

УДК 616.16–002.151–053.2:612.017.1

## ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕМОРРАГИЧЕСКИХ ВАСКУЛИТОВ У ДЕТЕЙ

Д. Б. НИЖЕГОРОВА<sup>1),2)</sup>, Г. М. БАТЯН<sup>3)</sup>, М. Ю. ЮРКЕВИЧ<sup>1)</sup>, М. М. ЗАФРАНСКАЯ<sup>1),2)</sup>

<sup>1)</sup>Международный государственный институт имени А. Д. Сахарова, Белорусский государственный университет,  
ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь

<sup>2)</sup>Белорусская медицинская академия последипломного образования,  
ул. П. Бровки, 3/3, 220023, г. Минск, Беларусь

<sup>3)</sup>Белорусский государственный медицинский университет,  
пр-т Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Беларусь

В настоящее время заболеваемость детей геморрагическим васкулитом характеризуется увеличением во всех возрастных группах, что может быть связано с экологическим неблагополучием, наличием хронической инфекции, а также алергизирующим действием лекарственных препаратов и пищевых продуктов. Однако на сегодняшний день отсутствуют биомаркеры, прогнозирующие дальнейшее развитие геморрагической экзантемы в дебюте заболевания и ее исход. В данной работе представлены количественные и функциональные показатели клеточного и гуморального иммунитета у детей с геморрагическими васкулитами различного генеза, сопровождающиеся геморрагической экзантемой в дебюте заболевания. Установлено, что у детей с системным (иммунокомплексным) васкулитом снижено количество  $\gamma$ Т-лимфоцитов в периферической крови наряду с высокой способностью данной популяции к активации, а также показана корреляция специфических аутоантител ANCA с количеством  $\gamma$ Т-лимфоцитов в периферической крови и концентрацией специфических антител IgG EBNA-1. В то же время у детей с геморрагическим васкулитом инфекционно-аллергического генеза на фоне нормального содержания  $\gamma$ Т-лимфоцитов выявлено снижение активационной способности данной субпопуляции. Таким образом, количественные и функциональные изменения  $\gamma$ Т-лимфоцитов могут являться потенциальным лабораторным биомаркером ранней диагностики системных или инфекционно-аллергических геморрагических васкулитов у детей, что позволит прогнозировать дальнейшее течение заболевания.

**Ключевые слова:** геморрагический васкулит; иммунная система; фенотип; лимфоидные клетки; антитела.

### Образец цитирования:

Нижегорова ДБ, Батян ГМ, Юркевич МЮ, Зафранская ММ. Иммунологическая характеристика геморрагических васкулитов у детей. *Журнал Белорусского государственного университета. Экология.* 2021;1:85–95.  
<https://doi.org/10.46646/2521-683X/2021-1-85-95>

### For citation:

Nizheharodava DB, Batsian GM, Yurkevich MYu, Zafranskaya MM. Immunological features in children with hemorrhagic vasculitis. *Journal of the Belarusian State University. Ecology.* 2021;1:85–95. Russian.  
<https://doi.org/10.46646/2521-683X/2021-1-85-95>

### Авторы:

**Дарья Борисовна Нижегорова** – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры иммунологии<sup>1</sup>, ведущий научный сотрудник отдела иммунологии и биомедицинских технологий<sup>2</sup>.

**Галина Михайловна Батян** – кандидат медицинских наук, доцент; доцент 1-ой кафедры детских болезней.

**Мария Юрьевна Юркевич** – кандидат биологических наук; доцент кафедры иммунологии.

**Марина Михайловна Зафранская** – доктор медицинских наук, доцент; заведующий кафедрой иммунологии, главный научный сотрудник отдела иммунологии и биомедицинских технологий.

### Authors:

**Darya B. Nizheharodava**, PhD (biology); docent; associate professor at the department of immunology, faculty of ecological medicine<sup>1</sup>; leading researcher at the department of immunology and biomedicine technology, scientific research labor<sup>2</sup>.

*nzh@tut.by*

**Galina M. Batsian**, PhD (medicine), docent; associate professor at the 1<sup>st</sup> Childhood diseases department.

*galina\_batsian@rambler.ru*

**Mariya Yu. Yurkevich**, PhD (biology); associate professor at the department of immunology.

*marija4567@gmail.com*

**Marina M. Zafranskaya**, doctor of science (medicine), docent; head at the department of immunology, faculty of ecological medicine, ISEI BSU; primary investigator at the department of immunology and biomedicine technology, scientific research labor.

*zafranskaya@gmail.com*

## IMMUNOLOGICAL FEATURES IN CHILDREN WITH HEMORRHAGIC VASCULITIS

*D. B. NIZHEHARODAVA<sup>a, b</sup>, G. M. BATSIAN<sup>c</sup>, M. Yu. YURKEVICH<sup>a</sup>, M. M. ZAFRANSKAYA<sup>a, b</sup>*

<sup>a</sup>*International Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University,  
23/1 Daŭhabrodskaja Street, Minsk 220070, Belarus*

<sup>b</sup>*Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education  
3/3 Petrusia Broŭki Street, Minsk 220013, Belarus*

<sup>c</sup>*Belarusian State Medical University,*

*83 Dzjarzhynskaga Avenue, Minsk 220116, Belarus*

*Corresponding author: D. B. Nizheharodava (nzh@tut.by)*

Currently the incidence of hemorrhagic vasculitis in children is characterized by an increase in all age groups what may be associated with environmental problems, chronic infection as well as food and drugs allergy. To date there are no biomarkers predicting the further development of hemorrhagic exanthema at the onset of the disease and followed its outcome. The quantitative and functional features of cellular and humoral immunity in children with hemorrhagic vasculitis of various origins accompanied by hemorrhagic exanthema at the onset of the disease are presented in this article. The reduction of  $\gamma\delta$ T-cells number in the peripheral blood correlated with levels of specific antineutrophil cytoplasmic antibodies and IgG EBNA-1 antibodies against a high ability of  $\gamma\delta$ T-cells to activation were established in children with systemic (immunocomplex) vasculitis. At the contrast, the background of a normal  $\gamma\delta$ T-lymphocytes' content was associated with the decrease in  $\gamma\delta$ T-cells activation capacity in children with hemorrhagic vasculitis of infectious-allergic genesis. Thus, quantitative and functional changes in  $\gamma\delta$ T-lymphocytes can be a potential labor biomarker for early diagnosis of systemic or infectious-allergic hemorrhagic vasculitis in children what may be used for the further disease course prediction.

**Keywords:** hemorrhagic vasculitis; immune system; phenotype; lymphoid cells; antibodies.

### Введение

Среди детского населения наиболее распространенной нозологической формой васкулитов является геморрагический васкулит (ГВ), представляющий собой комплексное полиэтиологическое заболевание, которое возникает как гиперергическая реакция макроорганизма с измененной реактивностью под воздействием эндогенных (генетических, иммунологических) и/или экзогенных (экологическое воздействие, инфекционные агенты) факторов и характеризуется воспалительной реакцией в стенке кровеносного сосуда [1]. Локализация, размер и степень повреждения сосуда, а также тип развивающихся патофизиологических реакций определяют фенотип и тяжесть заболевания [2]. У детей ГВ может протекать достаточно тяжело, нередко принимает рецидивирующую форму с вовлечением в патологический процесс внутренних органов, в частности, нарушением функции почек и формированием хронического гломерулонефрита с последующим исходом в хроническую почечную недостаточность [3].

Согласно литературным данным существует генетическая предрасположенность к развитию ГВ, которая ассоциируется с HLA B8, Ww35, A1, A2, A10, C3, дефицитом компонента C7 системы комплемента, часто выявляется ТТ-генотип TGF- $\beta$ -509 [4]. Существенная роль в возникновении заболевания принадлежит очагам хронической инфекции в организме. Известно, что развитию ГВ в 60–80 % случаев предшествует инфекция верхних дыхательных путей. Особый интерес представляют герпесвирусные-инфекции, вызванные вирусом простого герпеса 1-го и 2-го типов (HSV-1, -2), вирусом ветряной оспы (VZV), вирусом Эпштейна–Барр (EBV), цитомегаловирусом (CMV) и розеоловирусом (HHV-6). Кроме того, ГВ могут ассоциироваться с лекарственной и пищевой аллергией [5].

В основе большинства сосудистых повреждений при ГВ лежат иммунологически обусловленные патологические реакции. Среди предполагаемых триггерных механизмов иммунопатогенеза ГВ рассматривают феномен молекулярной мимикрии, стимуляция суперантигенами, клеточная активация распознающими рецепторами TLR (Toll-like receptors), анти-идиотипический ответ нейтрофильной внеклеточной «ловушки» NETs (neutrophil extracellular traps), дефекты моноцит-макрофагальной системы, гиперкомplementемия, нарушение баланса регуляторных Т-клеток, что впоследствии приводит к развитию клеточного и гуморального иммунного ответа. Известно, что в манифестации ГВ имеют значение следующие механизмы: иммунокомплексное повреждение; гиперчувствительность замедленного типа; аутоиммунные реакции; псевдоаллергический механизм [6].

Основной патогенетический механизм ГВ – образование циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и активация компонентов системы комплемента. Чрезмерное накопление ЦИК в условиях преобладания антигенов или при недостаточном образовании антител приводит к отложению их на эндотелии

микроциркуляторного русла, а также в коже и внутренних органах, с последующей активацией белков системы комплемента и вторичном изменении сосудистой стенки. В результате микрососуды подвергаются асептическому воспалению с деструкцией стенок и последующим тромбообразованием. При этом в иммунных комплексах чаще всего выявляют иммуноглобулины класса А (IgA) [7].

Наряду с гуморальным иммунным ответом развиваются иммунные реакции, опосредованные Т-лимфоцитами, которые характеризуются формированием гранулематозного воспаления. Клеточный состав гранул при этом представлен в первую очередь Т-лимфоцитами (как CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup> Т-клетками) и инфильтратами макрофагов. В механизмах возникновения Т-клеточно-опосредованного иммунного воспаления важную роль могут играть нарушения процессов распознавания антигенов Т-лимфоцитами [8]. Кроме того, особый интерес в патогенезе ГВ представляет минорная популяция  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, которая может проявлять как выраженные цитотоксические свойства, так и участвовать в регуляции иммунокомплексного воспаления [9].

В связи с отсутствием специфических лабораторных тестов, уточнение характера иммунологических нарушений у пациентов с геморрагической сыпью на ранних этапах развития заболевания дает возможность провести раннюю дифференциальную диагностику и прогнозировать дальнейшее течение заболевания. В данной работе представлены количественные и функциональные показатели клеточного и гуморального иммунитета у детей с заболеваниями, сопровождающимися геморрагической экзантемой в дебюте, для выявления потенциального биомаркера раннего прогнозирования манифестации геморрагического васкулита.

### Материалы и методы

Материалом исследования явилась периферическая венозная кровь детей с заболеваниями, сопровождающимися геморрагической экзантемой (n = 27), находившихся на стационарном лечении в УЗ «Городская детская инфекционная клиническая больница» г. Минска. Среди обследованных детей 52 % пациентов – мужского пола (n = 14) и 48 % пациентов – женского пола (n = 13). Возрастная медиана составила 4,0 (2,5 ÷ 9,5) года (минимальный возраст пациентов – 0,5 года, максимальный – 17 лет).

Установлено, что наибольшее количество заболевших детей приходилось на возраст 1–4 года (рис. 1). При этом заболеваемость не зависела от гендерной принадлежности и практически равно распределялась у мальчиков и девочек (табл. 1).

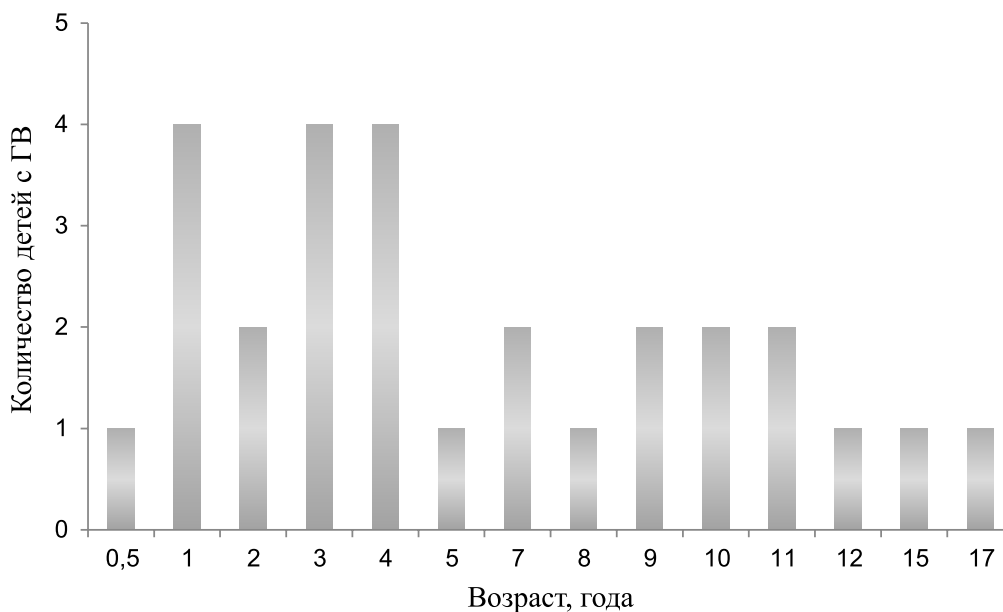


Рис. 1. Возрастное распределение детей с ГВ

Fig. 1. Age distribution of children with hemorrhagic vasculitis

Согласно клиническому диагнозу сформированы группы пациентов с проявлениями ГВ: группа 1 – системные (иммунокомплексные) васкулиты и группа 2 – инфекционно-аллергические васкулиты. Клинико-демографическая характеристика детей в исследуемых группах представлена в табл. 1.

Таблица 1

Клинико-демографическая характеристика детей с ГВ, *Me* (25%÷75%)

Table 1

Clinical and demographic characteristics of children with hemorrhagic vasculitis, *Me* (25%÷75%)

Группа	Количество пациентов	Возраст, г	Пол, м/ж	Клиническая группа
группа 1	n=11	2,0 (1,0÷10,0)	6/5	Системные (иммунокомплексные) васкулиты
группа 2	n=16	4,5 (3,0÷8,5)	7/8	Инфекционно-аллергические васкулиты

Все пациенты, за исключение 2 детей с предварительным диагнозом «болезнь Кавасаки» имели в дебюте заболевания геморрагическую сыпь. Сыпь выявлялась у 90 % пациентов группы 1 и у 94 % пациентов группы 2 (табл. 2). По локализации сыпи статистически значимых различий в исследуемых группах не выявлено.

Таблица 2

Характеристика сыпи по клиническим группам детей

Table 2

Rash characteristics in children clinical groups

Характеристика сыпи	Клиническая группа	
	группа 1	группа 2
Наличие сыпи	90 %	94 %
Длительность сыпи, дни	4–34	2–10
Пигментация после сыпи	30 %	25 %
Рецидивы сыпи	10 %	–
Зуд	–	13 %
Шелушение на месте сыпи	30 %	7 %
Суставной синдром	40 %	31 %
Локализация	Лицо, живот, грудь, нижние и верхние конечности, ягодицы	Лицо, живот, грудь, подмышечная область нижние и верхние конечности, спина, ягодицы

Диагнозы при поступлении выставлялись следующие: острая респираторная инфекция, вазопатия (n=5), иерсиниоз (n=2), инфекционный мононуклеоз (n=4), геморрагический васкулит (n=9), алерго-сепсис Вислера–Фанкони (n=1), узловатая эритема (n=2), болезнь Кавасаки (n=2), многоформная экссудативная эритема (n=2). Окончательные диагнозы: геморрагический васкулит (n=6), синдром Кавасаки (n=3), узловатая эритема (n=1), алерго-сепсис Вислера–Фанкони (n=1), инфекционный мононуклеоз (n=3), острая респираторная инфекция, вазопатия (n=10), многоформная экссудативная эритема (n=3). Окончательный диагноз соответствовал предварительному в 50 % случаев.

**Метод проточной цитометрии.** Иммунофенотипирование лимфоцитов осуществляли методом проточной цитометрии с использованием 5-канального проточного цитометра FC500 («Beckman Coulter», США) и 2 панелей моноклональных антител CYTO-STAT Tetra CHROME, включающих CD45-FITC, CD4-RD1, CD8-ECD, CD3-PC5 и CD45-FITC, CD56-RD1, CD19-ECD, CD3-PC5 («Beckman Coulter», США, «R&D», Канада). Количество минорной популяции  $\gamma\delta$ T-лимфоцитов определяли с использованием моноклональных антител к  $\gamma\delta$ TCR-FITC, CD45-PE, CD8-PC5, CD3-PC7 («Beckman Coulter», США). Цельную гепаринизированную периферическую венозную кровь инкубировали с соответствующими антителами или негативными контролями в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре. Для лизирования эритроцитов использовали раствор Optu Lyse B («Beckman Coulter», США).

**Культуральный метод.** Функциональную активность  $\gamma\delta$ T-лимфоцитов определяли в культуре мононуклеаров периферической крови (МПК) в присутствии 10 мкМ специфического активатора изопентенил пирофосфата (IPP, isopentenyl pyrophosphate, «Fluka», Швейцария). МПК выделяли из цельной периферической венозной крови центрифугированием на градиенте плотности Histopaque-1077 («Sigma», Германия) в течение 30 мин при 1500 об/мин и 4°C с последующим 2-кратным отмыванием в фосфатно-буферном растворе

(ФБР, «Gibco», Германия) в течение 10 мин при 1500 об/мин и 4°C. МПК культивировали в концентрации  $2 \cdot 10^5$  клеток/лунку 96-луночного планшета в культуральной среде RPMI-1640 с добавлением 25 мМ HEPES, 2 мМ L-глутамин, 1 % антибиотика («Sigma», Германия), 10 % инактивированной человеческой сыворотки группы АВ («РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий», Республика Беларусь), 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 (ИЛ-2, «Sigma», Германия) при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 6 суток.

**Иммуноферментный анализ.** Для определения общих и специфических иммуноглобулинов, интерферона-α (IFNα) использовали следующие наборы для иммуноферментного анализа: «Иммуноскрин-Г,М,А-ИФА-БЕСТ» (А-8674, «Вектор-Бест», Россия), «ВектоЦМВ-IgM» (D-1552, «Вектор-Бест», Россия), «ВектоЦМВ-IgG» (D-1554, «Вектор-Бест», Россия), «Лайм Бест-IgG» (D-1452, «Вектор-Бест», Россия), «Anti-EBNA-1 ELISA (IgG)» (EI 2793-9601 G, «Euroimmun», Германия) и «альфа-Интерферон-ИФА-БЕСТ» (А-8758, «Вектор-Бест», Россия) в соответствии с рекомендациями изготовителя. Измерение оптической плотности раствора в образцах выполняли с использованием иммуноферментного анализатора «Thermo Fischer» (Германия) при  $\lambda=450$  нм и  $\lambda=620-650$  нм.

**Метод прямой иммунофлуоресценции.** Анти-нейтрофильные цитоплазматические антитела (ANCA) определяли в сыворотке пациентов методом прямой флуоресценции с использованием тест-системы «ANCA-РИФ-ТЕСТ» («РНПЦ эпидемиологии и микробиологии», Беларусь) и флуоресцентного микроскопа Axiovert 200 («Carl Zeiss», Германия) согласно инструкции производителя. Результаты флуоресценции оценивались полуколичественно.

**Статистический анализ.** Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 7.0. Для проверки на нормальность распределения применяли критерий Холмогорова-Смирнова. Сравнение 2 групп и определение достоверности различий осуществляли непараметрическим критерием Манна – Уитни. Корреляционный анализ выполняли путем определения коэффициентов корреляции по Спирмену. Во всех случаях результаты считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Полученные данные представлены в медианах (Me) с 25 и 75 % перцентилями.

## Результаты исследования и их обсуждение

**Характеристика клеточных факторов иммунного ответа у детей с ГВ.** В периферической крови детей с ГВ исследовано количественное содержание лимфоцитов и охарактеризован их субпопуляционный состав. Сравнительная характеристика относительного содержания субпопуляций лимфоидных клеток в клинических группах детей с ГВ представлена в табл. 3.

У детей группы 1 относительно группы 2 установлено статистически значимое увеличение количества CD3<sup>+</sup>T-лимфоцитов, главным образом, за счет повышения процентного содержания CD8<sup>+</sup>T-клеток ( $p < 0,05$ ), что привело к инверсии соотношения Т-хелперов/цитотоксических Т-лимфоцитов (табл. 3). Кроме того, у детей с иммунокомплексными васкулитами показана тенденция к увеличению незрелых CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T-клеток.

В ходе исследования выявлена тенденция к снижению CD19<sup>+</sup>B-лимфоцитов в обеих исследуемых группах относительно нормативных показателей. Количество субпопуляций натуральных киллеров (НК- и НКТ-клеток) статистически значимо не изменялось, однако в группе 2 отмечалась преимущественная экспрессия CD56<sup>low</sup> маркера, характерного для истинных НК-клеток.

У пациентов с системными васкулитами наряду с увеличением относительного количества классической популяции αβТ-лимфоцитов установлено снижение минорной популяции CD3<sup>+</sup>T-лимфоцитов, экспрессирующих γδ Т-клеточный рецептор ( $p < 0,05$ ).

В связи с установленными количественными изменениями субпопуляции γδТ-лимфоцитов проведены исследования функциональных свойств данной популяции клеток. Показано, что способность γδТ-лимфоцитов к активации в ответ на специфический стимулятор IPP у детей с ГВ варьировала в зависимости от генеза заболевания и снижена в группе детей с васкулитами инфекционно-аллергического генеза по сравнению с аналогичным показателем в группе с системными васкулитами ( $p < 0,05$ ) (рис. 2). Индексы стимуляции γδТ-лимфоцитов при культивировании с IPP составили в группе 1 – 5,09 (3,95 ÷ 5,50) и в группе 2 – 1,78 (1,70 ÷ 2,50).

Согласно литературным данным субпопуляция γδТ-лимфоцитов представляет собой гетерогенную минорную популяцию Т-лимфоцитов периферической крови, но доминирует среди популяции лимфоидных Т-клеток слизистых оболочек, сочетая в себе свойства как клеток врожденного, так и приобретенного иммунитета. В силу своей гетерогенности популяция γδТ-лимфоцитов обладает многообразными биологическими функциями, которые определяются многими факторами: структурой антигенных рецепторов, распределением клеток в тканях, локальным микроокружением, способом активации клеток и стадией иммунного ответа, на которой происходит их активация и др. [9, 10]. У детей с ГВ популяция γδТ-лимфоцитов характеризуется различным функциональным состоянием. Так, при системном (иммунокомплексном) генезе васкулита наблюдается снижение количества γδТ-лимфоцитов в периферической крови и высокая способность к активации, что может отражать миграцию данной субпопуляции в ткани и активное

вовлечение в иммунопатогенез системного васкулита. У детей с ГВ инфекционно-аллергического генеза при нормальном содержании  $\gamma\delta$ T-лимфоцитов в периферической крови активационная способность данной субпопуляции значительно снижена.

Таблица 3

Количество субпопуляций лимфоидных клеток у детей с ГВ

Table 3

The numbers of lymphoid cell subsets in children with hemorrhagic vasculitis

Иммунологический показатель	Относительное содержание, %		p
	группа 1	группа 2	
Лимфоциты	62,2 (35,0÷65,1)	51,5 (39÷70,5)	n.s.
CD3 <sup>+</sup> T-клетки	74,4 (68,8÷75,8)	63,95 (59,9÷70,1)	p<0,05
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> Т-хелперы	33,1 (27,9÷67,8)	52,25 (37÷55,6)	p<0,05
Цитотоксические CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> Т-клетки	55,9 (27,4÷66,9)	38,6 (32,5÷49,9)	p<0,05
Иммунорегуляторный индекс	0,59 (0,50÷1,53)	1,43 (1,04÷1,67)	n.s.
Незрелые CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> Т-клетки, %	1,22 (0,58÷1,91)	0,78 (0,59÷1,36)	n.s.
CD56 <sup>+</sup> NK-клетки, %	8,51 (6,47÷12,33)	10,7 (7,37÷11,15)	n.s.
CD56 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> NKT-клетки, %	0,75 (0,36÷1,93)	1,185 (0,55÷2,49)	n.s.
CD19 <sup>+</sup> В-лимфоциты, %	10,2 (6,06÷23,9)	12,45 (11÷27,85)	n.s.
$\gamma\delta$ TCR <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> Т-клетки, %	1,88 (1,58÷3,71)	3,34 (2,08÷5,17)	p<0,05

Примечание: p - статистически значимые различия между группами; n.s. – статистически значимые различия отсутствуют.

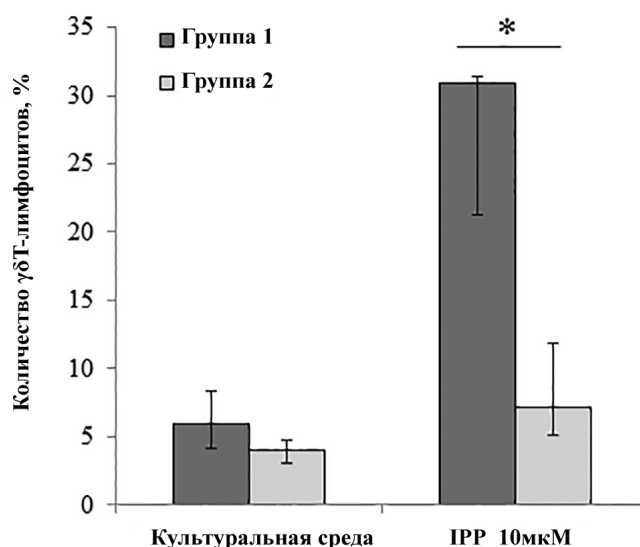


Рис. 2. Количество  $\gamma\delta$ T-лимфоцитов (%) в условиях специфической стимуляции IPP у пациентов с различными патогенетическими формами ГВ.

Примечание: \* – p<0,05, статистически значимые различия между исследуемыми группами

Fig. 2.  $\gamma\delta$ T-lymphocytes number (%) under specific IPP stimulation condition in children with different pathogenetic pattern of hemorrhagic vasculitis.

Note: \* – p<0,05, statistically significant differences in investigated groups

**Характеристика гуморальных факторов иммунного ответа у детей с ГВ.** Серологические маркеры воспалительного процесса (С-реактивный белок (СРБ), скорость оседания эритроцитов (СОЭ), IFN $\alpha$ ) представлены в табл. 4. У детей с системными васкулитами установлено увеличение концентрации СРБ и СОЭ ( $p < 0,01$ ) по сравнению с аналогичными показателями детей инфекционно-аллергическими васкулитами. При этом у детей группы 1 с увеличением СРБ повышались значения СОЭ и прослеживается обратная корреляция с удельным содержанием  $\gamma\delta$ T-лимфоцитов в периферической крови ( $R = -0,7$ ;  $p < 0,05$ ), что может являться результатом миграции клеток в ткани в ходе развития иммунного воспаления.

Таблица 4

**Серологические маркеры воспалительного процесса у детей с ГВ**

Table 4

**Serological markers of inflammation in children with hemorrhagic vasculitis**

Показатели	Клиническая группа		p
	группа 1	группа 2	
СРБ, мг/л	54,9 (17,0÷92,8)	4,7 (3,5÷16,7)	$p < 0,01$
СОЭ, мл/ч	34,0 (28,0÷40,0)	18,0 (8,0÷25,0)	$p < 0,01$
IFN $\alpha$ , пг/мл	2,3 (1,3÷3,4)	12,5 (9,3÷15,7)	$p < 0,01$

Примечание: p - статистически значимые различия между группами.

На фоне повышения СРБ и СОЭ у детей группы 1 регистрировался низкий уровень синтеза IFN $\alpha$ , который обладает противовирусной, антипролиферативной и иммуномодулирующей активностью. Известно, что ряд аутоиммунных заболеваний и острых вирусных инфекций, характеризуются подавлением индуцируемой продукции IFN $\alpha$ . В норме, под влиянием IFN $\alpha$  на поверхности клеток увеличивается экспрессия антигенов главного комплекса гистосовместимости I класса, что способствует иммунологическому распознаванию внутриклеточных антигенов и активации механизмов специфической цитотоксичности, а также повышается продолжительность жизни цитотоксических CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов за счет экспрессии антиапоптотических генов. IFN $\alpha$  также усиливает экспрессию Fc-рецептора на мембране макрофагов, что увеличивает эффективность антитело-зависимой цитотоксичности, и играет решающую роль в созревании и дифференцировке дендритных клеток [2, 11]. Снижение способности лимфоцитов синтезировать данный цитокин у детей с ГВ системного генеза свидетельствует о предположительном врожденном или приобретенном дефекте системы интерферонов и может являться показанием для интерферон-стимулирующей терапии.

В табл. 5 представлены результаты определения сывороточных иммуноглобулинов у детей исследуемых групп. Анализ полученных результатов проведен с учетом возрастных норм. У детей группы 1 в 50 % случаев отмечено увеличение количества IgM и IgA, а в 20 % случаев – IgG. В группе 2 наблюдалось преимущественное увеличение концентрации IgM (50 %), в то время как IgG и IgA увеличивались, соответственно в 37,5 и 12,0 % случаев.

Таблица 5

**Концентрация иммуноглобулинов в исследуемых группах детей с различными формами течения ГВ**

Table 5

**Immunoglobulins concentration in children with different patterns of hemorrhagic vasculitis**

Клиническая группа	Концентрация Ig, г/л		
	IgM	IgA	IgG
группа 1	1,88 1,43÷2,32	2,30 0,82÷4,12	8,02 6,89÷13,28
группа 2	1,88 1,25÷2,46	2,42 1,02÷2,95	11,39 8,68÷17,83

Повышение уровня общих иммуноглобулинов может свидетельствовать об активном формировании первичного и вторичного гуморального иммунного ответа у пациентов с ГВ с дальнейшим образованием

ЦИК и активации системы комплемента. Согласно литературным данным в большинстве случаев (80 %) ЦИК представлены IgA, однако, в состав иммунных депозитов могут также входить IgG (в 20 % случаев), IgM, С3 и фибрин [12].

Для идентификации этиологического фактора проведены качественные исследования для выявления специфических иммуноглобулинов к следующим инфекционным агентам: HSV-1, -2, CMV, EBV, энтеровирусы (EVI), вирус гепатита В (HBsAg), вирус гепатита С (HCV), *Borrelia burgdorferi s. l.*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, бактериологические исследования на определение *Mycoplasma pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Yersinia*, *Giardia*, *Candida spp.*, а также выявление ротавируса и глистных инвазий. Установлено, что клиническая манифестация ГВ в 73 % случаях ассоциировалась с вирусной, бактериальной или вирусно-бактериальной сочетанной инфекцией. В качестве основных этиологических агентов идентифицированы: EBV (61,5 %), CMV (26,9 %), *Borrelia burgdorferis. l.* (7,7 %), *Staphylococcus epidermidis* (7,7 %), *Streptococcus pneumoniae* (3,8 %), *Yersinia* (3,8 %), *Chlamydia pneumoniae* (3,8%), *Candida spp.* (3,8 %) (рис. 3).

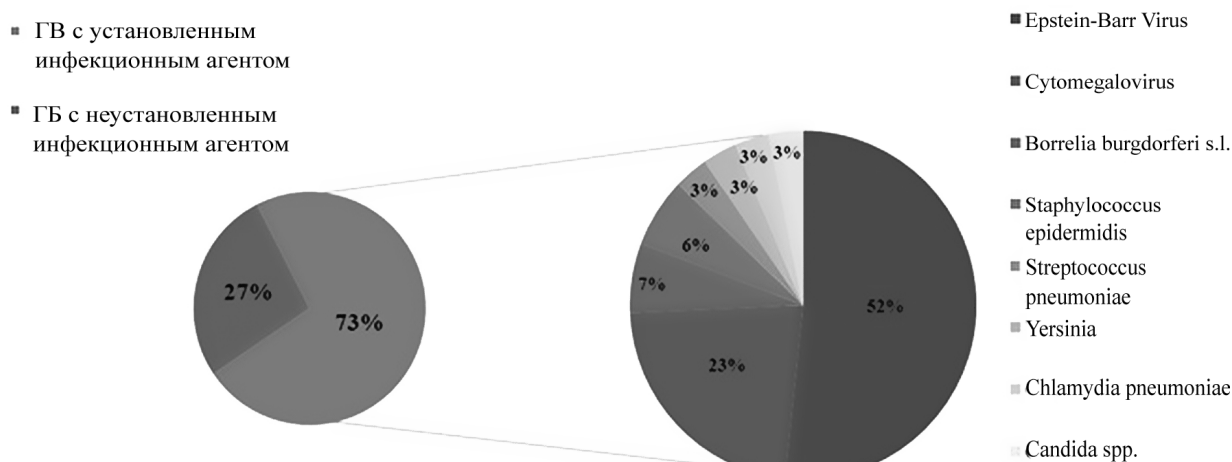


Рис. 3. Инфекционный агент как этиологический фактор ГВ у детей

Fig. 3. Infectious agent as an etiological factor of hemorrhagic vasculitis in children

Принимая во внимание, что в большинстве случаев ГВ ассоциировался с наличием EBV, проведены количественные исследования специфического IgG к нуклеарному антигену EBNA-1, представляющему собой единственный антиген вируса Эпштейна–Барр, который экспрессируется как в латентной, так и литической фазе вирусной инфекции. Синтез IgG EBNA-1 происходит на более поздних стадиях противовирусного иммунного ответа, однако, в ряде случаев может регистрироваться и в острой фазе заболевания [13]. Установлено, что у детей с ГВ специфический IgG EBNA-1 определялся в диапазоне 58,4 (0,9 ÷ 139,0) RU/мл. При этом, у детей группы 2 наблюдалось статистически значимое увеличение IgG EBNA-1 по сравнению с группой 1. Наряду с EBV у детей с ГВ в 23 % случаев идентифицировалась цитомегаловирусная инфекция. Показано, что IgM CMV регистрировались только у детей с иммунокомплексными васкулитами, в то время как IgG CMV выявлялись во всех исследуемых группах с ГВ. Кроме того, в группе 1 отмечалось наличие IgG *Borrelia burgdorferis. l.* (табл. 6).

Таблица 6

**Количество специфических иммуноглобулинов в исследуемых группах детей с ГВ**

Table 6

**Antibodies concentration in investigated groups of children with hemorrhagic vasculitis**

Клиническая группа	IgG EBNA-1, RU/ml	IgM CMV, %	IgG CMV, %	IgG <i>Borrelia burgdorferis. l.</i> , %
группа 1	19,6 [4,8 ÷ 53,2]	20	30	20
группа 2	101,7 [0,0 ÷ 150,1]	–	18,7	–
p	p<0,05		n.s.	

Примечание: p - статистически значимые различия между группами; n.s. – статистически значимые различия отсутствуют.



При проведении корреляционного анализа выявлены взаимосвязи общего количества IgG и уровня специфических антител IgG к ядерному антигену EBNA-1 вируса Эпштейна–Барр ( $R=0,61$ ;  $p<0,001$ ); общего количества IgG и уровня специфических антител IgG CMV ( $R=0,42$ ;  $p<0,05$ ), что свидетельствует о ведущей роли вируса Эпштейна–Барр и цитомегаловируса как основных этиологических факторов, инициирующих развитие ГВ у детей.

Персистенция EBV в организме может приводить к развитию ANCA-ассоциированных системных васкулитов, в том числе гранулематозу Вегенера и микроскопическому полиангииту. При этом инфекционный агент может выступать в качестве потенциального триггера воспалительного каскада и приводить к срыву аутоотолерантности в результате феномена молекулярной мимикрии [14].

Для выявления аутоиммунного компонента у детей с ГВ определены ANCA, представляющие класс органоспецифических аутоантител, реагирующие с различными компонентами цитоплазмы нейтрофилов и моноцитов, и являющиеся специфическим маркером системных васкулитов. Особенно важное значение имеют ANCA, реагирующие с различными ферментами цитоплазмы нейтрофилов: протеиназой-3, миелопероксидазой, реже с лактоферинном, катепсином G и др. Протеиназа-3 и миелопероксидаза экспрессируются на мембране нейтрофилов при стимуляции цитокинами (фактор некроза опухоли- $\alpha$ , интерлейкин-8) или в процессе апоптоза нейтрофилов. Связывание ANCA с мембран-ассоциированными формами данных ферментов приводит к активации нейтрофилов, индуцирует хемотаксис, продукцию оксида азота, адгезию нейтрофилов к эндотелию, гиперэкспрессию молекул адгезии на мембране нейтрофилов и эндотелиальных клеток [8, 15].

В 68,7 % случаев у детей с ГВ выявлены ANCA. При этом, наибольшая интенсивность свечения цитоплазмы нейтрофилов (3+) зарегистрирована в группе детей с инфекционно-аллергическими васкулитами (рис. 4), однако в группе с иммунокомплексными васкулитами ANCA идентифицировались в большем проценте случаев (71,4 %).

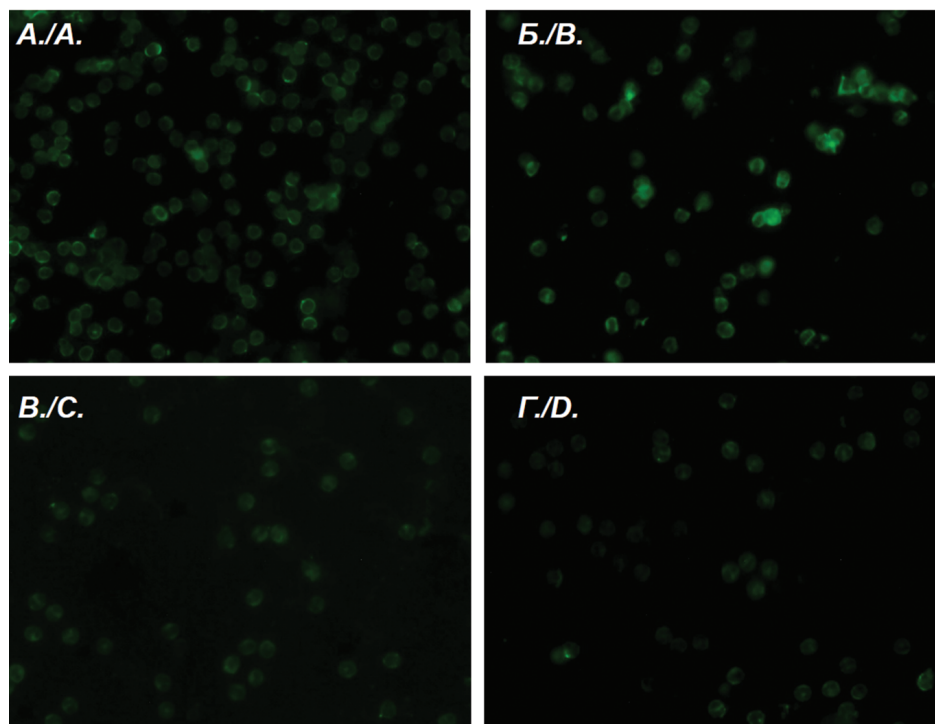


Рис. 4. Идентификация ANCA методом прямой иммунофлуоресценции в сыворотках детей с ГВ.

Примечание: А – положительный контроль, Б – сыворотка пациента с ГВ группы 2 (+++), В – сыворотка пациента с ГВ группы 1 (++) , Г – сыворотка пациента с ГВ группы 2 (+).

Fig. 4. ANCA identification by direct immunofluorescence in sera of children with hemorrhagic vasculitis.

Note: А – positive control, В – serum of patient with hemorrhagic vasculitis from group 2 (+++), С – serum of patient with hemorrhagic vasculitis from group 1 (++) , D – serum of patient with hemorrhagic vasculitis from group 2 (+).

Наличие ANCA коррелировало с количеством  $\gamma\delta$ T-лимфоцитов ( $R=0,95$ ;  $p<0,01$ ) и концентрацией специфических антител IgG EBNA-1 ( $R=0,59$ ;  $p<0,01$ ), что, предположительно, подтверждает гипотезу молекулярной мимикрии инфекционного агента и катионных нейтрофильных белков, согласно которой на фоне инфекции инициируется синтез ANCA.

## Заключение

У детей с ГВ клиническая манифестация болезни в 73 % случаях ассоциировалась с вирусной, бактериальной или вирусно-бактериальной сочетанной инфекцией.

Установлены выраженные различия в иммунологических показателях клеточного звена иммунитета: у детей с системными ГВ по сравнению с ГВ инфекционно-аллергического генеза регистрируется увеличение относительного количества классических CD3<sup>+</sup>αβT-лимфоцитов, сопровождающееся инверсией соотношения Т-хелперы/Т-цитотоксические, и снижение количества минорной популяции CD3<sup>+</sup>γδT-лимфоцитов, которые обратно пропорционально коррелируют с уровнем СРБ и СОЭ (R= -0,7; p<0,05).

T-лимфоциты с γδT-клеточным рецептором характеризуются различным функциональным состоянием в исследуемых группах детей с ГВ. При системном (иммунокомплексном) генезе васкулита, несмотря на снижение количества γδT-лимфоцитов в периферической крови, наблюдается высокая способность данной популяции к активации и, соответственно, вовлечение в иммунопатогенез системного васкулита. У детей с ГВ инфекционно-аллергического генеза при нормальном содержании γδT-лимфоцитов в периферической крови активационная способность значительно снижена, что может являться причиной нарушения реализации механизмов противоинфекционной защиты.

Кроме того, выявленная корреляция специфических аутоантител ANCA с количеством γδT-лимфоцитов в периферической крови и концентрацией специфических антител IgG EBNA-1, предположительно, подтверждает гипотезу молекулярной мимикрии инфекционного агента и катионных нейтрофильных белков, согласно которой на фоне инфекции инициируется синтез ANCA.

Таким образом, представленные данные о количественных и функциональных изменениях γδT-лимфоцитов свидетельствуют о том, что данная популяция клеток может являться потенциальным лабораторным биомаркером ранней диагностики системных (по количественному показателю) или инфекционно-аллергических (по функциональному потенциалу) ГВ у детей исследуемых групп, что позволит провести раннюю дифференциальную диагностику и прогнозировать дальнейшее течение заболевания.

## Библиографические ссылки

1. Muñoz-Grajales C and Pineda C. Pathophysiological Relationship between Infections and Systemic Vasculitis. *Autoimmune Diseases*. 2015; Volume 2015. Article ID 286783, 8 pages. DOI: 10.1155/2015/286783.
2. Schnabel A and Hedrich C. Childhood Vasculitis. *Front Pediatr*. 2019; 6:421–431. DOI: 10.3389/fped.2018.00421.
3. Eleftheriou D, Batu E, Ozen S and Brogan P. Vasculitis in children. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30:i94–i103. DOI: 10.1093/ndt/gfu393.
4. Falcini F and Cimaz R. Update on vasculitis in childhood. *Future Rheumatol*. 2006;1(6):751–760. DOI: 10.2217/17460816.1.6.751.
5. Mamyrbayeva M, Isanguzhina Zh, Shilmanova A, Nurgaliev N & Ismambetova G. Herpesvirus Infection in Development of Hemorrhagic Vasculitis in Children (Literature Review). *International Journal of Engineering and Technology (UAE)*. 2018;7:326–329. DOI: 10.14419/ijet.v7i4.38.24494.
6. Ramirez G, Maugeri N, Sabbadini M, Rovere-Querini P and Manfredi A. Intravascular immunity as a key to systemic vasculitis: a work in progress, gaining momentum // *Clinical and Experimental Immunology*. 2013;175:150–166. DOI: 10.1111/cei.12223.
7. Weiss P. Pediatric vasculitis. *Pediatr Clin North Am*. 2012;59(2):407–423. DOI: 10.1016/j.pcl.2012.03.013.
8. Wilde B, Thewissen M, Damoiseaux J, van Paassen P, Witzke O and Tervaert JW. T-cells in ANCA-associated vasculitis: what can we learn from lesional versus circulating T-cells? *Arthritis Research & Therapy*. 2010;12:204–212. URL: <http://arthritis-research.com/content/12/1/204>.
9. Kabelitz D, Fazio J, Adam-Klages S, Marget M, Oberg H, Wesch D, Lamprecht P. Gamma delta T-cells: basic features and potential role in vasculitis. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2010;28(1 Suppl 57):104–9.
10. Paul S, Giri S and Lal G. Role of gamma-delta T-cells in autoimmunity. *Journal of LEUKOCYTE Biology*. 2014;97. DOI: 10.1189/jlb.3RU0914-443R.
11. Ozen S and Batu E. Vasculitis Pathogenesis: Can We Talk About Precision Medicine? *Front Immunol*. 2018;9:1892. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01892.
12. Козарезова ТИ, Климович НН, Кувшинников ВА, Козарезов СН. *Геморрагический васкулит у детей: учебно-методическое пособие*. Минск: БелМАПО, 2007. с. 39.
13. Frappier L. Contributions of Epstein–Barr nuclear antigen 1 (EBNA1) to cell immortalization and survival. *Viruses*. 2012;4(9):1537–1547. DOI: 10.3390/v4091537.
14. Yamaguchi M, Yoshioka T, Yamakawa T et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis associated with infectious mononucleosis due to primary Epstein–Barr virus infection: report of three cases. *Clin Kidney J*. 2014;7:45–48. DOI: 10.1093/cjk/sft140.
15. Jennette J and Falk R. Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-mediated disease. *Nature Reviews Rheumatology*. 2014;10:463–473. DOI: 10.1038/nrrheum.2014.103.

## References

1. Muñoz-Grajales C and Pineda C. Pathophysiological Relationship between Infections and Systemic Vasculitis. *Autoimmune Diseases*. 2015; Volume 2015. Article ID 286783, 8 p. DOI: 10.1155/2015/286783.
2. Schnabel A and Hedrich C. Childhood Vasculitis. *Front Pediatr*. 2019; 6:421–431. DOI: 10.3389/fped.2018.00421.

3. Eleftheriou D, Batu E, Ozen S and Brogan P. Vasculitis in children. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30:i94–i103. DOI: 10.1093/ndt/gfu393.
4. Falcini F and Cimaz R. Update on vasculitis in childhood. *Future Rheumatol*. 2006;1(6):751–760. DOI: 10.2217/17460816.1.6.751.
5. Mamyrbayeva M, Isanguzhina Zh, Shilmanova A, Nurgaliev N & Ismambetova G. Herpesvirus Infection in Development of Hemorrhagic Vasculitis in Children (Literature Review). *International Journal of Engineering and Technology (UAE)*. 2018;7:326–329. DOI: 10.14419/ijet.v7i4.38.24494.
6. Ramirez G, Maugeri N, Sabbadini M, Rovere-Querini P and Manfredi A. Intravascular immunity as a key to systemic vasculitis: a work in progress, gaining momentum // *Clinical and Experimental Immunology*. 2013;175:150–166. DOI: 10.1111/cei.12223.
7. Weiss P. Pediatric vasculitis. *Pediatr Clin North Am*. 2012;59(2):407–423. DOI: 10.1016/j.pcl.2012.03.013.
8. Wilde B, Thewissen M, Damoiseaux J, van Paassen P, Witzke O and Tervaert JW. T-cells in ANCA-associated vasculitis: what can we learn from lesional versus circulating T-cells? *Arthritis Research & Therapy*. 2010;12:204–212. URL: <http://arthritis-research.com/content/12/1/204>.
9. Kabelitz D, Fazio J, Adam-Klages S, Marget M, Oberg H, Wesch D, Lamprecht P. Gamma delta T-cells: basic features and potential role in vasculitis. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2010;28(1 Suppl 57):104–9.
10. Paul S, Giri S and Lal G. Role of gamma-delta T-cells in autoimmunity. *Journal of Leukocyte Biology*. 2014;97. DOI: 10.1189/jlb.3RU0914-443R.
11. Ozen S and Batu E. Vasculitis Pathogenesis: Can We Talk About Precision Medicine? *Front Immunol*. 2018;9:1892. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01892.
12. Kozarezova TI, Klimkovich NN, Kuvshinnikov VA, Kozarezov SN. *Gemorragicheskiy vaskulit u detey: uchebno-metodicheskoe posobie*. [Hemorrhagic vasculitis in children: Study guide]. Minsk: BelMAPGE, 2007. p. 39. Russian.
13. Frappier L. Contributions of Epstein–Barr nuclear antigen 1 (EBNA1) to cell immortalization and survival. *Viruses*. 2012;4(9):1537–1547. DOI: 10.3390/v4091537.
14. Yamaguchi M, Yoshioka T, Yamakawa T et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis associated with infectious mononucleosis due to primary Epstein–Barr virus infection: report of three cases. *Clin Kidney J*. 2014;7:45–48. DOI: 10.1093/ckj/sft140.
15. Jennette J and Falk R. Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-mediated disease. *Nature Reviews Rheumatology*. 2014;10:463–473. DOI: 10.1038/nrrheum.2014.103.

Статья поступила в редколлегию 04.11.2020.  
Received by editorial board 04.11.2020.