

ХЕМОКИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ НА Т-ХЕЛПЕРАХ РАЗЛИЧНОГО УРОВНЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ: ОСНОВНЫЕ СУБПОПУЛЯЦИИ

Кудрявцев И.В.^{1,2,3}, Борисов А.Г.⁴, Кробинец И.И.⁵, Савченко А.А.⁴,
Серебрякова М.К.¹, Тотолян Арег А.^{3,6}

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

² ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

³ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

⁵ ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России», Санкт-Петербург, Россия

⁶ ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. С применением восьмицветного цитометрического анализа проведено исследование экспрессии хемокиновых рецепторов (CCR4, CCR6, CXCR3 и CXCR5) на Т-хелперах (Th) различного уровня дифференцировки, выявленных на основании CD45RA и CD62L, в группе условно здоровых доноров (n = 52). Показано, что «наивные» Т-хелперы (N) с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺ экспрессируют CXCR3 (4,94±0,39%) и CXCR5 (3,63±0,25%). Около половины CD45RA⁻CD62L⁺Т-хелперов центральной памяти (СМ) несут CXCR3, в среднем 43,72±1,27% клеток данной популяции экспрессировали CCR6, тогда как CXCR5 и CCR4 обнаруживались на 30% клеток данной популяции. На CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CD62L⁻ (ЕМ) лимфоцитах уровень экспрессии CXCR3 достигал 76,76±0,75%, сходные значения бил отмечены и для CCR6, относительное содержание CXCR5⁺ клеток снижалось до 13,68±0,50%, а уровень CCR4 не изменялся и составлял 33,26±1,13% позитивных клеток.

Анализ коэкспрессии указанных выше хемокиновых рецепторов позволил выявить основные субпопуляции Т-хелперов. Среди CXCR5⁻ Th обнаружены Th1 и Th1/Th17 с фенотипами CXCR3⁺CCR6⁻CCR4⁻ (содержавшей также Th9) и CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁻ соответственно. Th2 выявлялись на основании наличия CCR4 при отсутствие всех остальных хемокиновых рецепторов. Th17, помимо указанных выше Th1/Th17, были обнаружены в составе CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁻ и CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁺, причем последняя популяция также содержала Th22. Фолликулярные Th (CXCR5⁺) состояли из как минимум шести клеточных субпопуляций: CXCR3⁻CCR6⁻CCR4⁻ («Tfh/Tfh2»), CXCR3⁻CCR6⁻CCR4⁺ («Tfh2»), CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁻ («Tfh17»), CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁺ («Tfh17»), CXCR3⁺CCR6⁻CCR4⁻ («Tfh1») и CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁻ («Tfh1/Tfh17»). Среди СМ доминируют клетки с фенотипом «Th1 и Th9» и «Th1/Th17» (около 13%), тогда как в рамках ЕМ содержание этих субпопуляций достигает 22,37±1,69% и 31,69±1,52% соответственно. Th2 в рамках СМ составляют 8,15±0,46%, а в ЕМ — лишь

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-29-29
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Address for correspondence:

Kudryavtsev Igor' V.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-29-29.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Образец цитирования:

И.В. Кудрявцев, А.Г. Борисов, И.И. Кробинец,
А.А. Савченко, М.К. Серебрякова, Арег А. Тотолян,
«Хемокиновые рецепторы на Т-хелперах различного
уровня дифференцировки: основные субпопуляции»
// Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 3.
С. 239-250. doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-239-250

© Кудрявцев И.В. и соавт., 2016

For citation:

I.V. Kudryavtsev, A.G. Borisov, I.I. Krobinec, A.A. Savchenko,
M.K. Serebriakova, Areg A. Totolian, "Chemokine receptors
at distinct differentiation stages of T-helpers from peripheral
blood", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2016, Vol. 18, no. 3, pp. 239-250.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-239-250

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-3-239-250

1,72±0,15%. Для клеток с фенотипом «Th17 и Th22» эти значения составляют 8,07±0,30% и 12,03±0,57% соответственно. Основные субпопуляции Tfh были представлены среди CM T-хелперов, где относительное содержание «Tfh/Tfh2» достигало 5,79±0,26%, «Tfh2» — 1,34±0,07%, «Tfh17» с фенотипами CXCR3-CCR6⁺CCR4⁻ и CXCR3-CCR6⁺CCR4⁺ — 6,22±0,28% и 3,28±0,16% соответственно, а также «Tfh1» — 7,68±0,31% и «Tfh1/Tfh17» — 4,02±0,17%. Среди Th эффекторной памяти относительное содержание клеток указанных выше субпопуляций Tfh снижалось в два раза и более. Полученные результаты могут найти свое применение при диагностике патологических состояний иммунной системы и использоваться в качестве группы сравнения.

Ключевые слова: хемокиновые рецепторы, субпопуляции T-хелперов, CCR4 и CXCR5, CCR6 и CXCR3

CHEMOKINE RECEPTORS AT DISTINCT DIFFERENTIATION STAGES OF T-HELPERS FROM PERIPHERAL BLOOD

Kudryavtsev I.V.^{a, b, c}, Borisov A.G.^d, Krobinets I.I.^e, Savchenko A.A.^d, Serebriakova M.K.^a, Totolian Areg A.^{c, f}

^a Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^b Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

^c Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^d Research Institute of Medical Problems of the North», Krasnoyarsk, Russian Federation

^e Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Expression of chemokine receptors (CCR4, CCR6, CXCR3 and CXCR5) on T-helper (Th) cells at various levels of differentiation in a group of healthy volunteers (n = 52) was assessed on the basis of CD45RA and CD62L expression, using the eight-color flow cytometry. It was found that the “naive” T helper cells (N) with CD45RA⁺CD62L⁺ phenotype express CXCR3 (4.94±0.39%), and CXCR5 (3.63±0.25%). About 50% of central memory T helpers (CD45RA⁻CD62L⁺, CM) were CXCR3 positive, and 43.72±1.27% of CM cells expressed CCR6, whereas CXCR5 and CCR4 levels were about 30%. Furthermore, CXCR3 was expressed by 76.76±0.75% of the CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CD62L⁻ (EM) population, and similar values were obtained for CCR6, while the relative abundance of CXCR5⁺ cells decreased to 13.68±0.50%, and CCR4 levels did not change and accounted for 33.26±1.13% positive cells.

Likewise, co-expression of the chemokine receptors was studied for the abovementioned subpopulations of T helper cells. Among the CXCR5⁻ Th, Th1 cells were identified as CXCR3⁺CCR6⁻CCR4⁻ (this subset also contained Th9), and CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁻ subsets, referred to as Th1/Th17. Th2 were detected on the basis of CCR4 expression in absence of all other chemokine receptors. In addition to the mentioned Th1/Th17 populations, Th 17 cells were found in the subsets of Th17 CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁻ and CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁺. The latter also contained a Th22 population. Follicular Th cell populations (CXCR5⁺) consisted of, at least, six different subsets: CXCR3⁻CCR6⁻CCR4⁻ (Tfh/Tfh2), CXCR3⁻CCR6⁻CCR4⁺ (Tfh2), CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁻ (Tfh17), CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁺ (Tfh17), CXCR3⁺CCR6⁻CCR4⁻ (Tfh1) and CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁻ (Tfh1/Tfh17). The cells with Th1/Th9 and Th1/Th17 phenotypes dominated among CM (about 13%), whereas their relative abundance within EM increased to 22.37±1.69% and 31.69±1.52%, respectively. The amounts of Th2 were 8.15±0.46% within CM, and only 1.72±0.15% for EM population. For the cells with Th17/Th22 phenotype, these values are 8.07±0.30% and 12.03±0.57%, respectively. The main Tfh subsets were represented among the CM T-helpers: the relative content of Tfh/Tfh2 was 5.79±0.26%, Tfh2, 1.34±0.07%; Tfh17 with CXCR3-CCR6⁺CCR4⁻ and CXCR3-CCR6⁺CCR4⁺ phenotypes made up to 6.22±0.28% and 3.28±0.16%, as well as Tfh1 (7.68±0.31%), and Tfh1/Tfh17 (4.02±0.17%), respectively. Relative content of the mentioned Tfh subsets was decreased > 2-fold within effector memory Th subpopulation. The data obtained may be applied for diagnostics of different immunopathological conditions and could be used as a comparison group in further studies.

Keywords: chemokine receptors, T helper subsets, CCR4 and CXCR5, CCR6 and CXCR3

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № 1326).

Введение

Т-хелперы (Th) с фенотипом CD3⁺CD4⁺ играют ведущую роль в регуляции реакций врожденного и приобретенного иммунитета человека, как на локальном, так и на системном уровнях, что выражается в высокой гетерогенности данной популяции. Поэтому в настоящее время существует несколько основных подходов, главной задачей которых является исследование субпопуляционного состава Th при различных патологических состояниях с применением проточной цитофлуориметрии. Первый подход основан на анализе уровня экспрессии поверхностных антигенов — CD45RA или CD45R0, CD62L или CCR7 (CD197), репертуар которых изменяется по мере созревания Т-хелперов и приобретения ими эффекторных функций [5, 8]. Использование данных маркеров позволяет выявить субпопуляции «наивных» Т-хелперов (CD45RA⁺CD62L⁺), Т-хелперов центральной и эффекторной памяти (с фенотипами CD45RA⁻CD62L⁺ и CD45RA⁻CD62L⁻ соответственно), а также «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные эффекторные Т-хелперы (TEMRA, CD45RA⁺CD62L⁻). Второй подход предполагает исследование уровня продукции эффекторных цитокинов — IFN γ для выделения Т-хелперов 1 типа (Th1), IL-4 для Т-хелперов 2 типа (Th2), IL-17A для Т-хелперов-17 (Th17), IL-21 для фолликулярных Т-хелперов (Tfh), IL-22 и IL-9 для Th22 и Th9 соответственно [22, 27].

Если первый подход основан на применении антител против поверхностных маркеров, то второй предполагает использование длительных и трудоемких процедур, связанных с индукцией синтеза цитокинов *in vitro* и с последующим анализом их уровня во внутриклеточных компартментах клетки. Все это существенно увеличивает время подготовки образцов для анализа, а также ставит получаемые результаты в прямую зависимость от опыта исследователя, условий и протокола стимуляции образцов, что приводит к значительным различиям в получаемых результатах между отдельными лабораториями. Именно поэтому такое широкое применение находит подход, основанный на определении уровня экспрессии хемокиновых рецепторов на поверхности CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов для определения их принадлежности к тому или иному типу Т-хелперов [10, 12, 26].

Тесная взаимосвязь между наличием на поверхности Th хемокиновых рецепторов CXCR3

и CCR4 и продукцией IFN γ и IL-4, соответственно, была обнаружена еще в 2004 году [28]. Однако по результатам проведенного исследования указывалось, что данная взаимосвязь не является абсолютной, то есть популяции Th, экспрессирующие определенный набор рецепторов для хемокинов, были «преимущественно обогащены» клетками-продуцентами определенных цитокинов. Уже в рамках упомянутого выше исследования был описан принципиально новый тип Th, которые несли на своей поверхности CXCR5, рецепторы «хоуминга» в лимфоидную ткань — CCR7 и CD62L, а также в ответ на стимуляцию *in vitro* синтезировали IFN γ и IL-4. В ходе дальнейших исследований было показано, что этот тип клеток представлен Tfh, основной функцией которых является участие в регуляции и запуске специфического гуморального ответа, опосредованного В-лимфоцитами, за счет синтеза IL-21 [13]. Также была обнаружена взаимосвязь между присутствием на поверхности Th периферической крови хемокинового рецептора CCR6 и способностью этих лимфоцитов синтезировать цитокины семейства IL-17, что позволяет рассматривать CCR6 в качестве одного из маркеров Th17 [11].

Вместе с тем, по мере описания новых субпопуляций Th, возник вопрос о необходимости оценивать одновременно уровень экспрессии нескольких хемокиновых рецепторов [12]. Так, для выявления Т-хелперов, обладающих свойствами Th1 и Th17 (Th1/Th17), необходим анализ коэкспрессии двух рецепторов — CXCR3 и CCR6 [10], тогда как для разделения Tfh на отдельные субпопуляции (Tfh1, Tfh2, Tfh17 и др.) возникает необходимость в анализе как минимум четырех хемокиновых рецепторов — CXCR5, CXCR3, CCR6 и CCR4 [26].

Целями данного исследования были анализ экспрессии ключевых хемокиновых рецепторов — CCR4, CCR6, CXCR3 и CXCR5 — CD3⁺CD4⁺ лимфоцитами, находящимися на различных уровнях дифференцировки, выявленных на основании CD45RA и CD62L, а также определение относительного и абсолютного содержания выявленных субпопуляций Т-хелперов в периферической крови.

Материалы и методы

Объектом исследования служила венозная кровь условно здоровых доноров, полученная путем пункции периферической вены и собранная в вакуумные пробирки с содержанием K₃ЭДТА. Все исследования проводились в день взятия крови. В рамках данного исследования было обследовано 52 практически здоровых человека

(29 мужчин и 23 женщины) в возрасте 18–65 лет. Подготовку образцов периферической крови и настройку проточного цитофлуориметра проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными Байдун и соавторами [1]. Для выявления Th использовали антитела против CD3 (клон UCST1) и CD4 (клон 13B8.2), для разделения CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов на отдельные субпопуляции использовали антитела против CD45RA (клон 2H4LDH11LDB9 [2H4]) и CD62L (клон DREG56) с использованием описанной ранее «тактики гейтирования» основных субпопуляций [4, 6]. Субпопуляция «наивных» (N) Th обладала фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺, клетки с фенотипами CD45RA⁻CD62L⁺ и CD45RA⁻CD62L⁻ соответствовали Т-хелперам центральной (СМ) и эффекторной (ЕМ) памяти, а «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные эффекторные Т-хелперы (TEMRA) определялись как CD45RA⁺CD62L⁻. На всех указанных выше субпопуляциях Th, находившихся на разных стадиях дифференцировки, при помощи моноклональных антител анализировали уровень экспрессии следующих хемокиновых рецепторов: CCR4 (CD194, клон L291H4), CCR6 (CD196, клон G034E3), CXCR3 (CD183, клон G025H7) и CXCR5 (CD185, клон J252D4). Окраску антителами производили в соответствии с рекомендациями производителей. Подбор оптимальных комбинаций антител и конъюгированных с ними флуорохромов производили на основании принципов, изложенных в литературе [7, 25]. В работе использовали антитела против CD3, CD4, CD45RA и CD62L, конъюгированные с APC-AF750, Pacific Blue, FITC и PE, соответственно (Beckman Coulter, США), а антитела против CCR4, CCR6, CXCR3 и CXCR5 были конъюгированы с PerCP/Cy5.5, PE/Cy7, APC и Brilliant Violet 510™ соответственно (Biolegend, США). Удаление эритроцитов из образцов проводили по безотмывочной технологии с использованием лизирующего раствора VersaLyse (Beckman Coulter, США), к 975 мкл которого *ex tempore* добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (Beckman Coulter, США). После разрушения эритроцитов образцы однократно отмывали избытком физиологического раствора при 330 г в течение 7 минут, после чего надосады удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в физиологическом растворе с pH 7,2–7,4, содержащем 2% параформальдегида (Sigma-Aldrich, США). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенном тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ

Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.2 (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad Prism Software Inc., США). Нормальность распределения проверяли по критерию согласия Пирсона хи-квадрат. Результаты выражали в виде % позитивных клеток от искомого населения и абсолютного содержания клеток в 10 мкл периферической крови, приводили в виде среднего и ошибки среднего. Для подсчета абсолютного содержания различных популяций Т-хелперов использовали двухплатформенную систему. Сравнение уровней экспрессии основных хемокиновых рецепторов Т-хелперами различных стадий дифференцировки проводили при помощи t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

При анализе уровней экспрессии основных типов хемокиновых рецепторов было показано, что на «наивных» Th были представлены CXCR3 (4,94±0,39%) и CXCR5 (3,63±0,25%), тогда как исследованные рецепторы СС-семейства были обнаружены менее чем на 1% клеток данной популяции (рис. 1, гистограммы А–Г). По мере прохождения Т-клетками антиген-зависимой дифференцировки, сопровождавшейся снижением CD45RA на поверхностной мембране, уровень экспрессии всех исследованных рецепторов достоверно ($p < 0,001$) возрастал. Так, CXCR3 был представлен на поверхности почти половины Th центральной памяти. Несколько меньшие значения (43,72±1,27% клеток) были отмечены для CCR6, тогда как CXCR5 и CCR4 экспрессировало в среднем 30% клеток данной популяции. Что касается Th с фенотипом CD45RA⁻CD62L⁻, то уровень экспрессии CXCR3 на этих клетках возрастал до 76,76±0,75%, что превосходило ($p < 0,001$) значения, полученные для всех остальных популяций Th различного уровня дифференцировки. Относительное содержание CXCR5⁺ клеток среди ЕМ Th снижалось ($p < 0,001$) почти в два раза по сравнению с СМ и составляло 13,68±0,50%. Экспрессия CCR6 Т-хелперами популяции ЕМ возрастала на 50% при сравнении со значениями, зарегистрированными для клеток с фенотипом CD45RA⁻CD62L⁺, тогда как уровень CCR4 достоверно не изменялся и составлял 33,26±1,13% позитивных клеток. В ходе дальнейшей дифференцировки Т-хелперов при переходе в популяцию TEMRA уровень CXCR3 несколько снижался (63,51±2,11%, $p < 0,001$) по сравнению с клетками эффекторной памяти, но достоверно превосходил значения, полученные для «наивных» CD3⁺CD4⁺ клеток и Т-хелперов

центральной памяти. Содержание клеток, несущих на своей поверхности CXCR5, достоверно не изменялось по сравнению с EM клетками. При анализе уровней экспрессии хемокиновых рецепторов CC семейства – CCR6 и CCR4 – среди CD45RA⁺CD62L⁻Т-хелперов отмечено достоверное снижение ($p < 0,001$) числа позитивных клеток (до $28,97 \pm 2,74\%$ и $12,18 \pm 1,16\%$ соответственно) при сравнении с CM и EM клетками памяти, что также достоверно превосходило таковые у «наивных» Т-хелперов.

Полученные нами результаты указывают на то, что по мере дифференцировки «наивных» Т-хелперов разнообразие и уровень экспрессии хемокиновых рецепторов значительно возрастает. На поверхности «наивных» Т-клеток полностью отсутствуют рецепторы для провоспалительных хемокинов (например, CCR1, CCR3, CCR5 и CXCR3), а также адгезионные молекулы (например, CD11b, CD29 и CD49e), лиганды которых представлены на активированных эндотелиальных клетках микроцирку-

ляторного русла [30]. Результаты более поздних исследований указывают на то, что фенотип CXCR3⁺CD45RA⁺CD62L⁺ может соответствовать «стволовым» клеткам памяти, описанным еще в 2011 году [18]. Что же касается более дифференцированных популяций Т-хелперов, то на поверхности клетки эффекторной памяти хемокиновые рецепторы для «провоспалительных» хемокинов – например, CCR5, CCR6 и CXCR3 – представлены на самом высоком уровне. Кроме того, именно в составе данной популяции отмечается появление на мембране клеток антигенов, свойственных «тканевым» Т-клеткам памяти – CD69 и CD103, так как именно на этой стадии созревания CD3⁺CD4⁺ лимфоциты покидают кровеносное русло и мигрируют в ткани [34]. В регуляции последнего процесса особая роль принадлежит хемокиновым рецепторам, так как именно их экспрессия и определяет дальнейшее распределение зрелых антиген-специфических клеток в тканях, что оказывает непосредственное

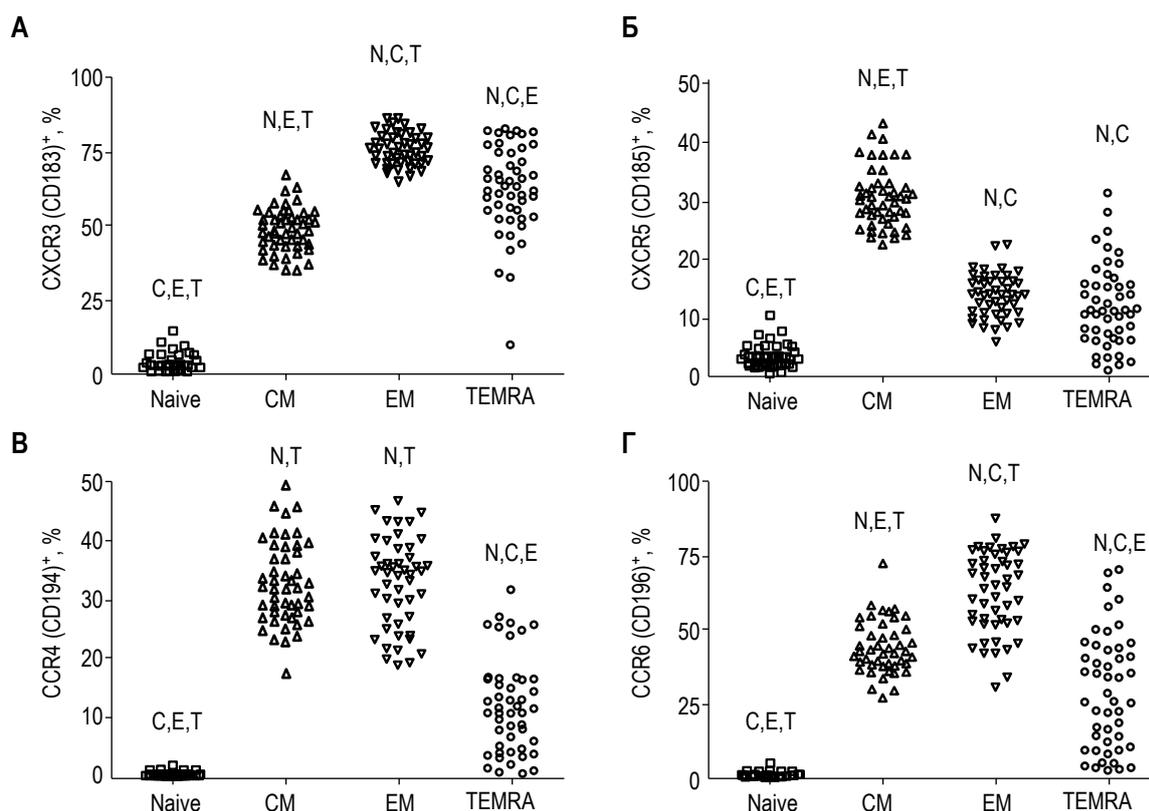


Рисунок 1. Экспрессия хемокиновых рецепторов CXCR3 (гистограмма А), CXCR5 (гистограмма Б), CCR4 (гистограмма В) и CCR6 (гистограмма Г) CD3⁺CD4⁺ лимфоцитами различного уровня дифференцировки

Примечание. N – «наивные» Т-хелперы с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺; CM – Т-хелперы центральной памяти с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁻; EM – Т-хелперы эффекторной памяти с фенотипом CD45RA⁻CD62L⁻; TEMRA – «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные эффекторные Т-хелперы. N, C, E, T – различия с популяцией «наивных» клеток, клеток центральной памяти, клеток эффекторной памяти и клетками TEMRA достоверны при $p < 0,05$ согласно t-критерию Стьюдента.

влияние на эффективность развития локальных иммунных реакций [9].

Экспрессия CCR4 связана со способностью клеток к миграции в очаги воспаления, локализованные в соединительной ткани кожных покровов. Лигандами для CCR4 выступают CCL17, экспрессируемый эндотелиальными клетками микроциркуляторного русла дермы кожи, и CCL22, синтезируемый дермальными дендритными клетками [14]. Основной функцией CCL17 является привлечение и усиление пенетрации лимфоцитов через стенки сосудов в непосредственной близости от очага воспаления, тогда как CCL22 отвечает за направленную миграцию клеток уже по соединительной ткани за пределами кровеносных сосудов. Единственным выявленным лигандом CCR6 служит CCL20, который синтезируется различными клетками, входящими в состав дермы (фибробласты, клетки эндотелия сосудов, дендритные клетки) и эпидермиса (в первую очередь, кератиноциты) кожи, слизистых оболочек кишечника, включая эпителий аппендикса и Пейеровых бляшек [15]. Основными лигандами же CXCR3 являются три хемокина CXС-семейства: CXCL9 или MIG, CXCL10 или IP-10 и CXCL11 или I-TAC, синтезируемые клетками различных органов и тканей при запуске воспалительного процесса под действием, в первую очередь, $IFN\gamma$ [20]. Увеличение синтеза этих хемокинов наблюдается при широком спектре патологических состояний, а места их продукции существенно различаются по своей локализации в пределах организма, что наводит на мысль о низкой специфичности механизмов инфильтрации CXCR3⁺ лимфоцитами очагов воспаления. Лигандом CXCR5 является CXCL13, который необходим для формирования В-клеточных фолликулов в составе лимфатических узлов, а также дифференцировки В-лимфоцитов в плазматические клетки [31]. Наличие данного рецептора определяет направленную миграцию клеток в состав этих структур периферических лимфоидных органов.

Как уже отмечалось ранее, анализ экспрессии хемокиновых рецепторов позволяет судить не только о направлении миграции Т-хелперов из кровотока, но и может выступать в качестве одного из методических приемов для определения поляризации CD3⁺CD4⁺ клеток в сторону того или иного типа Т-хелперов. Такой подход возможен только в случае использования многоцветного цитофлуориметрического анализа, позволяющего одновременно анализировать несколько поверхностных антигенов на одной клетке. В результате анализа коэкспрессии (табл. 1) хемокиновых рецепторов CXCR5,

CXCR3, CCR6 и CCR4 Т-хелперами различного уровня дифференцировки максимальное число клеток, не несущих ни один из указанных рецепторов, отмечено среди «наивных» CD4⁺Т-лимфоцитов (91,02±0,49%). Для популяций СМ и ТЕМРА этот показатель находился в пределах 15-20%, тогда как среди Т-хелперов эффекторной памяти не более 1% клеток не несло на своей поверхности исследованных хемокиновых рецепторов, что еще раз свидетельствует о высокой миграционной способности именно Th с фенотипом CD45RA⁻CD62L⁻.

При дальнейшем анализе все Т-хелперы исходно были разделены нами на CXCR5-негативные и CXCR5-позитивные клетки, так как последние формируют в высшей степени гетерогенную популяцию фолликулярных Т-хелперов. На основании экспрессии оставшихся трех антигенов — CXCR3, CCR6 и CCR4 — можно выделить основные популяции Т-хелперов.

Считается, что основным признаком Th1 является наличие на поверхности клетки CXCR3 при отсутствии CCR4 и CXCR5 [28], поэтому основная масса Th1 будет содержаться в популяции Т-хелперов с фенотипом CXCR5⁻CXCR3⁺CCR6⁻CCR4⁻. Отчасти это может служить следствием того, что у данного хемокинового рецептора имеется антагонист — CCL3, синтез которого осуществляется Th2 и эозинофилами. Лиганды CXCR3, в свою очередь, являются антагонистами CCR3, уровень экспрессии которого весьма высок на Th2. Наличие такого рода антагонистических отношений между лигандами хемокиновых рецепторов, характерных для Th1 и Th2, было положено в основу теории о ключевой роли хемокинов, синтезируемых клетками Т-зависимых зон лимфатических узлов, в регуляции поляризации «наивных» Т-хелперов [29]. Среди «наивных» Т-хелперов обнаружено только 3,91±0,34% CXCR5⁻CXCR3⁺CCR6⁻CCR4⁻ клеток (табл. 1). По мере дифференцировки Т-хелперов в клетки СМ и далее в ЕМ и ТЕМРА наблюдалось достоверное увеличение относительного содержания CXCR5⁻CXCR3⁺CCR6⁻CCR4⁻ Т-хелперов до 13,73±0,54%, 22,37±1,69% и 40,07±2,77% соответственно.

CCR4 экспрессируется на поверхности Th2, регуляторных Т-клеток, а также Т-клеток, мигрирующих в кожные покровы [19]. Уровень Th2 в циркуляции весьма низок вне зависимости от способов их определения: по экспрессии хемокиновых рецепторов, по наличию на поверхностной мембране CD294 или по индуцированной продукции IL-4 [2]. В результате наших исследований CCR4⁺Т-хелперы среди «наивных» клеток практически не обнаруживались, однако среди

ТАБЛИЦА 1. АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ХЕМОКИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ CD3⁺CD4⁺ ЛИМФОЦИТАМИ, НАХОДЯЩИМИСЯ НА РАЗЛИЧНЫХ УРОВНЯХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ, ВЫЯВЛЕННЫХ НА ОСНОВАНИИ CD45RA И CD62L (n = 52, X±s, % ОТ УКАЗАННОЙ ПОПУЛЯЦИИ)

Субпопуляции Т-хелперов (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	N	CM	EM	TEMRA
CXCR5 ⁻ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁻ CCR4 ⁻	91,02±0,49 ^{C, E, T}	14,18±0,81 ^{N, E, T}	1,07±0,19 ^{C, T}	19,80±2,19 ^{N, C, E}
CXCR5 ⁻ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁻ CCR4 ⁺ («Th2»)	0,60±0,05 ^{C, E, T}	8,15±0,46 ^{N, E, T}	1,72±0,15 ^{N, C}	1,31±0,19 ^{N, C}
CXCR5 ⁻ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁺ CCR4 ⁻ («Th17»)	0,57±0,05 ^{C, E, T}	3,14±0,13 ^{N, E}	2,32±0,18 ^{N, C}	2,73±0,41 ^N
CXCR5 ⁻ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁺ CCR4 ⁺ («Th17 и Th22»)	< 0,01	8,07±0,30 ^{N, E, T}	12,03±0,57 ^{N, C, T}	5,84±0,72 ^{N, C, E}
CXCR5 ⁻ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁻ CCR4 ⁻ («Th1 и Th9»)	3,91±0,34 ^{C, E, T}	13,73±0,54 ^{N, E, T}	22,37±1,69 ^{N, C, T}	40,07±2,77 ^{N, C, E}
CXCR5 ⁻ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁻ CCR4 ⁺	0,10±0,01 ^{C, E, T}	4,50±0,21 ^{N, E, T}	5,96±0,37 ^{N, C, T}	1,78±0,24 ^{N, C, E}
CXCR5 ⁻ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁺ CCR4 ⁻ («Th1/Th17»)	0,10±0,02 ^{C, E, T}	12,52±0,74 ^{N, E}	31,69±1,52 ^{N, C, T}	14,42±1,61 ^{N, E}
CXCR5 ⁻ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁺ CCR4 ⁺	< 0,01	5,48±0,36 ^{N, E, T}	9,17±0,44 ^{N, C, T}	2,02±0,30 ^{N, C, E}
CXCR5 ⁺ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁻ CCR4 ⁻ («Tfh/Tfh2»)	2,50±0,19 ^{C, E, T}	5,79±0,26 ^{N, E, T}	1,13±0,08 ^{N, C, T}	3,72±0,40 ^{N, C, E}
CXCR5 ⁺ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁻ CCR4 ⁺ («Tfh2»)	< 0,01	1,34±0,07 ^{N, E, T}	0,63±0,05 ^{N, C, T}	0,20±0,06 ^{N, C, E}
CXCR5 ⁺ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁺ CCR4 ⁻ («Tfh17»)	0,27±0,03 ^{C, E, T}	6,22±0,28 ^{N, E, T}	2,25±0,12 ^{N, C}	2,17±0,25 ^{N, C}
CXCR5 ⁺ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁺ CCR4 ⁺ («Tfh17»)	< 0,01	3,28±0,16 ^{N, E, T}	2,08±0,11 ^{N, C, T}	0,71±0,12 ^{N, C, E}
CXCR5 ⁺ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁻ CCR4 ⁻ («Tfh1»)	0,73±0,06 ^{C, E, T}	7,68±0,31 ^{N, E, T}	3,73±0,19 ^{N, C}	4,00±0,39 ^{N, C}
CXCR5 ⁺ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁻ CCR4 ⁺	< 0,01	0,90±0,06 ^{N, T}	1,04±0,08 ^{N, T}	0,15±0,05 ^{N, C, E}
CXCR5 ⁺ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁺ CCR4 ⁻ («Tfh1/Tfh17»)	0,07±0,01 ^{C, E, T}	4,02±0,17 ^{N, E, T}	2,18±0,11 ^{N, C, T}	0,90±0,13 ^{N, C, E}
CXCR5 ⁺ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁺ CCR4 ⁺	< 0,01	0,99±0,07 ^{N, E, T}	0,63±0,05 ^{N, C, T}	0,16±0,05 ^{N, C, E}

Примечание. N – «наивные» Т-хелперы с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁻; CM – Т-хелперы центральной памяти с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁻; EM – Т-хелперы эффекторной памяти с фенотипом CD45RA⁻CD62L⁻; TEMRA – «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные эффекторные Т-хелперы. N, C, E, T – различия с популяцией «наивных» клеток, клеток центральной памяти, клеток эффекторной памяти и клетками TEMRA достоверны при p < 0,05 согласно t-критерию Стьюдента.

Т-хелперов центральной памяти они составляли около 8% (табл. 1). В рамках анализа популяций EM и TEMRA CXCR5⁻CXCR3⁻CCR6⁻CCR4⁺ клетки составляли 1-2%, что было достоверно (p < 0,001) ниже значений, полученных для CM Т-хелперов. С другой стороны, часть Th2 может входить в состав популяций CXCR5⁻CXCR3⁺CCR6⁻CCR4⁺ и CXCR5⁻CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁺, обладающих «смешанным» или «переходным» фенотипом и содержащихся в весьма существенном количестве среди CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов центральной и эффекторной памяти. Считается, что именно такие клетки центральной и эффекторной памяти, но не «терминально-дифференцированные» или «наивные» Т-хелперы, способны менять свою поляризацию и спектр продуцируемых цитокинов [19].

Т-хелперы периферической крови, экспрессирующие CCR6 (при отсутствии CXCR5 или ряда других хемокиновых рецепторов), традиционно рассматриваются в качестве Th17, которые являются гетерогенной популяцией клеток [11]. В рамках использованной нами панели антител Th17 могут входить в состав следующих клеточных популяций: CXCR5⁻CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁻ (фенотип полностью соответствует Th17), CXCR5⁻CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁺ (помимо Th17, в состав этой популяции могут входить Th22, ко-экспрессирующие еще и CCR10), а также CXCR5⁻CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁻ [16]. Последняя представляет наибольший интерес, так как эта группа Т-хелперов способна к продукции как IL-17A, так и IFN γ , что и послужило поводом для ее обозначения как Th1/Th17 [10]. Содержа-

ние клеток, экспрессирующих исключительно CCR6, среди «наивных» Th не превышал 0,5%, тогда как среди более «зрелых» субпопуляций Т-клеток находился в пределах 3%. CCR6⁺CCR4⁺ Т-хелперы практически отсутствовали среди CD45RA⁺CD62L⁺ клеток (табл. 1). Снижение уровня CD45RA сопровождалось почти 16-кратным приростом содержания популяции Th1/Th17, тогда как снижение экспрессии еще и CD62L приводило к увеличению относительного содержания этих клеток до 12,03±0,57%. Более того, Т-хелперы указанного фенотипа обнаруживались и среди TEMRA клеток (около 6%). Что же касается CXCR5⁻CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁻ Th, то максимальное содержание этих клеток (31,69±1,52%) было обнаружено в рамках популяции EM. Среди «наивных» клеток они практически не встречались, а среди клеток популяций CM и TEMRA составляли лишь 12-14%.

Наличие на поверхности CXCR5 свидетельствует о способности клеток направленно мигрировать в В-зависимые зоны лимфатических узлов по градиенту концентрации хемокина CXCL13, поэтому CXCR5⁺CD4⁺CD3⁺ рассматриваются в качестве фолликулярных Т-хелперов [31]. Более того, Tfh обычно несут CD62L и CCR7 — молекулы, необходимые для проникновения в периферические лимфоидные органы через венулы с высоким эндотелием, что и соответствует выявленной нами максимальной экспрессии CXCR5 именно на клетках центральной памяти с фенотипом CD45RA⁻CD62L⁺ (рисунок, гистограмма А). Однако, помимо Tfh, локализованных в лимфоидной ткани, в периферической крови обнаруживаются «циркулирующие» фолликулярные Т-хелперы, способные синтезировать широкий спектр цитокинов, к числу которых, помимо IL-21, относятся IFN γ , IL-17 и IL-4, и играющие ведущую роль в процессах переключения класса синтезируемых В-клетками антител [26]. По аналогии со способностью к синтезу цитокинов, свойственных другим популяциям Т-хелперов, Tfh несут соответствующий репертуар хемокиновых рецепторов. Так, на основании фенотипа CXCR5⁺CXCR3⁺CCR6⁻CCR4⁻ можно выделить Tfh1, обладающие рядом свойств Th1, к числу которых относятся высокий уровень экспрессии транскрипционного фактора T-bet и способность к продукции IFN γ в ответ на стимуляцию. В условиях *in vitro* эти клетки не усиливали продукцию иммуноглобулинов «наивными» В-лимфоцитами, что также послужило одной из причин для их определения как Tfh1 [26]. Чаще всего клетки данного фенотипа встречались среди CD3⁺CD4⁺ центральной памяти, где они составляли 7,68±0,31%. Дальнейшая диффе-

ренцировка Т-хелперов сопровождалась двукратным снижением Tfh1 до 3,73±0,19% среди EM и 4,00±0,39% среди TEMRA (табл. 1).

Фолликулярные Т-хелперы, не экспрессирующие CXCR3 и CCR6, рассматриваются в качестве Tfh, обладающими свойствами Т-хелперов 2 типа (Tfh2), причем можно определить два их основных фенотипа: CXCR5⁺CXCR3⁻CCR6⁻CCR4⁻ и CXCR5⁺CXCR3⁻CCR6⁻CCR4⁺. Среди «наивных» Т-хелперов клетки, экспрессировавшие только CXCR5, составляли 2,50±0,19%, однако при переходе к популяции CM их число достоверно увеличивалось почти в 2 раза ($p < 0,001$). Следовые количества Tfh были отмечены при анализе фенотипа клеток эффекторной памяти, но среди эффекторных клеток популяции TEMRA их содержание вновь повышалось до 3,72±0,40% (табл. 1). CXCR5⁺CCR4⁺ клетки также обнаруживались среди CM Т-хелперов (1,34±0,07%), тогда как среди остальных популяций они практически не выявлялись. Это может быть связано с их преимущественной локализацией в лимфоидной ткани, так как в ответ на стимуляцию они способны синтезировать IL-4, IL-5 и IL-13, а также транскрипционный фактор GATA3 [26]. Более того, при со-культивировании CXCR3⁻CCR6⁻ клеток с «наивными» В-лимфоцитами последние усиливали продукцию всех основных классов иммуноглобулиновых молекул — IgM, IgG, IgA и IgE.

Фолликулярные Т-хелперы, экспрессирующие одновременно CXCR5 и CCR6, способны к синтезу и секреции цитокинов Th17 (в частности IL-17A и IL-22), а также экспрессии транскрипционного фактора ROR γ (t). Tfh17 усиливали продукцию «наивными» В-лимфоцитами иммуноглобулиновых молекул, за исключением IgE [26]. При этом максимальный эффект имел место в случае переключения класса синтезируемых антител с IgM на IgA. В ходе проведенного исследования Tfh17 можно было отнести к популяциям с фенотипами CXCR5⁺CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁻ и CXCR5⁺CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁺. Максимальное содержание этих клеток было отмечено среди CD45RA⁻CD62L⁺ Т-хелперов, где они составляли 6,22±0,28% и 3,28±0,16% соответственно (табл. 1). Была выделена группа Th с фенотипом CXCR5⁺CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁻, что позволяло охарактеризовать ее как Tfh1/Tfh17. В рамках Th центральной памяти Tfh1/Tfh17 составляли 4,02±0,17%, а при переходе к EM их относительное содержание уменьшалось в два раза и составляло 2,18±0,11%.

Клиническая значимость исследования основных субпопуляций Т-хелперов показана при весьма широком круге заболеваний, когда их со-

ТАБЛИЦА 2. АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ХЕМОКИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ CCR4, CCR6, CXCR3 И CXCR5 CD3⁺CD4⁺ ЛИМФОЦИТАМИ, НАХОДЯЩИМИСЯ НА РАЗЛИЧНЫХ УРОВНЯХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ, ВЫЯВЛЕННЫХ НА ОСНОВАНИИ CD45RA И CD62L (n = 52, X±s, КОЛ-ВО КЛЕТОК В 10 мкл ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ)

Субпопуляции Т-хелперов (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	N	CM	EM	TEMRA
CXCR5 ⁻ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁻ CCR4 ⁻	2709±215	519±45	24±5	17±5
CXCR5 ⁻ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁻ CCR4 ⁺ («Th2»)	16±2	296±26	37±4	< 1
CXCR5 ⁻ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁺ CCR4 ⁻ («Th17»)	16±2	110±8	46±4	1±1
CXCR5 ⁻ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁺ CCR4 ⁺ («Th17 и Th22»)	1±1	280±20	244±16	2±1
CXCR5 ⁻ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁻ CCR4 ⁻ («Th1 и Th9»)	115±15	488±36	492±54	27±5
CXCR5 ⁻ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁻ CCR4 ⁺	2±1	162±14	125±12	1±1
CXCR5 ⁻ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁺ CCR4 ⁻ («Th1/Th17»)	3±1	413±24	643±45	6±1
CXCR5 ⁻ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁺ CCR4 ⁺	< 1	184±11	184±11	1±1
CXCR5 ⁺ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁻ CCR4 ⁻ («Th1/Tfh2»)	68±6	200±13	22±1	2±1
CXCR5 ⁺ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁻ CCR4 ⁺ («Tfh2»)	< 1	46±3	12±1	< 1
CXCR5 ⁺ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁺ CCR4 ⁻ («Tfh17»)	8±1	217±15	45±3	1±1
CXCR5 ⁺ CXCR3 ⁻ CCR6 ⁺ CCR4 ⁺ («Tfh17»)	< 1	114±8	43±3	< 1
CXCR5 ⁺ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁻ CCR4 ⁻ («Tfh1»)	20±2	270±19	76±5	2±1
CXCR5 ⁺ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁻ CCR4 ⁺	< 1	31±2	21±2	< 1
CXCR5 ⁺ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁺ CCR4 ⁻ («Tfh1/Tfh17»)	2±1	141±9	44±3	< 1
CXCR5 ⁺ CXCR3 ⁺ CCR6 ⁺ CCR4 ⁺	< 1	34±2	13±1	< 1

Примечание. См. примечание к таблице 1.

держание может являться значимым маркером для определения тяжести патологических состояний и оценки эффективности применяемой терапии [2, 9]. В первую очередь это касается различных аутоиммунных патологий. Например, при исследовании периферической крови больных системной красной волчанкой было показано, что относительное содержание в периферической крови Т-хелперов с фенотипом CCR4⁺CCR6⁺ коррелировало с индексом активности системной красной волчанки SLEDAI [32]. Другой группой исследователей было показано, что в активной фазе данного заболевания наблюдается почти трехкратное снижение уровня циркулирующих Th1 с фенотипом CXCR5⁻CXCR3⁺CCR6⁻ при увеличении относительного содержания Th17 и Th2 по сравнению с группой контроля, что, по мнению авторов, может являться одним из важнейших диагностических признаков данного заболевания [24]. Более того, при анализе субпопуляционного состава Tfh

у этой группы больных было обнаружено, что относительное содержание Tfh1 находилось в обратной зависимости от активности заболевания, тогда как уровень Tfh2 в периферической крови высоко коррелировал с индексом активности SLEDAI. Двукратное увеличение уровня фолликулярных Т-хелперов с фенотипом CD4⁺CXCR5⁺ было отмечено в периферической крови больных сахарным диабетом 2 типа [33]. Анализ субпопуляционного состава Tfh показал, что у больных имело место сильное увеличение относительного содержания Tfh17 на фоне снижения Tfh1. Сходная динамика наблюдалась и в случае пациентов с идиопатическими воспалительными миопатиями, когда прирост циркулирующих фолликулярных Т-хелперов в периферической крови был связан со значительным увеличением Т-клеток с фенотипами CXCR5⁺CXCR3⁻CCR6⁻ и CXCR5⁺CXCR3⁻CCR6⁺, соответствовавших Tfh2 и Tfh17 [17].

Столь же перспективно и значимо исследование этих популяций при патологических процессах, связанных с хроническими вирусными инфекциями, такими как ВИЧ или хронический вирусный гепатит С. Инфицирование вирусом гепатита С сопровождалось увеличением относительного содержания CXCR3⁺CCR6⁻ среди эффекторных Т-клеток памяти с фенотипом CD45RA⁻CD62L⁻ и снижением субпопуляции CXCR3⁻CCR6⁺ среди популяций Т-хелперов, прошедших антиген-зависимую дифференцировку в периферических лимфоидных органах [3, 4]. При ВИЧ-инфекции снижение уровня CCR6⁺CD4⁺ клеток в периферической крови тесно связано с прогрессированием заболевания [23]. Одним из примеров высокой значи-

мости исследования изменения субпопуляций Т-хелперов в динамике, является тесная взаимосвязь между увеличением уровня Th1 с фенотипом CCR5⁺CXCR3⁺ в периферической крови больных и вероятностью отторжения почки после трансплантации [21].

Таким образом, примененный нами подход позволил выявить основные типы Т-хелперов среди CD4⁺Т-лимфоцитов, находящихся на различных стадиях дифференцировки. Полученные нами результаты по относительному (табл. 1) и абсолютному (табл. 2) содержанию данных популяций могут быть использованы в ходе дальнейших исследований в качестве контрольной группы.

Список литературы / References

1. Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А., Хайдуков С.В. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (проект) // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 3 С. 255-268. [Baydun L.A., Zurochka A.V., Totolian Areg A., Khaidukov S.V. Standardized technology "issledovatie subpopuliasionnogo soslava limfocytov pirifericheskoy krovi s primeneniem protochnih cytophluorimetrov-analizatorov (proekt). *Meditsinskaya Immunologiya = Medical immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 3, pp.255-268. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2012-3-255-268>
2. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в медицине и биологии. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2013. 552 с. [Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshevnev V.A. Flow cytometry in medicine and biology]. Ekaterinburg: RIO UrORAN, 2013. 552 p. (In Russ.)
3. Елезов Д.С., Кудрявцев И.В., Арсентьева Н.А., Семенов А.В., Эсауленко Е.В., Басина В.В., Тотолян Арег А. Анализ субпопуляций Т-хелперов периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR6 и активационные маркеры CD38 и HLA-DR // Инфекция и иммунитет, 2013. Т. 3, № 4. С. 327-334. [Elezov D.S., Kudryavtsev I.V., Arsentieva N.A., Semenov A.V., Esaulenko E.V., Basina V.V., Totolian Areg A. 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. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, Vol. 3. no. 4, pp. 327-334. (In Russ.)]
4. Елезов Д.С., Кудрявцев И.В., Арсентьев Н.А., Басин В.В., Эсауленко Е.В., Семенов А.В., Тотолян А.А. Анализ популяций Т-хелперных клеток памяти, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR6, в периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2015. Т. 160, № 8. С. 204-208. [Elezov D.S., Kudryavtsev I.V., Arsent'ev N.A., Basin V.V., Esaulenko E.V., Semenov A.V., Totolian A.A. Analysis of Populations of Memory T-Helper Cells Expressing CXCR3 and CCR6 Chemokine Receptors in Peripheral Blood of Patients with Chronic Viral Hepatitis C. *Byulleten' eksperimental' noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2015, Vol. 60, no. 2, pp. 238-242. (In Russ.)]
5. Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8, № 4 (17). С. 947-964. [Kudryavtsev I.V. Memory T cells: major populations and stages of differentiation. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8, no. 4, pp. 947-964. (In Russ.)]
6. Кудрявцев И.В., Савицкий В.П. Многоцветный анализ основных субпопуляций Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток методом проточной цитофлуориметрии // Российский иммунологический журнал, 2012. Т. 6, № 3 (1) (14). С. 94-97. [Kudryavtsev I.V., Savitskiy V.P. Multicolor flow cytometric analysis of the main subpopulations of T-helpers and cytotoxic T-cells from peripheral blood. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2012, Vol. 6, no. 3 (1) (14), pp. 94-97. (In Russ.)]
7. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шести-цветного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 19-26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 19-26 (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-19-26>

8. Сохоневич Н.А., Хазиахматова О.Г., Юрова К.А., Шуплетова В.В., Литвинова Л.С. Фенотипическая характеристика и функциональные особенности Т- и В-клеток иммунной памяти // Цитология, 2015. Т. 57, № 5. С. 311-318. [Sokhonevich N.A., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A., Shupletsova V.V., Litvinova L.S. Phenotypic characterization and functional features of memory T- and B-cells. *Tsitologiya = Cytology*, 2015, Vol. 57, no. 5, pp. 311-318. (In Russ.)]
9. Тотолян А.А. Роль хемокинов и их рецепторов в иммунорегуляции // Иммунология, 2001. № 5. С. 7-15. [Totolian A.A. The role of chemokines and their receptors in immunoregulation. *Immunologiya = Immunology*, 2001, no. 5, pp. 7-15. (In Russ.)]
10. Acosta-Rodriguez E.V., Rivino L., Geginat J., Jarrossay D., Gattorno M., Lanzavecchia A., Sallusto F., Napolitani G. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat. Immunol.*, 2007, Vol. 8, no. 6, pp. 639-646.
11. Annunziato F., Cosmi L., Santarlasci V., Maggi E., Liotta F., Mazzinghi B., Parente E., Fili L., Ferri S., Frosali F., Giudici F., Romagnani P., Parronchi P., Tonelli F., Maggi E., Romagnani S. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.*, 2007, Vol. 204, no. 8, pp. 1849-1861.
12. Brodie T., Brenna E., Sallusto F. OMIP-018: chemokine receptor expression on human T helper cells. *Cytometry A*, 2013, Vol. 83, no. 6, pp. 530-532.
13. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Ann. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 29, pp. 621-663.
14. D'Ambrosio D., Albanesi C., Lang R., Girolomoni G., Sinigaglia F., Laudanna C. Quantitative differences in chemokine receptor engagement generate diversity in integrin-dependent lymphocyte adhesion. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, pp. 2303-2312.
15. Dieu M.C., Vanbervliet B., Vicari A., Bridon J.M., Oldham E., Ait-Yahia S., Briere F., Zlotnik A., Lebecque S., Caux C. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J. Exp. Med.*, 1998, Vol. 188, no. 2, pp. 373-386.
16. Duhon T., Geiger R., Jarrossay D., Lanzavecchia A., Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.*, 2009, Vol. 10, no. 8, pp. 857-863.
17. Espinosa-Ortega F., Gomez-Martin D., Santana-De Anda K., Romo-Tena J., Villaseñor-Ovies P., Alcocer-Varela J. Quantitative T cell subsets profile in peripheral blood from patients with idiopathic inflammatory myopathies: tilting the balance towards proinflammatory and pro-apoptotic subsets. *Clin. Exp. Immunol.*, 2015, Vol. 179, no. 3, pp. 520-528.
18. Gattinoni L., Lugli E., Ji Y., Pos Z., Paulos C.M., Quigley M.F., Almeida J.R., Gostick E., Yu Z., Carpenito C., Wang E., Douek D.C., Price D.A., June C.H., Marincola F.M., Roederer M., Restifo N.P. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat. Med.*, 2011, Vol. 17, no. 10, pp. 1290-1297.
19. Geginat J., Paroni M., Maglie S., Alfen J.S., Kastirr I., Gruarin P., De Simone M., Paganini M., Abrignani S. Plasticity of human CD4 T cell subsets. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, p. 630.
20. Groom J.R., Luster A.D. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol. Cell Biol.*, 2011, Vol. 89, no. 2, pp. 207-215.
21. Hoerning A., Kohler S., Jun C., Lu J., Fu J., Tebbe B., Dolff S., Feldkamp T., Kribben A., Hoyer P.F., Witzke O. Cyclosporin but not everolimus inhibits chemokine receptor expression on CD4⁺ T cell subsets circulating in the peripheral blood of renal transplant recipients. *Clin. Exp. Immunol.*, 2012, Vol. 168, no. 2, pp. 251-259.
22. Korn T., Oukka M., Kuchroo V., Bettelli E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin. Immunol.*, 2007, Vol. 19, no. 6, pp. 362-371.
23. Lecureuil C., Combadiere B., Mazoyer E., Bonduelle O., Samri A., Autran B., Debre P., Combadiere C. Trapping and apoptosis of novel subsets of memory T lymphocytes expressing CCR6 in the spleen of HIV-infected patients. *Blood*, 2007, Vol. 109, no. 9, pp. 3649-3657.
24. Le Coz C., Joublin A., Pasquali J.L., Korganow A.S., Dumortier H., Monneaux F. Circulating TFH subset distribution is strongly affected in lupus patients with an active disease. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 9, e75319.
25. Mahnke Y.D., Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin. Lab. Med.*, 2007, Vol. 27, pp. 469-485.
26. Morita R., Schmitt N., Bentebibel S.E., Ranganathan R., Bourdery L., Zurawski G., Foucat E., Dullaers M., Oh S., Sabzghabaei N., Lavecchio E.M., Punaro M., Pascual V., Banchereau J., Ueno H. Human blood CXCR5(+) CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity*, 2011, Vol. 34, no. 1, pp. 108-121.
27. Murphy K.M., Reiner S.L. The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002, Vol. 2, no. 12, pp. 933-944.
28. Rivino L., Messi M., Jarrossay D., Lanzavecchia A., Sallusto F., Geginat J. Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4⁺ central memory T cells. *J. Exp. Med.*, 2004, Vol. 200, no. 6, pp. 725-735.
29. Sallusto F., Lanzavecchia A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol. Rev.*, 2000, Vol. 177, pp. 134-140.
30. Sallusto F., Lenig D., Forster R., Lipp M., Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 1999, Vol. 401, no. 6754, pp. 708-712.

31. Schaerli P, Willmann K, Lang A.B., Lipp M., Loetscher P, Moser B. CXCR5 chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 192, no. 11, pp. 1553-1562.
32. Shah K., Lee W.W., Lee S.H., Kim S.H., Kang S.W., Craft J., Kang I. Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.*, 2010, Vol. 12, no. 2, R53.
33. Wang Q., Zhai X., Chen X., Lu J., Zhang Y., Huang Q. Dysregulation of circulating CD4⁺CXCR5⁺ T cells in type 2 diabetes mellitus. *APMIS*, 2015, Vol. 123, no. 2, pp. 146-151.
34. Zhang H.H., Song K., Rabin R.L., Hill B.J., Perfetto S.P., Roederer M., Douek D.C., Siegel R.M., Farber J.M. CCR2 identifies a stable population of human effector memory CD4⁺ T cells equipped for rapid recall response. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 11, pp. 6646-6663.

Авторы:

Кудрявцев И.В. — к.м.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия; ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Борисов А.Г. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Кробинец И.И. — к.б.н., старший научный сотрудник ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России», Санкт-Петербург, Россия

Савченко А.А. — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Серебрякова М.К. — аспирант, научный сотрудник, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Тотolian Арег А. — д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, врио директора ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Kudryavtsev I.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg; Far Eastern Federal University, Vladivostok; Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Borisov A.G., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

Krobinets I.I., PhD (Biology), Senior Research Associate, Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg, Russian Federation

Savchenko A.A., PhD, MD (Medicine), Laboratory Head, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

Serebriakova M.K., Postdoc Fellow, Research Associate, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Member of Russian Academy of Sciences, Deputy Director, St. Petersburg Pasteur Institute; Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 15.03.2016
Принята к печати 01.04.2016

Received 15.03.2016
Accepted 01.04.2016