

Значение функционального анализа фагоцитов для диагностики неонатального сепсиса

И.В. Образцов¹, Ю.В. Жиркова^{1,2}, Е.В. Черникова¹, А.И. Крапивкин¹, О.Ю. Брунова¹,
А.Т. Абдраисова¹, Н.В. Давыдова¹

¹ГБУЗ «Детская городская клиническая больница №9 им. Г.Н. Сперанского» ДЗМ, Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия

Feasibility of phagocytes functional testing in neonatal sepsis diagnostics

I.V. Obratsov¹, Yu.V. Zhirkova^{1,2}, E.V. Chernikova¹, A.I. Krapivkin¹, O.Yu. Brunova¹,
A.T. Abdraisova¹, N.V. Davydova¹

¹Speransky City Children Hospital, Moscow, Russia;

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Проблема сепсиса новорожденных по-прежнему актуальна для здравоохранения России и зарубежных стран в связи с высокой летальностью и рефрактерностью к терапии. Генерализация инфекции у новорожденных реализуется за счет развития дефицита врожденного иммунитета, проявляющегося, в частности, нарушением активности нейтрофилов и моноцитов. В настоящее время в повседневную практику диагностики неонатального сепсиса не внедрены методы функционального тестирования фагоцитов. Цель исследования. Изучение возможности на основании оценки содержания биомаркеров сепсиса (С-реактивный белок, прокальцитонин, лактат, CD64, CD16, HLA-DR) дифференцировать патогенез органной дисфункции у новорожденных в отделении реанимации и интенсивной терапии.

Материалы и методы. Оценили поверхностную экспрессию нейтрофилов CD64 и CD16 и моноцитов HLA-DR у новорожденных пациентов с течением сепсиса или тяжелой асфиксией в группах, характеризующихся различным генезом полиорганной недостаточности — сепсис, асфиксия, сочетанный, а также различным исходом госпитализации в отделение реанимации и интенсивной терапии — выживших и умерших.

Результаты. Показано достоверное увеличение экспрессии CD64 нейтрофилами и снижение экспрессии HLA-DR моноцитами при инфекционном и сочетанном генезе полиорганной недостаточности по сравнению с тяжелой асфиксией; умершие пациенты характеризовались сниженной экспрессией CD16.

Заключение. Выявленные закономерности могут лечь в основу сочетанного использования предлагаемых показателей функциональной активности фагоцитов вместе с конвенциональными биомаркерами с целью повышения их прогностических и предиктивных способностей.

Ключевые слова: новорожденные, сепсис, нейтрофилы, моноциты, CD16, CD64, HLA-DR.

Для цитирования: Образцов И.В., Жиркова Ю.В., Черникова Е.В., Крапивкин А.И., Брунова О.Ю., Абдраисова А.Т., Давыдова Н.В. Значение функционального анализа фагоцитов для диагностики неонатального сепсиса. Рос вестн перинатол и педиатр 2023; 68:(1): 24–29. DOI: 10.21508/1027–4065–2023–68–1–24–29

Neonatal sepsis is a problem still relevant for healthcare in Russia and worldwide due to high mortality and resistance to treatment. Generalization of infection in newborns occurs because of innate immunity deficiency that particularly leads to neutrophil and monocyte malfunction. Nowadays clinical practice of neonatal sepsis diagnostics does not include phagocytes functional testing.

Purpose. The study aims at evaluating the ability of sepsis biomarkers (CRP, PCT, lactate, CD64, CD16, HLA-DR) to differentiate the pathogenesis of organ dysfunction in newborns in the ICU setting.

Material and methods. We assessed the surface expression of neutrophil CD64 and CD16, as well as monocytic HLA-DR in newborn ICU patients with different genesis of multiple organ failure — sepsis, asphyxia and combined; as well as different outcomes of hospitalization in the ICU — survivors and deaths.

Results. We have shown a significant increase in the neutrophil CD64 expression and a decrease in the monocytic HLA-DR in infectious and combined genesis of multiple organ failure compared with severe asphyxia; deaths were associated with reduced expression of neutrophil CD16.

Conclusion. Our data could substantiate combined use of the phagocytes functional testing indicators together with conventional sepsis biomarkers in order to increase their prognostic and predictive value.

Key words: newborns, sepsis, neutrophils, monocytes, CD16, CD64, HLA-DR.

For citation: Obratsov I.V., Zhirkova Yu.V., Chernikova E.V., Krapivkin A.I., Brunova O.Yu., Abdraisova A.T., Davydova N.V. Feasibility of phagocytes functional assay in neonatal sepsis diagnostics. Ros Vestn Perinatol i PEDIATR 2023; 68:(1): 24–29 (in Russ.). DOI: 10.21508/1027–4065–2023–68–1–24–29

Согласно современным представлениям сепсис определяется как угрожающая жизни органная недостаточность, вызванная дисрегуляцией иммунного ответа на инфекцию [1]. Сепсис, развивающийся в течение первых 30 дней жизни, называют неонатальным. Заболеваемость неонатальным сепсисом составляет 0,5–8,0‰. Заболевание характери-

зуется высокой летальностью, которая при раннем развитии может достигать 40%, при позднем — 20%. К факторам риска развития сепсиса относятся низкая масса при рождении, низкие оценки по шкале Апгар, материнский хориоамнионит и колонизация стрептококками группы В [2]. Диагностика сепсиса у новорожденных сложна из-за неспецифичности

клинических проявлений: помимо температурной нестабильности, гемодинамических нарушений и изменения сознания, заболевание на ранних этапах может проявляться только изменениями дыхания, периферической циркуляции или поведения новорожденного [3]. В связи с этим любое подозрение на развитие сепсиса у новорожденного требует выполнения развернутого лабораторного обследования, включающего оценку формулы крови, воспалительных биомаркеров, таких как С-реактивный белок и прокальцитонин, а также бактериологические исследования крови, мочи, спинномозговой жидкости и других сред по показаниям. Диагностическая точность конвенциональных лабораторных маркеров неонатального сепсиса высока и составляет в среднем около 90% [4]. Тем не менее сложная последовательность появления биомаркеров в ответ на развитие инфекции, а также индивидуальные особенности иммунного реагирования организма новорожденного могут стать источником диагностических ошибок при раннем выявлении септического процесса [5]. Поэтому не теряют актуальность поиск и внедрение в практику новых биомаркеров неонатального сепсиса.

Предложено большое количество перспективных биомаркеров сепсиса новорожденных. К ним относятся, в частности, цитокины и хемокины: интерлейкины (ИЛ) 6, 8 и 10, RANTES и др.; молекулы адгезии (sTREM-1), сывороточный амилоид А и гепцидин [6–12].

Особое внимание исследователей заслужила оценка функциональной активности фагоцитов в контексте ранней диагностики сепсиса. Система фаго-

цитов (в первую очередь нейтрофилов и моноцитов) одна из первых реагирует на минимальные изменения гомеостаза под воздействием инфекционных агентов и других повреждающих факторов [13]. Процесс фагоцитоза усиливается благодаря связыванию патогенов в иммунные комплексы с иммуноглобулином G (IgG) и активации фагоцитов через рецепторы IgG на поверхности клеточной мембраны. Выделение провоспалительных цитокинов, таких как интерферон-гамма, альфа-фактор некроза опухоли (ФНО), интерлейкин-6 и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, вызывает экспрессию высокоаффинного Fc-рецептора IgG CD64 на мембране нейтрофилов [14]. Мембранная экспрессия CD64 увеличивается при генерализации инфекционного процесса различной этиологии, этот биомаркер предлагается различными авторами к использованию как прогностический и предиктивный при сепсисе [15]. Потеря экспрессии низкоаффинного Fc-рецептора IgG CD16 нейтрофилами показана некоторыми авторами как фактор, ассоциированный с летальным исходом при сепсисе [16]. Функциональное истощение моноцитов при генерализации инфекции связано с потерей поверхностной инфекции HLA-DR. Оценка этого показателя также используется в качестве перспективного биомаркера неонатального сепсиса [17].

Цель исследования: изучение возможности на основании оценки содержания биомаркеров сепсиса (С-реактивный белок, прокальцитонин, лактат, CD64, CD16, HLA-DR) дифференцировать патогенез органной дисфункции у новорожденных в отделении реанимации и интенсивной терапии.

Характеристика детей и методы исследования

Исследовали кровь новорожденных пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии с сепсисом или тяжелой асфиксией (21 человек). Возраст детей составил 10 – 23 дня; срок гестации 27–40 нед; для оценки стабильности показателей исследования проводили на 11–23-и сутки заболевания, образцы крови брали 1–4 раза в зависимости от длительности пребывания пациентов в отделении. Всего проанализировано 43 образца крови. Оценили биомаркеры сепсиса в группах, характеризующихся различным генезом полиорганной недостаточности: сепсис ($n=10$), асфиксия ($n=5$), сочетанный ($n=6$), а также различным исходом госпитализации — выжившие ($n=15$) и умершие ($n=6$).

Образцы крови собирали в вакуумные пробирки Vacuette с литий-гепарином (Франция). Цельную кровь пациентов, стабилизированную гепарином, доставляли в лабораторию в течение 1 ч. Образец крови окрашивали флуоресцентно-мечеными антителами в соответствии с инструкцией производителя. Для исследования указанных биомаркеров использовали следующие панели: CD45-APC / CD64-PE / HLA-DR-PerCP-Cy5.5 и CD45-APC / CD16-PE (BD, США). Затем лизировали

© Коллектив авторов, 2023

Адрес для корреспонденции: Образцов Игорь Владимирович — к.м.н., врач-аллерголог-иммунолог центра аллергологии и иммунологии Детской городской клинической больницы №9 им. Г.Н. Сперанского, ORCID: 0000-0002-6649-853X
e-mail: igor_obraztsov@bk.ru

Жиркова Юлия Викторовна — д.м.н., проф. кафедры детской анестезиологии и интенсивной терапии Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова, и.о. зав. отделением реанимации и интенсивной терапии для новорожденных Детской городской клинической больницы №9 им. Г.Н. Сперанского, ORCID: 0000-0001-7861-6778

Черникова Екатерина Алексеевна — врач-анестезиолог-реаниматолог Детской городской клинической больницы №9 им. Г.Н. Сперанского, ORCID: 0000-0001-9409-7832

Крапивкин Алексей Игоревич — д.м.н., зам. гл. врача по лечебной части Детской городской клинической больницы №9 им. Г.Н. Сперанского, ORCID 0000-0002-4653-9867

Брунова Ольга Юрьевна — зав. отделением реанимации новорожденных Детской городской клинической больницы №9 им. Г.Н. Сперанского, ORCID: 0000-0003-2158-6672

Абдраисова Айгера Таймысовна — врач-анестезиолог-реаниматолог отделения реанимации новорожденных Детской городской клинической больницы №9 им. Г.Н. Сперанского, ORCID: 0000-0001-6141-5873

Давыдова Наталья Владимировна — к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики лаборатории иммунологии Детской городской клинической больницы №9 им. Г.Н. Сперанского, ORCID: 0000-0002-7325-6045
123317 Москва, Шмитовский проезд, д. 29

эритроциты и выполняли цитометрию. Лизис эритроцитов проводили раствором BD FACS Lysing solution (BD, США); цитометрию выполняли при помощи инструмента FACSCanto II (BD, США). Выделяли регион CD45-позитивных событий, затем по морфологии выделяли моноциты и нейтрофилы. Среди нейтрофилов определяли среднюю интенсивность флуоресценции CD64 и CD16, среди моноцитов определяли среднюю интенсивность флуоресценции HLA-DR.

Статистическую обработку полученных данных выполняли в пакете IBM SPSS 21 (IBM, США). Построены описательные статистики; выполнена проверка на нормальность на основании критерия Шапиро–Уилка. Поскольку полученные распределения статистически значимо отличались от нормального, межгрупповые сопоставления выполняли на основании критерия Манна–Уитни для парных выборок и Краскела–Уоллиса для множественных

сопоставлений. Корреляцию между показателями оценивали на основании коэффициента ρ Спирмена, силу корреляции определяли по шкале Чеддока, где $\rho < 0,33$ — слабая взаимосвязь; $0,33 < \rho < 0,66$ — взаимосвязь средней силы и $\rho > 0,66$ — сильная взаимосвязь. Численные значения показателей представлены в виде диапазона между 25-м и 75-м перцентильями.

Результаты

Согласно полученным данным уровень лактата не различается в группах с различным генезом полиорганной недостаточности. Сочетанный генез характеризуется более высоким уровнем С-реактивного белка (2,88–41,0 мг/л по сравнению с 1,00–15,8 мг/л при сепсисе и 0,43–2,98 мг/л при асфиксии); уровень прокальцитонина в группе асфиксии (0,01–1,05 нг/мл) достоверно ниже, чем при инфекционном (0,18–4,30 нг/мл) и смешанном (0,15–4,90 нг/мл) генезе полиорганной

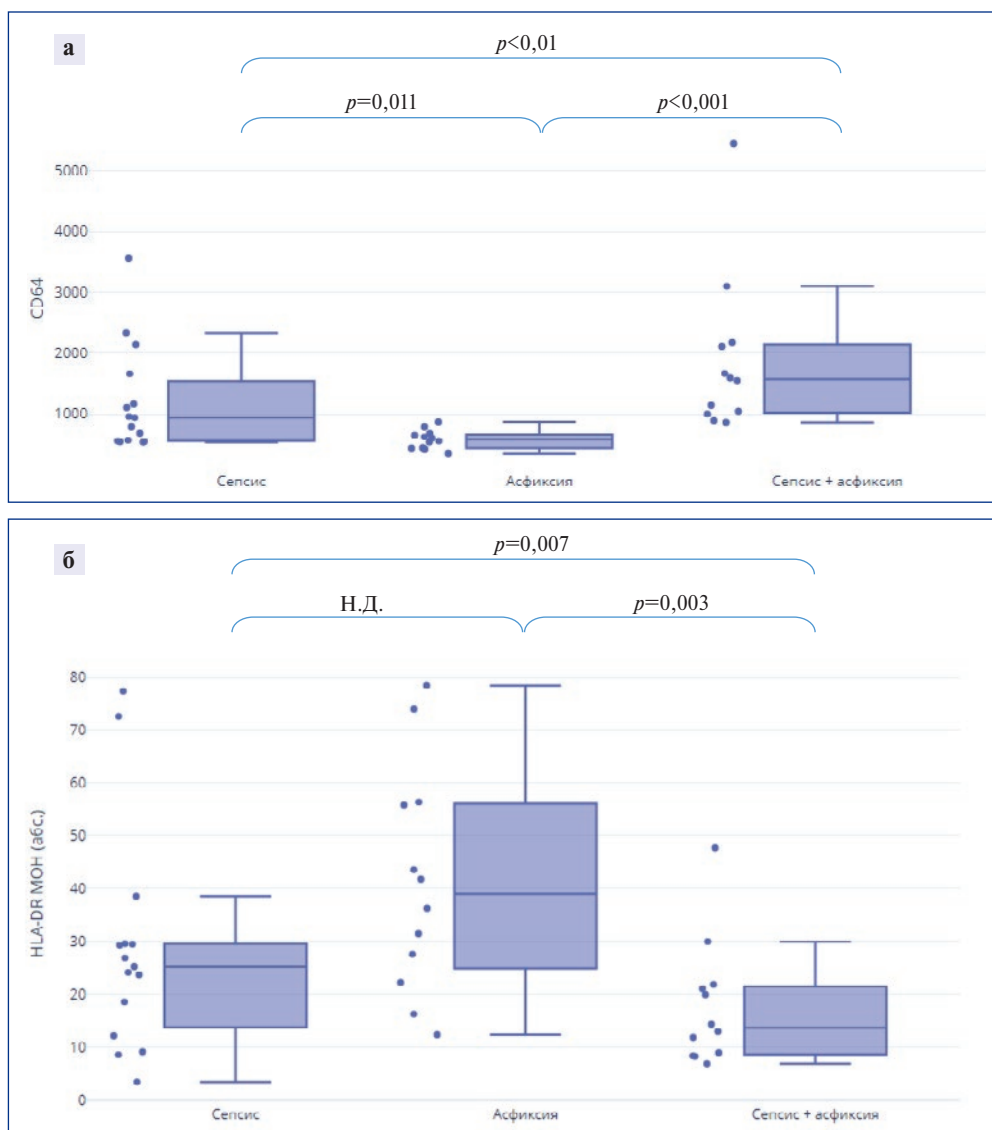


Рис. 1. CD64 (отн. ед. флуор.; а) и HLA-DR (отн. ед. флуор.; б) при различном генезе полиорганной недостаточности.

Fig. 1. CD64 (relative. fluor. units; а) and HLA-DR (relative. fluor. units; б) in different genesis of multiorgan failure.

НД — недостоверно.

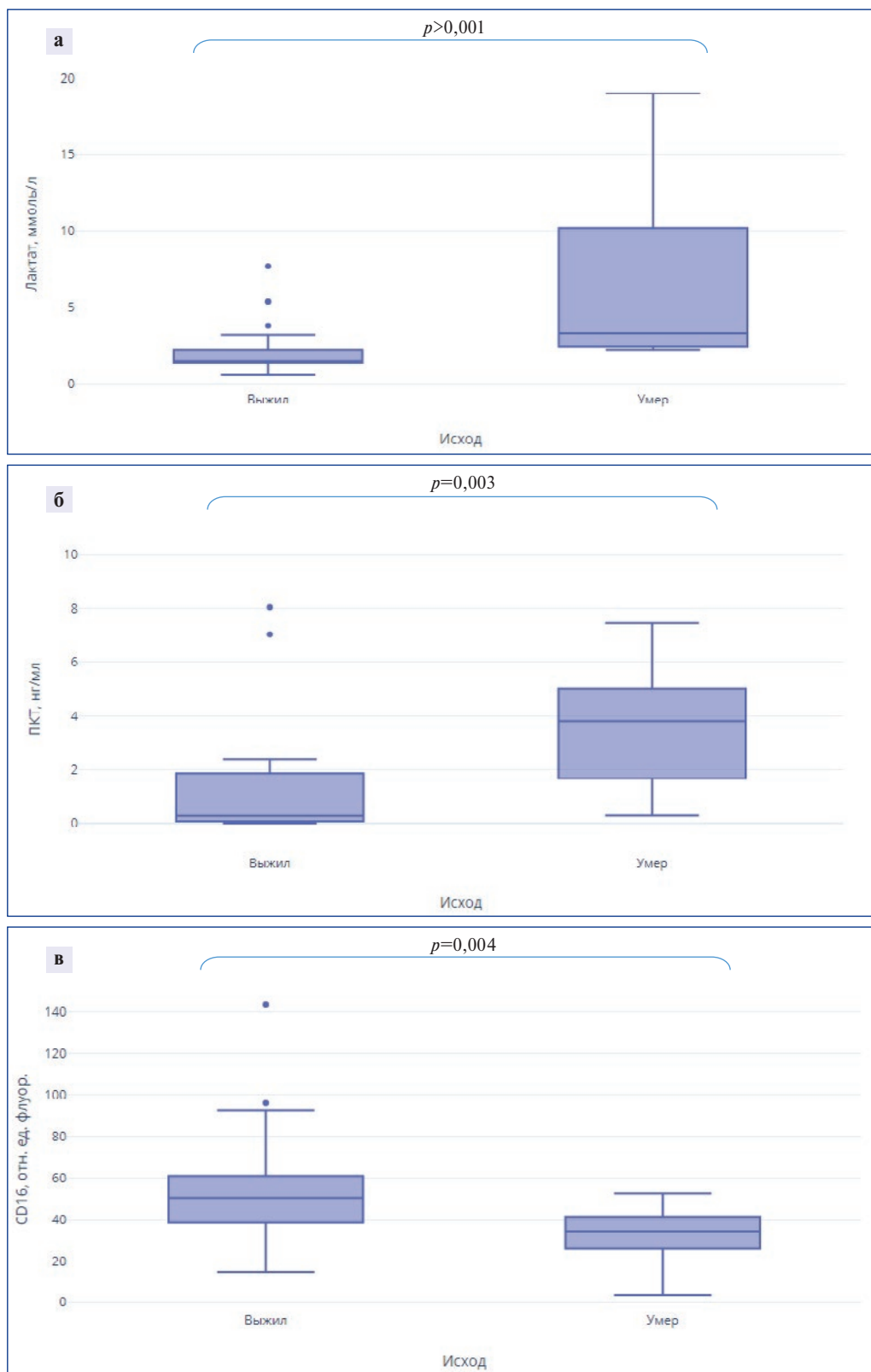


Рис. 2. Уровень лактата (а), прокальцитонина (б) и CD16 (в) при различных исходах.
Fig. 2. Lactate (а), PCT (б) and CD16 (в) in different outcomes.

недостаточности. Асфиксия также характеризуется меньшим уровнем нейтрофилов CD64 (433–674 отн. ед. флуор.); показатель достоверно выше в группе сепсиса (552–1660 отн. ед. флуор.) и наиболее высокий — в группе сочетанной полиорганной недостаточности (1010–2162 отн. ед. флуор.; рис. 1, а). Экспрессия HLA-DR моноцитами не различается в группах сепсиса и асфиксии (12,2–29,6 и 23,6–56,3 отн. ед. флуор. соответственно), в то же время этот показатель достоверно снижен у пациентов с сочетанной патологией и составляет 8,56–21,7 отн. ед. флуор. (рис. 1, б).

Умершие пациенты характеризовались значительным повышением уровня лактата (2,3–10,3 ммоль/л) и прокальцитонина (1,18–5,25 нг/мл) по сравнению с таковыми у выживших (1,4–2,08 ммоль/л и 0,06–1,38 нг/мл); кроме того, эта группа характеризовалась снижением экспрессии CD16 нейтрофилами (25,5–42,8 и 37,8–62,3 отн. ед. флуор. соответственно; рис. 2). Вариация показателей между пробами, взятыми от одного пациента, составила 13,0–81,7% для CD64, 22,6–40,7% для CD16 и 24,2–66,0% для моноцитов HLA-DR.

Корреляционный анализ выявил статистически значимую прямую взаимосвязь средней силы между CD64 и уровнем лактата ($\rho=0,443$; $p=0,005$) и С-реактивным белком ($\rho=0,496$; $p=0,001$), а также обратную — между уровнем CD16 и лактата ($\rho=-0,417$; $p=0,008$).

Обсуждение

Полученные данные демонстрируют отсутствие достоверных различий между уровнем С-реактивного белка в группах сепсиса и тяжелой асфиксии, а также между уровнем прокальцитонина в группах сепсиса и полиорганной недостаточности сочетанного генеза. Это может быть объяснено как малым размером обследуемой совокупности, так и недостаточной точностью биомаркеров при использовании по отдельности. Экспрессия CD64 оказалась наименьшей

у пациентов с асфиксией, при этом она достоверно увеличивается в группе с течением сепсиса, а в группе сочетанного генеза полиорганной недостаточности экспрессия CD64 максимальна. Эти данные полностью согласуются с описанной в литературе концепцией усиления экспрессии CD64 нейтрофилами на фоне течения инфекционного процесса, причем, по нашим данным, продукты гипоксического повреждения тканей еще больше стимулируют этот процесс [14]. Аналогичным образом можно наблюдать более интенсивную потерю HLA-DR моноцитами при сепсисе, развившемся на фоне асфиксии, в то время как уровень HLA-DR моноцитов в группах изолированного сепсиса и асфиксии достоверно не различается. Таким образом, одновременное применение конвенциональных биомаркеров сепсиса вместе с показателями функциональной активности фагоцитов позволит более точно судить о патогенезе полиорганной недостаточности. Потеря CD16 нейтрофилами по нашим данным может быть связана с повышенной вероятностью летального исхода наравне с повышением уровня лактата и прокальцитонина. Эти результаты согласуются с данными М.О.Ф. Нанна и соавт. [16] и дают основание для дальнейшего расширения обследуемой группы с целью улучшения прогностических возможностей биомаркеров, особенно при их комбинированном применении.

Заключение

Показатели функциональной активности фагоцитов (экспрессия CD64 и CD16 нейтрофилами, экспрессия HLA-DR моноцитами) обладают прогностическим потенциалом на клинической модели новорожденных пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии и позволяют дифференцировать инфекционный и неинфекционный генез полиорганной недостаточности, а также определить повышенный риск летального исхода.

ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315(8): 801–810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287
2. Дмитриев А.В., Заплатников А.Л. Неонатальный сепсис: современные диагностические возможности. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского* 2022; 101(1): 140–148. [Dmitriev A.V., Zaplatnikov A.L. Neonatal sepsis: modern diagnostic possibilities. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo* 2022; 101(1): 140–148. (in Russ.)] DOI: 10.24110/0031-403X-2022-101-1-140-148
3. Gilfillan M., Bhandari V. Biomarkers for the diagnosis of neonatal sepsis and necrotizing enterocolitis: Clinical practice guidelines. *Early Hum Dev* 2017; 105: 25–33. DOI: 10.1016/j.earlhumdev.2016.12.002
4. Akhmaltdinova L., Kolesnichenko S., Lavrinenko A., Kadyrova I., Avdienko O., Panibratov L. Influence of Pathogen Type on Neonatal Sepsis Biomarkers. *Int J Inflamm* 2021; 2021: 1009231. DOI: 10.1155/2021/1009231
5. Procianny R.S., Silveira R.C. The challenges of neonatal sepsis management. *J Pediatr (Rio J)* 2020; 96 Suppl 1: 80–86. DOI: 10.1016/j.jped.2019.10.004
6. Sun B., Liang L.F., Li J., Yang D., Zhao X.B., Zhang K.G. A meta-analysis of interleukin-6 as a valid and accurate index in diagnosing early neonatal sepsis. *Int Wound J* 2019; 16(2): 527–533. DOI: 10.1111/iwj.13079
7. Эфендиев А.М., Керимова Н.Т. Клиническая информативность цитокинов при оценке тяжести течения сепсиса. *Российский педиатрический журнал* 2022; 3(1): 360. [Efendiev A.M., Kerimova N.T. Clinical information content of cytokines in assessing the severity of sepsis. *Rossiiskii pediatricheskii zhurnal* 2022; 3(1): 360. (in Russ.)]
8. Omran A., Sobh H., Abdalla M.O., El-Sharkawy S., Rezk A.R., Khashana A. Salivary and Serum Interleukin-10, C-Reac-

- Protein, Mean Platelet Volume, and CRP/MPV Ratio in the Diagnosis of Late-Onset Neonatal Sepsis in Full-Term Neonates. *J Immunol Res* 2021; 2021: 4884537. DOI: 10.1155/2021/4884537
9. Fahmy E.M., Kamel N.M., Abdelsadik A., Botrous O.E., Sheemy M.S., Soliman S.R., Hodeib M.M. Assessment of Interleukin-27 and Chemokine RANTES as Biomarkers for Early Onset Neonatal Sepsis. *Egypt J Immunol* 2020; 27(1): 9–18
 10. Doughty C., O'Driscoll D.N., Smith S., O'Curraín E., Grant T., O'Hare F.M. et al. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1) in neonatal sepsis. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2022; 35(13): 2485–2492. DOI: 10.1080/14767058.2020.1786520
 11. Обедин А.Н., Васильев А.Ю. Значимость новых маркеров для диагностики неонатального сепсиса. *Анестезиология и реаниматология* 2021; 2: 45–49. [Obedin A.N., Vasiliev A.Yu. Significance of new markers for the diagnosis of neonatal sepsis. *Anesteziologiya i reanimatologiya* 2021; 2: 45–49. (in Russ.)] DOI: 10.17116/anaesthesiology202102145
 12. Ho J., Zhang L., Liu X., Wong S.H., Wang M.H.T., Lau B.W.M. et al. Pathological Role and Diagnostic Value of Endogenous Host Defense Peptides in Adult and Neonatal Sepsis: A Systematic Review. *Shock* 2017; 47(6): 673–679. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000815
 13. Мухин В.Е., Панкратьева Л.Л., Милева О.И., Ярцев М.Н., Володин Н.Н. Значение морфологических и функциональных особенностей нейтрофилов недоношенных новорожденных в развитии неонатальных инфекций. *Иммунология* 2021; 42(2): 140–147. [Mukhin V.E., Pankrat'yeva L.L., Mileva O.I., Yartsev M.N., Volodin N.N. Significance of morphological and functional features of neutrophils in premature newborns in the development of neonatal infections. *Immunologiya* 2021; 42(2): 140–147. (in Russ.)] DOI: 10.33029/0206–4952–2021–42–2–140–147
 14. El-Madbouly A.A., El Sehemawy A.A., Eldesoky N.A., Abd Elgalil H.M., Ahmed A.M. Utility of presepsin, soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1, and neutrophil CD64 for early detection of neonatal sepsis. *Infect Drug Resist* 2019; 12: 311–319. DOI: 10.2147/IDR.S191533
 15. Patnaik R., Azim A., Agarwal V. Neutrophil CD64 a Diagnostic and Prognostic Marker of Sepsis in Adult Critically Ill Patients: A Brief Review. *Indian J Crit Care Med* 2020; 24(12): 1242–1250. DOI: 10.5005/jp-journals-10071–23558
 16. Hanna M.O.F., Abdelhameed A.M., Abou-Elalla A.A., Hassan R.M., Kostandi I. Neutrophil and monocyte receptor expression in patients with sepsis: implications for diagnosis and prognosis of sepsis. *Pathog Dis* 2019; 77(6): ftz055. DOI: 10.1093/femspd/ftz055
 17. Khaertynov K.S., Anokhin V.A., Mustafin I.G., Rizyanov A.A., Sofronova S.A., Lubin S.A., Khaertynova A.K. Changes in HLA-DR Expression on Monocytes and Lymphocytes in Neonatal Sepsis. *BioNanoScience* 2018; 2(8): 647–653. DOI: 10.1007/s12668–018–0519–2

Поступила: 08.11.22

Received on: 2022.11.08

Исследование выполнено при поддержке гранта АНО «Московский центр инновационных технологий в здравоохранении» на реализацию научно-практического проекта в сфере медицины, грантовое соглашение №1712–3/22 от 06 апреля 2022 года.

The study was supported by a grant from ANO «Moscow Center for Innovative Technologies in Health Care» for the implementation of a scientific and practical project in the field of medicine, grant agreement No. 1712–3/22 dated April 06, 2022.

Конфликт интересов:

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов и финансовой поддержки, о которых необходимо сообщить.

Conflict of interest:

The authors of this article confirmed the lack of conflict of interest and financial support, which should be reported.