

ОПРЕДЕЛЕНИЕ IL-10 И IL-17 В СУПЕРНАТАНТАХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ПРИ ЭКСПАНСИИ ГАММА ДЕЛЬТА Т-ЛИМФОЦИТОВ ИЗ КРОВИ БОЛЬНЫХ РЕАКТИВНЫМИ ЭРИТЕМАМИ

Сорокина Е. В. ^{1,2},
Калиниченко Е. О. ¹,
Бишева И. В. ¹,
Столпникова В. Н. ¹,
Сходова С. А. ¹

¹ ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.

² Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства.

РОЛЬ ГАММА ДЕЛЬТА Т-ЛИМФОЦИТОВ И ОТДЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ РЕАКТИВНЫХ ЭРИТЕМАХ

THE ROLE OF GAMMA DELTA T-LYMPHOCYTES AND INDIVIDUAL CYTOKINES IN REACTIVE ERYTHEMAS

10.46235/1028-7221-17281-DOI

DETERMINATION OF IL-10 AND IL-17 IN CELL CULTURE SUPERNATANTS DURING THE EXPANSION OF GAMMA DELTA T LYMPHOCYTES FROM THE BLOOD OF PATIENTS WITH REACTIVE ERYTHEMA

Sorokina E. V. ^{a, b},
Kalinichenko E. O. ^a,
Bisheva I. V. ^a,
Stolpnikova V. N. ^a,
Skhodova S. A. ^a

^a I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow.

^b Federal state budgetary educational institution of additional professional education Institute of advanced training of Federal medical and biological Agency, Moscow.

Резюме

Реактивные эритемы - группа дерматозов со сложным иммуногенезом, в котором, вероятно, как и в развитии многих аутовоспалительных заболеваний, принимают участие субпопуляции $\gamma\delta$ Т-клеток. Несмотря на важную роль IL-17, его избыточный синтез, в том числе $\gamma\delta$ Т-клетками, способен индуцировать аутовоспаление. Напротив, IL-10 играет ключевую роль в контроле врождённых иммунных реакций, подавляя функцию моноцитов/макрофагов путём снижения выработки ими провоспалительных цитокинов. **Цель.** Экспансия $\gamma\delta$ Т-клеток культивированием *in vitro* лимфоцитов из крови больных эритемами в присутствии золедроната и добавления IL-2 и IL-15 и определение содержания IL-17 и IL-10 в супернатантах клеточных культур. **Материалы и методы.** Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) выделяли от 8 пациентов с реактивными эритемами (5 пациентов с многоформной эритемой, 1 пациент с кольцевидной центробежной эритемой, 2 пациента с мигрирующей эритемой – ранней формой болезни Лайма) и двух здоровых доноров в возрасте от 23 до 70 лет. Для культивирования $\gamma\delta$ Т лимфоцитов использовали модифицированный метод van Ackeretal(2016). Спонтанную и индуцированную секрецию цитокинов определяли методом твердофазного ИФА с использованием наборов Human IL-17 ELISA Kit(RK00397, ABclonal BiotechnologyCo., Китай) и Интерлейкин-10-ИФА-БЕСТ («Вектор Бест», Россия) согласно инструкциям производителей. **Результаты и заключение.** У пациентов с реактивными эритемами в процессе культивирования с золедронатом, IL-2 и IL-15 было получено к 7 дням культивирования от 3,1% до 62,8% клеток с экспрессией $\gamma\delta$ TCR. Наименее низкий процент содержания этих клеток отмечался в культуре клеток крови от пациентов с непрерывно-рецидивирующим течением многоформной эритемы и кольцевидной центробежной эритемы. В группе исследованных больных высокие уровни индуцированной продукции IL-17 могут указывать на наличие аутоиммунного компонента в патогенезе заболевания и/или отражают тяжесть течения. Эффективность терапии у обследованных больных коррелировала со способностью клеток крови в культуре к синтезу и высвобождению IL-10. Показано, что высокие значения спонтанной и индуцированной продукции IL-10 ассоциируются с хорошим ответом на терапию (значительное клиническое улучшение, длительная клиническая ремиссия). В то время как при низком терапевтическом эффекте (быстрое развитие рецидивов после окончания курса терапии) выявлены низкие значения спонтанной и индуцированной продукции IL-10. Полученные данные указывают на вероятную прогностическую значимость этих анализов как биомаркеров. Определение этих анализов в культуре МЛПК у больных исследованными патологиями в будущем позволят усовершенствовать оценку эффективности терапии и прогнозировать течение заболевания. Однако необходимы

РОЛЬ ГАММА ДЕЛЬТА Т-ЛИМФОЦИТОВ И ОТДЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ РЕАКТИВНЫХ ЭРИТЕМАХ

THE ROLE OF GAMMA DELTA T-LYMPHOCYTES AND INDIVIDUAL CYTOKINES IN REACTIVE ERYTHEMAS

10.46235/1028-7221-17281-DOI

дальнейшие исследования в этом направлении, в том числе при других нозологических формах.

Ключевые слова: многоформная эритема, кольцевидная эритема, мигрирующая эритема, гамма дельта Т- лимфоциты, интерлейкины, биомаркеры.

Abstract

Reactive erythemas are a group of dermatoses with complex immunogenesis involving subpopulations of $\gamma\delta$ T cells. Despite the important role of IL-17, its overproduction, including by $\gamma\delta$ T cells, is capable of inducing autoinflammation. On the contrary, IL-10 plays a key role in the control of innate immune responses by suppressing the function of monocytes/macrophages. Goal. Expansion of $\gamma\delta$ T cells by in vitro cultivation of lymphocytes from the blood of patients with erythema in the presence of zoledronate, IL-2 and IL-15 and determination of the content of IL-17, IL-10 in supernatants. Materials and methods. Peripheral blood mononuclear cells were isolated from 8 patients with reactive erythema (5 patients with erythema multiforme, 1 patient with ring-shaped centrifugal erythema, 2 patients with erythema migrans, an early form of Lyme disease) and two healthy donors aged 23 to 70 years. A modified van Ackeretal method (2016) was used to culture $\gamma\delta$ T lymphocytes. Cytokine concentrations were determined by solid-phase ELISA using Human IL-17 ELISA Kit (ABclonal BiotechnologyCo., China) and Interleukin-10-ELISA-BEST (Vector Best, Russia).

Results and conclusion. In patients with reactive erythema, 3.1% to 62.8% of cells with expression of $\gamma\delta$ TCR were obtained by 7 days of cultivation with zoledronate, IL-2 and IL-15. The minimum percentage of these cells was observed in blood cell culture from patients with continuously recurrent erythema multiforme and ring-shaped centrifugal erythema. In the examined patients, high levels of induced IL-17 production may indicate the presence of an autoimmune component in the pathogenesis of the disease and reflect the severity of the course. The effectiveness of therapy correlated with the ability of blood cells to synthesize and release IL-10. It has been demonstrated that high levels of IL-10 production are associated with significant clinical improvement and long-term clinical remission. On the contrary, with a low therapeutic effect, low values of spontaneous and induced IL-10 production were revealed. The determination of these analytes (IL-17, IL-10) in PBMC culture in patients with the studied pathologies in the future will improve the assessment of the effectiveness of therapy and predict the course of the disease.

Keywords: erythema multiforme, ring-shaped erythema, migrating erythema, gamma delta T lymphocytes, interleukins, biomarkers.

1 Введение

2 Реактивные эритемы представляют собой группу дерматозов со
3 сложным малоизученным иммуногенезом, для которых отсутствуют как
4 специфические биологические маркеры, так и специфическая
5 этиопатогенетическая терапия. Реактивные эритемы характеризуются общими
6 патогенетическими механизмами, в цепочке которых лежат дисфункции
7 иммунного ответа, ассоциированные, поддерживаемые или индуцируемые
8 триггерными факторами различной природы. Взгляд на эти патологии с
9 позиций врожденного и адаптивного иммунитета поможет приблизиться к
10 прерыванию порочного круга взаимодействия триггеров и иммунной системы.
11 Публикации, посвященные данным о роли и участии иммунных клеток в
12 патогенезе реактивных эритем и их функциональной активности, единичны.

13 Многоформная эритема - воспалительное заболевание кожи и слизистых
14 оболочек, в основном связанное с инфекционными агентами, такими как вирус
15 простого герпеса (*HSV I/II*), *Mycoplasma pneumoniae*, хотя оно также может
16 быть «идиопатическим». Для проведения надлежащего обследования и
17 лечения крайне важно иметь полное представление о клинических
18 характеристиках мультиформной эритемы, провоцирующих факторах и
19 дифференциальной диагностике, включающий синдром Стивенса-
20 Джонсона/токсический эпидермальный некролиз. Лечение хронической или
21 рецидивирующей мультиформной эритемы может быть затруднительным,
22 особенно когда противовирусные препараты не предотвращают рецидив. В
23 структуре фигурных эритем особое место занимает кольцевидная
24 центробежная эритема (КЦЭ), являясь редко встречающимся и недостаточно
25 диагностируемым заболеванием. Несмотря на многочисленные исследования,
26 направленные на выявление этиологии значимых факторов возникновения
27 КЦЭ, полученные данные не дают основания для суждения о причинах,
28 вызывающих КЦЭ. В ведении таких пациентов главное – выявить триггерный
29 фактор. Мигрирующая эритема является ранней кожной манифестацией
30 Лайм-боррелиоза, проявлением воспалительно-аллергической реакции кожи
31 на присасывание клеща, наблюдающейся у 50-80% больных болезнью Лайма
32 после инкубационного периода (от 3 до 32 дней), при ее существовании более
33 4-х недель может быть отнесена к хронической. При ведении таких пациентов
34 важно своевременно установить диагноз и назначить адекватную терапию.

35 В аспекте как дифференциальной диагностики, так и прогнозирования
36 течения реактивных эритем целесообразно уделить внимание биомаркерам и
37 диагностическим инструментам для выявления признаков развития тяжелых
38 кожных реакций или признаков торпидных к терапии форм.

39 Известно, что в развитии аутовоспалительных заболеваний принимают
40 участие субпопуляции $\gamma\delta$ Т-клеток, способствуя повреждению тканей.
41 Воспалительные функции $\gamma\delta$ Т-клеток определяются синтезом ими цитокинов,
42 включая IL-17, IFN- γ и TNF- α , которые обычно вовлечены в аутоиммунитет.
43 Повышенная и нерегулируемая активность $\gamma\delta$ Т-клеток может способствовать

44 или вызывать аутоиммунные заболевания и аутовоспалительные процессы с
45 поражением кожи, включая псориаз, склеродермию, красную волчанку.

46 Благодаря уникальным свойствам $\gamma\delta$ Т-клеток, сочетающим
47 адаптивные и врожденные иммунные функции, более глубокое понимание
48 этой популяции Т-клеток позволит пролить новый свет на патогенез
49 аутовоспалительных заболеваний, в том числе реактивных эритем, и
50 потенциально позволит разработать новые терапевтические подходы.

51 Гамма-дельта ($\gamma\delta$) Т-клетки — это подгруппа Т-лимфоцитов, которые
52 экспрессируют γ - и δ -цепи Т-клеточного рецептора и демонстрируют
53 структурную и функциональную неоднородность. $\gamma\delta$ Т-клетки обычно в
54 небольшом количестве присутствуют в организме и составляют 1–5%
55 лимфоцитов крови и периферических лимфоидных тканей. Являясь
56 связующим звеном между врожденным и адаптивным иммунитетом, $\gamma\delta$ Т-
57 клетки способны быстро реагировать на стимуляцию и регулировать
58 иммунные реакции в периферических тканях.

59 Выработка цитокинов и факторов роста $\alpha\beta$ - и $\gamma\delta$ -Т-клетками помогает
60 поддерживать гомеостаз кожи. Повышенная и неконтролируемая активность
61 Т-клеток может способствовать развитию или вызывать хронические
62 воспалительные заболевания.

63 Интерлейкин (IL)-17A — это провоспалительный цитокин, впервые
64 клонированный в 1993 году [13, 22]. IL-17 выполняет множество
65 физиологических функций, в том числе: привлечение нейтрофилов,
66 стимуляцию Th2 для обеспечения эффективного ответа на воздействие
67 внеклеточных организмов, выработку макрофагами IL-1 β и TNF- α , а также
68 индукцию матриксных металлопротеиназ (ММП) — медиаторов воспаления.

69 Несмотря на важную роль цитокина IL-17 в регулировании адаптивной
70 и врожденной иммунной систем, его избыточная выработка может быть
71 связана с некоторыми заболеваниями.

72 В последние годы в различных исследованиях предпринимались
73 попытки связать сигнальный путь IL-17 с растущим числом воспалительных
74 заболеваний, таких как астма, хроническая обструктивная болезнь лёгких
75 (ХОБЛ), волчанка, ревматическая полимиалгия, гигантоклеточный артериит,
76 болезнь Бехчета, синдром сухого глаза, синдром Шегрена, болезнь Крона и
77 рассеянный склероз. Однако роль IL-17 до сих пор неясна. Также было
78 идентифицировано, что клетки Th17 и IL-17 вовлечены в патогенез некоторых
79 аутоиммунных заболеваний человека, таких как ревматоидный артрит,
80 рассеянный склероз, воспалительные заболевания кишечника, системный
81 склероз, первичный синдром Шегрена, очаговая алопеция и витилиго. Кроме
82 того, недавнее исследование сообщило о корреляции между уровнями IL-17 в
83 сыворотке крови и активностью заболевания при отдельных аутоиммунных
84 буллезных заболеваниях кожи, таких как дерматит герпетиформный (DH),
85 буллезный пемфигоид (BP) и обыкновенная пузырчатка (PV) [1].

86 Сигнальный путь IL-17 в настоящее время является важной
87 терапевтической мишенью, и существует ряд одобренных препаратов,
88 которые ингибируют IL-17, как прямо, так и косвенно. IL-17A является
89 прототипом семейства цитокинов IL-17, которое состоит из шести членов: IL-
90 17A–F, из которых наиболее изучены IL-17A, C, E и F. IL-17A, C и F участвуют
91 в аутоиммунном воспалении.

92 Выработка IL-17 в основном осуществляется Т-хелперами 17-го типа
93 (Th17), CD8⁺ Т-клетками, $\gamma\delta$ Т-клетками, инвариантными естественными Т-
94 киллерами (iNKT), естественными киллерами (NK), естественными Th17-
95 клетками и клетками-индукторами лимфоидной ткани (LTi). IL-17A и IL-17F,
96 которые часто экспрессируются совместно, могут секретироваться не только
97 клетками Th17, но и CD8-Т-клетками (Tc17) [4], а также инвариантными
98 естественными киллерными (iNK) Т-клетками [17], гамма-дельта ($\gamma\delta$) Т-
99 клетками [8, 3] и врождёнными лимфоидными клетками 3-го типа (ILC3) [15].
100 Существуют также противоречивые данные о способности миелоидных
101 клеток экспрессировать цитокины семейства IL-17 [14]. Напротив, IL-17C,
102 который играет ключевую роль в воспалении кожи, экспрессируется, в
103 основном, эпителиальными клетками и кератиноцитами в ответ на активацию
104 цитокинов и Toll-подобных рецепторов (TLR)[12]. В то же время, IL-17E (IL-
105 25), который является наиболее варибельным из семейства IL-17,
106 вырабатывается кератиноцитами, но также может секретироваться
107 эндотелиальными клетками, Т-клетками, макрофагами, миелоидными
108 клетками и ILC. IL-17E наиболее известен своей ролью в стимулировании
109 реакций Th2 и аллергии [20], хотя он также участвует в воспалении при
110 псориазе [21].

111 IL-10 — ключевой регуляторный цитокин, оказывающий плеiotропное
112 воздействие на несколько типов клеток. Основная функция IL-10 —
113 ограничивать чрезмерную реакцию Т-клеток на микробные патогены, чтобы
114 предотвратить хроническое воспаление и повреждение тканей. IL-10 играет
115 ключевую роль в контроле врождённых иммунных реакций, подавляя
116 функцию моноцитов/макрофагов, путём снижения выработки ими
117 провоспалительных цитокинов.

118 **Цель** — в попытке внести свой вклад в изучение роли $\gamma\delta$ Т-клеток в развитии
119 воспаления, определить степень участия этих клеток в патогенезе реактивных
120 эритем, а также пролить свет на значение IL-17, вырабатываемого в том числе
121 $\gamma\delta$ Т-клетками, в развитии реактивных эритем, мы поставили цель—
122 осуществить экспансию $\gamma\delta$ Т-клеток культивированием *in vitro* лимфоцитов,
123 выделенных из крови больных эритемами в присутствии золедроната и
124 добавления IL-2 и IL-15, а также определить содержание IL-17 и IL-10 в
125 супернатантах клеточных культур, отражающего функциональное состояние
126 этих клеток у пациентов.

127 **2 Материалы и методы**

128 Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) были выделены от 8
129 пациентов с реактивными эритемами (5 пациентов с многоформной эритемой,
130 1 пациент с кольцевидной центростремительной эритемой и 2 пациента с
131 мигрирующей эритемой – ранней формой болезни Лайма) и двух здоровых
132 доноров в возрасте от 23 до 70 лет. Кровь получали у пациентов с их
133 информированного согласия в пробирки типа Vacutainer с натрий-гепарином
134 в объеме 9-18 мл.

135 Из крови доноров получали фракцию мононуклеарных лейкоцитов (РВМС),
136 разделяя методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-
137 урографина. Кровь разбавляли вдвое средой RPMI-1640 («Панэко», Россия),
138 наслаивали 6 мл смеси на 3 мл фиколл-урографина плотностью 1,077
139 («Панэко», Россия) и центрифугировали 30 минут при 1500 об/мин на
140 центрифуге LMC-3000 (Biosan, Латвия) с бакетным ротором R-12/15. Далее
141 интерфазное кольцо, содержащее мононуклеары периферической крови
142 (МНПК, РВМС), переносили в новые пробирки и трижды отмывали средой
143 RPMI-1640, центрифугируя на той же центрифуге при 1000 об/мин 5 минут.

144 Для культивирования $\gamma\delta$ Т лимфоцитов использовали модифицированный
145 метод van Acker et al. (2016)[16]. Мононуклеарные клетки ресуспендировали в
146 среде RPMI-1640 с добавлением 10 % аутологичной сыворотки и золедроната
147 (3 мкМ, или 0,8 мкг/мл) в конечной концентрации 3 млн клеток/мл и
148 культивировали 3 дня. На 4-й день культивирования среду заменяли
149 (центрифугируя суспензию клеток и удаляя супернатант) на свежую RPMI-
150 1640 с добавлением IL-2 (100 МЕ/мл) и IL-15 (10 нг/мл). Через 3-4 дня
151 культивирования среду заменяли на свежую RPMI-1640, разделяя образец
152 клеток на две пробы – с добавлением 5 мкг/мл фитогемагглютинаина А и без
153 него, довели концентрацию клеток до 1 млн клеток/мл и инкубировали 48
154 часов, а также отбирали пробы клеток для проточной цитометрии. По
155 окончании инкубации суспензию клеток центрифугировали при 1000 об/мин
156 10 минут, супернатанты замораживали при - 80°C, а осадок клеток
157 использовали для анализа методом проточной цитометрии. Для этого клетки
158 ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере с концентрацией 1 млн/мл и
159 окрашивали флуоресцентно-мечеными антителами для проточной
160 цитометрии. Для этого к 50 мкл суспензии клеток добавляли 5 мкл антител,
161 инкубировали 20 минут в темноте и отмывали фосфатно-солевым буфером
162 (центрифугируя при 300g и удаляя супернатант). Далее суспензию
163 окрашенных клеток ресуспендировали в 400 мкл фосфатно-солевого буфера и
164 анализировали на проточном цитометре Cytomics FC500 (Beckman Coulter,
165 США).

166 Спонтанную и индуцированную секрецию цитокинов определяли методом
167 твердофазного ИФА с использованием наборов Human IL-17 ELISA Kit
168 (RK00397, ABclonal Biotechnology Co., Китай) и Интерлейкин-10-ИФА-БЕСТ
169 («Вектор Бест», Россия) согласно инструкциям производителей.

170 Для определения концентрации IL-17 реагенты набора довели до
171 комнатной температуры и подготавливали к проведению анализа в
172 соответствии с инструкцией. Готовили стандартные разведения IL-17(с
173 концентрациями 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 0 пг/мл) из
174 лиофилизированного стандарта в составе набора.

175 Готовили промывочный буфер, растворы биотинилированных антител,
176 конъюгата стрептавидина и пероксидазы хрена, растворяя концентраты в
177 дистиллированной воде согласно инструкции за 15 минут до использования
178 каждого из растворов.

179 Плоскодонный 96-луночный планшет с сорбированными на нем
180 антителами трижды промывали перед использованием: добавляли по 350 мкл
181 промывочного буфера в каждую ячейку, инкубировали 40с и удаляли раствор
182 резким переворачиванием планшета и удаляли остатки жидкости
183 прикладыванием планшета в перевернутом виде к бумажным полотенцам.

184 В планшет добавляли по 100 мкл калибровочных проб и проб
185 исследуемых образцов. Планшет с внесенными в него пробами заклеивали
186 герметизирующей пленкой и инкубировали в течение 2 ч при 37 °С. После
187 окончания инкубации растворы удаляли из планшета и трижды промывали
188 лунки промывочным буфером, как описано ранее. В промытые лунки планшета
189 добавляли по 100 мкл раствора биотинилированных антител и инкубировали в
190 течение часа при 37 °С, далее удаляли раствор и промывали планшет трижды.
191 Добавляли по 100 мкл раствора конъюгата стрептавидина-пероксидазы хрена и
192 инкубировали в течение 30 мин при 37 °С, далее удаляли раствор и промывали
193 планшет трижды. В лунки добавляли по 100 мкл хромогенного раствора
194 тетраметилбензидаина из состава набора и инкубировали его в течение 20 минут
195 при 37 °С в темноте, после чего останавливали реакцию добавлением 50 мкл
196 стоп-реагента (раствора соляной кислоты) в каждую лунку. Планшет
197 переносили в спектрофотометр Stat Fax-2100 (Awareness Technology Inc., США)
198 и измеряли оптическую плотность на длине волны 450 нм с негативным
199 фильтром 630 нм.

200 Для определения концентрации IL-10 реагенты набора довели до
201 комнатной температуры и подготавливали к проведению анализа в
202 соответствии с инструкцией. Готовили стандартные разведения IL-10 из
203 лиофилизированных стандартов в составе набора. Готовили промывочный
204 буфер (раствор ФСБ-Т) из 25-кратного концентрата в составе набора, разбавляя
205 его дистиллированной водой.

206 Плоскодонный 96-луночный планшет с сорбированными на нем
207 антителами промывали перед использованием: добавляли по 350 мкл
208 промывочного буфера в каждую ячейку, удаляли раствор резким
209 переворачиванием планшета и удаляли остатки жидкости прикладыванием
210 планшета в перевернутом виде к бумажным полотенцам.

211 В планшет добавляли по 100 мкл калибровочных проб и проб
212 исследуемых образцов. Планшет с внесенными в него пробами заклеивали

герметизирующей пленкой и инкубировали в течение 2 ч при 37 °С в термостатированном шейкере с частотой вращения 700 об/мин. После окончания инкубации растворы удаляли из планшета и трижды промывали лунки промывочным буфером, как описано ранее. В промытые лунки планшета добавляли по 100 мкл конъюгата №1 (раствора биотинилированных антител) и инкубировали в течение часа при 37 °С при 700 об/мин, далее удаляли раствор и промывали планшет трижды. Добавляли по 100 мкл раствора конъюгата №2 (стрептавидина-пероксидазы хрена) и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С при 700 об/мин, далее удаляли раствор и промывали планшет трижды. В лунки добавляли по 100 мкл хромогенного раствора тетраметилбензидина из состава набора и инкубировали его в течение 25 минут при комнатной температуре в темноте, после чего останавливали реакцию добавлением 100 мкл стоп-реагента (раствора соляной кислоты) в каждую лунку. Планшет переносили в спектрофотометр Stat Fax-2100 (Awareness Technology Inc., США) и измеряли оптическую плотность на длине волны 450 нм с негативным фильтром 630 нм.

Обработку данных осуществляли с построением калибровочных кривых путем применения онлайн-калькулятора ELISA calculation sheet (HycultBiotech, США) по адресу <https://www.assayfit.com/company/hycult/hycult-input-new.html>

3 Результаты исследования.

В группе пациентов с МЭЭ при культивировании МЛПК в течение 7 дней для селективной стимуляции гамма-дельта Т-лимфоцитов к их размножению по описанной выше методике были выявлены представленные ниже показатели содержания субпопуляций лимфоцитов (таблица 1). У этих же пациентов были изучены концентрации цитокинов IL17 и IL10 в супернатантах клеточных культур методом ИФА. (таблица 2).

У пациентки 1(С) в период рецидива клеточный состав культуры на 7 день культивирования был представлен в большинстве клетками с экспрессией CD3(88,3%), CD3+CD4+ (24,9%), CD3+CD8+ (17,9%), отмечалось высокое содержание клеток, несущих HLA-DR рецептор HLA DR (60%), клеток с экспрессией костимулирующей молекулы CD86, появляющейся на поздних стадиях созревания дендритных клеток ДК (64%), $\gamma\delta$ TCR (39,8%), содержание клеток с маркером зрелых моноцитов/макрофагов CD14+ составило 1,3%. Исходное содержание клеток с экспрессией $\gamma\delta$ TCR составляло 4,2% (табл. 1).

В образце 1(С) сумма CD4+, CD8+ и $\gamma\delta$ TCR+ составляет 82,6%, следовательно, эти клетки составляют большую часть Т-клеток. Остальные могут быть НКТ или двойными негативными Т-лимфоцитами. В то же время CD14+ клеток (рецептор к ЛПС, характерен для миелоидных клеток, в основном для макрофагов и дендритных, но также для моноцитов и гранулоцитов) всего 1,1%. Вероятно, это моноциты из РВМС и созревшие из них клетки (макрофаги и ДК), но их вклад в популяцию CD86+ клеток незначителен. CD16 экспрессируется в данном случае на тех же миелоидных клетках, что и CD16, либо НК-клетках. В этом же образце большинство (64%)

256 CD86+, следовательно, в основном этот рецептор экспрессируют Т-клетки,
257 притом все три популяции – CD4+, CD8+ и $\gamma\delta$ Т-клетки. Отмечено, что Т-
258 клетки могут экспрессировать CD86, в частности, в условиях культивирования
259 с IL-2 [8, 11]. Для $\gamma\delta$ Тклеток также выявлена экспрессия CD86[7, 10 16,17], В-
260 клетки также экспрессируют CD86[18]. Также возможен захват антигенов
261 лимфоцитами от антигенпредставляющих клеток путем трофоцитоза[2].

262 В супернатантах полученных клеточных культур концентрация IL17
263 составила при индукции ФГА 139,42 пкг/мл, спонтанная продукция составила
264 60,0 пкг/мл; индуцированная ФГА продукция IL10 составила 236,3 пкг/мл при
265 спонтанных значениях - 61,4 пкг/мл (табл. 2).

266 У пациентки 2(Н) к 7-му дню культивирования МЛПК в ростовой среде
267 с индукторами созревания было выявлено, что 81,1% клеток экспрессировал
268 рецептор CD3, 10,9% клеток относились к CD3+CD4+ субпопуляции и 11,9%
269 клеток с фенотипом CD3+CD8+относящихся к супрессорной
270 /цитотоксической субпопуляции; довольно высоким было содержание зрелых
271 активированных Т- клеток, несущих рецептор HLADR: 64,4% HLA DR+CD3+.
272 Содержание клеток, с мембранным рецептором CD16, обладающих
273 естественной киллерной активностью (NK) было невысоким и составляло
274 10,5%. К 7-му дню культивирования РВМС в среде с добавлением цитокинов
275 и золедроната накапливалось до 62,8% Т-клеток, несущих $\gamma\delta$ вариант Т-
276 клеточного рецептора. В процессе культивирования было обнаружено 5,2%
277 клеток с рецептором CD14 и 39% клеток с экспрессией костимулирующей
278 молекулы CD86, появляющейся на поздних стадиях созревания дендритных
279 клеток ДК. Исходное содержание клеток с экспрессией $\gamma\delta$ TCR составляло
280 6,4% (табл. 1).

281 В образце 2(Н) также Т-клетки составляют большинство, и все они
282 CD4+, CD8+ и $\gamma\delta$ TCR+. Но их сумма даже больше числа CD3+, что
283 показывает, что часть $\gamma\delta$ Тклеток экспрессирует CD4+ и CD8+. Об экспрессии
284 CD86 можно сказать то же, что и по образцу 1(С). Популяции CD16+ и CD14+
285 клеток больше, чем в образце 1(С), при этом число CD16+ выше CD14+.

286 Оценивали также продукцию двух цитокинов в супернатантах культур
287 РВМС. Спонтанная продукция провоспалительного цитокина IL-17 в образце
288 2(Н) характеризовалась низкими значениями - 36 пкг/мл, но под воздействием
289 индуктора - ФГА - она увеличилась до 188,2 пкг/мл (в 5,2 раза). Содержание
290 цитокина, обладающего противовоспалительным потенциалом – IL-10 в
291 супернатантах было незначительным - 6 пкг/мл, при добавлении в среду ФГА
292 наблюдался 2-кратный рост концентрации IL-10 (табл. 2).

293 У пациентки 3(С) в ходе проведения иммунофенотипирования
294 культивируемых МЛПК было установлено содержание 57,1% Т-клеток CD3+,
295 при этом соотношение Т-хелперы/Т-цитотоксические (0,67) было сдвинуто в
296 сторону преобладания Т-цитотоксических: CD3+CD4+ - 13,7% ; CD3+CD8+ –
297 20,4%. Доля активированных Т-клеток с фенотипом HLA DR+CD3+ составила
298 46,8%. В культуре РВМС 23,6% клеток имело фенотип $\gamma\delta$ TCR и чуть больше,

299 26,8 % относилось к клеткам, экспрессирующим костимулирующую молекулу
300 CD86, характерную для зрелых дендритных клеток. Исходное содержание
301 клеток с экспрессией $\gamma\delta$ TCR составляло 5,3% (табл. 1). Сумма CD4+, CD8+ и
302 $\gamma\delta$ TCR+ примерно равна числу CD3+ клеток. Спонтанная продукция
303 провоспалительного цитокина IL-17 была на низком уровне - 30 пкг/мл, но в
304 присутствии ФГА протекала очень интенсивно и имела значение 220,79 пкг/мл
305 (усиление в 7,3 раз). Ограничивающий воспалительные процессы IL-10 тоже
306 синтезировался в небольших количествах, (спонтанная продукция IL-10 – 16,8
307 пкг/мл) при этом индуцированная продукция повышалась до 130,87
308 пкг/мл)(табл. 2).

309 У пациента 4(С) было обнаружено меньшее количество клеток с
310 фенотипом CD3 по сравнению с предыдущими пациентами: 50,3%. % клеток
311 с фенотипом CD3+CD8+(19,8%) был почти в 4 раза больше, чем хелперной
312 субпопуляции (5,0%). 40,6% CD3+клеток экспрессировало активационный
313 маркер HLADR. В процессе культивирования с индукторами созревания
314 количество $\gamma\delta$ TCR+ клеток оставалось на низком уровне – 3,1%. Исходное
315 содержание клеток с экспрессией $\gamma\delta$ TCR составляло 5,1%. Однако маркеры,
316 характерные для зрелых ДК встречались на 65,1% (CD86) и 66% (CD38)
317 клетках (табл. 1).

318 В образце 4(С) сумма CD4+, CD8+ и $\gamma\delta$ TCR+ значительно меньше
319 (примерно в 2 раза) числа CD3+ клеток. Следовательно, большая часть
320 размножившихся Т-клеток – двойные негативные Т-клетки (связаны с
321 аутоиммунитетом) [19,7,5]. Судя по большой доле CD16+ клеток и CD14+
322 клеток, CD16+ клетки – это в основном НК-клетки. Процент CD86+ клеток
323 выше доли CD3+ и CD14+ клеток, так что можно предположить, что
324 присутствуют в значительной доле также CD86+ В-клетки.

325 И спонтанная, и индуцированная ФГА продукция провоспалительного
326 цитокина IL-17 была на среднем уровне - 48 пкг/мл и 75пкг/мл. Спонтанная
327 продукция противовоспалительного IL-10 составила 29,82 пкг/мл, но при
328 индукции ФГА этот показатель парадоксально снизился до 8,7, что
329 значительно меньше чем у здоровых доноров (табл. 2, 6).

330 У пациента 5(К) в культуре МНПК было выявлено 72,8% CD3+ клеток.
331 У данного пациента хелперная субпопуляция CD3+CD4+ определялась в
332 большем количестве, чем цитотоксическая CD3+CD8+: 31,5% против 24,5%.
333 Активированных HLADR+CD3+ в культуре МНПК, выделенных от 6(К), было
334 меньше, чем у предыдущих пациентов - 37,1%. Процент накопленных к 7-му
335 дню культивирования $\gamma\delta$ TCR+ клеток, тоже, у данного пациента был
336 невысоким: 16,2%. Также, как и у пациента 5(С), при низком значении $\gamma\delta$
337 TCR+ клеток, обнаруживаются высокие значения клеток, несущих маркеры,
338 свойственные ДК : CD86+ 77,9% и 93% CD38+ клеток. Исходное содержание
339 клеток с экспрессией $\gamma\delta$ TCR составляло 5,2% (табл. 1). Число CD3+ клеток
340 примерно равно сумме CD4+, CD8+ и $\gamma\delta$ TCR+. Интересно, что CD86+ клеток
341 больше, чем CD3+, что позволяет предполагать, что большая часть Т-

342 лимфоцитов позитивны по этому маркеру. Кроме того, маркер CD86
343 экспрессируют миелоидные клетки (CD14+) и В-лимфоциты.

344 Спонтанная и индуцированная продукция провоспалительного
345 цитокина IL-17 протекала достаточно интенсивно - 59 пкг/мл и 236,6 пкг/мл
346 соответственно. Однако ограничивающий воспалительные процессы IL-10
347 синтезировался в минимальных количествах, значительно меньше, чем у
348 здоровых доноров (спонтанная продукция IL-10 – 0,6пкг/мл, индуцированная
349 - 4,32пкг/мл)(табл.2).

350 В образцах крови у *пациентки 6 (P)* в процессе иммунофенотипирования
351 клеточной суспензии, полученной в ходе культивирования МНПК в ростовой
352 среде с индукторами созревания было выявлено наличие 55,3% клеток с
353 фенотипом CD3+, среди этих Т-лимфоцитов преобладала субпопуляция с
354 фенотипом CD3+CD4+, характерным для Т-хелперов (44%), Т-
355 цитотоксических клеток было в 2,8 раз меньше (15,7%). Относительно много
356 было активированных клеток, несущих рецептор HLADR– 40,7%. Т-клеток,
357 экспрессирующих $\gamma\delta$ TCR в культуре МЛПК, выделенных от *пациента 6 (P)*
358 было мало – 3,6%. Клетки, экспрессирующие маркеры дендритных клеток
359 CD14 и CD86 были идентифицированы в небольших количествах – 1,4% и
360 8,1% соответственно. Также в клеточной суспензии были выявлены CD16+
361 клетки - 10,4%. Исходное содержание клеток с экспрессией $\gamma\delta$ TCR составляло
362 1,2% (табл3).

363 Спонтанная продукция провоспалительного IL-17 протекала со средней
364 интенсивностью - 48,0 пкг/мл, при индукции ФГА отмечалось повышение
365 до 151,69 пкг/мл. В то же время, ограничивающий воспалительные процессы
366 IL-10 синтезировался в минимальных количествах, (спонтанная продукция IL-
367 10 – 1,54 пкг/мл), однако при воздействии ФГА значения повышались в 63 раз
368 (до 98,76 пкг/мл)(табл4).

369 В образцах крови у *пациентки 7 (C)* на 7-й день культивирования РВМС
370 методом проточной цитофлюориметрии было обнаружено 52% CD3+ Т-
371 клеток. Причем соотношение хелперной и цитотоксической субпопуляций
372 было практически равным: 13,9% CD3+CD4+ и 14% CD3+CD8+. Клеток,
373 экспрессирующих маркер активации HLADR было довольно много – 38,5%. В
374 процессе культивирования было получено не менее 26,8 % $\gamma\delta$ TCR+ клеток.
375 Исходное содержание клеток с экспрессией $\gamma\delta$ TCR составляло 2,4 %.
376 Параллельно в клеточной суспензии были выявлены клетки, несущие
377 рецепторы, характерные для разных стадий созревания ДК: 8,7% – CD14+
378 клеток и 23% CD86+клеток. Относительно высоким было содержание клеток
379 CD16+ – 18,5%(табл.3).

380 Спонтанная продукция провоспалительного IL-17 была умерено
381 выражена и составляла 36,0 пкг/мл, при индукции ФГА отмечалось усиление
382 продукции до 175,0 пкг/мл. Противовоспалительный цитокин IL-10
383 синтезировался в минимальных количествах, (спонтанная продукция IL-10 –

384 0,72 пкг/мл), однако при индукции значения повышались в 53 раза (до
385 38,37 пкг/мл) (табл. 4).

386 В образцах 6 (Р) и 7 (С) отмечается относительно малое содержание Т-
387 клеток (чуть более 50%), примерно равное сумме CD4+, CD8+ и $\gamma\delta$ TCR+.
388 Однако в образце 7 (С) доля $\gamma\delta$ Т клеток гораздо выше, чем в образце 6 (Р). В
389 обоих образцах отмечается низкая доля CD86+ клеток. Возможно, это может
390 быть ассоциировано с низкой долей CD3+ клеток и отражать низкую
391 интенсивность их пролиферации под действием IL-2. Какие же клетки
392 составляют остальную часть культуры? Можно предположить по небольшой
393 доле CD14+ клеток (потомки моноцитов) и CD16+ (они же и NK-клетки), что
394 значительную долю составляют В-лимфоциты.

395 В образцах крови у пациентки 8 (Д) при анализе клеток, полученных
396 после 7-ми дней инкубации в полной питательной среде с индукторами
397 созревания, было выявлено, что 88,2% клеток несут дифференцировочный
398 кластер, характерный для Т-лимфоцитов. Цитотоксических Т-клеток
399 CD3+CD8+ было в 4,7 раз больше, чем клеток, относящихся к хелперной
400 субпопуляции (33,2% против 7,3%). Т-клетки в процессе культивирования
401 находились в активированном состоянии, на что указывает высокое
402 процентное содержание HLA DR: 84,3%. К окончанию культивирования
403 РВМС в клеточной суспензии не менее 44,5% клеток относились к
404 $\gamma\delta$ TCR+клеткам. Также встречались клетки, экспрессирующие рецепторы,
405 характерные для ДК: 3% CD14+ и 74,4% CD86+. Исходное содержание клеток
406 с экспрессией $\gamma\delta$ TCR составляло 6,2% (табл. 3).

407 У пациентки 8 (Д) спонтанная продукция провоспалительного IL-17
408 была на среднем уровне – 37,5 пкг/мл, но в присутствии ФГА протекала очень
409 интенсивно и имела значение 246,4 пкг/мл (увеличение в 6,6 раз).
410 Ограничивающий воспалительные процессы IL-10 синтезировался в
411 минимальных количествах, значительно меньше чем у здоровых доноров
412 (спонтанная продукция IL-10 – 0,15 пкг/мл, индуцированная - 0,45 пкг/мл)
413 (табл. 4).

414 Из образца крови здорового донора 9(Б), по окончанию
415 культивирования мононуклеарных клеток, выделенных из периферической
416 крови, было обнаружено присутствие 58,6% CD3+Т-клеток. Среди Т-клеток
417 преобладала хелперная субпопуляция – CD3+CD4+ 37,3% против 21,3%
418 цитотоксических Т-лф CD3+CD8+. Выявлено высокое содержание
419 активированных Т-клеток HLA-DR+CD3+ в клеточной культуре – 28,5%.
420 Напротив, клеток, несущих рецептор CD16+ обнаружено мало – 1,6%. За
421 время культивирования в клеточной суспензии накопилось не менее 24,1% $\gamma\delta$
422 TCR+. Исходное содержание клеток с экспрессией $\gamma\delta$ TCR составляло 1,7 %.
423 Процент клеток, экспрессирующих CD14 и CD86 составляет 3,1% и 25,9%
424 (табл. 5).

425 В супернатантах, полученных к 7-му дню культивирования клеточных
426 культур концентрация IL-17 составила 21,72 пкг/мл, индуцированная ФГА

427 продукция повысилась в 7,7 раз (163,8пкг/мл), спонтанная продукция ИЛ-10
428 составила 6,62пкг/мл, индуцированная повысилась в 10,6раз (70,4пкг/мл)
429 (табл. 6).

430 Из образца крови здорового донора 10(A), по окончанию
431 культивирования мононуклеарных клеток, выделенных из периферической
432 крови, было обнаружено присутствие 68,8% CD3+Т-клеток. Среди Т-клеток
433 преобладала хелперная субпопуляция - CD3+CD4+ 43,7%. За время
434 культивирования в клеточной суспензии накопилось не менее 16,2% $\gamma\delta$ TCR.
435 Исходное содержание клеток с экспрессией $\gamma\delta$ TCR составляло 1,3 % (табл. 5).
436 В супернатантах, полученных из клеточных культур концентрация ИЛ-17
437 составила 76,78 пкг/мл, индуцированная ФГА продукция повысилась до
438 180,65 пкг/мл, спонтанная продукция ИЛ-10 составила 16,0 пкг/мл,
439 индуцированная достигла значения 150,70 пкг/мл (табл. 6).

440 По-видимому, у здоровых лиц соотношение CD4+ и CD8+ в составе Т-
441 клеток более близко к естественному, и сумма CD4+ и CD8+ равна числу
442 CD3+. Получается, что у них размножившиеся гамма-дельта Т клетки также
443 должны экспрессировать CD4+ и CD8+. Отмечается в целом меньшая
444 экспрессия HLA-DR.

445 4 Обсуждение результатов и заключение.

446 У пациентов с реактивными эритемами в процессе культивирования с
447 золедронатом, ИЛ-2 и ИЛ-15 было получено к 7 дням культивирования от 3,1%
448 до 62,8% клеток с экспрессией $\gamma\delta$ TCR. Наименее низкий процент содержания
449 этих клеток отмечался в культуре клеток крови от пациентов 4(C) - с
450 многоформной эритемой и 6(P) с кольцевидной центробежной эритемой. Оба
451 клинических случая характеризовались непрерывно-рецидивирующим
452 течением. В группе здоровых лиц к 7 дню культивирования наблюдался рост
453 и размножение 16-24 %% лимфоцитов с маркером $\gamma\delta$ TCR. Отмечается
454 большая вариативность размножения $\gamma\delta$ Тлимфоцитов. В большинстве культур
455 отмечалось преобладание Т-клеток (CD3+) и небольшая доля миелоидных
456 клеток (1,3-8,7%), выполняющих функцию презентации антигена
457 (фосфоантигенов) лимфоцитам.

458 В исследованной группе больных также наряду с исследованием
459 содержания субпопуляций лимфоцитов крови на 7 день культивирования и
460 определением концентрации интерлейкинов ИЛ-10 и ИЛ-17 был проведен
461 анализ клинических данных.

462 В группе больных многоформной эритемой было выявлено, что у
463 пациентки 1(C) рецидив заболевания, во время которого было проведено
464 исследование, в ходе базисной терапии завершился длительной ремиссией,
465 что вероятно коррелирует с высокими значениями противовоспалительного
466 ИЛ-10, что возможно позволяет говорить о хорошем прогнозе заболевания.

467 У пациентки 2(H) к 7-му дню культивирования МЛПК в среде с
468 добавлением цитокинов и золедроната накапливалось до 62,8% Т-клеток,
469 несущих $\gamma\delta$ вариант Т-клеточного рецептора. Исследование проводилось в

470 период яркого тяжелого рецидива МЭЭ, что находит отражение, вероятно, в
471 высокой индуцированной продукции ИЛ-17 и низких значениях ИЛ-10, причем
472 как спонтанной, так и индуцированной продукции. У данной пациентки
473 наблюдалось длительное течение рецидива, динамика лечения была
474 неудовлетворительная - терапия базисными препаратами привела к регрессу
475 высыпаний только спустя 3 месяца, и короткой ремиссии длительностью 1
476 месяц. Это, по-видимому, связано с низкими значениями как спонтанной, так
477 и индуцированной продукции противовоспалительного ИЛ-10.

478 У *пациентки 3(С)* в процессе проведения иммунофенотипирования
479 культивируемых МЛПК 23,6% клеток имело фенотип $\gamma\delta$ TCR. Исследование
480 проводилось на фоне яркого затяжного рецидива, что находит отражение
481 вероятно в высокой индуцированной продукции ИЛ-17. Рецидив по
482 завершении базисной терапии закончился стойкой длительной ремиссией (6
483 месяцев), что, может быть ассоциировано со способностью к индуцированной
484 продукции ИЛ-10, который в результате индукции повысился в 7,7 раз).

485 У *пациента 4(С)* в процессе культивирования с индукторами созревания
486 количество $\gamma\delta$ TCR+ клеток оставалось на низком уровне – 3,1%. Однако
487 маркеры, характерные для зрелых ДК встречались на 65,1% (CD86) и 66%
488 (CD38) клетках. У пациента наблюдалась МЭЭ с длительными затяжными
489 частыми рецидивами (непрерывно-рецидивирующее течение), и ремиссиями
490 не более 2 месяцев в году. Исследование проводилось в период длительного,
491 но нетяжелого рецидива. Вероятно, это находит отражение в низких значениях
492 ИЛ17. Терапия привела к длительной ремиссии (что по всей видимости,
493 находит отражение в спонтанной высокой продукции ИЛ-10). Заболевание
494 связано с активностью вирусов (вируса простого герпеса и вируса Эпштейн-
495 Барр).

496 У *пациента 5(К)* процент накопленных к 7-му дню культивирования $\gamma\delta$
497 TCR+ клеток был невысоким: 16,2%. У *пациентов 4(С)* и *5(К)* наблюдались
498 частые рецидивы на фоне длительного – месяцы - повышения температуры до
499 37,1°C. Заболевание в обоих случаях связано с активностью вирусов (вируса
500 простого герпеса и вируса Эпштейн-Барр).

501 У *пациента 5(К)* отмечались длительные, легкие по тяжести, рецидивы
502 (что находит отражение в низких значениях ИЛ-17), ответ на терапию был
503 очень низкий (что вероятно отражается в низких уровнях ИЛ-10), и течение
504 заболевания приближалось к непрерывно-рецидивирующей форме.
505 Заболевание связано с активностью вирусов (вируса Эпштейн-Барр и
506 аденовируса).

507 При анализе данных пациентки с кольцевидной эритемой получены
508 следующие результаты.

509 У *пациентки 6 (Р)* с непрерывно рецидивирующей формой КЦЭ в
510 процессе иммунофенотипирования клеточной суспензии, полученной в ходе
511 культивирования МЛПК в ростовой среде с индукторами созревания было
512 выявлено низкое число Т-клеток, экспрессирующих $\gamma\delta$ TCR- 3,6%, что

513 свидетельствует о том, что добавление индукторов созревания в комбинации
514 золедроната, ИЛ-2 и ИЛ-15 в данном конкретном случае не сработал и не оказал
515 своего индуцирующего воздействия на пролиферацию $\gamma\delta$ Т-клеток (возможно
516 это связано с клинической формой заболевания, среди представленных в
517 публикации больных это был единственный случай КЦЭ). У пациентки
518 отмечалась непрерывно-рецидивирующая форма КЦЭ в течение более 2 лет,
519 процесс характеризовался вялотекущим течением. Ответ на терапию был
520 хороший, отмечалось значительное улучшение (что вероятно отражается в
521 значительном – в 100 раз - повышении индуцированной продукции ИЛ-10).
522 Заболевание связано с активацией вирусов (у пациентки выявлены
523 лабораторные признаки активации вируса Эпштейн-Барр).

524 При анализе данных пациентов с ранней формой болезни Лайма –
525 мигрирующей эритемой - в процессе культивирования было получено не
526 менее 26,8 % $\gamma\delta$ TCR+ клеток. У *пациентки 7 (С)* отмечалась легкая форма
527 мигрирующей эритемы (болезни Лайма). После проведенной терапии
528 отмечался быстрый регресс высыпаний, (что коррелирует с повышением
529 индуцированной продукции ИЛ-10).

530 При анализе данных второй *пациентки 8 (Д)* с ранней формой болезни
531 Лайма – мигрирующей эритемой - в процессе культивирования было получено
532 не менее 44,5% $\gamma\delta$ TCR+клеток. Также встречались клетки, экспрессирующие
533 рецепторы, характерные для ДК: 3% CD14+ и 74,4% CD86+.

534 У *пациентки 8 (Д)* спонтанная продукция провоспалительного ИЛ-17
535 была на низком уровне, но в присутствии ФГА протекала интенсивно
536 (усиление в 6,6 раз) (что вероятно отражает наличие аутоиммунного
537 компонента патогенеза и ассоциируется с обширным длительно
538 существующим плохо поддающимся терапии очагом мигрирующей эритемы).
539 При анализе клинических данных было отмечено, что у *пациентки 8 (Д)*
540 отмечалась слабая эффективность проведенной базисной терапии, высыпания
541 регрессировали только спустя 3 месяца, что по-видимому, связано с низкими
542 значениями как спонтанной, так и индуцированной продукции
543 противовоспалительного ИЛ-10.

544 5 Заключение

545 В результате проведенного исследования было выявлено, что клеточный
546 состав культивируемых МЛПК, выделенных от больных эритемами и от
547 здоровых лиц имеет определённые различия: у больных более высокие уровни
548 CD3+ лимфоцитов, $\gamma\delta$ Т клеток, активированных клеток CD3+HLADR+, а
549 также иммуноцитов, экспрессирующих костимулирующую молекулу CD86,
550 участвующую в активации Т-клеток.

551 Было обнаружено, что в группе больных реактивными эритемами
552 высокие уровни индуцированной продукции ИЛ-17, вероятно, указывают на
553 наличие аутоиммунного компонента в патогенезе заболевания (как у
554 *пациентки 2(Н)* и *8(Д)* и, в меньшей степени, у *1(С)* и *3(С)*, а также отражают
555 тяжесть течения (у *пациента 2(Н)* и *5(К)*). Эффективность терапии у

556 обследованных больных коррелировала со способностью клеток крови в
557 культуре *in vitro* к синтезу и высвобождению ИЛ-10. Так, в группе
558 исследованных больных, было показано, что высокие значения спонтанной и
559 индуцированной продукции ИЛ-10 ассоциируются с хорошим ответом на
560 терапию (значительное клиническое улучшение, длительная клиническая
561 ремиссия). В то время как при низком терапевтическом эффекте (быстрое
562 развитие рецидивов после окончания курса терапии) выявлены низкие
563 значения спонтанной и индуцированной продукции ИЛ-10. Вероятно,
564 определение этих анализов в культуре МЛПК у больных исследованными
565 патологиями позволят усовершенствовать оценку эффективности терапии и
566 прогнозировать течение заболевания, что позволяет предполагать их
567 прогностическую значимость как биомаркеров. Однако требуется дальнейшее
568 проведение углубленных исследований в этом направлении при других
569 нозологических формах.

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Содержание субпопуляций лимфоцитов при культивировании МЛПК пациентов с МЭЭ с целью экспансии гамма-дельта лимфоцитов (Результаты расширения популяции $\gamma\delta$ Т-клеток с помощью золедроновой кислоты в 7-ми дневной культуре).

Table 1. The content of lymphocyte subpopulations in the culture of MLPC in patients with MEE for the expansion of gamma-delta lymphocytes (The results of the expansion of the population of $\gamma\delta$ T cells using zoledronic acid in a 7-day culture).

Образец Sample	Субпопуляции лимфоцитов, % Subpopulations of lymphocytes, %							
	CD3 +	CD3+C D4+	CD3+C D8+	HLA- DR+CD 3+	CD16+	CD14 +	CD86 +	$\gamma\delta$ TCR
1(С)	88,3	24,9	17,9	60	1,1	1,3	64	39,8
2(Н)	81,1	10,9	11,9	64,4	10,5	5,2	39	62,8
3(С)	57,1	13,7	20,4	46,8	8,7	4,4	26,1	23,6
4(С)	50,3	5	19,8	40,6	15,1	2,8	65,1	3,1
5(К)	72,8	31,5	24,5	37,1	9,4	7,3	77,9	16,2

Таблица 2. Результаты определения уровней интерлейкинов IL10 и IL17 в супернатантах 7-ми дневных клеточных культур, полученных при экспансии гамма-дельта лимфоцитов (в результате расширения популяции $\gamma\delta$ Т-клеток с помощью золедроновой кислоты) от пациентов с МЭЭ.

Table 2. Results of determining the levels of interleukins IL10 and IL17 in the supernatants of 7-day cell cultures obtained from the expansion of gamma-delta lymphocytes (as a result of the expansion of the $\gamma\delta$ T cell population using zoledronic acid) from patients with MEE.

Образец Sample	Продукция цитокинов, пкг/мл (1 млн клеток) Cytokine production, pg/ml (1 million cells)			
	IL17		IL10	
	спонтанная spontaneous	индуцированная induced	спонтанная spontaneous	индуцированная induced
1(С)	60,0	139,42	61,4	236,3
2(Н)	36,	188,2	6,0	12,0
3(С)	30,0	220,79	16,8	130,87
4(С)	48,0	75,0	29,82	8,7
5(К)	59,	236,	0,6	4,32

Таблица 3. Содержание субпопуляций лимфоцитов при культивировании МЛПК пациентов с МЭ и КЦЭ с целью экспансии гамма-дельта лимфоцитов (Результаты расширения популяции $\gamma\delta$ Т-клеток при индукции золедроновой кислотой в 7-ми дневной культуре).

Table 3. The content of lymphocyte subpopulations in the culture of MLPC in patients with ME and CCE for the expansion of gamma-delta lymphocytes (Results of the expansion of the population of $\gamma\delta$ T cells during induction with zoledronic acid in a 7-day culture).

Образцы Samp-les	Субпопуляции лимфоцитов, % Subpopulations of lymphocytes, %							
	CD3	CD3+CD4+	CD3+CD8+	HLA-DR	CD16+	CD14+	CD86+	$\gamma\delta$ TCR
6 (P-ЭКЦ)	55,3	44	15,7	40,7	10,4	1,4	8,1	3,6
7(С)	52	13,9	14	38,5	18,5	8,7	23	26,8
8(Д)	88,2	7,3	33,2	84,3	6,3	3,3	74,4	44,5

Таблица 4. Результаты определения уровней интерлейкинов IL10 и IL17 в супернатантах 7-ми дневных клеточных культур, полученных при экспансии $\gamma\delta$ Т лимфоцитов (в результате расширения популяции $\gamma\delta$ Т-клеток при индукции золедроновой кислотой) от пациентов с МЭ и КЦЭ.

Table 4. Results of determining the levels of interleukins IL10 and IL17 in the supernatants of 7-day cell cultures obtained by the expansion of gamma-delta lymphocytes (as a result of the expansion of the population of $\gamma\delta$ T cells upon induction with zoledronic acid) from patients with ME and CCE.

Образец Sample	Продукция цитокинов, мкг/мл (1 млн клеток) Cytokine production, mcg/ml (1 million cells)			
	IL17		IL10	
	спонтанная spontaneous	индуцированная induced	спонтанная spontaneous	индуцированная induced
6 (P-ЭКЦ) 6 (R-ECC)	48,0	51,69	1,54	98,76
7(С) 7(С)	36,0	175,0	0,72	38,37
8(Д) 8(Д)	37,5	246,4	0,15	0,45

Таблица 5. Содержание субпопуляций лимфоцитов при культивировании МЛПК здоровых доноров с целью экспансии гамма-дельта лимфоцитов (Результаты расширения популяции $\gamma\delta$ Т-клеток при индукции золедроновой кислотой в 7-ми дневной культуре).

Table 5. The content of lymphocyte subpopulations in the cultivation of MLPC from healthy donors for the expansion of gamma-delta lymphocytes (Results of the expansion of the population of $\gamma\delta$ T cells upon induction with zoledronic acid in a 7-day culture).

Образец Sample	CD3	CD3+CD4+	CD3+CD8+	HLA-DR	HLA-DR+CD3+	CD16+	CD14+	CD86	$\gamma\delta$ TCR
9(Б) 9(B)	58,6	37,3	21,3	31,6	28,5	1,6	3,1	25,9	24,1
10 (А) 10 (A)	68,8	43,7	25,1	37,7	30,4	6,5	7,2	31,6	16,2

Таблица 6. Результаты определения уровней интерлейкинов IL10 и IL17 в супернатантах 7-ми дневных клеточных культур, полученных при экспансии гамма-дельта лимфоцитов (в результате расширения популяции $\gamma\delta$ Т-клеток при индукции золедроновой кислотой) от здоровых доноров.

Table 6. The results of determining the levels of interleukins IL10 and IL17 in the supernatants of 7-day cell cultures obtained by the expansion of gamma-delta lymphocytes (as a result of the expansion of the population of $\gamma\delta$ T cells during induction with zoledronic acid) from healthy donors.

Образец Sample	Концентрация цитокинов, пкг/мл (1 млн клеток) Cytokine concentration, pg/ml (1 million cells)			
	IL17		IL10	
	спонтанная продукция spontaneous production	индуцированная продукция induced production	спонтанная продукция spontaneous production	индуцированная продукция induced production
9(Б)	21,72	163,8	6,62	70,4
10 (А)	76,78	180,65	16,0	150,7

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Сорокина Екатерина Вячеславовна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией механизмов регуляции иммунитета;

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»;

адрес: Россия 105064, Москва, Малый Казенный переулок, д.5а;

факс: +7(495)917-49-00;

телефон: +7(495)917-49-00;

e-mail: sorokina-cathrine@yandex.ru

Sorokina Ekaterina Vyacheslavovna, MD, Professor, Head of the Laboratory of Mechanisms of Regulation of Immunity;

Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera»;

address: Russia 105064, Moscow, Maly Kazenny lane, 5a;

fax: +7(495)917-49-00;

telephone: +7(495)917-49-00;

e-mail: sorokina-cathrine@yandex.ru

Блок 2. Информация об авторах

Калиниченко Е.О., кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета;

Kalinichenko Evgeny Olegovich, Candidate of Medical Sciences, researcher at the Laboratory of mechanisms of regulation of immunity;

Бишева И.В., научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета;

Bisheva Irina Vasilyevna, researcher at the Laboratory of mechanisms of regulation of immunity;

Столпникова В.Н., кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета;

Stolpnikova Vera Nikolaevna, Candidate of Biological Sciences, leading researcher at the Laboratory of mechanisms of regulation of Immunity;

Сходова С.А., кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета;

Skhodova Svetlana Anatolyevna, Candidate of Biological Sciences, leading researcher at the Laboratory of mechanisms of regulation of immunity.

Блок 3. Метаданные статьи

ОПРЕДЕЛЕНИЕ IL-10 И IL-17 В СУПЕРНАТАНТАХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ПРИ ЭКСПАНСИИ ГАММА ДЕЛЬТА Т-ЛИМФОЦИТОВ ИЗ КРОВИ БОЛЬНЫХ РЕАКТИВНЫМИ ЭРИТЕМАМИ

DETERMINATION OF IL-10 AND IL-17 IN CELL CULTURE SUPERNATANTS DURING THE EXPANSION OF GAMMA DELTA T LYMPHOCYTES FROM THE BLOOD OF PATIENTS WITH REACTIVE ERYTHEMA

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

РОЛЬ ГАММА ДЕЛЬТА Т-ЛИМФОЦИТОВ И ОТДЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ РЕАКТИВНЫХ ЭРИТЕМАХ

THE ROLE OF GAMMA DELTA T-LYMPHOCYTES AND INDIVIDUAL CYTOKINES IN REACTIVE ERYTHEMAS

Ключевые слова: многоформная эритема, кольцевидная эритема, мигрирующая эритема, гамма дельта Т- лимфоциты, интерлейкины, биомаркеры.

Keywords: erythema multiforme, ring-shaped erythema, migrating erythema, gamma delta T lymphocytes, interleukins, biomarkers.

Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 14,

Количество таблиц – 6,

Количество рисунков – 0.

12.06.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или
1		Bernardini N., Skroza N., Tolino E., Mambrin A., Anzalone A., Veronica Balduzzi V., Colapietra D., Marchesiello A., Michelini S., Proietti I., Potenza C. IL-17 and its role in inflammatory, autoimmune, and oncological skin diseases: state of art. Int J Dermatol., 2019, Oct 30, 59(4), pp. 406–411.	doi: 10.1111/ijd.14695. Epub 2019 Oct 30.
2		Brown R, Kabani K, Favalaro J, Yang S, Ho P.J., Gibson J., Fromm P., Suen H., Woodland N., Nassif N., Hart D., Joshua D. CD86+ or HLA-G+ can be transferred via trogocytosis from myeloma cells to T cells and are reassociated with poor prognosis. Blood, 2012, Sep 6, 120(10), pp.2055-2063.	doi: 10.1182/blood-2012-03-416792. Epub 2012 Jun 15.
3		Cai Y., Shen X., Ding C., Ding C. , Qi C. , Li K. , Li X. , Jala V. R. , Zhang H. , Wang T. , Zheng J. , Yan J. Pivotal role of dermal IL-17-producing gammadelta T cells in skin	doi: 10.1016/j.immuni.2011.08.001. Epub 2011 Oct 6.

		inflammation. <i>Immunity</i> , 2011, 35, pp. 596–610.	
4		Cheuk S, Wiken M, Blomqvist L., Nylén S. , Talme T. , Ståhle M. , Eidsmo L. Epidermal Th 22 and Tc17 cells form a localized disease memory in clinically healed psoriasis. <i>J Immunol.</i> , 2014, 192, pp.111–20.	doi: 10.4049/jimmunol.1302313. Epub 2014 Mar 7.
5		Crispín JC., Oukka M., Bayliss G., Cohen RA., Van Beek CA., Stillman IE., Kyttaris VC., Juang YT., Tsokos GC. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. <i>J Immunol.</i> , 2008, Dec15,181(12), pp. 8761-8766.	doi: 10.4049/jimmunol.181.12.8761
6		Girard P., Charles J., Cluzel C., Degeorges E., Manches O., Plumas J., De Fraipont F., Leccia MT., Mouret S., Chaperot L., Aspod C. The features of circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells in melanoma patients display critical perturbations with prognostic impact on clinical outcome. <i>Oncoimmunology</i> , 2019 Apr 17;8(8):1601483.	doi: 10.1080/2162402X.2019.1601483.
7		Haug T., Aigner M., Peuser MM., Strobl CD., Hildner K., Mougiakakos D., Bruns H., Mackensen A., Völkl S. Human Double-	doi: 10.3389/fimmu.2019.00883

		Negative Regulatory T-Cells Induce a Metabolic and Functional Switch in Effector T-Cells by Suppressing mTOR Activity. <i>Front Immunol.</i> , 2019, Apr 26,10:883.	
8		Jeannin P., Herbault N., Delneste Y., Magistrelli G., Lecoanet-Henchoz S., Caron G., Aubry JP., Bonnefoy JY. Human effector memory T cells express CD86: a functional role in naive T cell priming. <i>J Immunol.</i> , 1999, Feb 15,162(4), pp:2044-2048.	doi: не найден
8		Laggner U., Di Meglio P., Perera GK., Hundhausen C., Lacy KE., Ali N., Smith CH., Hayday AC., Nickoloff BJ., Nestle FO. Identification of a novel proinflammatory human skin-homing Vgamma9 Vdelta2 T cell subset with a potential role in psoriasis. <i>J Immunol</i> 2011, 187, pp: 2783–2793.	doi: 10.4049/jimmunol.1100804.
9		Li C, Lin YD., Wang WB., Xu M., Zhang N., Xiong N. Differential regulation of CD8+ CD86+ Vγ1.1+ γδT cell responses in skin barrier tissue protection and homeostatic maintenance. <i>Eur J Immunol.</i> , 2022, Sep,52(9), pp.1498-1509.	doi: 10.1002/eji.202249793.
10			doi: 10.1097/BOR.0000000000000778.

		Li H., Tsokos GC. Double-negative T cells in autoimmune diseases. <i>Curr Opin Rheumatol.</i> 2021, Mar, 1,33(2), pp.163-172.	
11		Paine A., Kirchner H., Immenschuh S., Oelke M., Blasczyk R., Eiz-Vesper B. IL-2 upregulates CD86 expression on human CD4(+) and CD8(+) T cells. <i>J Immunol.</i> , 2012, Feb 15,188(4),pp.1620-1629.	doi: 10.4049/jimmunol.1100181.
12		Roth SA., Simanski M., Rademacher F., Schroder L., Harder J. The pattern recognition receptor NOD2 mediates Staphylococcus aureus-induced IL-17C expression in keratinocytes. <i>J Invest Dermatol.</i> , 2014, 134, pp.374–380.	doi: 10.1038/jid.2013.313.
13		Rouvier E., Luciani MF., Mattei MG., Denizot F., Golstein P. CTLA-8, cloned from an activated Tcell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. <i>J Immunol.</i> , 1993, 150, pp. 5445–5456.	doi: не найден
14		Tamassia N., Arruda-Silva F., Calzetti F., Lonardi S. , Gasperini S. , Gardiman E. , Bianchetto-Aguilera F. , Gatta LB. , Girolomoni G. , Mantovani A. , Vermi W. , Marco A Cassatella MA.	doi: 10.3389/fimmu.2018.00795.

		A reappraisal on the potential ability of human neutrophils to express and produce IL-17 family members in vitro: failure to reproducibly detect it. <i>Front Immunol.</i> , 2018, 9:795.	
15		Teunissen MBM, Munneke JM, Bernink JH., Spuls PI. , Res PCM , Velde AT. , Cheuk S. , Brouwer MWD. , Menting SP. , Eidsmo L. , Spits H. , Hazenbergh MD. , Mjösberg J. Composition of innate lymphoid cell subsets in the human skin: enrichment of NCR(+) ILC3 in lesional skin and blood of psoriasis patients. <i>J Invest Dermatol.</i> , 2014, 134, pp. 2351–2360.	doi: 10.1038/jid.2014.146.
16		Van Acker HH., Anguille S., Willemen Y., Van den Bergh JM., Berneman ZN., Lion E., Smits EL., Van Tendeloo VF. Interleukin-15 enhances the proliferation, stimulatory phenotype, and antitumor effector functions of human gamma delta T cells. <i>J Hematol Oncol.</i> , 2016, Sep 29, 9(1):101.	
17		Venken K., Jacques P., Mortier C., Labadia ME. , Decruy T. , Coudenys J. , Hoyt	doi: 10.1038/s41467-018-07911-6.

		<p>K., Wayne AL., Robert Hughes R., Turner M., Gassen SV., Martens L., Smith D., Harcken C., Wahle J., Wang CT., Verheugen E., Schryvers N., Varkas G., Cypers H., Wittoek R., Piette Y., Gyselbrecht L., Calenbergh SV., den Bosch FV., Saeys Y., Nabozny G., Elewaut D.</p> <p>ROR gamma t inhibition selectively targets IL-17 producing iNKT and gammadelta-Tcells enriched in spondyloarthritis patients. Nat Commun ., 2019,10:9.</p>	
18		<p>Wennhold K., Thelen M., Lehmann J., Schran S., Preugszat E., Garcia-Marquez M., Lechner A., Shimabukuro-Vornhagen A., Ercanoglu MS., Klein F., Thangarajah F., Eidt S., Löser H., Bruns C., Quaas A., von Bergwelt-Baildon M., Schlößer HA. CD86+ Antigen-Presenting B Cells Are Increased in Cancer, Localize in Tertiary Lymphoid Structures, and Induce Specific T-cell Responses. Cancer Immunol Res., 2021, Sep,9(9), pp.1098-1108.</p>	doi: 10.1158/2326-6066.CIR-20-0949
19		<p>Wu Z., Zheng Y., Sheng J., Han Y., Yang Y., Pan H., Yao J. CD3+CD4-CD8- (Double-Negative) T Cells in Inflammation,</p>	doi: 10.3389/fimmu.2022.816005

		ImmuneDisorders and Cancer. Front Immunol., 2022, Feb 10,13:816005.	
20		Xu M, Dong C. IL-25 in allergic inflammation. Immunol Rev 2017; 278:185–91.	doi: 10.1111/imr.12558.
21		Xu M., Lu H., Lee YH., Wu Y. , Liu K. , Shi Y. , An H. , Zhang J. , Wang X. , Lai Y. , Do C. An interleukin-25-mediated autoregulatory circuit in keratinocytes plays a pivotal role in psoriatic skin inflammation. Immunity, 2018, 48,pp. 787–798.	doi: 10.1016/j.immuni.2018.03.019.
22		Yao Z., Painter SL., Fanslow WC., Ulrich D., Macduff BM., Spriggs MK., Armitage RJ. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. J Immunol., 1995, 155, pp.5483–5486.	doi: не найден