

УДК 616.155.34:616.155.194.18-056.7]-
053.2

DOI:10.58708/2074-2088.2024-2(32)-121-126

И.А. Новикова¹, К.С. Макеева¹,
Е.Ф. Мицура²

ПАРАМЕТРЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ У ДЕТЕЙ С НАСЛЕДСТВЕННЫМ СФЕРОЦИТОЗОМ

¹УО «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Беларусь;

²ГУ «РНПЦ радиационной медицины и экологии человека», г. Гомель, Беларусь

Данное исследование посвящено изучению функциональной активности нейтрофилов периферической крови у детей с наследственным сфероцитозом — одной из наиболее распространенных форм врожденных гемолитических анемий. Впервые проведено комплексное исследование различных аспектов реактивности нейтрофилов при этой патологии, включая их способность к образованию активных форм кислорода и формированию внеклеточных ловушек (нетоз). Результаты показали значительные изменения в функциональной активности нейтрофилов у пациентов с наследственным сфероцитозом вне гемолитического криза, в частности — повышенную способность к образованию активных форм кислорода и усиленный нетоз. Особенно выраженная активация нетоза наблюдалась у пациентов младшей возрастной группы (до 5 лет). Выявлены корреляции между показателями нетоза и количеством эритроцитов и лейкоцитов в периферической крови пациентов. Исследование вносит значительный вклад в изучение взаимосвязи между патологией эритроцитов и функциональным состоянием нейтрофилов, что ранее не было подробно изучено в контексте наследственного сфероцитоза.

Ключевые слова: наследственный сфероцитоз, нейтрофилы, нетоз, эритроциты

Введение

Наследственные гемолитические анемии представляют собой гетерогенную группу генетически обусловленных патологий, характеризующихся сокращением продолжительности жизни эритроцитов и персистирующим гемолизом. В спектре этих заболеваний наследственный сфероцитоз (НС) занимает особое место, являясь одной из наиболее распространенных форм врожденных гемолитических анемий. Эпидемиологические данные свидетельствуют о частоте встречаемости НС 1:2000 в популяциях Северной Европы и Северной Америки [1]. Однако эти цифры могут быть заниженными, учитывая существование субклинических и легких форм заболевания, которые часто остаются недодиагностированными.

Патогенез НС обусловлен генетическими абберациями, затрагивающими

один или несколько белков мембраны и цитоскелета эритроцитов. Эти белки играют ключевую роль в поддержании структурной целостности и морфологической пластичности эритроцитов. Мутации в генах, кодирующих эти белки, приводят к нарушению нормальной двояковогнутой формы эритроцитов, что существенно снижает их деформируемость и, как следствие, сокращает время циркуляции в кровотоке [2]. Клинический фенотип НС крайне вариабелен: от бессимптомных форм до тяжелых гемолитических анемий, требующих регулярных трансфузий эритроцитарной массы [1, 2]. Эта вариабельность клинических проявлений создает определенные диагностические трудности и подчеркивает необходимость индивидуального подхода к ведению пациентов. Классическая триада симптомов НС включает желтуху, анемию и спленомегалию. Однако клини-

ческая картина может осложняться развитием гематологических кризов различной этиологии: гемолитических, апластических или мегалобластных [2, 3]. Эти кризы представляют собой наиболее серьезные осложнения НС и требуют немедленного медицинского вмешательства.

Современные исследования в области иммунологии и гематологии существенно расширили наше понимание роли эритроцитов в иммунных процессах организма. Эритроциты, традиционно рассматриваемые как пассивные переносчики кислорода, в настоящее время признаны активными участниками иммунных реакций [4, 5]. В частности, они осуществляют транспорт иммунных комплексов, связывая их через рецептор к С3-компоненту комплемента, что обеспечивает полноценную элиминацию комплексов из организма системой фагоцитирующих клеток [6]. Контактное взаимодействие эритроцитов с нейтрофилами через сиалогликопротеины может подавлять их активацию и потенциально снижать воспалительные реакции [4]. Компоненты цитоплазмы эритроцитов, высвобождающиеся в процессе гемолиза, влияют на общую реактивность организма [4, 7]. Данный эффект также может реализовываться через систему нейтрофильных гранулоцитов, которые являются важнейшим компонентом врожденного иммунитета и в большом количестве представлены в периферической крови [7, 8]. Известны различные проявления реактивности нейтрофилов, посредством которых эти клетки осуществляют защиту от патогенов, — хемотаксис, фагоцитоз, образование активных продуктов кислорода, формирование внеклеточных ловушек (нетоз) и другие [9]. Особенности функциональных свойств нейтрофилов крови при патологии мембран эритроцитов исследованы мало.

Цель исследования

Поставлена задача изучить параметры функциональной активности нейтрофилов периферической крови у детей с наследственным сфероцитозом.

Материал и методы исследования

В нерандомизированное контрольное исследование были включены 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 «Наследственный сфероцитоз». 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.

После получения информированного согласия пациента или законных представителей ребенка были взяты образцы периферической крови из кубитальной вены 25 пациентов с НС и 50 детей контрольной группы. Всем пациентам кроме стандартного клинико-биохимического обследования проведена оценка функционального статуса нейтрофилов — поглотительная активность клеток, способность к формированию активных форм кислорода (АФК) и формированию 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 соавт. [10] в нашей модификации [11]. Клетки инкубировали при температуре 37°C в течение 30 (витальный, ранний нетоз, NET30) и 150 минут (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 проведен с использованием непараметрических методов: критерий Манна-Уитни, коэффициент Спирмена. Результаты представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q₁; Q₃). Различия считались значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования

Результаты оценки функционального статуса нейтрофилов пациентов с наследственным сфероцитозом представлены в таблице 1

Как следует из таблицы 1, у обследованных пациентов при сравнении параметров функционального статуса нейтрофилов с контрольной группой сопоставимого возраста выявлено значимое увеличение стимулированного варианта NBT-теста — 53,0% (48,0; 58,0) и 46,0% (42,0; 51,0) соответственно ($p = 0,00001$). Образование активных форм кислорода в спонтанном варианте теста (NBTсп) значимо не изменялось.

Способность нейтрофилов крови к поглощению тест-частиц (ФИ) у пациентов и здоровых лиц не различалась, но отмечалось снижение среднего количества бактерий (ФЧ) ($p = 0,014$).

Выявлены значимые различия между сравниваемыми группами по способности лейкоцитов крови к формированию внеклеточных ловушек. Мы использовали различные варианты постановки теста нетоза: кратковременную (NET30) и длительную инкубацию (NET150), спонтанный и стимулированный вариант (NETсп и NETст). Ранний нетоз развивается быстро (по данным литературы — до 1 часа), часто индуцируется тромбоцитами через TLR4, сопровождается выбросом как ядерной, так и митохондриальной ДНК с формированием везикул, содержимое которых выделяется из клетки без перфорации мембраны. Такие нейтрофилы могут оставаться жизнеспособными в течение некоторого времени. Поздний нетоз реализуется в течение 120–240 минут после активации клетки, протекает с участием фермента НАДФ-оксидазы и заканчивается гибелью нейтрофилов [9].

Таблица 1 — Параметры функциональной активности нейтрофилов пациентов с наследственным сфероцитозом

Параметр, единица измерения	Контрольная группа (n=50)	Пациенты с НС (n=25)
ФЧ	7,0 (7,0; 8,0)	6,0 (5,0; 7,0)*
ФИ, %	67,0 (64,0; 70,0)	67,0 (63,0; 71,0)
NBTсп, %	10,0 (7,0; 12,0)	8,0 (6,0; 14,0)
NBTст, %	46,0 (42,0; 51,0)	53,0 (48,0; 58,0)*
NET30сп, %	2,5 (2,0; 3,0)	3,0 (2,0; 7,0)*
NET30ст, %	5,0 (4,0; 6,0)	6,0 (5,0; 9,0)*
NET150сп, %	5,0 (4,0; 6,0)	6,0 (5,0; 9,0)*
NET150ст, %	9,0 (8,0; 10,0)	11,0 (10,0; 15,0)*

* — различия значимы при сравнении с контрольной группой при $p \leq 0,05$.

Одновременная оценка различных типов нетоза позволяет оценить функциональные свойства различных субпопуляций нейтрофилов [9, 11]. В нашем исследовании параметры нетоза по всем использованным тестам были повышены у пациентов относительно контрольной группы как при 30-минутной инкубации ($p = 0,012$ для NET30сп, $p = 0,0009$ для NET30ст), так при инкубации 150 минут ($p = 0,003$ для NET150сп, $p = 0,0001$ для NET150ст).

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 2).

Как видно из таблицы 2, 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-й 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 $p = 0,0029$ соответ-

ственно), а также показателей позднего нетоза (NET150сп, $p = 0,036$; NET150ст, $p = 0,016$). У пациентов 2-й 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 существенно выше значений у детей старше 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 па-

Таблица 2 — 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 $p \leq 0,05$.

раметрам функциональной активности нейтрофилов. В частности, фагоцитарная способность нейтрофилов и их потенциал к генерации активных форм кислорода в спонтанном и стимулированном состоянии 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.

При оценке взаимосвязей между параметрами функционального статуса нейтрофилов и показателями общего анализа крови пациентов была выявлена значимая корреляция умеренной силы между значениями NET150ст и количеством эритроцитов ($r_s = -0,41$, $p = 0,04$). Также отмечалась ассоциация между спонтанной способностью к образованию внеклеточных ловушек и количеством лейкоцитов — (NET30сп $r_s = 0,48$, $p = 0,01$; NET30ст $r_s = 0,48$, $p = 0,01$).

Заключение

Проведенное исследование выявило значительные изменения функциональной активности нейтрофилов крови у детей с наследственным сфероцитозом вне гемолитического криза по сравнению с контрольной группой: повышенная способность к образованию активных форм кислорода в ответ на стимуляцию и к формированию внеклеточных ловушек (ранний и поздний спонтанный и стимулированный нетоз). Активация нетоза в наибольшей степени выражена у пациентов младшей возрастной группы (до 5 лет). Показатели нетоза взаимосвязаны с количеством эритроцитов и лейкоцитов в периферической крови пациентов.

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.

Библиографический список

1. Ciepiela, O. Old and new insights into the diagnosis of hereditary spherocytosis [Electronic resource] / O. Ciepiela // *Ann Transl Med.* – 2018. – No 6(17). – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6174190/pdf/atm-06-17-339.pdf>. Date of access: 25.08.2024.
2. Narla, J. Red cell membrane disorders [Electronic resource] / J. Narla, N. Mohandas // *Int J Lab Hematol.* – 2017. – No 39. – Mode of access: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/ijlh.12657>. Date of access: 25.08.2024.
3. Hemolytic crisis as the initial presentation of hereditary spherocytosis induced by parvovirus b19 and herpes virus infection in a patient with the thalassemia trait: a case report [Electronic resource] / C.M. Kaymak [et al.] // *Turk J Haematol.* – 2012. – No 29(4). – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3781628/pdf/TJH-29-425.pdf>. Date of access: 25.08.2024.
4. Erythrocyte sialoglycoproteins engage Siglec-9 on neutrophils to suppress activation [Electronic resource] / A. Lizcano [et al.] // *Blood.* – 2017. – No 129(23). Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5465837/#:~:text=Suppression%20of%20neutrophil%20activation%20involves,dampen%20innate%20immune%20cell%20activation>. Date of access: 25.08.2024.
5. 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. – No 187. – Mode of access: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1040842823001270>. Date of access: 25.08.2024.
6. Plasma iron controls neutrophil production and function [Electronic resource] / J.N. Frost [et al.] // *Science Advances. Immunology.* – 2022. – No 8(40). – Mode of access: <https://www.science.org/doi/epdf/10.1126/sciadv.abq5384>. Date of access: 25.08.2024.
7. Zhong, H. Hemolysis and immune regulation [Electronic resource] / H. Zhong, K. Yazdanbakhsh // *Curr Opin Hematol.* – 2018. – No 25(3). – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6309361/pdf/nihms-1001169.pdf>. Date of access: 25.08.2024.
8. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vasoocclusion in murine sickle cell disease [Electronic resource] / J.D. Belcher [et al.] // *Blood.* – 2014. – No 123(3). – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3894494/>. Date of access: 25.08.2024.

9. Neutrophils' Extracellular Trap Mechanisms: From Physiology to Pathology [Electronic resource] / J. Schoen [et al.] // Int J Mol Sci. – 2022. – No 23(21). – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9653572/pdf/ijms-23-12855.pdf>. Date of access: 25.08.2024.

10. Технологии определения и роль нейтрофильных внеклеточных ловушек в анти микроб-

ной защите / И.И. Долгушин [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2010. – No 4. – С. 26-30.

11. Новикова, И.А. Комплексная оценка функциональной активности нейтрофилов при хроническом рецидивирующем фурункулезе / И.А. Новикова, Н.В. Гусакова, А.В. Гомоляко // – Медицинская иммунология. – 2016. – No 16(1). – С. 81-88.

I.A. Novikova, K.S. Makeyeva, E.F. Mitsura

**PARAMETERS OF NEUTROPHIL FUNCTIONAL ACTIVITY
IN CHILDREN WITH HEREDITARY SPHEROCYTOSIS**

This study investigates the functional activity of peripheral blood neutrophils in children with hereditary spherocytosis – one of the most common forms of congenital hemolytic anemias. For the first time, a comprehensive examination of various aspects of neutrophil reactivity in this pathology was conducted, including their ability to form reactive oxygen species and neutrophil extracellular traps (NETosis). The results revealed significant changes in neutrophil functional activity in patients with hereditary spherocytosis outside of hemolytic crisis, particularly an increased capacity for reactive oxygen species formation and enhanced NETosis. Notably pronounced NETosis activation was observed in patients of the younger age group (up to 5 years). Correlations were identified between NETosis indicators and the number of erythrocytes and leukocytes in patients' peripheral blood. This study contributes significantly to understanding the relationship between erythrocyte pathology and neutrophil functional status, an aspect that had not been previously studied in detail in the context of hereditary spherocytosis.

Key words: *hereditary spherocytosis, neutrophils, NETosis, erythrocytes*

Поступила 06.09.2024