

УДК 616.155.34-053.2:616.155.194.18-056.7

К. С. Макеева¹, И. А. Новикова¹, Ж. В. Зубкова¹, Е. Ф. Мицура²

¹Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»,

²Государственное учреждение

«Республиканский научно-практический центр
радиационной медицины и экологии человека»

г. Гомель, Республика Беларусь

ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА НЕЙТРОФИЛОВ У ДЕТЕЙ С НАСЛЕДСТВЕННЫМ СФЕРОЦИТОЗОМ

Введение

Наследственные гемолитические анемии – это гетерогенная группа генетически обусловленных патологий, для которых характерны укороченный срок жизни эритроцитов и персистирующий гемолиз. Среди этих болезней наследственный сфероцитоз (НС) занимает особое место, являясь одной из наиболее распространенных форм врожденных гемолитических анемий. Эпидемиологические данные показывают, что в Северной Европе и Северной Америке НС встречается с частотой 1 случая на 2000 человек [1].

Тем не менее, эти данные могут не отражать реальную картину, так как существуют субклинические и легкие формы заболевания, которые часто остаются невыявленными. Проявления НС очень разнообразны: от случаев без каких-либо симптомов до серьезных гемолитических анемий, при которых необходимо регулярное переливание эритроцитарной массы [1, 2]. Такое разнообразие клинических проявлений осложняет процесс диагностики и указывает на важность персонализированного подхода к ведению каждого пациента.

Типичные признаки НС включают триаду: желтуху, анемию и увеличение селезенки. Однако течение болезни может осложняться возникновением гематологических кризов разного происхождения – гемолитических, апластических или мегалобластных. Эти кризы являются наиболее серьезными осложнениями НС и требуют немедленного медицинского вмешательства [2].

Современные достижения в области иммунологии и гематологии значительно углубили наше понимание функциональной роли эритроцитов в иммунологических процессах организма. Эритроциты, ранее рассматриваемые исключительно как переносчики кислорода, в настоящее время признаны активными участниками иммунного ответа [3]. Установлено, что эритроциты осуществляют транспортировку иммунных комплексов посредством связывания с рецептором C3-компонента комплемента, что способствует эффективной элиминации этих комплексов фагоцитарной системой организма. Межклеточные взаимодействия эритроцитов и нейтрофилов, опосредованные сиалогликопротеинами, могут ингибировать активацию последних, потенциально модулируя воспалительные реакции [3]. Внутриклеточные компоненты эритроцитов, высвобождаемые в процессе гемолиза, оказывают влияние на общую реактивность организма [3]. Предполагается, что данный эффект может реализовываться через систему нейтрофильных гранулоцитов – ключевого компонента врожденного иммунитета, широко представленного в периферической крови [4]. Нейтрофильные гранулоциты обладают широким спектром функциональных механизмов, обеспечивающих защиту организма от патогенов, – хемотаксисом, фагоцитозом, образованием активных продук-

тов кислорода, формированием внеклеточных ловушек (нетозом) и др. [4]. Особенности функциональных свойств нейтрофилов крови при патологии мембран эритроцитов исследованы мало.

Цель

Изучить параметры функционального статуса нейтрофилов периферической крови у детей с наследственным сфероцитозом.

Материал и методы исследования

Было проанализировано 25 пациентов в возрасте от 1 до 16 лет (медиана возраста 8 лет, мальчиков 72%, девочек 28%), которые наблюдались в онкологическом гематологическом отделении для детей ГУ «РНПЦ радиационной медицины и экологии человека» с диагнозом наследственного сфероцитоза. В исследование не включали пациентов с гемолитическим кризом, с острыми инфекционно-воспалительными заболеваниями, а также после спленэктомии. В качестве контрольной группы было проанализировано 50 сопоставимых по полу и возрасту практически здоровых лиц, не имеющих гематологических заболеваний и без клинико-лабораторных признаков иммунологической недостаточности.

Были взяты образцы периферической крови из кубитальной вены 25 пациентов с НС и 50 детей контрольной группы. Проведена оценка параметров функциональной активности нейтрофилов – фагоцитоза, способности к формированию активных форм кислорода (АФК) и внеклеточных сетей. Материалом для исследования служила взвесь лейкоцитов, полученных из гепаринизированной крови (10 Ед/мл), с содержанием нейтрофилов 5×10^6 клеток/мл. В качестве индуктора применяли инактивированный нагреванием музейный штамм *S. aureus* ATCC 25923, который предварительно был опсонизирован сывороткой здоровых лиц.

Поглотительную активность оценивали в реакции фагоцитоза *S. aureus* с подсчетом процента фагоцитирующих нейтрофилов (фагоцитарный индекс, ФИ) и среднего числа бактерий в клетке (фагоцитарное число, ФЧ). Способность к продукции АФК оценивали в реакции восстановления нитросинего тетразолия (Nitroblue tetrazolium, NBT-тест) в спонтанном (NBT-спонтанный, NBTсп, %) и стимулированном *S. aureus* (NBT-стимулированный, NBTст, %) вариантах теста с микроскопической оценкой окрашенных нейтральным красным препаратов. Учитывали количество нейтрофилов с гранулами диформаза на 200 сосчитанных гранулоцитов.

Способность к формированию внеклеточных сетей оценивали микроскопически по методу И. И. Долгушина и соавторов в нашей модификации [5]. Клетки инкубировали при температуре 37°C в течение 30 (витальный, ранний нетоз, NET30) и 150 мин (суицидальный, поздний нетоз, NET150). Использовали спонтанный (без предварительной активации) и стимулированный *S. aureus* варианты постановки теста (NETсп и NETст соответственно).

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета программ STATISTICA 12.0. Для оценки нормальности распределения использован критерий Шапиро – Уилка. Статистический анализ был проведен с использованием непараметрических методов: критерия Манна – Уитни, коэффициентм Спирмена. Результаты представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (25%;75%). Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Учитывая разнообразие возрастного состава обследуемых пациентов, мы провели отдельный анализ параметров функциональных свойств нейтрофилов у детей с НС

двух возрастных групп: до 5 лет (n=10) – 1 группа, 6 и более лет (n=15) – 2 группа (таблица 1).

Таблица 1 – Параметры функциональной активности нейтрофилов пациентов различных возрастных групп

Параметр, единица измерения	Контрольная группа до 5 лет (n=30)	1 группа, пациенты с НС до 5 лет (n=10)	Контрольная группа 6 и более лет (n=20)	2 группа, пациенты с НС 6 и более лет (n=15)
ФЧ	7,0 (6,0;8,0)	6,0 (5,0;8,0)	7,0 (7,0;8,0)	6,0 (6,0;7,0)*
ФИ, %	66,0 (62,0;68,5)	67,0 (62,0;71,0)	69,0 (65,0;70,0)	67,0 (64,0;72,0)
NBTсп, %	10,0 (8,0;12,0)	11,0 (7,0;14,0)	10,0 (6,0;14,0)	8,0 (6,0;14,0)
NBTст, %	45,0 (39,0;51,0)	53,5 (50,0;58,0)*	47,0 (43,0;52,0)	53,0 (48,0;60,0)*
NET30сп, %	3,0 (2,0;4,0)	5,0 (2,0;10,0)*	2,0 (2,0;3,0)	3,0 (2,0;5,0)*
NET30ст, %	5,0 (4,0;7,0)	8,0 (6,0;11,0)*	4,0 (4,0;6,0)	6,0 (4,0;7,0)*
NET150сп, %	5,5 (4,0;6,5)	9,5 (6,0;12,0)*. **	5,0 (3,0;5,0)	6,0 (4,0;7,0)*
NET150ст, %	9,0 (8,0;10,0)	16,5 (13,0;23,0)*. **	8,0 (7,0;10,0)	10,0 (8,0;12,0)*

* различия значимы в сравнении с контрольной группой соответствующего возраста при $p \leq 0,05$;

** различия значимы в сравнении с группой 2 при $p \leq 0,05$.

Как видно из таблицы 1, у детей с НС до 5 лет отмечались более высокие по сравнению с контрольной группой аналогичного возраста параметры стимулированного NBT-теста ($p=0,002$), а также раннего нетоза (NET30сп, $p=0,028$; NET30ст, $p=0,021$) и позднего нетоза (NET150сп, $p=0,01$; NET150ст, $p=0,00002$). Аналогичные изменения имели место у пациентов 2 группы (6 лет и старше) – повышение продукции АФК в индуцированном варианте теста ($p=0,037$), раннего нетоза (NET30 спонтанный и стимулированный вариант – $p=0,028$ и $p=0,0029$ соответственно), а также показателей позднего нетоза (NET150сп, $p=0,036$; NET150ст, $p=0,016$). У пациентов 2 группы дополнительно обнаруживалось значимое снижение фагоцитарного числа (ФЧ) по сравнению с соответствующей контрольной группой ($p=0,014$) без отклонений по значениям фагоцитарного индекса.

Полученные данные свидетельствуют, что изменения функциональных свойств нейтрофилов у пациентов с НС различного возраста имеют одинаковый вектор. В то же время следует отметить различия по степени повышения нетоза в сравниваемых группах пациентов. Так, значения NET150сп у пациентов младшей возрастной группы были значимо выше значений у детей более 6 лет (9,5% (6,0;12,0) vs 6,0% (4,0;7,0) соответственно, $p=0,04$). Аналогичная особенность отмечалась и по параметрам стимулированного варианта нетоза: NET150ст (16,5% (13,0;23) vs 10,0% (8,0;12,0), $p=0,0005$). Эти результаты могут быть обусловлены возрастными особенностями функционирования нейтрофилов, что потенциально связано с созреванием иммунной системы или различиями в патофизиологических механизмах заболевания в разных возрастных группах. В то же время анализ не выявил значимых различий между возрастными группами по другим параметрам функциональной активности нейтрофилов. В частности, фагоцитарная способность нейтрофилов и их потенциал к генерации активных форм кислорода в спонтанном и стимулированном состояниях оказались сопоставимыми в обеих возрастных группах. Эти наблюдения позволяют предполагать, что возрастные изменения в функциональной активности нейтрофилов у пациентов с НС могут быть характерными только для определенных проявлений их реактивности, в частности – для процесса позднего нетоза.

Заключение

Проведенное исследование выявило статистически значимые отклонения функциональной активности нейтрофилов крови у детей с наследственным сфероцитозом вне гемолитического криза по сравнению с контрольной группой. Наблюдалось усиление оксидативного метаболизма нейтрофилов в ответ на стимуляцию, характеризующееся повышенной продукцией активных форм кислорода (АФК). Кроме того, отмечалась интенсификация процессов формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ), что проявлялось увеличением как раннего, так и позднего спонтанного и индуцированного нетоза.

Примечательно, что наиболее выраженная активация нетоза наблюдалась в младшей возрастной группе пациентов (до 5 лет), что может свидетельствовать о возрастных особенностях иммунологической реактивности при данной патологии.

Полученные данные открывают новые перспективы для понимания патофизиологических механизмов наследственного сфероцитоза и могут служить основой для разработки новых диагностических и терапевтических подходов. Дальнейшие исследования необходимы для уточнения механизмов выявленных изменений и их клинического значения.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ciepiela, O.* Old and new insights into the diagnosis of hereditary spherocytosis [Electronic resource] / O. Ciepiela // *Ann Transl Med.* – 2018. – № 6 (17). – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6174190/pdf/atm-06-17-339.pdf>. – Date of access: 17.10.2024.
2. *Narla, J.* Red cell membrane disorders [Electronic resource] / J. Narla, N. Mohandas // *Int J Lab Hematol.* – 2017. – № 39. – Mode of access: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/ijlh.12657>. – Date of access: 17.10.2024.
3. *Ren, Y.* Erythrocytes: Member of the immune system that should not be ignored [Electronic resource] / Y. Ren, C. Yan, H. Yang // *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* – 2023. – № 187. – Mode of access: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1040842823001270>. – Date of access: 17.10.2024.
4. Neutrophils' Extracellular Trap Mechanisms: From Physiology to Pathology [Electronic resource] / J. Schoen [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2022. – № 23 (21). – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9653572/pdf/ijms-23-12855.pdf>. – Date of access: 17.10.2024.
5. *Новикова, И. А.* Комплексная оценка функциональной активности нейтрофилов при хроническом рецидивирующем фурункулезе / И. А. Новикова, Н. В. Гусакова, А. В. Гомоляко // *Медицинская иммунология.* – 2016. – № 16 (1). – С. 81–88.

УДК 616.5-006.6-018.1-07

Е. М. Мураценко¹, А. Е. Осипенко¹, Е. В. Солодуха²

¹Учреждение

«Гомельский областной клинический онкологический диспансер»,
г. Гомель, Республика Беларусь

²Учреждение

«Минский клинический консультативный медико-диагностический центр»,
г. Минск, Республика Беларусь

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИСЛЕДОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ КОЖИ

Введение

В последние годы отмечен рост числа больных злокачественными опухолями кожи, в первую очередь базальноклеточной карциномой. Ежегодно в мире диагностируется не менее 3,5 млн новых немеланоцитарных злокачественных новообразований