22)	5 (29)	0,539

**Примечание.** АН(-)/(+) – недоношенные новорожденные без/с абсолютной нейтропенией в первые 14 сут. жизни (хотя бы один эпизод). ОРИ – острые респираторные инфекции.

В течение 14 сут хотя бы один эпизод абсолютной нейтропении был обнаружен у 17 из 102 (17%) недоношенных новорожденных. У 7 (41%) недоношенных новорожденных абсолютная нейтропения была обнаружена уже в первые сутки жизни, у 11 (65%) — в первые 3 сут. После первой недели жизни абсолютная нейтропения была обнаружена у 4 (24%) детей (рисунок 5). Продолжительность периода абсолютной нейтропении (последовательное выявление у новорожденного в ОАК абсолютного числа нейтрофилов <1000/мкл) варьировала от 1 до 7 сут.



**Рисунок 5. Возраст обнаружения первого эпизода абсолютной нейтропении у недоношенных новорожденных.**

Нами была изучена структура диагнозов у недоношенных новорожденных, находившихся под наблюдением. 63 (61,8%) недоношенных новорожденных составили группу детей с локализованной формой бактериальной инфекции (пневмония, некротизирующий энтероколит, омфалит). У 10 из 63 детей (14,3%) с локализованными инфекциями отмечалось снижение абсолютного числа нейтрофильных гранулоцитов менее 1000/мкл по данным как минимум одного общего анализа крови в первые 2 недели жизни, у 53 (85,7%) абсолютной нейтропении выявлено не было. У 15 недоношенных новорожденных (14,5%) основным диагнозом являлся ранний неонатальный сепсис. При этом у 3 (20,8%) детей отмечалась абсолютная нейтропения хотя бы 1 раз, у 12 (79,2%) новорожденных эпизодов абсолютной нейтропении выявлено не было. 24 (14,7%) ребенка в раннем неонатальном периоде не имели инфекционного диагноза. Эпизоды абсолютной нейтропении наблюдались у 3 (13,3%) детей.

Оценка силы связи между фактором риска (АН) и развитием инфекционной патологии не продемонстрировала статистически значимых различий. Частота случаев инфекционных осложнений (локальные бактериальные инфекции, ранний неонатальный сепсис) в группе недоношенных новорожденных с

эпизодами абсолютной нейтропении в первые 14 сут. жизни не отличалась от таковой в группе недоношенных без нейтропении. Не было обнаружено связи абсолютной нейтропении и с риском летального исхода недоношенных новорожденных в первые 14 сут жизни. Результаты приведены в таблице 7.

**Таблица 7. Риск развития инфекционных осложнений и летального исхода у недоношенных новорожденных с абсолютной нейтропенией.**

Показатели	АН(-), n=85	АН(+), n=17	p
Локализованные инфекции, абс. (%)	53 (62)	10 (59)	0,999
Сепсис, абс. (%)	12 (22)	3 (29)	0,756
Летальность, абс. (%)	9 (11)	2 (12)	0,999

**Примечание.** АН(-)/(+) – недоношенные новорожденные без/с абсолютной нейтропенией в первые 14 сут жизни (хотя бы один эпизод).

По результатам наблюдений видно, что частота случаев инфекционных осложнений в группе недоношенных новорожденных с эпизодами абсолютной нейтропении в первые 14 сут жизни не отличалась от таковой в группе недоношенных без нейтропении. Не было обнаружено связи частоты развития абсолютной нейтропении с тяжестью инфекционного процесса и риском неблагоприятного исхода.

### **3.3. Изучение экспрессии поверхностных рецепторов нейтрофилов у недоношенных новорожденных разного гестационного возраста**

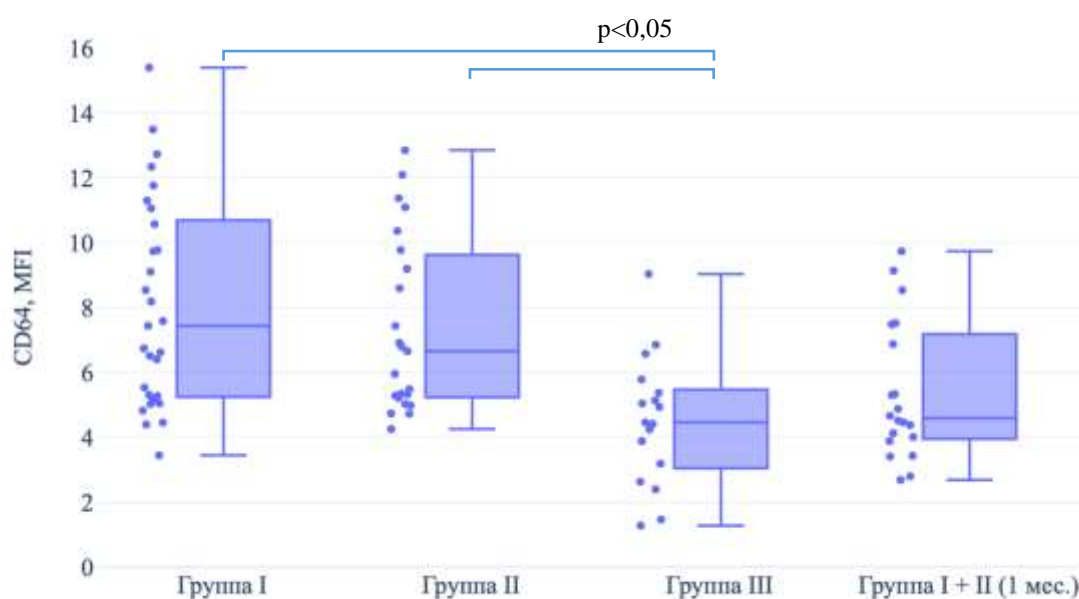
На втором этапе исследования была проведена оценка фенотипических и функциональных характеристик нейтрофилов новорожденных различного гестационного возраста. С этой целью были исследованы образцы пуповинной крови (ПК), а также периферической крови на 7, 14 и 30 сут. жизни недоношенных новорожденных из исследуемых групп. В зависимости от

гестационного возраста, недоношенные новорожденные были разделены на группы: в I группу вошли новорожденные с ГВ 25-31 нед. (n=58), во II группу – 32-37 нед. (n=44). Доношенные новорожденные с физиологическим течением беременности составили III группу (n=30).

Используя метод проточной цитометрии была проанализирована экспрессия поверхностных маркеров нейтрофилов, в частности рецепторов семейства FcγR (CD64, CD32, CD16).

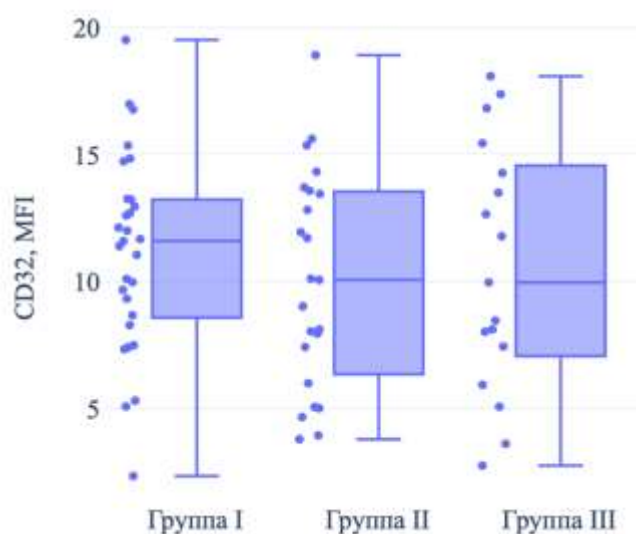
По результатам иммунофенотипического исследования поверхностных рецепторов нейтрофильных гранулоцитов было выявлено, что экспрессия FcγRI (CD64) значимо повышена у недоношенных детей при рождении по сравнению с доношенными новорожденными (p=0,021).

В I группе недоношенных новорожденных медиана средних значений флуоресценции маркера CD64 составила 7,43 MFI [5,24-10,69]. Во II группе данный показатель составил 6,65 MFI [5,23-9,63]. В группе доношенных новорожденных медиана экспрессии CD64 была равна 4,45 MFI [3,04-5,46]. 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 (4,58 MFI; [3,94-7,17]) (рисунок 6).



**Рисунок 6. Экспрессия FcγRI (CD64) у недоношенных детей (группы I, II) при рождении и к концу первого месяца жизни в сравнении с доношенными новорожденными (группа III).**

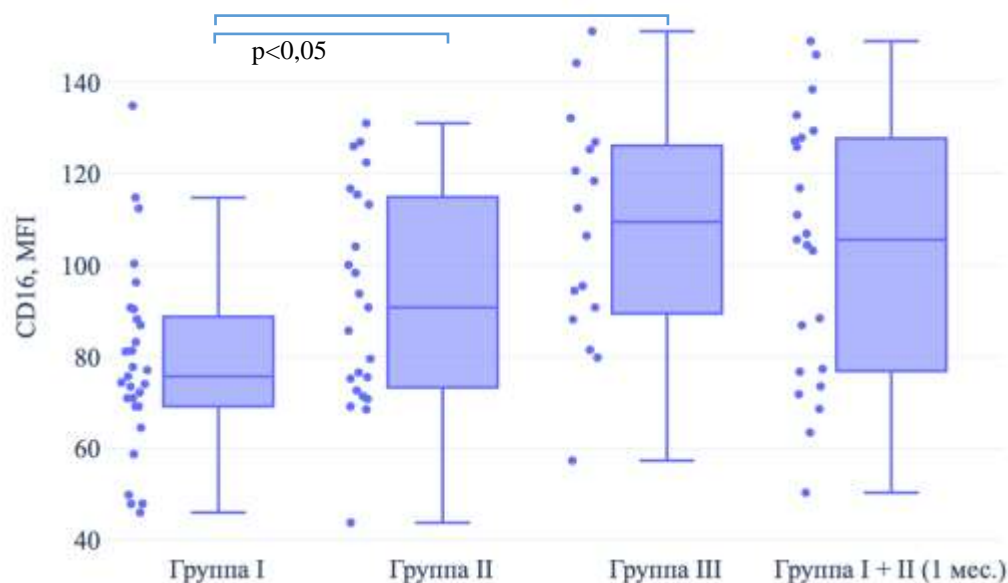
Определение экспрессии FcγRII (CD32) в исследуемых группах показало, что данный показатель не зависит от гестационного возраста и степени зрелости новорожденного. Для I группы недоношенных новорожденных экспрессия была на уровне 11,59 MFI [8,57-13,22], во II группе недоношенных новорожденных - 10,06 MFI [6,35-13,54], а в группе доношенных новорожденных (III группа) - 9,96 MFI [7,06-14,56]. Исключение составили дети с генерализацией инфекционного процесса: для этих пациентов медиана экспрессии CD32 составила 6,98 MFI [4,95-9,04] (рисунок 7).



**Рисунок 7. Экспрессия FcγRII (CD32) у недоношенных детей (группы I, II) и доношенных новорожденных (группа III).**

Анализ экспрессии FcγRIII (CD16) продемонстрировал снижение экспрессии данного маркера на поверхности гранулоцитов недоношенных детей по сравнению с доношенными новорожденными: для недоношенных новорожденных из групп I и II этот показатель составил 75,7 MFI [69,1-88,7] и 90,8 MFI [73,3-114,9] соответственно, в то время как у доношенных (группа III)

экспрессия данного рецептора находилась на уровне 109,4 MFI [89,4-126,1]. Для обеих групп недоношенных новорожденных наблюдалось увеличение экспрессии CD16 к концу 1 месяца жизни (105,6 MFI [76,9-127,7]). (рис. 8).

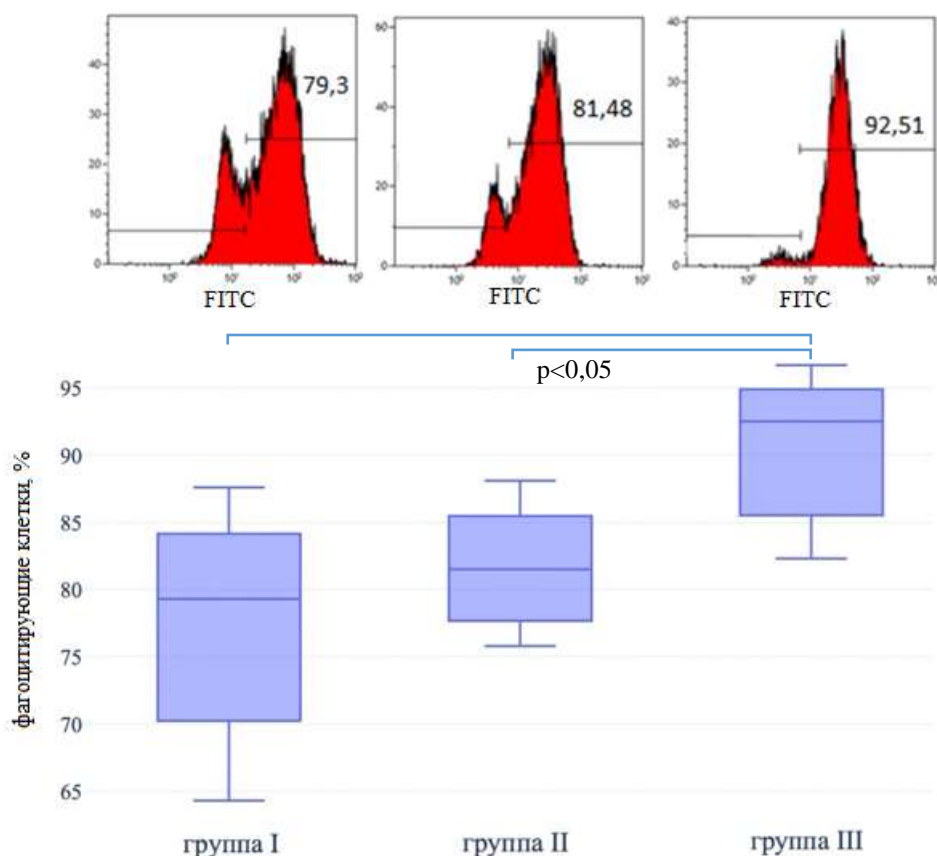


**Рисунок 8.** Экспрессия FcγRIII (CD16) у недоношенных детей (группа I, группа II) при рождении и к концу первого месяца жизни в сравнении с доношенными новорожденными (группа III).

### *Изучение функциональной активности нейтрофилов новорожденных различного гестационного возраста.*

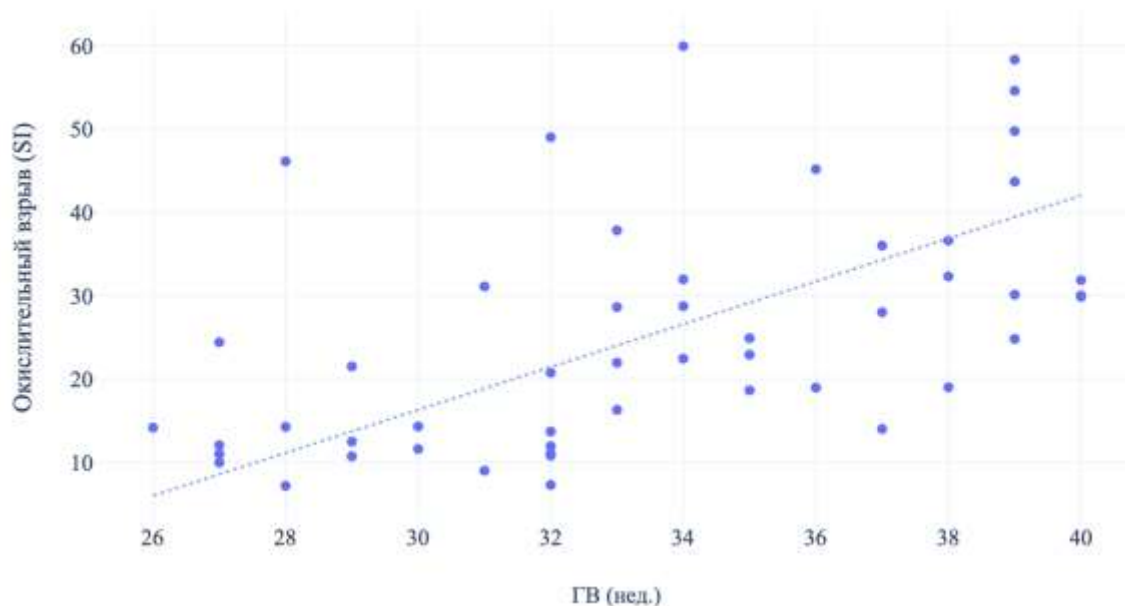
Изучение функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в образцах пуповинной крови показало, что недоношенные новорожденные характеризуются сниженной способностью полиморфноядерных лейкоцитов к фагоцитозу в сравнении с доношенными новорожденными, причем чем меньше гестационный возраст ребенка (рис 9). Так, в I и II группе недоношенных новорожденных доля фагоцитирующих нейтрофилов составила 79,3% [70,2-83,4] и 81,5% [78,1-85,9] соответственно, в то время как у доношенных новорожденных (группа III) количество способных к фагоцитозу клеток составило 92,5% [85,5-94,9].





**Рисунок 9. Доля фагоцитирующих клеток в группах недоношенных (группа I и II) и доношенных новорожденных (группа III)**

Нейтрофилы из всех групп недоношенных новорожденных также показали сниженную продукцию активных форм кислорода в ответ на стимуляцию *E.coli* по сравнению с доношенными новорожденными. Корреляционный анализ ранга Спирмена показал значительную связь между гестационным возрастом и кислородным взрывом нейтрофилов в ответ на стимуляцию *E.coli* ( $R_s = 0,67$ ;  $p = 0,0005$ ), причем чем меньше гестационный возраст ребенка, тем более выражена функциональная недостаточность указанных процессов (рисунок 10).



**Рисунок 10. Корреляционный анализ интенсивности кислородного взрыва нейтрофильных гранулоцитов и гестационного возраста новорожденных ( $R_s = 0,67$ ;  $p = 0,0005$ ).**

Нами был выполнен корреляционный анализ количественных признаков, характеризующих морфофункциональные особенности нейтрофилов, и гестационного возраста новорожденных (таблица 8). Обнаружена положительная корреляционная связь средней силы между гестационным возрастом, интенсивностью фагоцитоза и кислородным взрывом, а также уровнем экспрессии CD16. Кроме того, выявлена отрицательная корреляционная связь между фагоцитарной активностью нейтрофильных гранулоцитов и экспрессией CD64.

**Таблица 8. Матрица корреляционного анализа количественных признаков, характеризующих морфофункциональные особенности нейтрофилов, и гестационного возраста новорожденных.**

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

**Примечание.** Жирным выделены статистически значимые (при  $p < 0,05$ ) значения коэффициента корреляции  $r$ .

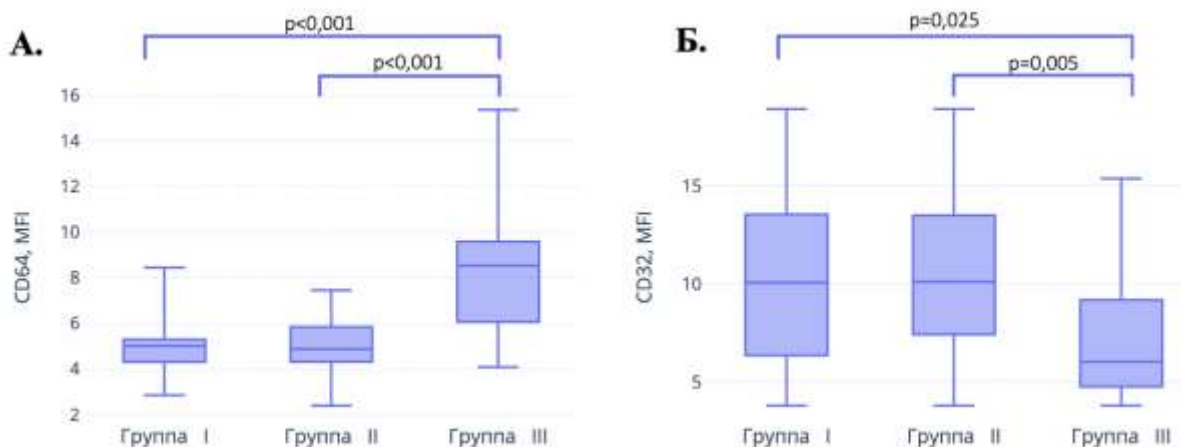
#### **3.4. Диагностическое значение функциональных и фенотипических характеристик нейтрофилов недоношенных новорожденных в патогенезе инфекционных заболеваний раннего неонатального периода**

С целью оценки диагностического значения фенотипических и функциональных характеристик нейтрофилов недоношенные новорожденные были дополнительно распределены в 3 группы (по факту наличия либо отсутствия инфекционной патологии в раннем неонатальном периоде): 1-я группа ( $n = 63$ ) – дети с локализованной формой бактериальной инфекции (пневмония, некротизирующий энтероколит, омфалит); 2-я группа ( $n = 24$ ) – дети без инфекционного диагноза в раннем неонатальном периоде; 3-я группа ( $n = 15$ ) – дети с ранним неонатальным сепсисом (таблица 9).

**Таблица 9. Характеристика исследуемых групп недоношенных новорожденных**

<b>Параметр</b>	<b>1-я группа (n = 63)</b>	<b>2-я группа (n = 24)</b>	<b>3-я группа (n = 15)</b>
Гестационный возраст, нед min–max	31 (28; 33) 26–36	32 (30; 34) 28–36	30 (28; 32) 25–35
Масса тела, г min–max	1380 (1155; 1750) 750–2670	1790 (1430; 2125) 930–2570	1395 (1102; 1640) 690–2330
APGAR на 1-й мин жизни, баллы min–max	6 (5; 6) 5–7	6 (6; 7) 5–7	6 (5; 6) 3–7
APGAR на 5-й мин жизни, баллы min–max	7 (7; 7) 6–8	7 (7; 7) 6–8	6 (6; 7) 5–8

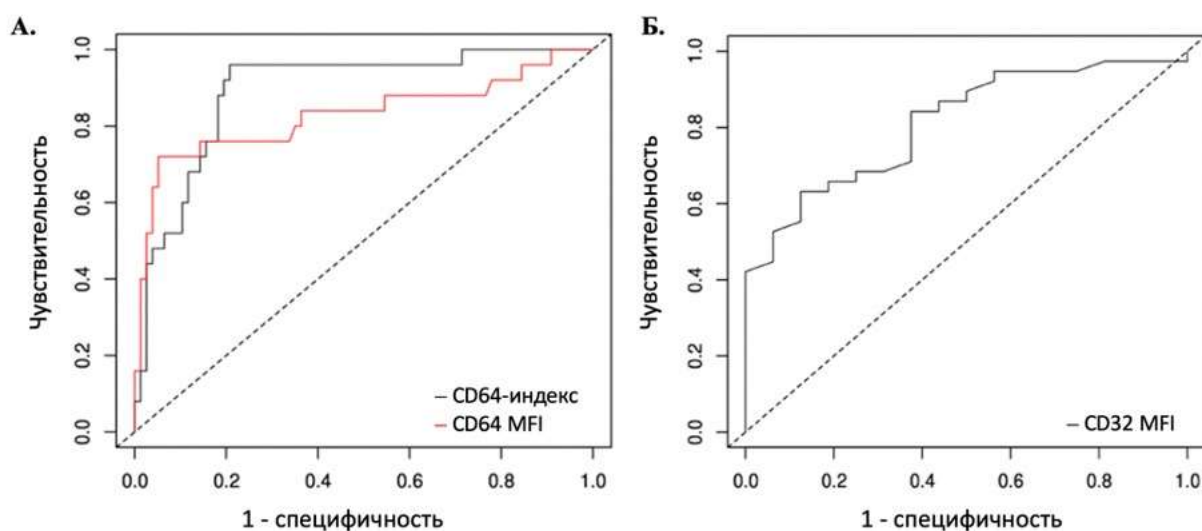
С помощью проточной цитометрии была проанализирована экспрессия поверхностных рецепторов семейства FcγR (CD64, CD32, CD16). Было выявлено, что экспрессия FcγRI (CD64) значимо не отличалась у недоношенных детей из 1-й и 2-й групп (5,02 MFI [4,31–5,29] и 4,87 MFI [4,31–5,85] соответственно). Однако у недоношенных детей с развившимся ранним неонатальным сепсисом (3-я группа) при рождении наблюдалось значительное увеличение экспрессии CD64 на поверхности полиморфноядерных нейтрофилов в сравнении с недоношенными из 1-й и 2-й групп (8,53 MFI [6,07–9,59],  $p < 0,001$ ) (рисунок 11А).



**Рисунок 11.** Экспрессия CD64 (А) и CD32 (Б) на поверхности нейтрофилов недоношенных исследуемых групп

*MFI – значение интенсивности флуоресценции.*

Были исследованы диагностические характеристики CD64-рецептора в качестве дополнительного маркера неонатального сепсиса у недоношенных новорожденных. ROC-анализ в отношении интенсивности флуоресцентного сигнала CD64 продемонстрировал AUC = 0,83 [95% доверительный интервал (ДИ) 0,71–0,94]. Так как CD64 конститутивно экспрессируется на поверхности моноцитов, с целью минимизации возможной погрешности межсерийных аналитических определений было принято решение использовать показатель CD64-индекса: отношение величины экспрессии рецептора на поверхности нейтрофилов к аналогичному показателю моноцитов. CD64-индекс продемонстрировал AUC = 0,89 (95% ДИ 0,82–0,96). Проведенный анализ выявил, что CD64-индекс является достоверным ранним маркером неонатального сепсиса у недоношенных с высокой чувствительностью (0,94) и специфичностью (0,82) при cut-off 1,86 (рисунок 12А).



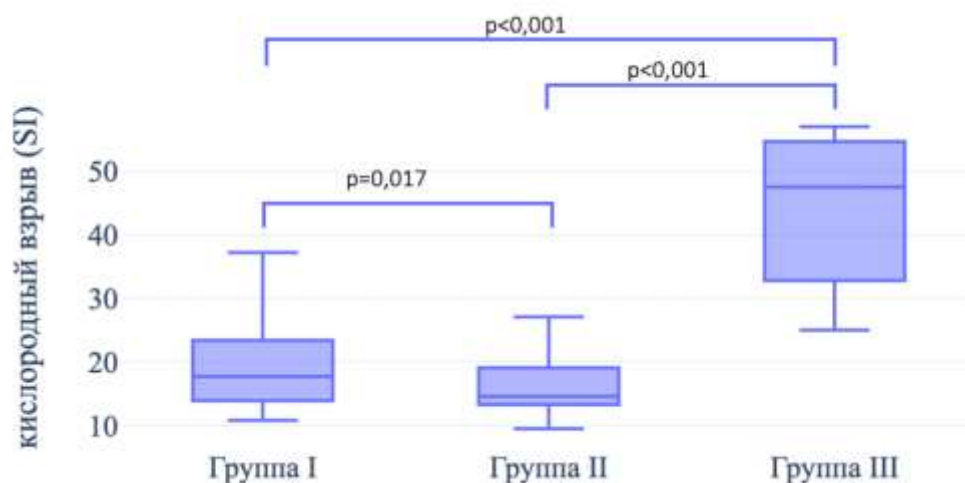
**Рисунок 12.** ROC-кривая для исследуемых лабораторных показателей: А – CD64-MFI и CD64-индекса; Б- CD32-MFI

Определение экспрессии FcγRII (CD32) нейтрофилами показало снижение данного показателя в группе недоношенных новорожденных с сепсисом в сравнении с группами новорожденных с локализованным инфекционным процессом и без инфекционного диагноза (6,03 MFI [4,75–9,17] против 10,06 MFI [6,35–13,54];  $p = 0,025$  и 10,11 FMI [7,42–13,48];  $p = 0,005$  соответственно) (рис. 1Б). ROC-анализ показал, что уровень экспрессии CD32 является ранним маркером сепсиса с чувствительностью 0,76 (95% ДИ 0,67–0,85), специфичностью 0,87 (95% ДИ 0,65–0,98) и положительной прогностической значимостью 0,92 (95% ДИ 0,74–0,96), AUC = 0,811 при cut-off 7,26 (рисунок 12Б).

Анализ уровня экспрессии FcγRIII (CD16) не показал значимых различий в сравниваемых группах: значения флуоресценции составили 90,76 MFI [73,27–114,88] в 1-й группе, 93,75 MFI [76,28–104,28] во 2-й группе и 96,03 MFI [74,08–125,98] в 3-й группе соответственно.

Изучение функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в ответ на стимуляцию *E. coli* показало, что недоношенные новорожденные с локализованным инфекционным процессом характеризуются повышением

показателей «кислородного взрыва» в сравнении с группой недоношенных без инфекционного диагноза (17,7 SI [13,9–23,4] и 14,6 SI [13,2–19,07] соответственно,  $p = 0,017$ ). В то же время продукция активных форм кислорода нейтрофилами в ответ на *E.coli* была значительно выше у недоношенных новорожденных с сепсисом по сравнению с другими группами (47,5 MFI [32,8–54,67]) (рисунок 13).



**Рисунок 13.** Интенсивность «кислородного взрыва» нейтрофильных гранулоцитов в ответ на стимуляцию *E.coli* в исследуемых группах недоношенных SI – индекс стимуляции, – сравнительная характеристика интенсивности «кислородного взрыва», рассчитывается как отношение MFI нейтрофилов, стимулированных *E.coli*, к MFI нейтрофилов отрицательного контроля (без стимуляции *E.coli*).

### 3.5. *In vitro* модуляция экспрессии FcγR рецепторов на поверхности нейтрофилов недоношенных новорожденных

С целью проверки предположения, может ли модуляция экспрессии рецепторов FcγR на поверхности нейтрофилов недоношенных новорожденных стимулировать опсонофагоцитарные реакции, нами была произведена оценка эффекта Г-КСФ на активацию и прайминг нейтрофилов в условиях *in vitro*.

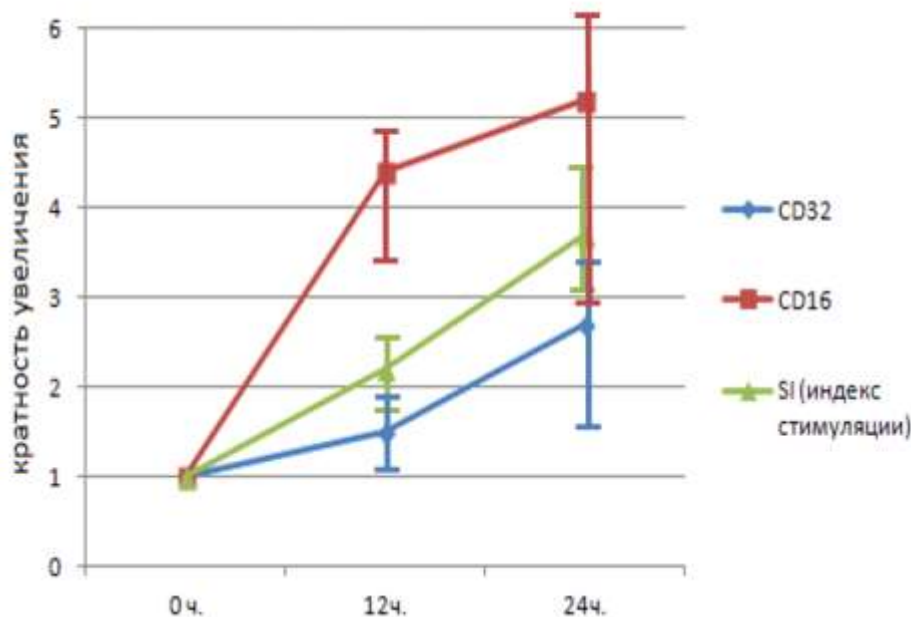
Продемонстрировано, что культивирование гранулоцитов пуповинной крови в присутствии Г-КСФ в концентрации 5 нг/мл в течение 12-24ч. приводит к повышению экспрессии FcγRIII (CD16) и FcγRII (CD32) рецепторов на этих клетках, а также увеличению доли фагоцитирующих клеток. Так, отношение средних значений флуоресценции (MFI) экспрессии CD16 нейтрофилами, культивированных в присутствии Г-КСФ, в течение 12 ч. и 24 ч. инкубации к контрольным образцам (нейтрофилы, культивированные без Г-КСФ) составило 4,4 [3,3 – 4,9] и 5,1 [2,9–6,1] соответственно (рисунок 14).

Экспрессия CD32 на поверхности нейтрофилов во время *in vitro* инкубации в течение 24ч. также увеличивалась в присутствии Г-КСФ по сравнению с контрольными клетками в 2,8 [1,4 – 3,2] раза.

Поверхностная экспрессия CD64 нейтрофилами пуповинной крови недоношенных новорожденных в присутствии Г-КСФ статистически значимо не менялась в сравнении с клетками без добавления Г-КСФ.

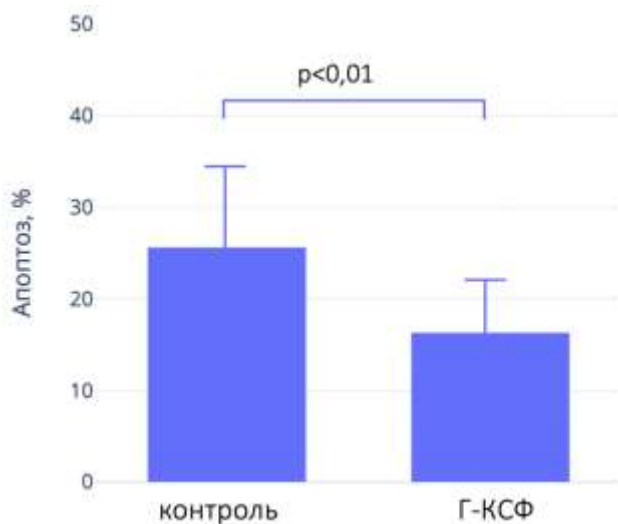
Кроме того, кокультивированные с Г-КСФ гранулоциты проявляют значительно большую интенсивность кислородного взрыва нейтрофилов после стимуляции *E.coli*. Продукция активных форм кислорода нейтрофилами в ответ на стимуляцию преопсонизированными *E.coli* была значительно выше после 24ч. инкубации с Г-КСФ. (рисунок 14).





**Рисунок 14.** Повышение экспрессии FcγRIII (CD16) и FcγRII (CD32) рецепторов на гранулоцитах и усиление интенсивности кислородного взрыва после совместного *in vitro* культивирования клеток с Г-КСФ

Была произведена оценка влияния Г-КСФ на апоптоз нейтрофилов. Продемонстрировано, что культивирование нейтрофилов пуповинной крови недоношенных новорожденных совместно с Г-КСФ в течении 24ч. приводит к существенной задержке раннего спонтанного апоптоза (рисунок 15).



**Рисунок 15.** Г-КСФ замедляет спонтанный апоптоз нейтрофилов недоношенных новорожденных *in vitro*.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1. Нейтропения новорожденных как фактор развития неонатальных инфекций

Изолированная нейтропения новорожденных (снижение абсолютного числа нейтрофилов менее 1500/мкл) наблюдается при различных состояниях – от варианта нормы до жизнеугрожающих приобретенных и врожденных заболеваний. Клинические проявления, как и осложнения, зависят от тяжести нейтропии. Абсолютное количество нейтрофилов в пределах 1000–1500/мкл расценивается как легкая нейтропения; количество нейтрофилов 500–1000/мкл соответствует умеренной нейтропии; снижение числа нейтрофилов менее 500/мкл считают тяжелой формой нейтропией. Помимо тяжести нейтропии, риск инфицирования новорожденных с нейтропией также зависит от общей тяжести заболевания и наличия сопутствующих заболеваний, что может потребовать дополнительного наблюдения. У младенцев с очень низкой массой тела при рождении риск вторичной инфекции по отношению к нейтропии и смертность, связанная с инфекцией на фоне нейтропии, значительно выше, чем у доношенных новорожденных [55]. Наконец, длительность нейтропии является важным фактором, и бессимптомные новорожденные с нейтропией легкой и средней степени тяжести, продолжающейся в течение 7–10 дней и более должны быть направлены на дальнейшее обследование [31]. В отношении здоровых доношенных новорожденных со стойкой нейтропией следует учитывать возможную иммуноопосредованную этиологию с участием антинейтрофильных антител [19], что может быть причиной неонатальной аллоиммунной и изоиммунной нейтропии, а также аутоиммунной нейтропии новорожденных [35]. Неонатальная аллоиммунная нейтропения возникает из-за сенсибилизации матери к отцовским антигенам, присутствующим на поверхности нейтрофилов плода, что приводит к выработке специфических антинейтрофильных антител. Проникая через плаценту, антинейтрофильные антитела приводят к разрушению нейтрофилов плода [92].

Неонатальная изоиммунная нейтропения возникает в результате передачи плоду уже существующих материнских антинейтрофильных аутоантител вследствие имеющегося аутоиммунного заболевания (например – системная красная волчанка). В отличие от этих двух состояний, вызываемых материнскими антителами, развитие аутоиммунной нейтропении обусловлено выработкой антинейтрофильных антител иммунной системой новорожденного и обычно развивается в раннем детском возрасте. Однако данные состояния встречаются относительно редко в сравнении с идиопатической нейтропенией новорожденных.

В настоящее время связь между нейтропенией новорожденных и риском развития инфекций остается спекулятивной и является экстраполяцией осложнений, связанных с тяжелой врожденной нейтропенией (синдром Костманна) или панцитопенией вследствие химиотерапии. Предпринимались неоднократные попытки определить, являются ли случаи нейтропении у недоношенных новорожденных клинически значимыми, однако имеющиеся опубликованные данные о связи снижения числа нейтрофилов с рисками развития сепсиса и уровнем смертности противоречивы [137].

Полученные нами данные анализа абсолютного количества нейтрофилов у недоношенных новорожденных демонстрируют, что частота случаев инфекционных осложнений в группе новорожденных с эпизодами абсолютной нейтропении в первые 14 суток жизни не отличалась от таковой в группе недоношенных без нейтропении. Не было обнаружено связи абсолютной нейтропении и с риском летального исхода у недоношенных новорожденных.

Мы обнаружили, что наибольшая частота абсолютной нейтропении встречалась в группе недоношенных с ЭНМТ. Однако нейтропения в данной группе недоношенных обычно носила временный характер с продолжительностью 1-3 суток. Нам не удалось найти связь между наличием нейтропении, а также ее выраженностью и длительностью с повышенным уровнем смертности у недоношенных новорожденных с ЭНМТ, за исключением

случаев доказанной ранней бактериальной инфекции, связанной с неблагоприятным исходом.

В отношении новорожденных с ЭНМТ нейтропения часто рассматривается как ранний признак бактериальной инфекции, что часто является поводом к превентивному назначению антибиотиков широкого спектра действия даже в случае отрицательных результатов бактериологических исследований. В то же время известно, что длительное использование антибактериальной терапии не снижает частоту развития тяжелого инфекционного процесса. Применение антибактериальных препаратов без учета ГВ и других этиологических факторов не только снижает эффективность лечения, но и препятствует становлению микробиоты кишечника, что ведет к нарушению локальных механизмов иммунной защиты и активации условно патогенной микрофлоры. Это может явиться причиной бактериальной транслокации с генерализацией инфекционного процесса и развития некротического энтероколита у недоношенных и физиологически незрелых детей [139].

В нашем исследовании показано, что абсолютная нейтропения у недоношенных новорожденных встречается одинаково часто вне зависимости от наличия либо отсутствия инфекционной патологии, а показатель летальности у недоношенных новорожденных с эпизодами абсолютной нейтропении в раннем неонатальном периоде не отличается от такового у новорожденных без абсолютной нейтропении по данным клинического анализа крови. Это позволяет предположить, что большая частота развития инфекционных осложнений у недоношенных новорожденных может быть связана не с количеством циркулирующих нейтрофилов, а с фенотипическими и функциональными особенностями этих клеток.

## 4.2. Фенотипические и функциональные особенности нейтрофилов новорожденных различного гестационного возраста

Известно, что связывание иммуноглобулинов с поверхностными клеточными рецепторами улучшает элиминацию бактерий функционально активными нейтрофилами [106]. Участок антитела Fc взаимодействует с различными рецепторами Fc и лигандами, которые опосредуют передачу множества важных клеточных сигналов для осуществления различных эффекторных функций. В иммуноглобулинах класса IgG Fc-участок включает иммуноглобулиновый домен C $\gamma$ 2 и C $\gamma$ 3 и N-концевой шарнир, ведущий в C $\gamma$ 2. В свою очередь за распознавание Fc-участка иммуноглобулинов класса IgG отвечают Fc гамма-рецепторы (Fc $\gamma$ Rs). Именно эти рецепторы осуществляют связь между антителами и клеточными механизмами иммунной системы. В настоящее время известно, что Fc $\gamma$ RI и Fc $\gamma$ RIII рецепторы относятся к активирующим рецепторам, а Fc $\gamma$ RII относится к ингибирующим (или регуляторным) рецепторам [53]. В данной работе показано, что экспрессия поверхностных рецепторов на поверхности нейтрофилов — первой линии противобактериальной защиты у новорожденных различного гестационного возраста — имеет свои уникальные для данного возраста особенности.

CD64 представляет собой высокоаффинный Fc- $\gamma$  рецептор, ответственный за связывание молекул иммуноглобулинов класса IgG. Стимуляция с помощью Повышение экспрессии CD64 приводит к заметному улучшению фагоцитоза, а также других эффекторных функции нейтрофилов [62], поэтому регуляция экспрессия этого рецептора, вероятно, представляет собой важный механизм усиления функции нейтрофилов при бактериальных инфекциях.

Нами продемонстрировано, что экспрессия CD64 на поверхности нейтрофилов значимо повышена у недоношенных детей при рождении, и к концу первого месяца жизни сравнивается с показателями их экспрессии у доношенных детей и не имеет тенденции к повторному увеличению с течением времени при

отсутствии факта генерализации инфекционного процесса. Повышенная экспрессия CD64 на нейтрофилах в течение первых дней жизни, вероятно, представляет собой эффект Г-КСФ, концентрация которого заметно повышена в пуповинной крови у недоношенных новорожденных [85]. Помимо Г-КСФ, экспрессия CD64 может быть индуцирована на поверхности нейтрофилов также другими провоспалительными цитокинами, такими как IFN- $\gamma$  [142]. Повышение экспрессии CD64 обычно наблюдается через 4-6 часов после стимуляции IFN $\gamma$ , Г-КСФ или другими активаторами, такими как липополисахарид [104].

Нами показано, что экспрессия CD16, напротив, существенно снижена на поверхности гранулоцитов недоношенных детей и увеличивается до уровня экспрессии доношенных новорожденных в течение первых 4 недель постнатальной жизни. Эти данные согласуются с полученными ранее результатами исследований [24]. Поскольку CD16 является наиболее представленным на поверхности нейтрофильных гранулоцитов Fc- $\gamma$  рецептором, предполагается, что снижение экспрессии этого рецептора является ведущим фактором, обуславливающим сниженную функциональную активность нейтрофилов недоношенных новорожденных [25]. Более того, нами была выявлена положительная корреляция между уровнем экспрессии CD16 и выраженностью респираторного взрыва у недоношенных новорожденных различного гестационного возраста.

В последние годы обсуждается существование отдельных функциональных фенотипических групп нейтрофилов [114]. Самая большая подгруппа гранулоцитов в периферической крови, называемая «классическими гранулоцитами», характеризуется высоким уровнем экспрессии CD16 и в некоторой степени CD62L (CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>), в то время как «провоспалительные гранулоциты» определяются как CD16<sup>dim</sup>CD62L<sup>+</sup>, а «противовоспалительные гранулоциты» - CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>. На сегодняшний день имеется ограниченное количество публикаций о различиях в регуляторной функции этих субпопуляций гранулоцитов у новорожденных. Было обнаружено, что субпопуляция

противовоспалительных нейтрофилов играет важную иммуномодулирующую роль, подавляя активность Т-клеток путем высвобождения перекиси водорода в иммунологический синапс [114]. В настоящее время неизвестно, участвуют ли противовоспалительные нейтрофилы в ограничении местного воспалительного ответа с целью избежать чрезмерного повреждения тканей организма. Однако противовоспалительные нейтрофилы также могут быть связаны с развитием иммуногического паралича, что делает таких пациентов крайне восприимчивыми к бактериальной инфекции.

Fc-рецептор CD32 опосредует множество специфических функций клеточного типа, включая фагоцитоз или высвобождение медиаторов воспаления, которые являются важными функциями клеток врожденного иммунитета

Нами было показано, что Fc-рецептор CD32 (FcγRII) в значительно меньшей степени экспрессировался нейтрофилами недоношенных новорожденных по сравнению с доношенными новорожденными и взрослыми. Этот вывод также согласуется с результатами других исследований. Однако, в отличие от CD16, экспрессия CD32 на нейтрофилах недоношенных детей не увеличивалась значительно в течение первых недель жизни. CD32 имеет самое высокое сродство из всех трех рецепторов Fcγ к IgG2, наиболее важному подклассу IgG антител в процессе опсонизации. Сохраняющаяся сниженная экспрессия CD32 на нейтрофилах недоношенных детей по сравнению с доношенными новорожденными и взрослыми может являться фактором, определяющим повышенную восприимчивость новорожденных к тяжелым бактериальным инфекциям.

Учитывая приведенные выше результаты оценки экспрессии FcγR на поверхности нейтрофилов новорожденных различного гестационного возраста, можно сделать предположение, что у недоношенных новорожденных за опсонофагоцитарные реакции отвечает FcγRIII (CD16) (а не FcγRI, как у

взрослых), так как повышение экспрессии CD16 на поверхности нейтрофилов недоношенных новорожденных приводит к стимуляции фагоцитоза. Эти различия могут быть частью баланса системы иммунной регуляции новорожденного между предотвращением чрезмерных воспалительных реакций и защитой от патогенов.

Это особенно актуально для недоношенных детей, у которых концентрация специфических антител низкая, а функциональная активность нейтрофилов по многим параметрам не соответствует показателям у доношенных детей и взрослых. Нейтрофилы здоровых доношенных новорожденных фагоцитируют как грамотрицательные, так и грамположительные бактерии с эффективностью, эквивалентной взрослым клеткам. Напротив, фагоцитоз менее эффективен у недоношенных новорожденных с ГВ < 33 недель по сравнению с доношенными новорожденными и взрослыми. Представляет интерес тот факт, что эти нарушения сохраняются в возрасте 1-2 месяцев постнатального развития, несмотря на отсутствие явных дефектов созревания нейтрофилов. Есть предположение, что указанная особенность является результатом низких уровней циркулирующих факторов опсонизации, в частности, материнских иммуноглобулинов, которые активно транспортируются через плаценту в последнем триместре беременности. Данный факт подтверждается наблюдением, что использование препаратов иммуноглобулинов внутривенного введения (ИГВВ) нормализует способность к фагоцитозу у недоношенных детей с ГВ < 32 недель. В то же время использование ИГВВ для лечения неонатального сепсиса не снижает показатели летальности, младенческой смертности и инвалидизации в возрасте 2 лет у детей с подозрением или доказанным сепсисом в неонатальном периоде.

В настоящее время препараты ИГВВ используются в неонатологической практике для лечения сепсиса, в том числе с расчетом усиления опсонизации возможных возбудителей инфекций, однако польза от использования ИГВВ не была четко определена. Так, в своем мета анализе Olson и



соавторы пришли к выводу, что, хотя необходимы дополнительные исследования, имеющиеся данные свидетельствуют о преимуществах снижения смертности. Высказывалось мнение о целесообразности использования препаратов ИГВВ для новорожденных с числом нейтрофилов в крови  $<1000$  / мл и доказанным (или весьма вероятным) бактериальным сепсисом. Однако в отношении недоношенных новорожденных убедительных данных о пользе препаратов ИГВВ нет.

Эффективность рекомбинантного Г-КСФ не является доказанной при лечении новорожденных с сепсисом и нейтропенией. В Кокрановском обзоре Yuhang и соавторы сделали вывод о том, что, хотя необходимы дополнительные исследования, имеющиеся данные предполагают, что он не имеет никакого преимущества в снижении смертности. В процессе согласованной разработки мы предположили, что Г-КСФ не следует рутинно использовать для новорожденных с сепсисом и нейтропенией, но что он должен быть предложен к применению у новорожденных с сохраняющейся нейтропенией  $<500$ /мкл в течение 2 дней и более, а также для длительной (более 5 дней) нейтропении  $<1000$ /мкл.

Мы предполагаем, что оптимизация эффективности препаратов ИГВВ возможна при условии повышения экспрессии FcγRIII (CD16) на поверхности гранулоцитов с целью стимуляции опсонофагоцитарных реакций, а также FcγRII (CD32) лиганд-специфичного связывания для предупреждения преждевременного интенсивного апоптоза полиморфноядерных лейкоцитов.

Г-КСФ может выступать не только в качестве хемоаттрактанта и стимулятора пролиферации нейтрофилов, но и модулировать экспрессию поверхностных рецепторов нейтрофилов и их функциональную активность, в том числе путем повышения экспрессии FcγRIII (CD16). Что интересно, добавление Г-КСФ увеличивает и экспрессию регуляторного FcγRII (CD32). Известно, что экспрессия рецепторов к Г-КСФ на нейтрофилах новорожденных детей одинакова с таковой у взрослых, в то время как продукция Г-КСФ и экспрессия м-РНК Г-КСФ достоверно снижены у новорожденных детей по сравнению со взрослыми.

Таким образом, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор может обеспечить повышение функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в терапии тяжелых инфекций у новорожденных различного гестационного возраста вне зависимости факта развития абсолютной нейтропении. Кроме того, модуляция экспрессии повышение экспрессии Fcγ рецепторов на поверхности гранулоцитов может быть одним из факторов оптимизации эффективности препаратов ИГВВ за счет повышения экспрессии FcγRIII (CD16) и стимуляции опсонофагоцитарных реакций, а также FcγRII (CD32) лиганд-специфичного связывания для предупреждения преждевременного интенсивного апоптоза полиморфноядерных лейкоцитов. Нами было продемонстрировано, что стимуляция Г-КСФ повышает стабильность нейтрофилов новорожденных за счет задержки апоптоза, а также оказывает значительное влияния на функциональную активность нейтрофилов.

В данной работе продемонстрировано, что нейтрофилы доношенных новорожденных характеризуются частично сниженной продукцией активных форм кислорода (АФК), что согласуется с данными других исследователей [115]. В тоже время Usmani и соавт. Gessler и соавт. не выявили существенных различий у доношенных и недоношенных новорожденных в интенсивности кислородного взрыва нейтрофилов пуповинной крови после стимуляции миелопероксидазой и *E.coli*. В нашем исследовании мы обнаружили связь между гестационным возрастом и кислородным взрывом нейтрофилов в ответ на стимуляцию *E.coli* ( $R_s = 0,67$ ;  $p = 0,0005$ ). Различия в полученных результатах могут быть частично объяснены разными методологическими подходами в проведении лабораторных тестов. В нашем исследовании проведена количественная оценка окисления дигидрородамина-123 супероксидными радикалами в родамин. Эти радикалы генерируются НАДФН-оксидазой, количество которой различается у новорожденных и взрослых [112]. Повышенная активность НАДФН-оксидазы, в отличие от сниженной продукции АФК активированными гранулоцитами, может быть индикатором баланса

между функциональной незрелостью неонатальных гранулоцитов, с одной стороны, и эффективностью иммунного ответа на патогенные микроорганизмы, с другой.

### **4.3. Роль морфофункциональных особенностей нейтрофилов в развитии неонатальных инфекций**

Известно, что новорожденные характеризуются сниженной функциональной активностью нейтрофилов, причем чем меньше гестационный возраст, тем сильнее недостаточность этих процессов. Данный факт может отражать, по крайней мере частично, причину повышенной восприимчивости недоношенных новорожденных к инфекциям. Однако все больше данных свидетельствует о том, что нейтрофилы новорожденных в норме не испытывают функциональный дефицит вследствие своей незрелости, а скорее «запрограммированы» на снижение активности для обеспечения нормальной адаптации к внеутробной жизни. Показано, что иммунная система даже глубоко недоношенных новорожденных способна к развитию всех основных механизмов иммунного ответа на чужеродные антигены. Таким образом, в возникновении неонатальных инфекций определенную роль может играть дисрегуляция иммуноопосредованных реакций.

В настоящей работе продемонстрировано, что сепсис в раннем неонатальном периоде ассоциирован с повышением экспрессии активирующего Fc $\gamma$ RI (CD64) и снижением экспрессии регуляторного Fc $\gamma$ RII (CD32). Баланс между активирующим и ингибирующим Fc $\gamma$ R может быть принципиальным в регуляции иммунного ответа.

CD64 постоянно экспрессируется только на макрофагах и моноцитах, однако уровень экспрессии на гранулоцитах существенно повышается после активации клеток. Было показано, что экспрессия CD64 нейтрофилами не повышается при респираторном дистресс-синдроме и других неинфекционных

перинатальных патологических состояниях и поэтому может являться маркером инфекционных осложнений [142].

Так, при цитометрическом исследовании образцов периферической крови новорожденных, часть из которых поступили с подозрением на ранний НС, было продемонстрировано, что в группе новорожденных с подозрением на сепсис экспрессия CD64 на нейтрофилах была статистически значимо выше ( $p < 0,001$ ), по сравнению с детьми без клинических признаков сепсиса. Уровень экспрессии CD64 не зависел от факта назначения антибиотикотерапии в течение 24 ч после начала клинических проявлений сепсиса у недоношенных новорожденных.

Основным недостатком использования в качестве диагностического параметра показателя поверхностной экспрессии CD64 методом проточной цитофлуориметрии является сложность выбора унифицированных критических значений (cut-off). Улучшение диагностической ценности маркера CD64 возможно в случае, если регистрировать не средние значения флуоресценции, а использовать расчетную величину – CD64 индекс. Данный показатель рассчитывается как отношение средних значений флуоресценции нейтрофилов к калибровочным частицам либо моноцитам (так как CD64 константно экспрессируется на моноцитах).

Использование CD64 индекса позволяет стандартизировать процедуру анализа и выработать единые диагностические значения для данного маркера. Анализ соотношения средних значений флуоресценции CD64 нейтрофилов к моноцитам в группе новорожденных с клиническими признаками сепсиса по сравнению с контрольной группой продемонстрировал существенное повышение данного показателя в случае бактериологически подтвержденного НС.

Эти данные подтверждают более раннее представление о поверхностной экспрессии CD64 на нейтрофилах как о специфическом и чувствительном маркере бактериальных инфекций. Таким образом, наши результаты подтверждают возможность того, что измерение экспрессии этого рецептора на

нейтрофильных гранулоцитах может представлять собой полезный диагностический инструмент для раннего выявления бактериальных инфекций как у недоношенных, так и у доношенных новорожденных.

Соотношение уровней экспрессии CD64/CD16 также может быть использовано в качестве маркера сепсиса. В исследовании пациентов, находящихся в отделении реанимации, в группе больных с бактериологически подтвержденным сепсисом показано статистически значимое увеличение соотношения CD64/CD16 ( $p=0,028$ ).

Факт повышения продукции активных форм кислорода нейтрофилами у недоношенных с сепсисом позволяет предположить, что генерализованная инфекция первоначально запускает «кислородный взрыв» и функционирует в качестве праймера, в конечном итоге приводя к увеличению продукции активных форм кислорода после повторной стимуляции клеток *in vitro*. Значительные различия в интенсивности кислородного взрыва между группами недоношенных и доношенных новорожденных могут объясняться различиями в эффективности внутриклеточных бактерицидных реакций после фагоцитоза в большей степени, чем в процентном количестве активных фагоцитирующих клеток.

#### **4.4. Регуляция функции нейтрофилов новорожденных**

Несмотря на то, что иммунная регуляция новорожденных отличается от иммунной регуляции взрослых, наши результаты показывают, что выявленные изменения не являются иммунным дефицитом. Следовательно, можно предположить, что понятия «инертного иммунного ответа», а также «повышенной восприимчивости к инфекциям» у новорожденных весьма условны. Наши данные показывают, что функциональные особенности гранулоцитов, а также регуляция активационных маркеров являются частью сбалансированной иммунной системы в раннем возрасте. Вопрос о том,

повышают ли эти сбалансированные изменения восприимчивость к инфекциям у недоношенных детей, остается дискуссионным и должен стать предметом будущих исследований. Так, нехватка важнейших рецепторов клеточной мембраны, снижение внутриклеточной передачи сигналов и других внутриклеточных механизмов могут привести к дисфункции нейтрофилов, и как следствие к повышенной восприимчивости к запуску воспалительного процесса.

Показано, что нейтрофилы доношенных новорожденных характеризуются повышенной экспрессией IL-1 $\beta$  после стимуляции TNF- $\alpha$  и ЛПС по сравнению с нейтрофилами взрослых [37]. Однако при прямом стимулировании toll-подобных рецепторов (TLR) нейтрофилы новорожденных демонстрируют снижение продукции цитокинов, поляризующих Th1-ответ, которые в свою очередь необходимы для индукции антибактериальной активности. Напротив, нейтрофилы новорожденных переключаются на выработку цитокинов Th-2 цитокинов, таких как IL-6 и IL-10 [152]. Данная особенность нейтрофилов новорожденных может быть обусловлена снижением внутриклеточных медиаторов передачи сигналов TLR [118] или повышенным уровнем аденозина в плазме [152].

Предполагается, что аденозин опосредованно через связанные с G-белком рецепторы аденозина A3 (A3ARs) повышает внутриклеточные уровни цАМФ, тем самым поляризует выработку Th2-цитокинов, обладающих противовоспалительными свойствами и препятствующих миграции нейтрофилов в очаг воспаления [152]. Хотя аденозин подавляет экспрессию CD11b на поверхности нейтрофилов, способность к фагоцитозу остается неизменной. Кроме того, у новорожденных аденозин не подавляет продукцию нейтрофилами активных форм кислорода [63]. Таким образом, аденозин способствует колонизации комменсальных микроорганизмов после рождения путем ограничения чрезмерного воспаления, одновременно повышая восприимчивость новорожденного к развитию инфекционного процесса.

Экспрессия галектина-3 на клеточной мембране покоящихся нейтрофилов новорожденных значительно повышена по сравнению с нейтрофилами взрослых [132]. Это позволяет предположить, что нейтрофилы новорожденных находятся в предварительно «подготовленном» состоянии. Однако при *in vitro* стимуляции ЛПС уровни экспрессии галектина-3 на нейтрофилах новорожденных и взрослых не отличались. Важно отметить, что нейтрофилы новорожденных также не продемонстрировали повышения экспрессии L-селектина [132]. Сниженная экспрессия L-селектина приводит к нарушению адгезии нейтрофилов и трансэндотелиальной миграции, что ограничивает их накопление в очаге воспаления.

Идентифицированы гранулярные белки нейтрофилов, которые способны подавлять бактерицидную активность нейтрофилов. Так, гликопротеин ольфактомедин-4 (OLFM-4) ингибирует активацию гранулированных протеаз, в том числе катепсина С, эластазы, катепсина G и протеиназы 3 (PR3), а также опосредованную Nod-подобными рецепторами активацию NF-κB, тем самым ограничивая высвобождение из гранул эффекторных молекул, обеспечивающих противобактериальную защиту [87]. Экспрессия OLFM-4 значительно повышена в нейтрофилах пуповинной крови здоровых доношенных новорожденных по сравнению с нейтрофилами взрослых [93]. Повышенная экспрессия OLFM-4 связана со снижением уровней циркулирующих провоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-6, IL-12p40, CXCL2, Г-КСФ и ГМ-КСФ). Кроме того, выявлена связь повышения экспрессии OLFM-4 с частотой развития сепсиса и смертностью, связанной с сепсисом [149].

Другим механизмом регуляции провоспалительного ответа нейтрофилов является ингибирование апоптоза. Апоптоз нейтрофилов сам по себе связан с противовоспалительным ответом и запуском регенеративных процессов, поэтому задержка апоптоза нейтрофилов у новорожденных может играть роль в патологическом воспалении. Показано, в нейтрофилах новорожденных по сравнению с клетками взрослых снижены уровни маркеров апоптоза, таких как гистон-ассоциированные фрагменты ДНК и разрывы цепей, а также активность

каспазы-3 [60]. Известно, что апоптоз нейтрофилов с последующим удалением погибших клеток макрофагами играет важную роль в разрешении повреждения легких у пациентов с ОРДС [77]. Таким образом, отсроченный апоптоз нейтрофилов новорожденных может усугублять воспаление и повреждение тканей, что частично объясняет тяжесть воспалительных заболеваний, наблюдаемых у новорожденных, несмотря на функциональный дефицит нейтрофилов.

#### **4.5. Возможности модуляции функции нейтрофилов недоношенных новорожденных**

Риск развития генерализованных бактериальных инфекций и сепсиса у глубоко недоношенных детей значительно выше по сравнению с более зрелыми по сроку гестации новорожденными. В нашем исследовании показано, что у недоношенных новорожденных и новорожденных с сепсисом снижены показатели кислородного взрыва и экспрессия поверхностных Fc $\gamma$  рецепторов на гранулоцитах по сравнению с доношенными новорожденными. У новорожденных при сепсисе происходит быстрое истощение относительно небольшого пула циркулирующих нейтрофилов, что стимулирует к выходу множества юных форм гранулоцитов из пролиферативного пула. Однако это может указывать также на синдром компенсаторного противовоспалительного ответа у новорожденного, который отличается от преобладающего в большинстве случаев синдрома системного воспалительного ответа у взрослых при сепсисе. Нейтрофилы новорожденных относительно гипореактивны к стимуляции по сравнению с нейтрофилами взрослых. Показано, что стимуляция Г-КСФ повышает хемотаксис нейтрофилов новорожденных, усиливает экспрессию CD11b и снижают экспрессию L-селектина на гранулоцитах [72]. Указанные эффекты Г-КСФ *in vitro* на функциональную активность нейтрофилов



были подтверждены *in vivo* у доношенных новорожденных с сепсисом, а также у детей с онкологическими заболеваниями на фоне аплазии кроветворения.

В ряде исследований было изучено влияние рекомбинантного Г-КСФ на восстановление и функцию нейтрофилов у пациентов, перенесших трансплантацию костного мозга по поводу лимфопролиферативных заболеваний, и проведено сравнение с пациентами, не получавших Г-КСФ. При восстановлении гранулопоэза у таких пациентов снижалась фагоцитарная и метаболическая функция нейтрофилов, что могло быть связано с увеличением количества незрелых циркулирующих нейтрофилов. Незрелые нейтрофилы экспрессируют меньше рецепторов для Fc домена молекул иммуноглобулинов класса IgG. Fc $\gamma$ RIII экспрессируется на поздних стадиях миелоидной дифференцировки и может использоваться для идентификации незрелых клеток. Ранее исследователи показали, что через 12 часов после внутривенного введения рекомбинантного Г-КСФ происходит истощение зрелых нейтрофилов пролиферативного пула в костном мозге, что приводит к смещению влево миелоидной гиперплазии. В тоже время, Г-КСФ может специфически воздействовать на экспрессию Fc $\gamma$ RIII. В нашем исследовании были изучены *in vitro* эффекты при культивировании незрелых гранулоцитов в присутствии или в отсутствие Г-КСФ. Кроме того, при регенерации наблюдалась лишь слабая корреляция между скоростью фагоцитоза и экспрессией FcRII и FcRIII. Это указывает на то, что сниженная функция нейтрофилов была вызвана дополнительными к экспрессии FcR факторами. У тех пациентов, которые получали Г-КСФ, функциональная активность нейтрофилов от пациентов с аллотрансплантатами оказалась значимо более сниженной по сравнению с таковыми с аутооттрансплантатами. Таким образом, данное исследование подтвердило результаты других исследователей, которые показали, что Г-КСФ модулирует экспрессию Fc $\gamma$ R рецепторов нейтрофилов.

Рецепторы к ГМ-КСФ снижены на нейтрофилах новорожденных по сравнению с клетками взрослых, что может объяснить отсутствие повышения

функциональной активности нейтрофилов при стимуляции ГМ-КСФ [26]. Более того, экспрессия рецептора ГМ-КСФ дополнительно подавляется при неонатальном сепсисе и может объяснять сниженный ответ нейтрофилов у новорожденных с высоким риском реализации инфекции. Снижение стимулированной продукции ГМ-КСФ и экспрессии гена ГМ-КСФ было обнаружено и на мононуклеарных клетках доношенных новорожденных по сравнению со взрослыми. Уровни Г-КСФ и ГМ-КСФ в сыворотке при неонатальном сепсисе повышаются с увеличением гестационного возраста. Это может указывать на то, что функциональная активность нейтрофилов может быть опосредована связыванием соответствующего рецептора, а апоптоз может сдерживаться посредством механизма, реализующегося независимо от рецептора цитокинов.

Точные механизмы, оказывающие влияние на стабильность гранулоцитов у новорожденных, неясны. Г-КСФ, по-видимому, опосредует свой эффект через митохондриальный апоптотический путь, предотвращая транслокацию белка ВАХ, высвобождение цитохрома С и последующую активацию каспазы 3. Г-КСФ и ГМ-КСФ ингибируют высвобождение цитохрома С и активность каспазы в нейтрофилах у взрослых. ЛПС, Г-КСФ и ГМ-КСФ не обладают способностью предотвращать спонтанное высвобождение цитохрома С в нейтрофилах новорожденных, однако значительно снижают активности каспазы 3 и 9 по сравнению со взрослыми. В попытке определить, почему существует базальная устойчивость к апоптозу у нейтрофилов новорожденных на уровне активности каспаз, ряд авторов исследовали экспрессию ингибиторов апоптоза в гранулоцитах у новорожденных и взрослых. Несмотря на значительно более высокие уровни мРНК ингибиторов апоптоза в нейтрофилах новорожденных по сравнению со взрослыми, каких-либо существенных различий в экспрессии белков апоптоза выявлено не было.

Недавнее рандомизированное контролируемое исследование, в котором сравнивали терапевтический эффект применения Г-КСФ и ГМ-КСФ у новорожденных, показало, что абсолютное количество нейтрофилов было значительно увеличено в группе Г-КСФ по сравнению с терапией ГМ-КСФ и группой плацебо [26]. Г-КСФ оказывает наибольшее антиапоптотическое действие на нейтрофилы новорожденных, а ГМ-КСФ оказывает наибольшее влияние на функциональную активность. Эта работа указывает на необходимость дальнейших исследований в этой области для разработки схем лечения с тщательным подбором дозировки, возможно, с комбинацией Г-КСФ и ГМ-КСФ [26]. Оптимальное время введения имеет решающее значение для максимизации полезных эффектов этих цитокинов, поскольку у некоторых новорожденных уже могут быть высокие уровни циркуляции этих цитокинов. Понимание роли нейтрофилов в иммунном ответе при сепсисе имеет важное значение для оптимизации терапии новорожденного.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

При подозрении на ранний неонатальный сепсис у недоношенных новорожденных с ОНМТ и ЭНМТ рекомендовано определение CD64- индекса и исследование экспрессии FcγRII (CD32).

Экспрессия FcγR рецепторов на поверхности нейтрофилов недоношенных новорожденных имеет свои уникальные для данного возраста характеристики. Следует учитывать различия в уровнях экспрессии FcγR рецепторов новорожденных различного гестационного возраста в принятии клинических решений.

Предложена модель оценки *in vitro* эффекта КГСФ на морфологические и функциональные характеристики нейтрофилов новорожденных. Препараты Г-КСФ стимулируют опсонофагоцитарные реакции и препятствуют преждевременному апоптозу нейтрофилов и развитию абсолютной нейтропении. Экспериментальное подтверждение эффективности предложенного способа терапии у детей с ранним неонатальным сепсисом обосновывает целесообразность рассмотрения вопроса о внедрении в клиническую практику.

Частота инфекционных осложнений неонатального периода не зависит от частоты развития абсолютной нейтропении у недоношенных новорожденных. Не следует рассматривать факт абсолютной нейтропении в качестве фактора риска развития нарушений постнатальной адаптации.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Успехи, достигнутые в перинатальной медицине в последние годы, привели к существенному снижению неонатальной смертности, но вместе с тем - к возникновению целого ряда проблем, связанных с последствиями патологических состояний в перинатальном периоде. Известно, что иммунные механизмы участвуют в патогенезе основных заболеваний пери-/неонатального периода и, во многом, обуславливают их исход. Поэтому в настоящее время одним из актуальных направлений современной неонатологии и педиатрии являются исследования, направленные на изучение закономерностей становления и формирования иммунных реакций в процессе внутриутробного развития и раннем постнатальном периоде. Это обусловлено тем, что именно адекватная иммунная регуляция обеспечивает поддержание гомеостаза организма плода и новорожденного ребенка в условиях стресса и высокой антигенной нагрузки в процессе постнатальной адаптации. На процесс формирования фенотипа иммунных реакций могут влиять многочисленные факторы, причем генетические факторы, очевидно, имеют важное, но не решающее значение.

Функциональное состояние системы иммунного надзора организма, а именно ее возрастные особенности, могут быть основным фактором, определяющим неэффективность подходов к профилактике и терапии неонатальных инфекций. Дальнейшее изучение точных механизмов становления иммунной системы у плода и у недоношенного новорожденного может послужить базой для более глубокого понимания патогенетических основ заболеваний перинатального периода и позволит разработать дифференцированный подход к профилактике тяжелых осложнений заболеваний перинатального периода, что позволит улучшить прогноз жизни и здоровья и снизить частоту инвалидизации детей с ОНМТ и ЭНМТ.

В качестве костимулятора 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.

Нами была выполнена оценка модулирующего эффекта Г-КСФ на нейтрофильные гранулоциты в условиях *in vitro*. В данной модели продемонстрировано, что культивирование гранулоцитов в присутствии Г-КСФ приводит к 2,4-5 кратному повышению экспрессии FcγRIII (CD16) и FcγRII (CD32) рецепторов на этих клетках.

Таким образом, состояние иммунной системы новорожденного ребенка вне зависимости от его гестационного возраста нельзя назвать иммунодефицитным. Напротив, новорожденный ребенок, а в большей степени недоношенный ребенок, имеет особое, не повторяющееся в онтогенезе, но с биологической точки зрения целесообразное состояние иммунной системы, которое препятствует развитию избыточных реакций системного воспалительного ответа, аутоиммунных процессов, деструкции собственных органов и тканей. Дальнейшее изучение точных механизмов становления иммунорегуляции у плода послужит базой для более глубокого понимания патогенетических основ заболеваний перинатального периода и позволит разработать дифференцированный подход к профилактике тяжелых

осложнений перинатального периода, что улучшит прогноз жизни и здоровья и снизит частоту инвалидизации детей, родившихся с очень низкой и экстремально низкой массой тела. Поскольку все больше усилий прилагается для улучшения результатов выхаживания у детей с ЭНМТ, необходимо определение того, какие случаи нейтропении действительно доброкачественные, а какие, вероятно, выиграют от применения ИГВВ, Г-КСФ или других вмешательств.

## **ВЫВОДЫ**

1. Недоношенные новорожденные характеризуются дисрегуляцией экспрессии Fcγ рецепторов на поверхности нейтрофилов, которая зависит от их гестационного возраста.
2. Генерализованная инфекция и сепсис в раннем неонатальном периоде ассоциированы со сниженной экспрессией активационного рецептора FcγRIII (CD16) и регуляторного FcγRII (CD32) в течение как минимум 3 недель постнатального периода. Баланс между активирующим и ингибирующим FcγR является принципиальным в регуляции иммунного ответа.
3. Совместное *in vitro* культивирования клеток с Г-КСФ приводит к повышению экспрессии FcγRIII (CD16) и FcγRII (CD32) рецепторов на гранулоцитах, усилению их функциональной активности, а также к существенной задержке раннего спонтанного апоптоза.
4. Абсолютная нейтропения, выявленная у новорожденных в раннем неонатальном периоде, не свидетельствует о тяжести инфекционного процесса, независимо от гестационного возраста, результатов посева крови на стерильность и этиологического фактора. В возникновении нейтропенических состояний основную роль играет характер осложнений беременности, а именно: гестоз и ЗВУР.

5. Показатель летальности у недоношенных новорожденных с эпизодами абсолютной нейтропении в раннем неонатальном периоде не отличается от такового у новорожденных без абсолютной нейтропении по данным клинического анализа крови.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляева И.А., Бомбардинова Е.П., Турти Т.В., Митиш М.Д., Потехина Т.В. Кишечная микробиота у недоношенных детей — современное состояние проблемы. // Педиатрическая фармакология. —2015— Т.12 — № 3— С. 296–303.
2. Володин Н.Н., Румянцев А.Г., Щербина А.Ю. Применение рекомбинантных гранулоцитарных колониестимулирующих факторов у новорожденных. Показания и клинические рекомендации // Вопросы практической педиатрии. — 2012. — Т. 7. — № 4. — С. 44–49.
3. Воробьева Н.В., Кондратенко И.В., Вахлянская С.С., Черняк Б.В., Пинегин Б.В. Роль митохондриальной поры в эффекторных функциях нейтрофилов человека. // Иммунология. — 2020. — Т. 41— № 1— С. 42–53.
4. Дегтярева М.В., Бирюкова Т.В., Володин Н.Н. Клинико-лабораторные особенности раннего неонатального сепсиса у детей различного гестационного возраста и оценка эффективности иммунозаместительной терапии Пентаглобином. // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского —2008 — Т.87 — С. 32–40.
5. Дементьева Ю.Н. Иммунологические аспекты грудного вскармливания // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2015. – Т. 60. – №. 4.
6. Исаков Ю.Ф., Белобородова Н.В. Сепсис у детей. М.:Мокеев, 2001: 368.
7. Неонатология: национальное руководство / под ред. Н.Н. Володина. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009. 848с.
8. Хаитов Р.М. Иммунология. Р.М. Хаитов - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. - 496с.
9. Щеголев А.И., Мишнёв О.Д., Туманова У.Н., Шувалова М.П. неонатальный сепсис как причина перинатальной смертности в российской федерации // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 5-4. – С. 589-594.

10. Adkins B. Neonatal immunology: responses to pathogenic microorganisms and epigenetics reveal an “immunodiverse” developmental state. // *Immunol Res.* – 2013. – V.57. P. 246–257
11. Aktas D. et al. A randomized case-controlled study of recombinant human granulocyte colony stimulating factor for the treatment of sepsis in preterm neutropenic infants // *Pediatrics & Neonatology.* – 2015. – V. 56. – № 3. – P. 171-175.
12. Allen R. C. Neutrophil leukocyte: combustive microbicidal action and chemiluminescence // *Journal of immunology research.* – 2015. – V. 2015.
13. Ander S. E., Diamond M. S., Coyne C. B. Immune responses at the maternal-fetal interface // *Science immunology.* – 2019. – V. 4. – № 31.
14. Anderson D. C. Impaired transendothelial migration by neonatal neutrophils: abnormalities of Mac-1 (CD11b/CD18)-dependent adherence reactions. – 1990. P. 2613-2621.
15. Arts R. J. W. et al. Glutaminolysis and fumarate accumulation integrate immunometabolic and epigenetic programs in trained immunity // *Cell metabolism.* – 2016. – V. 24. – № 6. – P. 807-819.
16. Beuers U. et al. Tauroursodeoxycholic acid inhibits the cytosolic Ca<sup>++</sup> increase in human neutrophils stimulated by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine // *Biochemical and biophysical research communications.* – 1990. – V. 171. – № 3. – P. 1115-1121.
17. Bizzarro M. J. et al. Changing patterns in neonatal *Escherichia coli* sepsis and ampicillin resistance in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis // *Pediatrics.* – 2008. – V. 121. – № 4. – P. 689-696.
18. Björkqvist M. et al. Defective neutrophil oxidative burst in preterm newborns on exposure to coagulase-negative staphylococci // *Pediatric research.* – 2004. – V. 55. – № 6. – P. 966-971.
19. Black LV, Maheshwari A. Immune-mediated neutropenia in the neonate // *Neoreviews.* – 2009. – V. 10. – P. 446–453.

20. Brinkmann V. Neutrophil extracellular traps kill bacteria // *science*. – 2004. – V. 303. – № 5663. – P. 1532-1535.
21. Burdon P. C. E., Martin C., Rankin S. M. Migration across the sinusoidal endothelium regulates neutrophil mobilization in response to ELR+ CXC chemokines // *British journal of haematology*. – 2008. – V. 142. – № 1. – P. 100-108.
22. Byrd A. S. et al. NETosis in neonates: evidence of a reactive oxygen species-independent pathway in response to fungal challenge // *The Journal of infectious diseases*. – 2016. – V. 213. – № 4. – P. 634-639.
23. Carr R. et al. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor administered as prophylaxis for reduction of sepsis in extremely preterm, small for gestational age neonates (the PROGRAMS trial): a single-blind, multicentre, randomised controlled trial // *The Lancet*. – 2009. – V. 373. – № 9659. – P. 226-233.
24. Carr R., Huizinga T. W. J. Low soluble FcRIII receptor demonstrates reduced neutrophil reserves in preterm neonates // *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition*. – 2000. – V. 83. – № 2. – P. F160-F160.
25. Carr R. Neutrophil production and function in newborn infants // *Br J Haematol*. – 2000. – V. 110. – P. 18–28.
26. Carr R., Modi N., Doré C. J. G-CSF and GM-CSF for treating or preventing neonatal infections // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2003. – № 3.
27. Chaudhuri J. et al. Granulocyte colony-stimulating factor for preterms with sepsis and neutropenia: a randomized controlled trial // *Journal of clinical neonatology*. – 2012. – V. 1. – № 4. – P. 202.
28. Cho C. E., Norman M. Cesarean section and development of the immune system in the offspring // *American journal of obstetrics and gynecology*. – 2013. – V. 208. – № 4. – P. 249-254.
29. Christensen R.D. et al. Early-onset neutropenia in small-for-gestational-age infants // *Pediatrics*. – 2015. – V. 136. – № 5. – P. e1259-e1267.

30. Christensen R.D. et al. Low blood neutrophil concentrations among extremely low birth weight neonates: data from a multihospital health-care system // *Journal of perinatology*. – 2006. – V. 26. – № 11. – P. 682-687.
31. Christensen R.D., Calhoun D.A., Rimsza L. M. A practical approach to evaluating and treating neutropenia in the neonatal intensive care unit // *Clinics in perinatology*. – 2000. – V. 27. – № 3. – P. 577-601.
32. Christensen R.D., Harper T.E., Rothstein G. Granulocyte-macrophage progenitor cells in term and preterm neonates // *The Journal of pediatrics*. – 1986. – V. 109. – № 6. – P. 1047-1051.
33. Christensen R.D., Rothstein G. Exhaustion of mature marrow neutrophils in neonates with sepsis // *The Journal of pediatrics*. – 1980. – V. 96. – № 2. – P. 316-318.
34. Christensen R.D., Calhoun D.A., Rimsza L.M. A practical approach to evaluating and treating neutropenia in the neonatal intensive care unit // *Clin Perinatol*. – 2000. – V. 27. – P. 577–601.
35. Clay M.E., Schuller RM, Bachowski GJ. Granulocyte serology: current concepts and clinical significance// *Immunohematology*. – 2010. – V. 26. – P. 11–21.
36. Colombo M., Raposo G., Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles // *Annual review of cell and developmental biology*. – 2014. – V. 30. – P. 255-289.
37. Contrino J. et al. Elevated interleukin-1 expression in human neonatal neutrophils // *Pediatric research*. – 1993. – V. 34. – № 3. – P. 249-252.
38. Corriden R. et al. Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (E-NTPDase1/CD39) regulates neutrophil chemotaxis by hydrolyzing released ATP to adenosine // *Journal of biological chemistry*. – 2008. – V. 283. – № 42. – P. 28480-28486
39. Cotten C. M. et al. Prolonged duration of initial empirical antibiotic treatment is associated with increased rates of necrotizing enterocolitis and death for extremely low birth weight infants // *Pediatrics*. – 2009. – V. 123. – № 1. – P. 58-66.

40. Cuenca A. G. et al. TRIF-dependent innate immune activation is critical for survival to neonatal gram-negative sepsis // *The Journal of Immunology*. – 2015. – V. 194. – № 3. – P. 1169-1177.
41. Decembrino L. et al. Plasma lactoferrin levels in newborn preterm infants with sepsis // *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. – 2017. – V. 30. – № 23. – P. 2890-2893.
42. Desai J. et al. Matters of life and death. How neutrophils die or survive along NET release and is “NETosis”= necroptosis? // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2016. – V. 73. – № 11-12. – P. 2211-2219.
43. Deshmukh H. S. et al. The microbiota regulates neutrophil homeostasis and host resistance to *Escherichia coli* K1 sepsis in neonatal mice // *Nature medicine*. – 2014. – V. 20. – № 5. – P. 524-530.
44. Devaux C. A., Raoult D. The microbiological memory, an epigenetic regulator governing the balance between good health and metabolic disorders // *Frontiers in microbiology*. – 2018. – V. 9. – P. 1379.
45. Domínguez-Andrés J. et al. The itaconate pathway is a central regulatory node linking innate immune tolerance and trained immunity // *Cell Metabolism*. – 2019. – V. 29. – № 1. – P. 211-220. e5.
46. Edwards S. W. *Biochemistry and Physiology of the Neutrophil*. – Cambridge University Press, 2005.
47. Fábrega M. J. et al. Activation of immune and defense responses in the intestinal mucosa by outer membrane vesicles of commensal and probiotic *Escherichia coli* strains // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – V. 7. – P. 705.
48. Falconer A. E., Carr R., Edwards S. W. Impaired neutrophil phagocytosis in preterm neonates: lack of correlation with expression of immunoglobulin or complement receptors // *Neonatology*. – 1995. – V. 68. – № 4. – P. 264-269.
49. Faurschou M., Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation // *Microbes and infection*. – 2003. – V. 5. – № 14. – P. 1317-1327.

50. Fermino M. L. et al. LPS-induced galectin-3 oligomerization results in enhancement of neutrophil activation // *PloS one.* – 2011. – V. 6. – № 10. – P. e26004.
51. Filias A. et al. Phagocytic ability of neutrophils and monocytes in neonates // *BMC pediatrics.* – 2011. – V. 11. – № 1. – P. 29.
52. Fox S. E. et al. The effects and comparative differences of neutrophil specific chemokines on neutrophil chemotaxis of the neonate // *Cytokine.* – 2005. – V. 29. – № 3. – P. 135-140.
53. Fransen M. F. et al. A restricted role for FcγR in the regulation of adaptive immunity // *The Journal of Immunology.* – 2018. – V. 200. – № 8. – P. 2615-2626.
54. Frochoux V, Hildebrand D, Talke A, Linscheid MW, Schlüter H. Alpha-1-antitrypsin: a novel human high temperature requirement protease A1 (HTRA1) substrate in human placental tissue. *PLoS One.* 2014;9(10): doi: 10.1371/journal.pone.0109483.
55. Funke A, Berner R, Traichel B, Schmeisser D, Leititis JU, Niemeyer CM. Frequency, natural course, and outcome of neonatal neutropenia. *Pediatrics* 2000;106:45–51.
56. Garcia-Alvarez M., Marik P., Bellomo R. Sepsis-associated hyperlactatemia // *Critical care.* – 2014. – V. 18. – № 5. – P. 503.
57. Gollwitzer E. S., Marsland B. J. Impact of early-life exposures on immune maturation and susceptibility to disease // *Trends in immunology.* – 2015. – V. 36. – № 11. – P. 684-696.
58. Guo C. et al. Bile acids control inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome // *Immunity.* – 2016. – V. 45. – № 4. – P. 802-816.
59. Gupta A.K., Hasler P., Holzgreve W., Gebhardt S., Hahn S. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia // *Hum Immunol.* – 2005. – V. 66. – № 11. – P. 1146–1154.

60. Hanna N. et al. Mechanisms underlying reduced apoptosis in neonatal neutrophils // *Pediatric research*. – 2005. – V. 57. – № 1. – P. 56-62.
61. Haridan U. S. et al. A comparison of assays for accurate copy number measurement of the low-affinity Fc gamma receptor genes FCGR3A and FCGR3B // *PLoS One*. – 2015. – V. 10. – № 1. – P. e0116791.
62. Hawley K. L. et al. IFN $\gamma$  enhances CD64-potentiated phagocytosis of *Treponema pallidum* opsonized with human syphilitic serum by human macrophages // *Frontiers in immunology*. – 2017. – V. 8. – P. 1227.
63. Hou P. C. et al. Different modulating effects of adenosine on neonatal and adult polymorphonuclear leukocytes // *The Scientific World Journal*. – 2012. – V. 2012.
64. Iwamura C. et al. Sensing of the microbiota by NOD1 in mesenchymal stromal cells regulates murine hematopoiesis // *Blood*. – 2017. – V. 129. – № 2. – P. 171-176.
65. Jennewein M.F, Alter G. The Immunoregulatory Roles of Antibody Glycosylation // *Trends Immunol*. – 2017. – V. 38. – №8– P. 372.
66. Jennewein M.F, Goldfarb I., Dolatshahi S., Cosgrove C., Noelette F.J., Krykbaeva M. Fc Glycan-Mediated Regulation of Placental Antibody Transfer // *Cell*. – 2019. – V. 178. – № 1. – P. 202–215.e14.
67. Jiao J. et al. Central role of conventional dendritic cells in regulation of bone marrow release and survival of neutrophils // *The Journal of Immunology*. – 2014. – V. 192. – № 7. – P. 3374-3382
68. Josefsdottir K. S. et al. Antibiotics impair murine hematopoiesis by depleting the intestinal microbiota // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2017. – V. 129. – № 6. – P. 729-739.
69. Kanoh S., Rubin B. K. Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications // *Clinical microbiology reviews*. – 2010. – V. 23. – № 3. – P. 590-615.
70. Khosravi A. et al. Gut microbiota promote hematopoiesis to control bacterial infection // *Cell host & microbe*. – 2014. – V. 15. – № 3. – P. 374-381.

71. Kim J. et al. Staphylococcus aureus-derived extracellular vesicles induce monocyte recruitment by activating human dermal microvascular endothelial cells in vitro // *Clinical & Experimental Allergy*. – 2019. – V. 49. – № 1. – P. 68-81.
72. Kim S. K. et al. Comparison of L-selectin and CD11b on neutrophils of adults and neonates during the first month of life // *Pediatric research*. – 2003. – V. 53. – № 1. – P. 132-136.
73. Klein J. O., Remington J. S. (ed.). *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. – WB Saunders, 1983.
74. Kobayashi S. D. et al. Spontaneous neutrophil apoptosis and regulation of cell survival by granulocyte macrophage-colony stimulating factor // *Journal of leukocyte biology*. – 2005. – V. 78. – № 6. – P. 1408-1418.
75. Koeppen K. et al. A novel mechanism of host-pathogen interaction through sRNA in bacterial outer membrane vesicles // *PLoS pathogens*. – 2016. – V. 12. – № 6. – P. e1005672.
76. Koh A. et al. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites // *Cell*. – 2016. – V. 165. – № 6. – P. 1332-1345.
77. Kotecha S. et al. The role of neutrophil apoptosis in the resolution of acute lung injury in newborn infants // *Thorax*. – 2003. – V. 58. – № 11. – P. 961-967.
78. Laver J. et al. High levels of granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors in cord blood of normal full-term neonates // *The Journal of pediatrics*. – 1990. – V. 116. – № 4. – P. 627-632.
79. Lawrence S. M. et al. Is the use of complete blood counts with manual differentials an antiquated method of determining neutrophil composition in newborns? // *Annals of Clinical & Laboratory Science*. – 2015. – V. 45. – № 4. – P. 403-413.
80. Lawrence S. M., Corriden R., Nizet V. Age-appropriate functions and dysfunctions of the neonatal neutrophil // *Frontiers in pediatrics*. – 2017. – V. 5. – P. 23.



81. Levy O. Impaired innate immunity at birth: deficiency of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in the neutrophils of newborns // *Pediatric research*. – 2002. – V. 51. – № 6. – P. 667-669.
82. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates // *Nature Reviews Immunology*. – 2007. – V. 7. – № 5. – P. 379-390.
83. Linden J. R. et al. Galectin-3 plays an important role in protection against disseminated candidiasis // *Medical Mycology*. – 2013. – V. 51. – № 6. – P. 641-651.
84. Linden J. R. et al. The role of galectin-3 in phagocytosis of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* by human neutrophils // *Cellular microbiology*. – 2013. – V. 15. – № 7. – P. 1127-1142.
85. Lindner U. et al. Levels of cytokines in umbilical cord blood in small for gestational age preterm infants // *Klinische Pädiatrie*. – 2013. – V. 225. – № 2. – P. 70-74.
86. Liu G. et al. Modulation of neutrophil development and homeostasis // *Current Molecular Medicine*. – 2013. – V. 13. – № 8. – P. 1270-1283.
87. Liu W. et al. Olfm4 deletion enhances defense against *Staphylococcus aureus* in chronic granulomatous disease // *The Journal of clinical investigation*. – 2013. – V. 123. – № 9. – P. 3751-3755.
88. Lloyd B. W., Oto A. Normal values for mature and immature neutrophils in very preterm babies // *Archives of disease in childhood*. – 1982. – V. 57. – № 3. – P. 233-235.
89. Lorant D. E. et al. P-selectin expression by endothelial cells is decreased in neonatal rats and human premature infants // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 1999. – V. 94. – № 2. – P. 600-609.
90. Luis T. C., Killmann N. M. B., Staal F. J. T. Signal transduction pathways regulating hematopoietic stem cell biology: introduction to a series of Spotlight Reviews // *Leukemia*. – 2012. – V. 26. – № 1. – P. 86-90.

91. Luis Domínguez M.J. et al. I-selectin expression is regulated by CXCL8-induced reactive oxygen species produced during human neutrophil rolling // *European journal of immunology*. – 2019. – V. 49. – № 3. – P. 386-397.
92. Maheshwari A, Christensen RD, Calhoun DA. Immune-mediated neutropenia in the neonate // *Acta Paediatr Suppl*. – 2002. – V. 91. – P. 98–103.
93. Makoni M. et al. Alterations in neonatal neutrophil function attributable to increased immature forms // *Early human development*. – 2016. – V. 103. – P. 1-7.
94. Manzoni P. et al. Early-onset neutropenia is a risk factor for *Candida* colonization in very low-birth-weight neonates // *Diagnostic microbiology and infectious disease*. – 2007. – V. 57. – № 1. – P. 77-83.
95. Mayadas T.N., Cullere X., Lowell C. A. The multifaceted functions of neutrophils // *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. – 2014. – V. 9. – P. 181-218.
96. McEvoy L. T., Zakem-Cloud H., Tosi M. F. Total cell content of CR3 (CD11b/CD18) and LFA-1 (CD11a/CD18) in neonatal neutrophils: relationship to gestational age. – 1996.
97. Merry C., Puri P., Reen D. J. Phosphorylation and the actin cytoskeleton in defective newborn neutrophil chemotaxis // *Pediatric research*. – 1998. – V. 44. – № 2. – P. 259-264.
98. Mesa M.A., Vasquez G. NETosis // *Autoimmune diseases*. – 2013. – V. 2013.
99. Mitroulis I. et al. Modulation of myelopoiesis progenitors is an integral component of trained immunity // *Cell*. – 2018. – V. 172. – № 1-2. – P. 147-161. e12.
100. Moriguchi N. et al. Granulocyte functions and changes in ability with age in newborns; Report no. 2: Activation of granulocyte functions by cytokines // *Pediatrics international*. – 2006. – V. 48. – № 1. – P. 22-28.
101. Nagelkerke S. Q., Kuijpers T. W. Immunomodulation by IVIg and the role of Fc-gamma receptors: classic mechanisms of action after all? // *Frontiers in immunology*. – 2015. – V. 5. – P. 674.

102. Nauseef W. M., Borregaard N. Neutrophils at work // *Nature immunology*. – 2014. – V. 15. – № 7. – P. 602-611.
103. Nguyen D.N., Stensballe A., Lai J.C., Jiang P., Brunse A., Li Y. Elevated levels of circulating cell-free DNA and neutrophil proteins are associated with neonatal sepsis and necrotizing enterocolitis in immature mice, pigs and infants // *Innate Immun.* – 2017. – V.23. – P.524–36.
104. Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. Fcγ receptors as regulators of immune responses // *Nature Rev. Immunol* . – 2008. – V. 8. – P. 34–47.
105. Nishimura H. et al. Bactericidal/permeability-increasing protein promotes complement activation for neutrophil-mediated phagocytosis on bacterial surface // *Immunology*. – 2001. – V. 103. – № 4. – P. 519-525.
106. Nordenfelt P., Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils // *Journal of leukocyte biology*. – 2011. – V. 90. – № 2. – P. 271-284.
107. Nussbaum C. et al. Neutrophil and endothelial adhesive function during human fetal ontogeny // *Journal of leukocyte biology*. – 2013. – V. 93. – № 2. – P. 175-184.
108. Nussbaum C., Sperandio M. Innate immune cell recruitment in the fetus and neonate // *Journal of reproductive immunology*. – 2011. – V. 90. – № 1. – P. 74-81.
109. O'Brien XM, Biron BM, Reichner JS. Consequences of extracellular trap formation in sepsis. *Curr Opin Hematol.* (2017) 24:66–71.
110. Ohlin A. et al. Sepsis as a risk factor for neonatal morbidity in extremely preterm infants // *Acta Paediatrica*. – 2015. – V. 104. – № 11. – P. 1070-1076.
111. Ohlsson A., Lacy J. B. Intravenous immunoglobulin for suspected or proven infection in neonates (Reviews) // *Cochrane Database Syst Rev*. – 2015. – V. 3.
112. Parker H. et al. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus // *Journal of leukocyte biology*. – 2012. – V. 92. – № 4. – P. 841-849.

113. Peyssonnaud C. et al. HIF-1 $\alpha$  expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes // *The Journal of clinical investigation*. – 2005. – V. 115. – № 7. – P. 1806-1815.
114. Pillay J. et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1 // *The Journal of clinical investigation*. – 2012. – V. 122. – № 1. – P. 327-336.
115. Quinn M. T., Gauss K. A. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases // *Journal of leukocyte biology*. – 2004. – V. 76. – № 4. – P. 760-781.
116. Raymond S. L. et al. Neutrophil chemotaxis and transcriptomics in term and preterm neonates // *Translational Research*. – 2017. – V. 190. – P. 4-15.
117. Roos D. Chronic granulomatous disease // *British medical bulletin*. – 2016. – V. 118. – № 1. – P. 50.
118. Sadeghi K. et al. Immaturity of infection control in preterm and term newborns is associated with impaired toll-like receptor signaling // *The Journal of infectious diseases*. – 2007. – V. 195. – № 2. – P. 296-302.
119. Saffarzadeh M, Preissner KT. Fighting against the dark side of neutrophil extracellular traps in disease: manoeuvres for host protection. // *Curr Opin Hematol*. 2013;20(1):3–9
120. Saverymuttu S. H. et al. The kinetics of <sup>111</sup>indium distribution following injection of <sup>111</sup>indium labelled autologous granulocytes in man // *British journal of haematology*. – 1985. – V. 61. – № 4. – P. 675-685.
121. Schmutz N. et al. Expected ranges for blood neutrophil concentrations of neonates: the Manroe and Mouzinho charts revisited // *Journal of Perinatology*. – 2008. – V. 28. – № 4. – P. 275-281.
122. Sharma G. et al. Maternal and neonatal characteristics associated with neonatal neutropenia in hypertensive pregnancies // *American journal of perinatology*. – 2009. – V. 26. – № 09. – P. 683-689.

123. Silvestre-Roig C., Hidalgo A., Soehnlein O. Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis // *Blood*. – 2016. – V. 127. – № 18. – P. 2173-2181.
124. Slayton W. B. et al. The first-appearance of neutrophils in the human fetal bone marrow cavity // *Early human development*. – 1998. – V. 53. – № 2. – P. 129-144.
125. Sørensen O. E. et al. Neutrophil extracellular traps—the dark side of neutrophils // *The Journal of clinical investigation*. – 2016. – V. 126. – № 5. – P. 1612-1620.
126. Stadlbauer V. et al. Effect of probiotic treatment on deranged neutrophil function and cytokine responses in patients with compensated alcoholic cirrhosis // *Journal of hepatology*. – 2008. – V. 48. – № 6. – P. 945-951.
127. Steinbeck M.J., Khan A.U., Karnovsky M.J. Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap // *Journal of Biological Chemistry*. – 1992. – V. 267. – № 19. – P. 13425-13433.
128. Stiel C.U., Ebenebe C.U., Trochimiuk M., Pagarols Raluy L., Vincent D., Singer D., Reinshagen K., Boettcher M. Markers of NETosis Do Not Predict Neonatal Early Onset Sepsis: A Pilot Study. // *Front. Pediatr.* – 2020 . – V 7. – P. 555.
129. Strydom N., Rankin S. M. Regulation of circulating neutrophil numbers under homeostasis and in disease // *Journal of innate immunity*. – 2013. – V. 5. – № 4. – P. 304-314.
130. Summers C. et al. Neutrophil kinetics in health and disease // *Trends in immunology*. – 2010. – V. 31. – № 8. – P. 318-324.
131. Klausen P. et al. End-stage differentiation of neutrophil granulocytes in vivo is accompanied by up-regulation of p27kip1 and down-regulation of CDK2, CDK4, and CDK6 // *Journal of leukocyte biology*. – 2004. – V. 75. – № 3. – P. 569-578.
132. Sundqvist M. et al. Cord blood neutrophils display a galectin-3 responsive phenotype accentuated by vaginal delivery // *BMC pediatrics*. – 2013. – V. 13. – № 1. – P. 128.

133. Swartwout B., Luo X. M. Implications of probiotics on the maternal-neonatal interface: gut microbiota, immunomodulation, and autoimmunity // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – V. 9. – P. 2840.
134. Sweeney C. L. et al. Molecular analysis of neutrophil differentiation from human induced pluripotent stem cells delineates the kinetics of key regulators of hematopoiesis // *Stem cells*. – 2016. – V. 34. – № 6. – P. 1513-1526.
135. Tak T. et al. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited // *Journal of leukocyte biology*. – 2013. – V. 94. – № 4. – P. 595-601.
136. Tavian M., Peault B. Embryonic development of the human hematopoietic system // *International Journal of Developmental Biology*. – 2003. – V. 49. – № 2-3. – P. 243-250.
137. Teng R.J. et al. Early neutropenia is not associated with an increased rate of nosocomial infection in very low-birth-weight infants // *Journal of Perinatology*. – 2009. – V. 29. – № 3. – P. 219-224.
138. Teng T.S. Neutrophils and immunity: from bactericidal action to being conquered // *Journal of immunology research*. – 2017. – P. 2017.
139. Thompson A.M., Bizzarro M.J. Necrotizing enterocolitis in newborns // *Drugs*. – 2008. – V. 68. – № 9. – P. 1227-1238.
140. Tober J. et al. The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis // *Blood*. – 2007. – V. 109. – № 4. – P. 1433-1441.
141. Urlichs F., Speer C. P. Neutrophil function in preterm and term infants // *NeoReviews*. – 2004. – V. 5. – № 10. – P. e417-e430.
142. van der Meer W. et al. Hematological indices, inflammatory markers and neutrophil CD64 expression: comparative trends during experimental human endotoxemia // *Journal of endotoxin research*. – 2007. – V. 13. – № 2. – P. 94-100.

143. Vieira A. T. et al. Dietary fiber and the short-chain fatty acid acetate promote resolution of neutrophilic inflammation in a model of gout in mice // *Journal of leukocyte biology*. – 2017. – V. 101. – № 1. – P. 275-284.
144. Vincent D., Klinke M., Eschenburg G., Trochimiuk M., Appl B., Tiemann B. NEC is likely a NETs dependent process and markers of NETosis are predictive of NEC in mice and humans. // *Sci Rep*. – 2018. – V. 8 – P. 12612.
145. Vong L. et al. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* inhibits the formation of neutrophil extracellular traps // *The Journal of Immunology*. – 2014. – V. 192. – № 4. – P. 1870-1877.
146. Warner B. B. et al. Gut bacteria dysbiosis and necrotising enterocolitis in very low birthweight infants: a prospective case-control study // *The Lancet*. – 2016. – V. 387. – № 10031. – P. 1928-1936.
147. Weinberger B. et al. Mechanisms underlying reduced responsiveness of neonatal neutrophils to distinct chemoattractants // *Journal of leukocyte biology*. – 2001. – V. 70. – № 6. – P. 969-976.
148. Weinschenk N. P., Farina A., Bianchi D. W. Premature infants respond to early-onset and late-onset sepsis with leukocyte activation // *The Journal of pediatrics*. – 2000. – V. 137. – № 3. – P. 345-350.
149. Welin A. et al. The human neutrophil subsets defined by the presence or absence of OLFM4 both transmigrate into tissue in vivo and give rise to distinct NETs in vitro // *PloS one*. – 2013. – V. 8. – № 7. – P. e69575.
150. Wong H. R. et al. Plasma bactericidal/permeability-increasing protein concentrations in critically ill children with the sepsis syndrome // *The Pediatric infectious disease journal*. – 1995. – V. 14. – № 12. – P. 1087-1091.
151. Wu B. B. et al. Effects of *Bifidobacterium* supplementation on intestinal microbiota composition and the immune response in healthy infants // *World Journal of Pediatrics*. – 2016. – V. 12. – № 2. – P. 177-182.
152. Wynn J. L., Levy O. Role of innate host defenses in susceptibility to early-onset neonatal sepsis // *Clinics in perinatology*. – 2010. – V. 37. – № 2. – P. 307-337.

153. Yang D. et al. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells // *Journal of leukocyte biology*. – 2000. – V. 68. – № 1. – P. 9-14.
154. Yost C. C. et al. Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates // *Blood*. – 2009. – V. 113. – № 25. – P. 6419-6427.
155. Yost C.C., Schwertz H., Cody M.J., Wallace J.A., Campbell R.A., Vieira-de-Abreu A., Araujo C.V., Schubert S., Harris E.S. Neonatal NET-inhibitory factor and related peptides inhibit neutrophil extracellular trap formation. // *J Clin Invest*. – 2016. – V. 126. – № 10 – P. 3783-3798.
156. Yuen J. et al. NETosing neutrophils activate complement both on their own NETs and bacteria via alternative and non-alternative pathways // *Frontiers in immunology*. – 2016. – V. 7. – P. 137.
157. Zeissig S., Blumberg R. S. Life at the beginning: perturbation of the microbiota by antibiotics in early life and its role in health and disease // *Nature immunology*. – 2014. – V. 15. – № 4. – P. 307-310.
158. Zhang D. et al. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome // *Nature*. – 2015. – V. 525. – № 7570. – P. 528-532.
159. Zhang D., Frenette P. S. Cross talk between neutrophils and the microbiota // *blood*. – 2019. – V. 133. – № 20. – P. 2168-2177.