

В.Е. Мухин<sup>1</sup>, Л.Л. Панкратьева<sup>2</sup>, О.И. Милева<sup>3</sup>, М.Н. Ярцев<sup>4</sup>, Н.Н. Володин<sup>2</sup><sup>1</sup> Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью, Москва, Российская Федерация<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачёва, Москва, Российская Федерация<sup>3</sup> Городская клиническая больница № 24, Москва, Российская Федерация<sup>4</sup> Государственный научный центр «Институт иммунологии», Москва, Российская Федерация

# Абсолютная нейтропения и развитие инфекций в раннем неонатальном периоде у недоношенных новорожденных: одномоментное исследование

## Контактная информация:

Мухин Владимир Евгеньевич, ведущий аналитик отдела анализа и прогнозирования медико-биологических рисков здоровью ФГБУ ЦСП ФМБА России

Адрес: 119435, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 1, тел.: +7 (495) 540-61-74 (доб. 1122), e-mail: [muhinldmr@gmail.com](mailto:muhinldmr@gmail.com)

Статья поступила: 20.09.2020, принята к печати: 23.10.2020

**Обоснование.** В раннем неонатальном периоде у недоношенных новорожденных отмечается высокий риск развития нейтропении и инфекций. Связь этих событий требует дополнительного изучения. **Цель исследования** — изучить частоту случаев абсолютной нейтропении и инфекционных осложнений у недоношенных новорожденных в раннем неонатальном периоде с оценкой фенотипических и функциональных особенностей нейтрофилов пуповинной крови.

**Методы.** В исследование включали недоношенных новорожденных (гестационный возраст 25–36 нед) с оценкой по шкале APGAR < 8 баллов на 1-й и 5-й мин жизни. Анализировали частоту случаев абсолютной нейтропении (хотя бы однократно <  $1,5 \times 10^9$ /л) и инфекционных осложнений (локализованные инфекции бактериальной этиологии, ранний неонатальный сепсис) в первые 14 сут жизни. Дополнительно у недоношенных ( $n = 102$ ) и доношенных новорожденных ( $n = 30$ ) методом проточной цитофлуориметрии определяли экспрессию нейтрофилами пуповинной крови CD64, CD16, CD32, с использованием FITC-меченых *Escherichia coli* — их фагоцитарную активность, путем стимуляции нейтрофилов *E. coli* в присутствии 5 мМ дигидрородамина 123 — индекс стимуляции (отношение средней интенсивности флуоресценции, MFI, активированных нейтрофилов в стимулированных образцах и отрицательных контролях, образцы без *E. coli*). **Результаты.** В группе недоношенных новорожденных эпизоды абсолютной нейтропении в первые 14 сут жизни зафиксированы в 17 случаях, инфекционные осложнения — у 87 детей (у 24 — сепсис). Частота инфекционных осложнений у недоношенных не ассоциировалась с частотой эпизодов абсолютной нейтропении. Нейтрофилы пуповинной крови недоношенных новорожденных отличались более высокой экспрессией CD64 и, напротив, более низкой экспрессией CD16, низкой фагоцитарной активностью и величиной индекса стимуляции (во всех случаях  $p < 0,001$ ). **Заключение.** Абсолютная нейтропения в раннем неонатальном периоде у недоношенных новорожденных не ассоциирована с высоким риском бактериальных инфекций. Вместе с тем нейтрофилы пуповинной крови недоношенных новорожденных отличаются более низкой функциональной активностью.

**Ключевые слова:** абсолютная нейтропения, недоношенные, бактериальные инфекции, ранний неонатальный период, фагоцитоз, Fc-γатта рецепторы, кислородный взрыв

**Для цитирования:** Мухин В.Е., Панкратьева Л.Л., Милева О.И., Ярцев М.Н., Володин Н.Н. Абсолютная нейтропения и развитие инфекций в раннем неонатальном периоде у недоношенных новорожденных: одномоментное исследование. *Вопросы современной педиатрии*. 2020; 19 (5): 352–358. doi: 10.15690/vsp.v19i5.2211

## ОБОСНОВАНИЕ

Генерализованные инфекции и сепсис остаются основными причинами инвалидизации и смерти новорожденных в отделениях реанимации и интенсивной терапии [1, 2]. Проблема сепсиса в педиатрии усугубляется тем, что данные, полученные на взрослой популяции больных, нельзя экстраполировать на педиатрическую практику. Это обусловлено особенностями иммунологической реактивности новорожденных, связанными с адаптацией к внеутробному образу жизни [3]. Одна из таких особенностей — количественные и функциональные характеристики нейтрофилов крови. Известно, например, что неонатальные нейтрофилы адаптированы к внутриутробным условиям — это позволяет

избегать развития нежелательных провоспалительных реакций [4]. Кроме того, естественное подавление функций нейтрофилов необходимо для создания здорового микробиома в послеродовом периоде [5], что, однако, может препятствовать развитию достаточного ответа на патогенные микроорганизмы [6, 7]. Изучение характеристик нейтрофилов новорожденного с учетом гестационного возраста может иметь решающее значение в установлении подходов к улучшению терапии неонатальных инфекций [8].

Неонатальная нейтропения является часто выявляемым отклонением: хотя бы один эпизод снижения общего количества нейтрофилов наблюдается, по разным оценкам, у 15–58% недоношенных новорожденных

[9, 10]. Эпизоды абсолютной нейтропении (< 1500 клеток/мкл) регистрируют примерно у 8–10% новорожденных, поступающих в отделение интенсивной терапии [11]. Хотя существуют варианты врожденного генетически обусловленного нарушения созревания нейтрофилов [12], в большинстве случаев неонатальная нейтропения является вторичной [13]. В ряде исследований было показано, что длительная и выраженная нейтропения у новорожденных с очень низкой массой тела (ОНМТ) выступает фактором риска развития сепсиса и ассоциированной с ним смерти [14, 15]. Позже были опубликованы результаты, согласно которым эта взаимосвязь не была подтверждена [8]. Связь хронической нейтропении, в т.ч. возникшей на фоне химиотерапии, с высоким риском развития инфекции была показана и на примере детей более старшего возраста [16].

Накопление новых экспериментальных данных и эволюция лабораторных методов за последние 50 лет позволили существенно расширить знания о физиологии нейтрофилов. В частности, установлено, что нейтрофилы экспрессируют Fc-гамма рецепторы для IgG, которые способствуют поглощению опсонизированных антителами патогенов и запускают активацию нейтрофилов при перекрестном связывании нескольких рецепторов [17]. Семейство Fc-рецепторов включает Fc-гамма RI (CD64), RII (CD32) и RIII (CD16), каждый из которых способен модулировать иммунный ответ посредством взаимодействия с клетками иммунной системы и высвобождения цитокинов [17]. Известно также, что нейтрофилы необходимы для функционирования В- и Т-клеток, презентации антигена и регенерации тканей [18]. Различия в лабораторных методах оценки характеристик нейтрофилов новорожденных, а также медико-социальные, демографические и генетические особенности новорожденных могут

затруднить сравнение полученных ранее данных и привести к потенциально противоречивым результатам [19].

### Цель исследования

Изучить частоту случаев абсолютной нейтропении и инфекционных осложнений у недоношенных новорожденных в раннем неонатальном периоде с оценкой фенотипических и функциональных особенностей нейтрофилов пуповинной крови.

### МЕТОДЫ

Некоторые результаты настоящего исследования были опубликованы ранее и освещали особенности экспрессии Fc-гамма рецепторов нейтрофилов у доношенных ( $n = 10$ ) и недоношенных ( $n = 38$ ) новорожденных и возможности ее модуляции *ex vivo* [20].

### Дизайн исследования

Исследование было проведено в два этапа. На первом этапе изучали частоту случаев абсолютной нейтропении и инфекционных осложнений у недоношенных новорожденных в общий (первые 14 сут жизни) период времени. На втором этапе сравнивали фенотипические и функциональные характеристики нейтрофилов пуповинной крови у недоношенных и доношенных новорожденных. В обоих случаях исследование выполнено по схеме одномоментного исследования.

### Условия проведения исследования

В исследование включали новорожденных, родившихся в родильном доме Городской больницы № 24, филиал № 2 (г. Москва) в период с ноября 2015 по сентябрь 2018 г. Наблюдение детей осуществляли в реанимационном отделении этого же стационара.

Vladimir E. Mukhin<sup>1</sup>, Lyudmila L. Pankratyeva<sup>2</sup>, Olga I. Mileva<sup>3</sup>, Mikhael N. Yartsev<sup>4</sup>, Nikolay N. Volodin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centre for Strategic Planning, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Dmitry Rogachev National Medical Research Center Of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> City Clinical Hospital № 24, Moscow, Russian Federation

<sup>4</sup> State Scientific Center «Institute of Immunology», Moscow, Russian Federation

## Absolute Neutropenia and Infection Development in Premature Infants in Early Neonatal Period: Cross-Sectional Study

**Background.** Premature infants have high risk of developing of neutropenia and infections in the early neonatal period. The correlation of these events requires further studies. **Objective.** The aim of the study was to investigate the frequency of absolute neutropenia and infectious complications cases in premature infants in the early neonatal period with estimation of phenotypical and functional features of cord blood neutrophils. **Methods.** The study included premature infants (gestational age 25–36 weeks) with APGAR score < 8 on the 1st and 5th minutes of life. The frequency of absolute neutropenia (at least once <  $1.5 \times 10^9/l$ ) and infectious complications (localized infections of bacterial etiology, early neonatal sepsis) cases in the first 14 day of life was analysed. Additionally, we have determined the expression of CD64, CD16, CD32 by cord blood neutrophils in premature ( $n = 102$ ) and mature infants ( $n = 30$ ) via method of flow cytofluorometry. We have used FITC labeled *Escherichia coli* to estimate their phagocytic activity, and stimulation of *E. coli* neutrophils in the presence of 5 mM of dihydrorhodamine 123 to estimate their stimulation index (ratio of mean fluorescent intensity (MFI) of activated neutrophils in stimulated samples and in negative controls, *E. coli* free samples). **Results.** The episodes of absolute neutropenia in the first 14 days of life were recorded in 17 cases, infectious complications — in 87 children (in 24 cases — sepsis) in the group of premature infants. The frequency of infectious complications in premature children did not correlate with the frequency of absolute neutropenia episodes. Cord blood neutrophils in premature infants had higher CD64 expression and, on the contrary, lower CD16 expression, as well as low phagocytic activity and stimulation index value (in all cases  $p < 0.001$ ). **Conclusion.** Absolute neutropenia in premature infants in early neonatal period does not correlate with high risk of bacterial infections. However, cord blood neutrophils in premature infants had lower functional activity.

**Key words:** absolute neutropenia, premature, bacterial infections, early neonatal period, phagocytosis, Fc-gamma receptors, respiratory burst

**For citation:** Mukhin Vladimir E., Pankratyeva Lyudmila L., Mileva Olga I., Yartsev Mikhael N., Volodin Nikolay N. Absolute Neutropenia and Infection Development in Premature Infants in Early Neonatal Period: Cross-Sectional Study. *Voprosy sovremennoi pediatrii — Current Pediatrics*. 2020; 19 (5): 352–358. doi: 10.15690/vsp.v19i5.2211

### Критерии соответствия

**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.

### Целевые показатели исследования

#### Основной показатель исследования

Анализировали частоту случаев абсолютной нейтропении и инфекционных осложнений у недоношенных новорожденных в раннем неонатальном периоде. Случаями абсолютной нейтропении признавали снижение числа нейтрофилов  $< 1,5 \times 10^9$ /л, зафиксированное хотя бы однократно в первые 14 сут жизни. Инфекционные осложнения регистрировали также в первые 14 сут жизни. В их числе отмечали развитие случаев локализованных инфекций бактериальной этиологии (пневмония, некротизирующий энтероколит, инфекция мочевыводящих путей, гнойный менингит, омфалит и флебит пупочной вены) и раннего неонатального сепсиса (сочетание очага бактериальной инфекции с полиорганной недостаточностью и синдромом системной воспалительной реакции, согласно рекомендациям РАСПМ [21]).

#### Дополнительные показатели исследования

Уровень экспрессии нейтрофилами пуповинной крови CD64, CD32 и CD16, доля фагоцитирующих нейтрофилов пуповинной крови и интенсивность кислородного взрыва нейтрофилов пуповинной крови у недоношенных и доношенных новорожденных.

#### Методы измерения целевых показателей

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 1 мг 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).

Фенотипические (Fc- $\gamma$  рецепторы CD64, CD16, CD32) и функциональные характеристики (фагоцитарная активность, кислородный взрыв) 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. Определение экспрессии Fc- $\gamma$  рецепторов осуществляли с помощью многоцветной проточной цитофлуориметрии на анализаторе Navios (Beckman Coulter, США) в соответствии с протоколом производителя. В качестве красителей использовали конъюгированные с флуоресцентными метками антитела против CD64, CD16, CD32 и соответствующие им изотипические контроли (Beckman Coulter, США) для исключения аутофлуоресценции образцов. 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. Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения Kaluza (Beckman Coulter, США).

Фагоцитарную активность нейтрофилов пуповинной крови определяли с помощью проточной цитометрии с использованием FITC-меченых *Escherichia coli* IngoFlowEx Kit (EXBIO Praha, Чешская Республика). Для этого в образцы цельной пуповинной крови объемом 50 мкл добавляли 10 мкл суспензии флуоресцентно меченых *E. coli* и инкубировали при 37 °C на водяной бане в течение 10 мин. Затем осуществляли лизис эритроцитов добавлением 2 мл фиксирующего/лизирующего реагента и инкубацией при комнатной температуре (20 °C) в течение 20 мин. Сразу после осуществления цитометрический анализ. Одновременно с каждой реакцией проводили контроль посредством анализа образцов без добавления *E. coli* для различения фагоцитирующих и нефагоцитирующих клеток.

Количественную оценку кислородного взрыва *in vitro* проводили с использованием набора реагентов FagoFlowEx Kit (EXBIO Praha, Чешская Республика). 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 мМ дигидрородамином 123 (DHR123) в течение 20 мин при 37 °C на водяной бане. В процессе окисления DHR123 образуется флуоресцентный родамин 123, который регистрируется проточным цитометром Navios (Beckman Coulter, США). Результаты оценивали путем расчета индекса стимуляции (ИС): отношение средней интенсивности флуоресценции активированных гранулоцитов в стимулированных образцах и отрицательных контролей (образцы без стимуляции *E. coli*).

Оценка фенотипа и функциональных характеристик нейтрофилов выполнялась не позднее 8 ч после взятия биоматериала в лаборатории НМИЦ им. Дмитрия Рогачёва. Хранение и транспортировку образцов осуществляли при комнатной температуре (18–25 °C) с сохранением холодовой цепи.

#### Анализ в подгруппах

Фенотипические и функциональные особенности нейтрофилов периферической крови были изучены в подгруппах, сформированных на основе гестационного возраста недоношенных новорожденных, у детей, рожденных в возрасте 25–31 и 32–36 нед.

#### Этическая экспертиза

Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом ФГБУ НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва Минздрава России (протокол № 119 от 28.09.2015).

#### Статистические процедуры

##### Расчет размера выборки

Необходимый размер выборки предварительно не рассчитывали.

##### Статистические методы

Анализ данных выполнен с использованием пакета статистических программ STATISTICA v. 9.1 (StatSoft Inc., США). Описание количественных признаков выполнено с указанием медианы (25-й; 75-й процентиля). Сравнение независимых выборок по количественным показателям проведено с использованием *U*-теста Манна–Уитни, по качественным (бинарным) признакам — с помощью

двухстороннего точного критерия Фишера. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Характеристика участников исследования

В исследование были включены 102 недоношенных и 30 доношенных новорожденных. Общая характеристика новорожденных представлена в табл. 1.

### Основные результаты исследования

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 (см. рис.). Продолжительность периода абсолютной нейтропении (последовательное выявление у новорожденного абсолютного числа нейтрофилов  $< 1,5 \times 10^9/\text{л}$ ) варьировала от 1 до 7 сут.

Дети с абсолютной нейтропенией имели более низкие показатели массы тела при рождении и оценки по шкале APGAR на 1-й мин жизни, чем новорожденные без абсолютной нейтропении. Кроме того, во время беременности у недоношенных новорожденных с абсолютной нейтропенией чаще устанавливали синдром задержки роста плода (табл. 2). Вместе с тем при сравнении групп недо-

ношенных детей в зависимости от факта развития абсолютной нейтропении не выявлено различий по частоте таких патологических состояний течения беременности, как гестоз, инфекции (острые респираторные инфекции, обострение хронических очагов инфекций, урогенитальные инфекции), маловодие, многоводие и угроза прерывания беременности. Частота основных интранатальных характеристик (характер околоплодных вод, длительность безводного промежутка) в сравниваемых группах была сопоставимой.

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 (табл. 3). Не было обнаружено связи абсолютной нейтропении и с риском летального исхода недоношенных новорожденных в первые 28 сут жизни.

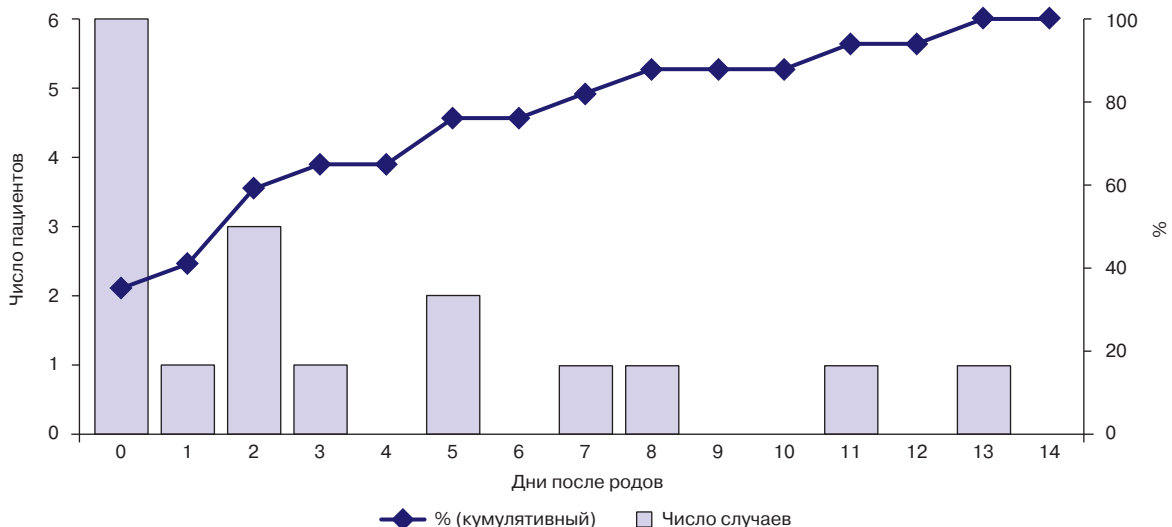
### Дополнительные результаты исследования

У недоношенных новорожденных в сравнении с доношенными отмечена более высокая экспрессия нейтрофилами пуповинной крови CD64 и, напротив, низкая экспрессия CD16, а также более низкие значения показателей, отражающих функциональные свойства нейтрофилов (фагоцитарная активность, интенсивность кислородного взрыва) (табл. 4).

**Таблица 1.** Характеристики включенных в исследование групп недоношенных и доношенных новорожденных  
**Table 1.** Characteristics of premature and mature infants' groups included to the study

Показатели	Недоношенные новорожденные, n = 102	Доношенные новорожденные, n = 30
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-й мин, баллы min-max	6 (5; 6) 4-7	8 (8; 8) 8-8
APGAR на 5-й мин, баллы min-max	7 (7; 7) 6-7	9 (9; 9) 8-9

**Рис.** Возраст обнаружения первого эпизода абсолютной нейтропении у недоношенных новорожденных  
**Fig.** The age of first episode of absolute neutropenia in premature infants



**Таблица 2.** Сравнительная характеристика недоношенных новорожденных в зависимости от развития абсолютной нейтропении  
**Table 2.** Comparative analysis of premature infants according to absolute neutropenia development

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)	0,028
Гестационный возраст, нед	31 (29; 33)	29 (28; 31)	0,309
APGAR на 1-й мин жизни, баллы	6 (5; 7)	6 (5; 6)	0,047
APGAR на 5-й мин жизни, баллы	7 (7; 7)	7 (6; 7)	0,252
Синдром задержки роста плода, абс. (%)	9 (11)	7 (41)	0,005
У матери во время беременности, абс. (%)			
• преэклампсия	18 (21)	5 (29)	0,526
• ОРВИ	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). ОРВИ — острые респираторные инфекции.

Note. АН(-)/(+) — premature infants without/with absolute neutropenia in first 14 days of life (at least once). ОРВИ — acute respiratory infections.

**Таблица 3.** Риск развития инфекционных осложнений и летального исхода у недоношенных новорожденных с абсолютной нейтропенией

**Table 3.** Risk of infectious complications and lethal outcome development in premature infants with absolute neutropenia

Показатели	АН(-), n = 85	АН(+), n = 17	p
Локализованные инфекции, абс. (%)	53 (62)	10 (59)	0,999
Сепсис, абс. (%)	19 (22)	5 (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).

Note. АН(-)/(+) — premature infants without/with absolute neutropenia in first 14 days of life (at least once).

**Таблица 4.** Фенотипические и функциональные характеристики нейтрофилов пуповинной крови недоношенных и доношенных новорожденных

**Table 4.** Phenotypical and functional features of cord blood neutrophils of premature and mature infants

Показатели	Недоношенные новорожденные, n = 102	Доношенные новорожденные, n = 30	p
CD64, MFI	6,8 (5,25; 9,9)	4,45 (3,0; 5,5)	0,001
CD32, MFI	11,2 (7,8; 13,3)	10,0 (7,1; 14,6)	0,950
CD16, MFI	78,6 (70,9; 98,7)	109,4 (89,4; 126,1)	0,001
Фагоцитирующие нейтрофилы, %	81,9 (74,5; 86,8)	92,5 (85,5; 94,9)	0,001
Индекс стимуляции	15,3 (11,5; 23,4)	34,8 (29,9; 48,3)	0,001

Примечание. MFI — значение интенсивности флуоресценции. Индекс стимуляции — сравнительная характеристика интенсивности кислородного взрыва, рассчитывается как отношение MFI нейтрофилов, стимулированных *E. coli*, к MFI нейтрофилов отрицательного контроля (без стимуляции *E. coli*).

Note. MFI — mean fluorescent intensity. Stimulation index — comparative analysis of respiratory burst intensity (calculated as ratio of MFI of neutrophils stimulated by *E. coli*), to MFI of neutrophils of negative control (without *E. coli* stimulation).

### Анализ в подгруппах

У недоношенных новорожденных с гестационным возрастом 25–31 нед выявлены относительно низкий уровень экспрессии нейтрофилами пуповинной крови CD16 и более низкие значения индекса стимуляции (характеристика величины кислородного взрыва) (табл. 5). Статистически значимых различий по другим показателям обнаружено не было.

### ОБСУЖДЕНИЕ

#### Резюме основного результата исследования

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 абсолютной нейтропении и с риском летального исхода недоношенных новорожденных.

**Таблица 5.** Фенотипические и функциональные характеристики нейтрофилов пуповинной крови недоношенных новорожденных с разным гестационным возрастом

**Table 5.** Phenotypical and functional features of cord blood neutrophils of premature infants with different gestational age

Показатели	Гестационный возраст		p
	25–31 нед, n = 58	32–36 нед, n = 44	
CD64, MFI	7,4 (5,2; 10,7)	6,65 (5,2; 9,6)	0,537
CD32, MFI	11,6 (8,6; 13,2)	10,1 (6,35; 13,5)	0,381
CD16, MFI	75,7 (69,1; 88,7)	90,8 (73,3; 114,9)	0,046
Фагоцитирующие нейтрофилы, %	79,3 (70,2; 83,4)	81,5 (78,1; 85,9)	0,135
Индекс стимуляции	11,3 (10,7; 13,4)	23,90 (19,7; 31,1)	0,001

*Примечание.* MFI — значение интенсивности флуоресценции. Индекс стимуляции — сравнительная характеристика интенсивности кислородного взрыва, рассчитывается как отношение MFI нейтрофилов, стимулированных *E. coli*, к MFI нейтрофилов отрицательного контроля (без стимуляции *E. coli*).

*Note.* MFI — mean fluorescent intensity. Stimulation index — comparative analysis of respiratory burst intensity (calculated as ratio of MFI of neutrophils stimulated by *E. coli*), to MFI of neutrophils of negative control (without *E. coli* stimulation).

### Ограничения исследования

Прямое сравнение риска развития инфекционных осложнений и летального исхода у недоношенных новорожденных без поправки на вмешивающиеся факторы не дает полного представления об ассоциации абсолютной нейтропении с исходами.

Следует учитывать, что нейтрофилы проявляют чувствительность к различным изменениям внешней среды (в т.ч. к факторам, обусловленным взятием образцов крови, их хранением и транспортировкой в лабораторию), которые способны приводить к их спонтанной активации и искажению полученных результатов исследований.

### Интерпретация результатов исследования

Известно, что у недоношенных новорожденных, в особенности с ОНМТ и экстремально низкой массой тела (ЭНМТ), чаще наблюдается уменьшение абсолютного числа нейтрофилов < 1500/мкл по сравнению с доношенными новорожденными [10]. Кроме того, данные группы недоношенных новорожденных характеризуются повышенным риском развития неонатального сепсиса и некротического энтероколита [10]. 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 [8, 14, 15].

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.

Результаты ограниченного числа исследований свидетельствуют о том, что нейтрофилы недоношенных детей с ОНМТ и ЭНМТ не обладают функциональной активностью в той же степени, что и у доношенных новорожденных и взрослых [22, 23]. Данная дисфункция объяснялась физиологической незрелостью компонентов иммунной системы [24]. Однако функциональная недостаточность нейтрофи-

лов недоношенных может быть объяснена необходимостью поддержания иммунологической толерантности плода.

Нами показана сниженная фагоцитарная активность нейтрофилов у недоношенных новорожденных в сравнении с доношенными новорожденными. Интенсивность кислородного взрыва также снижена, причем у недоношенных с меньшим гестационным возрастом данная недостаточность выражена сильнее. Учитывая результаты оценки экспрессии Fc-gamma R на поверхности нейтрофилов новорожденных различного гестационного возраста, можно сделать предположение, что у недоношенных новорожденных за опсонофагоцитарные реакции отвечает Fc-gamma RIII (CD16) (а не Fc-gamma RI, как у взрослых [25]), так как повышение экспрессии CD16 на поверхности гранулоцитов приводит к стимуляции фагоцитоза. Также было выявлено, что у недоношенных детей экспрессия Fc-gamma RI (CD64) значительно повышена при рождении (по сравнению с доношенными новорожденными).

В проведенном нами исследовании анализ в подгруппах недоношенных с разным гестационным возрастом показал сопоставимые результаты фагоцитарной активности нейтрофилов. Ввиду выявленного значительного различия в интенсивности кислородного взрыва нейтрофилов между этими подгруппами можно предположить, что основное различие между нейтрофилами разной степени недоношенности заключается в эффективности внутриклеточных бактерицидных реакций после фагоцитоза.

Таким образом, именно функциональные особенности нейтрофилов недоношенных новорожденных могут predispose к развитию инфекционных осложнений в раннем неонатальном периоде. Дальнейшее 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.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Абсолютная нейтропения у недоношенных новорожденных в первые 14 сут жизни не ассоциирована с повышением риска развития неонатальных инфекций и наступления летального исхода. Показана сниженная способность нейтрофилов пуповинной крови недоношенных новорожденных к фагоцитозу и кислородному взрыву. При этом недостаток функциональной активности нейтрофилов может быть обусловлен особенностями экспрессии ими Fc-gamma рецепторов. Дальнейшее изучение точных механизмов становления иммунной системы плода

и недоношенного новорожденного послужит базой для более глубокого понимания патогенетических основ заболеваний перинатального периода и позволит разработать дифференцированный подход к профилактике тяжелых осложнений заболеваний перинатального периода.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

#### FINANCING SOURCE

Not specified.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

#### CONFLICT OF INTERESTS

Not declared.

#### ORCID/SCOPUS AUTHOR ID

**В. Е. Мухин**

<https://orcid.org/0000-0001-8973-7890>

**Л. Л. Панкратьева**

<https://orcid.org/0000-0002-1339-4155>

**О. Г. Милева**

<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=56175448800>

**М. Н. Ярцев**

<https://orcid.org/0000-0003-0952-2801>

**Н. Н. Володин**

<https://orcid.org/0000-0002-2667-8229>

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Chow S, Chow R, Popovic M, et al. A Selected Review of the Mortality Rates of Neonatal Intensive Care Units. *Front Public Health*. 2015;3:225. doi: 10.3389/fpubh.2015.00225.
2. Fleischmann-Struzek C, Goldfarb DM, Schlattmann P, et al. The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review. *Lancet Respir Med*. 2018;6(3):223–230. doi: 10.1016/S2213-2600(18)30063-8.
3. Yu JC, Khodadadi H, Malik A, et al. Innate Immunity of Neonates and Infants. *Front Immunol*. 2018;9:1759. doi: 10.3389/fimmu.2018.01759.
4. Lawrence SM, Corriden R, Nizet V. Age-Appropriate Functions and Dysfunctions of the Neonatal Neutrophil. *Front Pediatr*. 2017;5:23. doi: 10.3389/fped.2017.00023.
5. Lajqi T, Pöschl J, Frommhold D, Hudalla H. The Role of Microbiota in Neutrophil Regulation and Adaptation in Newborns. *Front Immunol*. 2020;11:568685. doi: 10.3389/fimmu.2020.568685.
6. Rodriguez J, Jordan S, Mutic A, Thul T. The Neonatal Microbiome: Implications for Neonatal Intensive Care Unit Nurses. *MCN Am J Matern Child Nurs*. 2017;42(6):332–337. doi: 10.1097/NMC.0000000000000375.
7. Ge Y, Gong M, Colliou N, et al. Neonatal intestinal immune regulation by the commensal bacterium, P. UF1. *Mucosal Immunol*. 2019;12(2):434–444. doi: 10.1038/s41385-018-0125-1.
8. Teng RJ, Wu TJ, Garrison R. Early neutropenia is not associated with an increased rate of nosocomial infection in very low-birth-weight infants. *J Perinatol*. 2009; 29(3):219–224. doi: 10.1038/jp.2008.202.
9. Nittala S, Subbarao GC, Maheshwari A. Evaluation of neutropenia and neutrophilia in preterm infants. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012;25(Suppl 5):100–103. doi: 10.3109/14767058.2012.715468.
10. Christensen RD, Yoder BA, Baer VL, Snow GL. Early-onset neutropenia in small-for-gestational-age infants. *Pediatrics*. 2015;136(5):e1259–e1267. doi: 10.1542/peds.2015-1638.
11. Akhil M, Christensen RD. Neutropenia in the neonatal intensive care unit. *NeoReviews*. 2004;5(10):e431–e443. doi: 10.1542/neo.5-10-e431.
12. Link DC, Kunter G, Kasai Y, et al. Distinct patterns of mutations occurring in de novo AML versus AML arising in the setting of severe congenital neutropenia. *Blood*. 2007;110(5):1648–1655. doi: 10.1182/blood-2007-03-081216.
13. Maheshwari A. Neutropenia in the newborn. *Curr Opin Hematol*. 2014;21(1):43–49. doi: 10.1097/MOH.000000000000010.
14. Christensen RD, Colhoun DA, Rimszo LM. A practical approach to evaluating and treating neutropenia in the neonatal intensive care unit. *Clin Perinatal*. 2000; 27(3):577–601. doi: 10.1016/s0095-5108(05)70040-3.
15. Manzoni P, Farina D, Monetti C. Early-onset neutropenia is a risk factor for Candida colonization in very low-birth-weight neonates. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;57(1):77–83. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.10.018.
16. 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. [Volodin NN, Rumyantsev AG, Shcherbina AYU. The use of recombinant granulocytic colony-stimulating factors in the neonate. Indications and clinical recommendations. *Voprosy prakticheskoy pediatrii = Issues of Practical Pediatrics*. 2012;7(4):44–49. (In Russ).]
17. Wang Y, Jönsson F. Expression, Role, and Regulation of Neutrophil Fcγ Receptors. *Front Immunol*. 2019;10:1958. doi: 10.3389/fimmu.2019.01958.
18. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:181–218. doi: 10.1146/annurev-pathol-020712-164023.
19. Le Lann L, Jouve PE, Alarcón-Riquelme M, et al. Standardization procedure for flow cytometry data harmonization in prospective multicenter studies. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–8. doi: 10.1038/s41598-020-68468-3.
20. Мухин В.Е., Праулова Д.А., Панкратьева Л.Л., Милева О.И., Румянцев А.Г., Володин Н.Н. Экспрессия Fc-гамма рецепторов нейтрофилов у недоношенных детей различного гестационного возраста // *Вопросы современной педиатрии*. — 2016. — Т. 15. — № 3. — С. 273–278. [Mukhin VE, Praulova DA, Pankratyeva LL, et al. Expression of Fc-Gamma Receptors of Neutrophils in Preterm Infants of Different Gestational Age. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*. 2016;15(3):273–278. (In Russ).] doi: 10.15690/vsp.v15i3.1565.
21. *Неонатология: национальное руководство* / под ред. Н.Н. Володиной. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009. 848 с. [*Neonatologiya: natsional'noe rukovodstvo*. Volodin NN, ed. Moscow: GEOTAR-Media; 2009. 848 p. (In Russ).]
22. Ulrichs F, Speer CP. Neutrophil function in preterm and term infants. *Neoreviews*. 2004;5:e417–e429. doi: 10.1016/j.trsl.2017.08.003.
23. Raymond SL, Mathias BJ, Murphy TJ, et al. Neutrophil chemotaxis and transcriptomics in term and preterm neonates. *Transl Res*. 2017;190:4–15. doi: 10.1016/j.trsl.2017.08.003.
24. Melville JM, Moss TJM. The immune consequences of preterm birth. *Front Neurosci*. 2013;7:79. doi: 10.3389/fnins.2013.00079.
25. Rivas-Fuentes S, García-García E, Nieto-Castañeda G, Rosales C. Fcγ receptors exhibit different phagocytosis potential in human neutrophils. *Cell Immunol*. 2010; 263(1):114–121. doi: 10.1016/j.cellimm.2010.03.006.