

## Выраженность нетоза при неонатальном сепсисе

Х.С. Хаертынов<sup>1</sup>, В.А. Анохин<sup>1</sup>, Г.В. Галина<sup>1</sup>, С.В. Бойчук<sup>1</sup>, Н.В. Донцова<sup>2</sup><sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Казань, Россия;<sup>2</sup>ГАУЗ «Городская детская больница №1» Минздрава Республики Татарстан, Казань, Россия

## The severity of netosis in patients with neonatal sepsis

Kh.S. Khaertynov<sup>1</sup>, V.A. Anokhin<sup>1</sup>, G.V. Galina<sup>1</sup>, S.V. Boychuk<sup>1</sup>, N.V. Dontsova<sup>2</sup><sup>1</sup>Kazan State Medical University, Kazan, Russia;<sup>2</sup>City Children's Hospital No. 1, Tatarstan, Kazan

**Цель исследования.** Оценка выраженности спонтанного нетоза в периферической крови при сепсисе у детей периода новорожденности.

**Характеристика детей и методы исследования.** Изучена выраженность спонтанного нетоза у 12 детей с неонатальным сепсисом, находившихся на стационарном лечении в отделении реанимации новорожденных Городской детской больницы №1 Казани. Диагноз устанавливали на основании развития синдрома системного воспалительного ответа, повышения в крови концентрации С-реактивного белка более 1 мг/дл, наличия одного или нескольких очагов инфекции, развития органной дисфункции и выделения микроорганизма из венозной крови.

**Результаты.** Установлено, что начальный период неонатального сепсиса протекает на фоне активации нетоза. Это проявлялось обнаружением в периферической крови нейтрофильных внеклеточных ловушек, количество и процентное содержание которых было достоверно больше, чем в контрольной группе ( $p=0,02$  и  $p=0,0007$  соответственно). Наиболее высокие уровни нейтрофилов в состоянии нетоза (67 и 70%) оказались у 2 детей с септическим шоком, у которых отмечалась лейкопения ( $2,7 \cdot 10^9/\text{л}$  и  $2,8 \cdot 10^9/\text{л}$  соответственно). Развитие абсолютной нейтропении (менее  $2 \cdot 10^9/\text{л}$ ) и лейкопении (менее  $5 \cdot 10^9/\text{л}$ ) наблюдалось только у одного ребенка с септическим шоком. У 5 из 12 детей с неонатальным сепсисом имелась тромбоцитопения, которая у каждого четвертого была менее  $100 \cdot 10^9/\text{л}$ . При этом ни в одном случае не выявлены клинические проявления геморрагического синдрома и нарушения свертываемости крови.

**Заключение.** Образование нейтрофильных внеклеточных ловушек служит одним из важнейших механизмов противoinфекционной защиты, направленных на купирование воспалительного процесса и достижение очищения внутренних сред организма.

**Ключевые слова:** дети, неонатальный сепсис, врожденный иммунитет, нейтрофилы, нетоз.

**Для цитирования:** Хаертынов Х.С., Анохин В.А., Галина Г.В., Бойчук С.В., Донцова Н.В. Выраженность нетоза при неонатальном сепсисе. Рос вестн перинатол и педиатр 2020; 65(5): 164–168. DOI: 10.21508/1027-4065-2020-65-5-164-168

**Objective.** To evaluate the severity of spontaneous netosis in peripheral blood in neonatal children with sepsis.

**Characteristics of children and research methods.** The researchers have studied the severity of spontaneous netosis in 12 neonates with sepsis who were hospitalized in the neonatal intensive care unit of the City Children's Hospital No.1 in Kazan. The diagnose was based on a systemic inflammatory response syndrome, an increase in the concentration of C-reactive protein in the blood of more than 1 mg/dL, the presence of one or more foci of infection, the development of organ dysfunction, and the presence of a microorganism in venous blood.

**Results.** It was found that the initial period of neonatal sepsis proceeds against the background of activation of netosis, which was manifested by neutrophil extracellular traps in the peripheral blood. Their quantity and percentage was significantly higher compared to the indicators of the control group ( $p=0.02$  and  $p=0.0007$  accordingly). The highest levels of neutrophils in the state of netosis (67% and 70%) were found in 2 neonates with septic shock and leukopenia ( $2.7 \cdot 10^9/\text{L}$  and  $2.8 \cdot 10^9/\text{L}$ , respectively). Only one neonate with septic shock developed absolute neutropenia (less than  $2 \cdot 10^9/\text{L}$ ) and leukopenia (less than  $5 \cdot 10^9/\text{L}$ ). Thrombocytopenia was noted in 5 of 12 neonates with sepsis, which was less than  $100 \cdot 10^9/\text{L}$  in every fourth child. At the same time, there were no clinical cases of hemorrhagic syndrome and blood clotting disorders.

**Conclusion.** The formation of neutrophilic extracellular traps is one of the most important mechanisms of anti-infective protection aimed at arresting the inflammatory process and clearing the internal media of the body.

**Key words:** children, neonatal sepsis, innate immunity, neutrophils, netosis.

**For citation:** Khaertynov Kh. S., Anokhin V. A., Galina G. V., Boychuk S. V., Dontsova N. V. The severity of netosis in patients with neonatal sepsis. Ros Vestn Perinatol i PEDIATR 2020; 65(5): 164–168 (in Russ). DOI: 10.21508/1027-4065-2020-65-5-164-168

**Н**еонатальный сепсис — наиболее клинически значимая инфекционная патология новорожденных детей со значительной заболеваемостью

и летальностью [1, 2]. Ежегодно в мире от раннего неонатального сепсиса умирают около 1 млн новорожденных [3]. Несмотря на определяющую роль

© Коллектив авторов, 2020

**Адрес для корреспонденции:** Хаертынов Халит Саубанович — к.м.н., доц. кафедры детских инфекций Казанского государственного медицинского университета,

ORCID: 0000-0002-9013-4402

e-mail: khalit65@rambler.ru

Анохин Владимир Алексеевич — д.м.н., проф., зав. кафедрой детских инфекций Казанского государственного медицинского университета,

ORCID: 0000-0003-1050-9081

Галина Гузель Васильевна — ординатор кафедры детских инфекций Казанского государственного медицинского университета

Бойчук Сергей Васильевич — д.м.н., проф., зав. кафедрой общей патологии Казанского государственного медицинского университета

420012 Казань, ул. Бутлерова, д. 49

Донцова Надежда Викторовна — врач-реаниматолог отделения реанимации новорожденных городской детской больницы №1,

ORCID: 0000-0002-8563-8091

420034 Казань, ул. Декабристов, д. 125 А

микроорганизмов, не меньшее значение в развитии тяжелых бактериальных инфекций у новорожденных отводится факторам противоинфекционной защиты, особенно клеткам врожденного иммунитета, играющим решающую роль на начальных этапах инфекционного процесса [4]. Среди них наиболее многочисленными нейтрофилами. Хемотаксис и фагоцитоз — основные функции нейтрофилов — играют ключевую роль при развитии бактериальных заболеваний [4]. Как известно, у новорожденных способность к адгезии и хемотаксису, а также пролиферативная активность нейтрофилов заметно ниже, чем у взрослых, что обуславливает более высокую заболеваемость сепсисом в этой возрастной группе [5]. В то же время нейтрофилы располагают еще одним важным механизмом антимикробной защиты — нетозом, или способностью после активации образовывать сетеподобные структуры, состоящие из ДНК, хроматина, различных пептидов и ферментов, получившие название «нейтрофильные внеклеточные ловушки» [6]. Эти структуры захватывают, изолируют и уничтожают различные условно-патогенные бактерии, ограничивая дальнейшее их распространение [7]. Поэтому выраженность нетоза — один из важных механизмов защиты, направленный на элиминацию микроорганизмов при тяжелых бактериальных инфекциях.

**Цель исследования:** оценка выраженности спонтанного нетоза в периферической крови при сепсисе у детей периода новорожденности.

### Характеристика детей и методы исследования

Изучена выраженность спонтанного нетоза у 12 детей с неонатальным сепсисом, находившихся на стационарном лечении в отделении реанимации новорожденных Городской детской больницы №1 Казани. Диагноз неонатального сепсиса был уста-

новлен на основании клинико-лабораторных данных: развития синдрома системного воспалительного ответа, повышения в крови концентрации С-реактивного белка (СРБ) более 1 мг/дл, наличия одного или нескольких очагов инфекции, развития органной дисфункции и выделения микроорганизма из венозной крови. Из этих детей 5 родились недоношенными, в том числе 4 с очень низкой массой тела.

Очаги инфекции были определены у 9 детей, из них у 5 диагностирована пневмония, у 3 — гнойный менингит, у 1 — остеомиелит правой плечевой кости. Этиология неонатального сепсиса была установлена у 3 детей: у 2 из крови был выделен *Staphylococcus epidermidis*, у одного ребенка с гнойным менингитом из ликвора был выделен антиген *Streptococcus agalactiae*, детектированный иммунохроматографическим методом. В 2 случаях отмечалось развитие септического шока.

У всех пациентов исход заболевания был благоприятным. Дети получали комплексное лечение, включавшее антибактериальные препараты (цефалоспорины третьего поколения), инфузионную терапию, внутривенное введение иммуноглобулина человека, обогащенного IgM. Двоим пациентам проводилась искусственная вентиляция легких. Контрольную группу составили 10 детей без признаков инфекционного заболевания, из которых 2 родились недоношенными. Основные характеристики пациентов представлены в табл. 1.

Для выделения нейтрофилов использовали гепаринизированную периферическую венозную кровь в объеме 2 мл (10–15 ед/мл гепарина). Образцы крови у детей с неонатальным сепсисом брали однократно в период развернутых клинико-лабораторных проявлений заболевания. Забранную в стерильную пробирку кровь с целью осаждения эритроцитов

Таблица 1. Характеристика обследованных детей

Table 1. Characteristics of the children

Параметр	Неонатальный сепсис, n=12	Контрольная группа, n=10	p
Гестационный возраст, нед (Me [МКР])	37,5 [34; 39]	38,5 [38; 40]	0,3
Число детей <37 нед, абс. (%)	5 (42)	2 (20)	
Масса тела при рождении, г (Me [МКР])	2745 [1412; 3255]	3175 [2870; 3570]	0,08
Оценка по шкале Апгар, баллы	7,5 [7; 8]	8 [8; 9]	0,03
Очаги инфекции:	9		
пневмония	5		
менингит	3	—	
остеомиелит	1		
септицемия	3		
Лейкоциты крови, $\times 10^9/\text{л}$ (Me [МКР])	12,3 [6,9; 23,1]	12,1 [10,5; 15,8]	0,9
Нейтрофилы крови, $\times 10^9/\text{л}$ (Me [МКР])	7,4 [4,7; 9,2]	4,5 [2,8; 5,8]	0,02
Нейтрофилы крови, % (Me [МКР])	58 [43,5; 71,5]	32 [26; 38]	0,001
Тромбоциты крови, $\times 10^9/\text{л}$ (Me [МКР])	180 [93,5; 255]	347 [216; 436]	0,02

Примечание. Me — медиана; МКР — межквартильный размах.

Таблица 2. Количество нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) у новорожденных с сепсисом  
 Table 2. Number of neutrophil extracellular traps in newborns with sepsis

Параметр	Неонатальный сепсис, n=12	Контрольная группа, n=10	p
Число нейтрофилов в поле зрения, абс. (Ме [МКР])	3 [2,2; 5]	4,7 [2,8; 9,6]	0,2
Число НВЛ, абс. в поле/зрения (Ме [МКР])	1,4 [1,2; 2]	0,8 [0,4; 1,2]	0,02
Число НВЛ, % (Ме [МКР])	42,5 [30; 51]	17,5 [9; 27]	0,0007

Примечание. Ме — медиана, МКР — межквартильный размах.

отстаивали при температуре 37 °С в течение 30 мин. Нейтрофилы выделяли из лейкоцитарной взвеси на двойном градиенте плотности стерильных растворов фиколла—верографина. Плотность верхнего слоя градиента составляла 1,075–1,077, нижнего — 1,093–1,095. Объем каждого градиента равнялся 1,5 мл. Через 40 мин центрифугирования при 1500 оборотов в минуту на границе между градиентами появлялось кольцо гранулоцитов. Кольцо нейтрофилов аккуратно собирали, переносили в стерильные центрифужные пробирки, трижды отмывали от градиента стерильным изотоническим раствором хлорида натрия. После инкубации полученной взвеси клеток в течение 180 мин при температуре 37 °С готовили мазок, который после высушивания фиксировали 96% раствором этилового спирта. Для окрашивания нейтрофильных внеклеточных ловушек использовали раствор акридинового оранжевого; их определение проводили с помощью люминесцентного микроскопа, фильтры, обеспечивающие возбуждающий свет с длиной волны не более 490 нм, и эмиссию с длиной волны 520 нм. Подсчет количества нейтрофильных внеклеточных ловушек проводили в 5 полях зрения каждого мазка.

Полученные данные были статистически обработаны с использованием пакета программ Statistica for Windows 6,1 (Statsoft Inc., США) и программного обеспечения MS Excell (Microsoft, США).

## Результаты

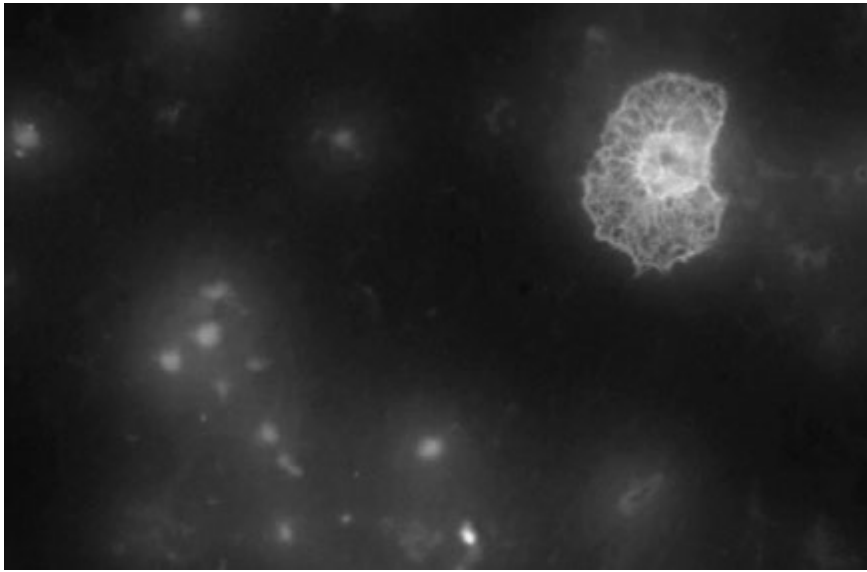
Было установлено, что начальный период неонатального сепсиса протекает на фоне активации нетоза, проявляющейся обнаружением в периферической крови нейтрофильных внеклеточных ловушек (рис. 1, 2), количество которых было достоверно больше, чем в контрольной группе ( $p=0,02$ ; табл. 2). Процентное содержание в крови нейтрофильных внеклеточных ловушек также было выше в группе детей с неонатальным сепсисом ( $p=0,0007$ ). При этом наиболее высокие уровни нейтрофилов в состоянии нетоза (67 и 70%) оказались у 2 детей с септическим шоком и проявляющейся лейкопенией ( $2,7 \cdot 10^9/\text{л}$  и  $2,8 \cdot 10^9/\text{л}$  соответственно). Развитие абсолютной нейтропении (менее  $2 \cdot 10^9/\text{л}$ ) и лейкопении (менее  $5 \cdot 10^9/\text{л}$ ) выявлено только у одного ребенка с септическим шоком.

## Обсуждение

Нейтрофилы играют ключевую роль в системе противоинфекционной защиты [8]. Хемотаксис

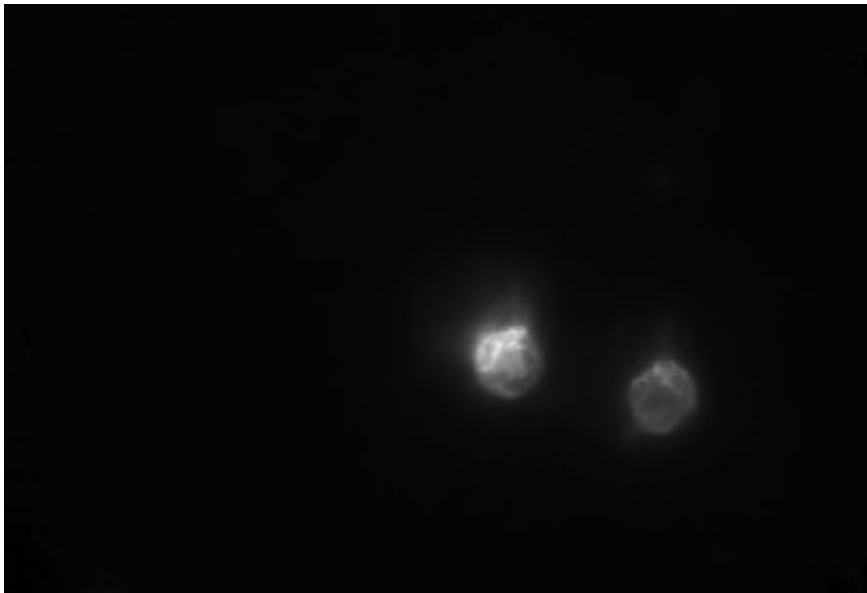
и фагоцитоз микроорганизмов — хорошо известные и изученные функции нейтрофилов, реализующиеся в ответ на инфекционную агрессию [4]. Другой важнейший механизм, направленный на элиминацию вторгшихся в организм микробов, — формирование нейтрофилами внеклеточных ловушек [6]. Выбрасываемые активированными нейтрофилами внеклеточные ловушки, с одной стороны, создают механическое препятствие дальнейшему распространению микроорганизмов из первичного очага инфекции [9]. С другой стороны, содержащиеся в нейтрофильных внеклеточных ловушках лизоцим, хелаторы железа, гистоны и миелопероксидаза обеспечивают антимикробный эффект, что приводит к гибели бактерий [9]. Нами установлено, что начальный период неонатального сепсиса сопровождается увеличением в крови количества нейтрофильных внеклеточных ловушек, которое, очевидно, направлено на нейтрализацию и последующую элиминацию микроорганизмов. Отсутствие у большинства детей с неонатальным сепсисом нейтро- и лейкопении свидетельствует о сохранении достаточного количества нейтрофилов в костном мозге и поступлении их в кровоток. В нашем исследовании только у одного ребенка (с септическим шоком) зафиксированы лейкопения (менее  $5 \cdot 10^9/\text{л}$ ) и нейтропения (менее  $2 \cdot 10^9/\text{л}$ ). При массивной бактериемии и эндотоксинемии вследствие образования большого количества нейтрофильных внеклеточных ловушек уменьшение в крови количества нейтрофилов может в некоторой мере быть объяснено нетозом. Наряду с некрозом, апоптозом и аутофагией, нетоз — одна из известных форм гибели клеток [9]. Поэтому наблюдающиеся при тяжелой форме сепсиса — септическом шоке — лейкопения и нейтропения могут быть ассоциированы именно с нетозом. Это особенно актуально для новорожденных детей, у которых вследствие исходно малого числа депонированных нейтрофилов выброс их в кровоток не сопровождается таким же быстрым восполнением их запаса [4].

Следует отметить, что нейтрофильные внеклеточные ловушки образуются только зрелыми нейтрофилами [10]. При этом способностью образовывать эти структуры обладает не более 30% клеток [6]. На основании выявленной ассоциации между неонатальным сепсисом и нетозом [11] некоторые исследователи предлагают использовать последний в качестве потенциального биомаркера сепсиса [12]. Однако способность образовывать нейтрофильные внеклеточные



**Рис. 1. Нейтрофильная внеклеточная ловушка у новорожденного с сепсисом. Окраска акридиновым оранжевым. ×100.**

**Fig. 1. Neutrophilic extracellular trap in a newborn with sepsis. The color of acridine orange. ×100.**



**Рис. 2. Нейтрофилы новорожденного без инфекционного заболевания (контроль). Окраска акридиновым оранжевым. ×100**

**Fig. 2. Neutrophils of a newborn without an infectious disease (control). The color of acridine orange. ×100.**

ловушки у новорожденных менее выражена, чем у взрослых [13], что отражает в целом низкую функциональную активность нейтрофилов. Считается, что нейтрофилы цельной крови в норме спонтанно не образуют внеклеточные ловушки [14]. Однако образование такого рода структур может быть инициировано не только микроорганизмами, но и цитокинами, хемокинами, агонистами тромбоцитов [15]. В нашем исследовании умеренно выраженный спонтанный нетоз в крови отмечался и в контрольной группе.

Кроме участия в нейтрализации и локализации бактериального процесса нейтрофильные внеклеточ-

ные ловушки могут быть ответственны за нарушения и в системе гемостаза. Было показано, что формирование нетоза ассоциировано с повреждением эндотелия сосудов, адгезией и активацией тромбоцитов [16, 17]. Кроме того, сами нейтрофилы способны сорбироваться на поверхности поврежденного эндотелия, инициировать тромбообразование [9]. С нетозом ассоциируются активация внутрисосудистого пути свертывания крови и развитие тромбозов сосудов при сепсисе [18]. В нашем исследовании у 5 из 12 детей с неонатальным сепсисом отмечалась тромбоцитопения, которая у каждого четвертого была менее

100·10<sup>9</sup>/л. Однако ни в одном случае не выявлены клинические проявления геморрагического синдрома и нарушения свертываемости крови.

### Заключение

Проведенное исследование показало, что нейтрофильные внеклеточные ловушки у новорожден-

ных при генерализованных вариантах бактериальных инфекций представляют один из реализуемых механизмов защиты ребенка. Изучение нетоза при неонатальном сепсисе расширяет наши представления о патофизиологии этого заболевания и позволит наметить перспективы патогенетической терапии.

### ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Verma P., Berwal P.K., Nagaraj N. Neonatal sepsis: epidemiology, clinical spectrum, recent antimicrobial agents and their antibiotic susceptibility pattern. *Int J Contemp Pediatr* 2015; 2 (3): 176–180. DOI: 10.18203/2349-3291.ijcp20150523
2. Camacho-Gonzales A., Spearman P.W., Stoll B.J. Neonatal infectious diseases: evaluation of neonatal sepsis. *Pediatr Clin North Am* 2013; 60: 367–389. DOI: 10.1016/j.pcl.2012.12.003
3. Bryce J., Black R.E., Walker N., Bhutta Z.A., Lawn J.E., Steketee R.W. Can the world afford to save the lives of 6 million children each year? *Lancet* 2005; 365: 2193–2200.
4. Олс Р., Едер М. Гематология, иммунология и инфекционные болезни. М.: 2013; 408. [Ols R., Eder M. Hematology, immunology and infectious diseases. M.: 2013; 408. (in Russ.)]
5. Melvan J.N., Bagby G.J., Welsh D.A., Nelson S., Zhang P. Neonatal sepsis and neutrophil insufficiencies. *Int Rev Immunol* 2010; 29: 315–348. DOI: 10.3109/08830181003792803
6. Cooper P.R., Palmer L.J., Chapple I.L.C. Neutrophil extracellular traps as a new paradigm in innate immunity: friend or foe? *Periodontol* 2000; 63(1): 165–197. DOI: 10.1111/prd.12025
7. McDonald B., Urrutia R., Yipp B.G., Jenne C.N., Kubes P. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe* 2012; 12: 324–33. DOI: 10.1016/j.chom.2012.06.011
8. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 173–182. DOI: 10.1038/nri1785
9. Iba T., Hashiguchi N., Nagaoka I., Tabe Y., Muray M. Neutrophil cell death in response to infection and its relation to coagulation. *J Intens Care* 2013; 1: 13. DOI: 10.1186/2052-0492-1-13.
10. Martinelli S., Urošević M., Daryadel A., Oberholzer P.A., Baumann C., Fey M.F. et al. Induction of genes mediating interferon-dependent extracellular trap formation during neutrophil differentiation. *J Biol Chem* 2004; 279: 44123–44132. DOI: 10.1074/jbc.M405883200
11. Nguyen D.N., Stensballe A., Lai J.C., Jiang P., Brunse A., Li Y. et al. 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; 23: 524–36. DOI: 10.1177/1753425917719995
12. Vincent D., Klinke M., Eschenburg G., Trochimiuk M., Appl B., Tiemann B. et al. NEC is likely a NETs dependent process and markers of NETosis are predictive of NEC in mice and humans. *Sci Rep* 2018; 8: 12612. DOI: 10.1038/s41598-018-31087-0
13. Lipp P., Ruhnau J., Lange A., Vogelgesang A., Dressel A., Heckmann M. Less Neutrophil Extracellular Trap Formation in Term Newborns than in Adults. *Neonatology* 2017; 111: 182–188. DOI: 10.1159/000452615
14. Brinkmann V., Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to, make NETs. *Nature Rev* 2007; 5: 577–582. DOI: 10.1038/nrmicro1710.
15. Lipińska-Gediga M. Neutrophils, NETs, NETosis – old or new factors in sepsis and septic shock? *Anaesthesiol Intens Therap* 2017; 49(3): 235–240. DOI: 10.5603/AIT.2017.0041.
16. Clark S.R., Ma A.C., Tavenner S.A., McDonald B., Goodarzi Z., Kelly M.M. et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 2007; 13: 463–469. DOI: 10.1038/nm1565
17. Tanaka K., Koike Y., Shimura T., Okigami M., Ide S., Toiyama Y. et al. In vivo characterization of neutrophil extracellular traps in various organs of a murine sepsis model. *PLoS ONE* 2014; 9: e111888. DOI: 10.1371/journal.pone.0111888
18. Angus D.C., van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *Engl J Med* 2014; 369 (9): 840–851. DOI: 10.1056/NEJMra1208623.

Поступила: 14.07.20

Received on: 2020.07.14

### 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.