

АНАЛИЗ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ХЕЛПЕРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ХЕМОКИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ CXCR3 И CCR6 И АКТИВАЦИОННЫЕ МАРКЕРЫ CD38 И HLA-DR

Д.С. Елезов¹, И.В. Кудрявцев^{2, 3, 4}, Н.А. Арсентьева¹, А.В. Семенов¹,
Е.В. Эсауленко⁵, В.В. Басина⁵, Арег А. Тотолян¹

¹ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

²ФГБУ НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

³Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия

⁴Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁵ГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Адекватный адаптивный иммунный ответ при вирусных инфекциях зависит от Т-хелперных субпопуляций лимфоцитов и привлечения специфических Т-клеток в очаг инфекции. Целью исследования была оценка изменений состава субпопуляций Т-хелперов, несущих на поверхности хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR6 и активационные маркеры CD38 и HLA-DR, в периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С (n = 19) и практически здоровых доноров (n = 24). Содержание субпопуляций определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием комбинации моноклональных антител: HLA-DR-FITC/CD38-PE/CD3-ECD/CCR6-PE-Cy7/CXCR3-APC/CD4-APC-Cy7. Установлено сниженное количество CD38⁺ Т-хелперов и повышенное CXCR3 и CCR6 экспрессирующих Т-хелперов, в частности субпопуляции CD3⁺CD4⁺CXCR3⁺CCR6⁺ клеток. Показана значимость сочетанного определения комбинаций хемокиновых рецепторов CXCR3 и CCR6 и активационных маркеров CD38 и HLA-DR по сравнению с их раздельным анализом при хроническом гепатите С.

Ключевые слова: гепатит С, Т-хелперы, хемокиновые рецепторы, активационные маркеры, CXCR3, CCR6, CD38, HLA-DR.

Авторы:

Елезов Д.С., младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и сероэпидемиологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Кудрявцев И.В., к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБУ НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург; доцент кафедры фундаментальной медицины Дальневосточного Федерального Университета, г. Владивосток; доцент кафедры цитологии и гистологии Санкт-Петербургского Государственного Университета, Санкт-Петербург, Россия;

Арсентьева Н.А., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии и сероэпидемиологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Семенов А.В., к.б.н., заведующий лабораторией иммунологии и эпидемиологии ВИЧ инфекции ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Эсауленко Е.В., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии ГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия;

Басина В.В., ассистент кафедры инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии ГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия;

Тотолян Арег А., член-корреспондент РАМН, д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Адрес для переписки:

Елезов Дмитрий Сергеевич
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, ФБУН НИИЭМ имени Пастера.
Тел.: (812) 232-31-55 (служебн.).
E-mail: elezovds@yahoo.com

поступила в редакцию 26.08.2013
принята к печати 09.09.2013

© Елезов Д.С. и соавт., 2013

Введение

Вирус гепатита С (ВГС) — один из основных возбудителей хронических заболеваний печени в мире. В Российской Федерации число лиц с наличием в крови антител к ВГС составляет более чем 3 млн человек и заболеваемость хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС) постоянно увеличивается, что формирует серьезную проблему для системы здравоохранения [2, 15].

Вирус гепатита С способен ускользать от иммунного ответа. При ХВГС выражен гуморальный иммунный ответ, но специфические анти-ВГС антитела не осуществляют необходимую защиту. Поэтому ключевая роль в контроле над инфекцией может быть реализована через действие специфических Т-клеток [1]. Формируется, преимущественно, Т-хелперный ответ I типа. Когда адаптивный иммунный ответ не справляется с задачей, в очаг инфекции привлекаются неспецифические Т-клетки, что вызывает хроническое повреждение печени и формирование воспалительного инфильтрата, определяющие в дальнейшем патогенез заболевания [18, 19]. Ключевую роль в привлечении и регуляции миграции клеток в очаг воспаления играют хемокины [3, 4, 5]. Они составляют структурно родственную группу хемотаксических цитокинов, которые синтезируются при развитии любой воспалительной реакции, в том числе и при ХВГС, когда они продуцируются клетками печени, определяя миграцию клеток иммунной системы. Например, различные популяции Т-хелперов (Th), несущие специфические рецепторы, мигрируют из крови в воспалительный инфильтрат вдоль вектора нарастания хемокинового градиента [18]. Так, за привлечение Th1-клеток отвечают CXCL-хемокины (CXCL9, CXCL10, CXCL11) и рецептор CXCR3, а также CC-хемокины (CCL4, CCL5) и рецептор CCR5. При этом на поверхности этих клеток не экспрессируются рецепторы CCR4 и CCR6, тогда как Th2-клетки экспрессируют CCR4, но на их мембране не представлены или присутствуют в малой степени CXCR3, CCR5 и CCR6 [8, 14, 18]. Вопрос о миграции Th17-клеток в воспаленную ткань печени в настоящее время изучен слабо. Известно, что данная популяция Т-клеток несет CCR6-рецептор, рассматриваемый в качестве ключевого фактора для инфильтрации Th17 тканей-мишеней. При этом на поверхности Th17-клеток определяются и другие хемокиновые рецепторы, например CCR4 и CXCR3, хотя их роль в клиническом

проявлении процесса инфильтрации пораженной ткани печени еще обсуждается [7, 11]. Наличие того или иного набора хемокиновых рецепторов на поверхности клеток определяет направление их миграции, что может оказывать существенное влияние на развитие воспалительного процесса, равно как и на распределение клеточных популяций в различных органах и тканях. Например, в тканях печени CCR5 отвечает за миграцию клеток в порталный тракт, а CXCR3 — в паренхиму данного органа [17]. В настоящее время используется цитофлюориметрическое исследование экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR3 и CCR6 для количественного определения субпопуляций Th1-, Th2- и Th17-клеток, которые имеют фенотипы CD3⁺CD4⁺CXCR3⁺CCR6⁻, CD3⁺CD4⁺CXCR3⁻CCR6⁻ и CD3⁺CD4⁺CXCR3⁻CCR6⁺ соответственно [11].

Плотность CXCR3 на поверхности наивных покоящихся клеток в норме очень низкая, но может быстро увеличиваться при их активации [8]. Кроме хемокиновых рецепторов такими особенностями обладают маркеры активации. Активированные Т-клетки непосредственно определяют тип иммунного ответа при гепатите С. Определение уровня экспрессии молекул активации Т-клеток рассматривается как информативный лабораторный маркер прогрессирования целого ряда инфекционных заболеваний. Например, интенсивность хронического воспаления возможно описывать с использованием молекул CD38 и HLA-DR [16]. Так эти маркеры доказали свою значимость при изучении активационного статуса ВИЧ-инфицированных пациентов, но данные об экспрессии этих молекул на Т-хелперах при других вирусных инфекциях, например при гепатите С, весьма фрагментарны. На точность и воспроизводимость результатов оценки уровня экспрессии молекулы CD38 методом проточной цитофлюориметрии влияют различные факторы. Отмечено, что использование конъюгатов моноклональных антител против CD38, меченных разными флюорохромами, равно как и применение для анализа антител, полученных от разных клонов-продуцентов, оказывают существенное влияние на конечный результат исследования [16].

Таким образом, целью данной работы была оценка изменений состава субпопуляций Т-хелперов, несущих на поверхности активационные маркеры CD38 и HLA-DR и хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR6 у пациентов с ХВГС.

Материалы и методы

В исследование были включены 43 человека. Из них 19 — больные с диагнозом ХВГС, 24 человека составили контрольную группу. Больные находились на амбулаторном наблюдении в Городской инфекционной больнице им. С.П. Боткина. Диагноз устанавливался на основании обнаружения анти-ВГС антител и выявления вирусной РНК методом ПЦР. Никто из больных не получал до включения в исследование стандартной патогенетической терапии, включающей препараты интерферона и рибавирина. Контрольная группа была сопоставима по полу и возрасту с основной группой.

Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови проводили методом проточной цитофлуориметрии с использованием прибора Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенный двумя диодными лазерами 488 и 638 нм. Для окрашивания лимфоцитов использовали следующие меченые флуорохромами моноклональные антитела: HLA-DR-

FITC, CD38-PE, CD3-ECD, CCR6-PE-Cy7, CXCR3-APC, CD4-APC-Cy7 (производства Beckman Coulter, США и BioLegend, США). Пробоподготовку осуществляли по стандартной методике [16]. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента VersaLyse (Beckman Coulter, США). В каждой пробе анализировали не менее 50 000 лимфоцитов. Абсолютное количество клеток определяли с помощью реагента FlowCount™ (Beckman Coulter, США). Математическую обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.2 (Beckman Coulter, США). Статистический анализ осуществляли с применением пакета прикладных программ GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, США). Данные представлены как медиана и интерквартильный размах (25; 75%). Для сравнения групп использовали непараметрический критерий Манна–Уитни, различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

ТАБЛИЦА 1. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ХЕЛПЕРОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ХЕМОКИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ CXCR3 И CCR6 (МЕ [25; 75 ПРОЦЕНТИЛИ])

Популяции Т-хелперов		Контроль (n = 24)	Группа больных ХВГС (n = 19)	P
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CXCR3 ⁺	%	35,98 (28,86; 38,68)	44,12 (38,54; 54,45)	< 0,001
	абс.	259,5 (106,2; 413,1)	425,5 (329,9; 478,2)	< 0,001
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CCR6 ⁺	%	27,40 (22,73; 36,75)	34,23 (25,49; 41,35)	0,032
	абс.	214,4 (166,1; 301,7)	281,9 (259,1; 375,7)	0,006
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁺	%	15,64 (12,10; 22,52)	23,90 (15,99; 30,55)	0,007
	абс.	120,5 (94,5; 174,0)	210,0 (156,0; 260,0)	< 0,001
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁻	%	16,36 (13,40; 19,90)	18,92 (18,47; 23,19)	0,015
	абс.	133,0 (89,0; 211,5)	208,0 (141,0; 252,4)	0,011
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁺	%	13,32 (10,94; 15,28)	12,64 (10,81; 14,25)	0,608
	абс.	96,0 (78,3; 158,3)	111,0 (104,0; 126,0)	0,152
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁻	%	53,37 (46,67; 60,47)	42,64 (33,21; 49,92)	0,002
	абс.	391,0 (326,3; 603,0)	440,0 (251,0; 489,0)	0,566

Примечание: % — содержание клеток относительно популяции Т-хелперов; абс. — абсолютное количество клеток ($10^6/л$).

ТАБЛИЦА 2. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ХЕЛПЕРОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ АКТИВАЦИОННЫЕ МАРКЕРЫ CD38 И HLA-DR (МЕ [25; 75 ПРОЦЕНТИЛИ])

Популяции Т-хелперов		Контроль (n = 24)	Группа больных ХВГС (n = 19)	P
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD38 ⁺	%	61,35 (55,27; 67,78)	53,27 (43,69; 57,72)	0,01
	абс.	442,5 (370,6; 672,0)	492,1 (299,0; 632,9)	0,855
CD3 ⁺ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺	%	4,66 (2,84; 7,40)	5,96 (4,57; 7,80)	0,067
	абс.	37,3 (22,6; 57,1)	52,7 (39,7; 74,0)	0,016
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD38 ⁺ HLA-DR ⁺	%	1,96 (1,39; 2,8)	3,03 (2,09; 3,51)	0,007
	абс.	16,5 (12,4; 18,8)	23,9 (20,0; 33,5)	< 0,001
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD38 ^{bright} HLA-DR ⁺	%	0,41 (0,32; 0,62)	0,72 (0,41; 1,17)	0,013
	абс.	3,2 (2,5; 4,5)	6,2 (4,5; 9,9)	< 0,001
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD38 ^{dim} HLA-DR ⁺	%	1,44 (0,94; 2,14)	2,13 (1,71; 2,52)	0,009
	абс.	11,6 (9,9; 16,1)	17,5 (15,3; 23,6)	< 0,001
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD38 ⁺ HLA-DR ⁻	%	56,17 (50,66; 61,51)	49,21 (41,47; 55,64)	0,009
	абс.	402,5 (344,4; 540,9)	490,8 (273,9; 626,7)	0,687
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD38 ^{bright} HLA-DR ⁻	%	6,76 (4,57; 9,19)	4,71 (3,53; 7,62)	0,12
	абс.	51,4 (41,9; 70,1)	46,9 (31,1; 69,5)	0,797
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD38 ^{dim} HLA-DR ⁻	%	49,96 (42,70; 54,49)	45,68 (36,10; 49,83)	0,015
	абс.	368,3 (298,4; 549,7)	397,3 (251,1; 580,5)	0,779
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD38 ⁻ HLA-DR ⁺	%	2,99 (2,55; 5,04)	4,27 (2,90; 5,20)	0,316
	абс.	26,8 (14,5; 40,5)	35,2 (20,2; 55,4)	0,126
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD38 ⁻ HLA-DR ⁻	%	36,45 (31,56; 43,68)	44,0 (38,49; 50,60)	0,017
	абс.	302,9 (210,8; 455,0)	411,6 (328,1; 508,4)	0,009

Примечание: % — содержание клеток относительно популяции Т-хелперов; абс. — абсолютное количество клеток (10⁶/л).

Результаты и обсуждение

Результаты измерения количественного содержания субпопуляций Т-хелперов представлены в табл. 1 и 2.

Оценка субпопуляций Т-хелперов при ХВГС показала увеличение относительного количества как $CD3^+CD4^+CXCR3^+$, так и $CD3^+CD4^+CCR6^+$ клеток. У больных по сравнению с группой контроля относительное количество $CXCR3^+$ Т-хелперов ($CD3^+CD4^+CXCR3^+$) было повышено в 1,34 раза ($p < 0,05$), а абсолютное — в 1,51 раза ($p < 0,05$). $CCR6^+$ Т-хелперы ($CD3^+CD4^+CCR6^+$) относительно контрольной группы возрастали в 1,24 раза в процентном и в 1,38 раза в абсолютном количестве ($p < 0,05$). Увеличение происходило только за счет субпопуляции клеток с фенотипом $CD3^+CD4^+CXCR3^+CCR6^+$ (рис., III обложка), а относительное количество $CD3^+CD4^+CXCR3^-CCR6^-$ клеток наоборот у больных было снижено в 1,26 раза ($p < 0,05$).

Таким образом, при ХВГС происходит достоверное возрастание количества Т-хелперов, экспрессирующих хемокиновые рецепторы $CXCR3$ и $CCR6$ ($p < 0,05$). При этом увеличенное количество субпопуляции, экспрессирующей $CXCR3$ и участвующей в формировании $Th1$ -опосредованного ответа, наблюдалось в большей мере, чем количество $CCR6^+$ Т-хелперов. Вместе с тем, наблюдается и явление коэкспрессии хемокиновых рецепторов. Так увеличивается субпопуляция, несущая одновременно и $CXCR3$ и $CCR6$, в то время как количество клеток, экспрессирующих только одну молекулу, возрастает незначительно ($CD3^+CD4^+CXCR3^+CCR6^-$) или вообще не изменяется ($CD3^+CD4^+CXCR3^-CCR6^+$). Представленные результаты не противоречат данным о возможности существования $CXCL10/IP-10$ преимущественно в антагонистической форме, что приводит к ограничению миграции $CXCR3^+$ субпопуляций Th в воспалительный инфильтрат [10] с последующей хронизацией воспалительного процесса.

При изучении ХВГС многократно отмечалось повышение уровня лиганда $CXCL10/IP-10$ при неудачном проведении стандартной терапии ПЭГ-интерфероном, и была показана связь уровня $CXCL9/MIG$ и $CXCL10/IP-10$ со стадиями фиброза печени [9, 12]. Zeremski и соавт. показали, что большинство лимфоцитов, инфильтрирующих печень, несут $CXCR3$ [19]. Однако не сразу удалось объяснить, почему при повышенном уровне провоспалительных хемокинов в плазме крови пациентов с ХВГС, ответственных за привлечение активированных лимфоцитов в печень, все равно

наблюдался неудачный исход противовирусной терапии с прогрессированием фиброза печени. Возможный механизм этого феномена был найден недавно: $CXCL10/IP-10$ (лиганд рецептора $CXCR3$) может существовать в двух формах — нормальной и антагонистической. При этом антагонистическая форма $CXCL10/IP-10$ способна взаимодействовать с $CXCR3$, но без последующей передачи внутриклеточного сигнала. Конкурентное связывание антагонистической формы $CXCL10/IP-10$ с рецептором тормозит миграцию в ткань лимфоцитов по $CXCR3$ -зависимому механизму, что снижает выраженность местного воспалительного процесса [10].

При отдельной оценке субпопуляций Т-хелперов, экспрессирующих активационные маркеры, показано достоверно повышенное содержание абсолютного количества $HLA-DR^+Th$ ($CD3^+CD4^+HLA-DR^+$) в 1,46 раза ($p < 0,05$), хотя в относительном количестве статистически значимых изменений этой популяции клеток не было обнаружено. Кроме того, было выявлено сниженное в 1,15 раза ($p < 0,01$) относительное количество $CD38^+Th$ ($CD3^+CD4^+CD38^+$), что отличалось от данных, полученных Gonzalez et al. [13]. Это может быть связано как с использованием различных типов моноклональных антител, что уже отмечалось выше, так и с особенностями выделения этой субпопуляции клеток. Из данных литературы известно, что на основании 3 вариантов экспрессии рецептора $CD38$ ($CD38^{bright}$, $CD38^{dim}$ и $CD38^-$) Т-хелперы с учетом наличия или отсутствия на их мембране $HLA-DR$ можно условно разделить на 6 субпопуляций [16]. У больных количество дубли-позитивных активированных $CD38^+HLA-DR^+$ Т-хелперов ($CD3^+CD4^+CD38^+HLA-DR^+$) по сравнению с контрольной группой достоверно возрастало и в абсолютном, и в относительном количествах почти в 1,5 раза ($p < 0,01$). Одновременно наблюдалось увеличенное количество как $CD3^+CD4^+CD38^{bright}HLA-DR^+$, так и $CD3^+CD4^+CD38^{dim}HLA-DR^+$ субпопуляций (в 1,6 и 1,4 раз соответственно). При этом у пациентов с ХВГС по сравнению с контрольной группой изменений в содержании $CD3^+CD4^+CD38^-HLA-DR^+$ клеток не было обнаружено, а относительное количество $CD3^+CD4^+CD38^+HLA-DR^-$ клеток было снижено ($p < 0,01$). Количество дубли-негативных Т-хелперов по $CD38$ и $HLA-DR$ было увеличено у лиц с гепатитом С ($p < 0,05$). Измерение количества субпопуляций, обладающих активационными молекулами $CD38$ и $HLA-DR$ среди субпопуляций, несущих $CXCR3$ и $CCR6$, не выявило статистически значимых различий (данные не приведены).

В результате постоянного антигенного воздействия ВГС на клетки иммунной системы происходит дисбаланс активации Т-хелперов, что выражается, с одной стороны, в уменьшении экспрессии молекул CD38 на поверхности клеток, а с другой стороны, в возрастании уровня экспрессии HLA-DR. Таким образом, нет возможности оценить активационный статус при ХВГС, используя определение содержания данных молекул по отдельности для количественной оценки активированных CD4⁺ клеток, но при этом активацию можно оценивать по субпопуляции, коэкспрессирующей данные антигены.

Таким образом, при ХВГС, кроме оценки активационных маркеров CD38 и HLA-DR на Т-хелперах по отдельности, оказалось важным использование их комбинации. Данное утверждение также справедливо и для хемокиновых рецепторов CXCR3 и CCR6, что позволяет сделать предположение о возможности расширения стандартных цитометрических панелей моноклональными антителами для определения хемокиновых рецепторов CXCR3 и CCR6 и активационных маркеров CD38 и HLA-DR на Т-хелперах периферической крови больных ХВГС.

Список литературы

1. Арсентьева Н.А., Семенов А.В., Тотолян А.А. Роль полиморфизма генов цитокинов при вирусном гепатите С // Инфекция и иммунитет. — 2012. — Т. 2, № 4. — С. 687–698.
2. Вирусные гепатиты в Российской Федерации. Аналитический обзор. 8 выпуск / Под ред. В.И. Покровского, А.Б. Жебруна. — СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2011. — 116 с.
3. Жданов К.В., Гусев Д.А., Чирский В.С., Сысоев К.А., Якубовская Л.А., Шахманов Д.М., Тотолян А.А. Хроническая HCV-инфекция и экспрессия мРНК СС-хемокинов и их рецепторов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 2008. — № 4. — С. 73–78.
4. Сысоев К.А., Чухловин А.Б., Тотолян А.А. Диагностическая роль определения хемокинов и их рецепторов при хроническом гепатите С // Клиническая лабораторная диагностика. — 2013. — № 2. — С. 23–29.
5. Сысоев К.А., Чухловин А.Б., Шахманов Д.М., Жданов К.В., Тотолян А.А. Профиль цитокинов и хемокинов в плазме крови пациентов с хроническим гепатитом С // Инфекция и иммунитет. — 2013. — Т. 3, № 1. — С. 49–58.
6. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян А.А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (Проект) // Медицинская иммунология. — 2012. — Т. 14, № 3. — С. 255–268.

Ссылки 7–19 см. в References (с. 333–334). See References for numbers 7–19 at p. 333–334.

ANALYSIS OF T-HELPER SUBSETS OF PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C EXPRESSING CHEMOKINE RECEPTORS CXCR3 AND CCR6 AND ACTIVATION MARKERS CD38 AND HLA-DR

Elezov D.S.^a, Kudryavtsev I.V.^{b, c, d}, Arsentieva N.A.^a, Semenov A.V.^a, Esaulenko E.V.^e, Basina V.V.^e, Totolian Areg A.^a

^a St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^b Institute of Experimental Medicine of the North West Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

^c Far East Federal University, Vladivostok, Russian Federation

^d St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

^e St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. In case of hepatitis C the adequate adaptive immune response depends on T-helper lymphocyte subsets and recruiting specific T cells in the site of infection. The purpose of the study was to assess changes in subpopulations of T-helper cells bearing chemokine receptor CXCR3 and CCR6 and activation markers CD38 and HLA-DR in peripheral blood of patients with chronic hepatitis C (n = 19) and healthy donors (n = 32). The T-helper phenotype was assessed by flow cytometry using a combination of monoclonal antibodies HLA-DR-FITC/CD38-PE/CD3-ECD/CCR6-PE-Cy7/CXCR3-APC/CD4-APC-Cy7. It was demonstrated reduction of CD38⁺ subset, increase of CXCR3⁺ and CCR6⁺ subsets

of T-helper cells in particular CD3⁺CD4⁺ CXCR3⁺CCR6⁺ cells and importance of joint determination of the chemokine receptors CXCR3 and CCR6 and the activation markers CD38 and HLA-DR compared to their separate analysis in chronic hepatitis C.

Key words: hepatitis C, T-helpers, chemokine receptors, activation markers, CXCR3, CCR6, CD38, HLA-DR.

Authors:

Elezov D.S. ✉, Researcher, Laboratory of Molecular Immunology and Seroepidemiology, St. Petersburg Pasteur Institute 197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14, St. Petersburg Pasteur Institute. Phone: (812) 232-31-55 (office). E-mail: elezovds@yahoo.com;

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine of the North West Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, Russian Federation; Associated Professor, Department of Fundamental Medicine, Far East Federal University, Vladivostok; Associated Professor, Department of Cytology and Histology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

Arsentieva N.A., Researcher, Laboratory of Molecular Immunology and Seroepidemiology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Semenov A.V., PhD (Biology), Head of Laboratory of Immunology and Epidemiology of HIV infection, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Esaulenko E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Infectious Disease of Adults and Epidemiology, St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Basina V.V., Assistant Professor, Department of Infectious Disease of Adults and Epidemiology, St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Medical Sciences, Deputy Director of Research, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

References

1. Arsent'eva N.A., Semenov A.V., Totolian A.A. Rol' polimorfizma genov tsitokinov pri virusnom gepatite S [The role of cytokine gene polymorphism in hepatitis C virus infection]. *Infektsiya i immunitet — Infection and Immunity*, 2012, vol. 2, no. 4, pp. 687–698.
2. Virusnye gepatity v Rossiyskoy Federatsii. Analiticheskiy obzor. 8 vypusk (Pod red. V.I. Pokrovskogo, A.B. Zhebruna) [Viral hepatitis in Russian Federation. Analytical review. Issue 8 (Ed. Pokrovskiy V.I., Zhebrun A.B.)]. *St. Petersburg Pasteur Institute*, 2011. 116 p.
3. Zhdanov K.V., Gusev D.A., Chirskiy B.C., Sysoev K.A., Yakubovskaya L.A., Shakhmanov D.M., Totolian A.A. Hronicheskaya HCV-infektsiya i ekspressiya mRNK SS-khemokinov i ikh retseptorov [Chronic HCV infection and mRNA expression of CC-chemokines and their receptors]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii — Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2008, vol. 4, pp. 73–78.
4. Sysoev K.A., Chukhlovin A.B., Totolian A.A. Diagnosticheskaya rol' opredeleniya khemokinov i ikh retseptorov pri khronicheskom gepatite S [The diagnostic role of chemokines and their receptors in chronic hepatitis C]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika — Clinical Laboratory Diagnostics*, 2013, vol. 2, pp. 23–29.
5. Sysoev K.A., Chukhlovin A.B., Shakhmanov D.M., Zhdanov K.V., Totolian A.A. Profil' tsitokinov i khemokinov v plazme krovi patsientov s khronicheskim gepatitom S [Cytokines and chemokines in the blood plasma of patients with chronic hepatitis C]. *Infektsiya i immunitet — Infection and Immunity*, 2013, vol. 3, no. 1, pp. 49–58.
6. Khaidukov S.V., Baydun L.A., Zurochka A.V., Totolian A.A. Standartizovannaya tekhnologiya "Issledovanie subpopulyatsionnogo sostava limfotsitov perifericheskoy krovi s primeneniem protochnykh tsitofluorimetrov-analizatorov" (Proekt) [Standard technology "Flow cytometric immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes" (Draft version)]. *Meditsinskaya immunologiya — Medical Immunology*, 2012, vol. 12, no. 3, pp. 255–268.
7. Annunziato F., Cosmi L., Liotta F., Maggi E., Romagnani S. The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int. Immunol.*, 2008, vol. 20, pp. 1361–1368.
8. Bromley S., Mempel T., Luster A. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat. Immunol.*, 2008, vol. 9, pp. 970–980.
9. Butera D., Marukian S., Iwamaye A., Hembrador E., Chambers T., Di Bisceglie A., Charles E., Tatal A., Jacobson I., Rice C., Dustin L. Plasma chemokine levels correlate with the outcome of antiviral therapy in patients with hepatitis C. *Blood*, 2005, vol. 106, pp. 1175–1182.
10. Casrouge A., Decalf J., Ahloulay M., Lababidi C., Mansour G., Vallet-Pichard A., Mallet V., Mottez E., Mapes J., Fontanet A., Pol S., Albert M. Evidence for an antagonist form of the chemokine CXCL10 in patients chronically infected with HCV. *J. Clin. Invest.*, 2011, vol. 121, pp. 308–317.
11. Crome S., Clive B., Wang A, Kang C, Chow V, Yu J, Lai A., Ghahary A., Broady R., Levings M. Inflammation effects of ex vivo human Th17 cells are suppressed by regulatory T cells. *J. Immunol.*, 2010, vol. 185, pp. 3199–3208.
12. Diago M., Castellano G., Garcia-Samaniego J., Perez C., Fernandez I., Romero M., Iacono O., Garcia-Monson C. Association of pretreatment serum interferon gamma inducible protein 10 levels with sustained virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 infected patients with chronic hepatitis C. *Gut*, 2006, vol. 55, pp. 374–379.

13. Gonzales V., Falconer K., Blom K., Reichard O., Morn B., Laursen A., Weis N., Alaeus A., Sandberg J. High levels of chronic activation in the T-cell compartments of patients coinfecting with hepatitis C virus type 1 and on highly active antiretroviral therapy are reverted by alpha interferon and ribavirin treatment. *J. Virol.*, 2009, vol. 83, pp. 11407–11411.
14. Groom J., Luster A. CXCR3 in T cell function. *Exp. Cell Res.*, 2011, vol. 317, pp. 620–631.
15. Lauer G., Walker B. Hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.*, 2001, vol. 345, pp. 41–52.
16. Maecker H., McCoy P., Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, vol. 12, pp. 191–200.
17. Oo Y., Banz V., Kavanagh D., Liaskou E., Withers D., Humphreys E., Reynolds G., Lee-Turner L., Kalia N., Hubscher S., Klenerman P., Eksteen B., Adams D. CXCR3-dependent recruitment and CCR6-mediated positioning of Th-17 cells in the inflamed liver. *J. Hepatol.*, 2012, vol. 57, pp. 1044–1051.
18. Oo Y., Shetty S., Adams D. The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *Dig. Dis.*, 2010, vol. 28, pp. 31–44.
19. Zeremski M., Petrovic L., Talal A. The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection. *J. Viral Hepat.*, 2007, vol. 14, pp. 675–687.

Received 26.08.2013

Accepted 09.09.2013

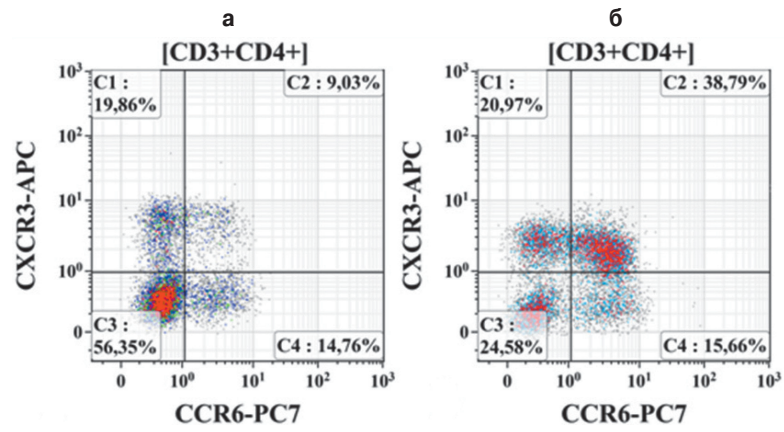


Рисунок. Распределение Т-хелперов по CXCR3/CCR6 у практически здорового человека (а) и больного ХВГС (б)