

- Biochemical Analysis Methods [Biokhimicheskie metody analiza]*. Moscow: Nauka; 2010: 91–135. (in Russian)
36. Lu F., Wang K.H., Lin Y. Rapid, quantitative and sensitive immunochromatographic assay based on stripping voltammetric detection of a metal ion label. *Analyst*. 2005; 130 (11): 1513–7.
  37. Fernández-Sánchez C., McNeil C.J., Rawson K., Nilsson O. Disposable noncompetitive immunosensor for free and total prostate-specific antigen based on capacitance measurement. *Anal. Chem.* 2004; 76 (19): 5649–56.
  38. Lin Y.Y., Wang J., Liu G., Wu H., Wai C.M., Lin Y. A nanoparticle label/immunochromatographic electrochemical biosensor for rapid and sensitive detection of prostate-specific antigen. *Biosens. Bioelectron.* 2008; 23 (11): 1659–65.
  39. Yu Q., Li H., Li C., Zhang S., Shen J., Wang, Z. Gold nanoparticles-based lateral flow immunoassay with silver staining for simultaneous detection of fumonisin B 1 and deoxynivalenol. *Food Control*. 2015; 54: 347–52.
  40. Shan S., Lai W., Xiong Y., Wei H., Xu H. Novel strategies to enhance lateral flow immunoassay sensitivity for detecting foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* 2015; 63 (3): 745–53.
  41. Wong R., Tse H. *Lateral Flow Immunoassay*. New York: Humana Press; 2009.
  42. Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Sveshnikov P.G., Dzantiev B.B. Pretreatment-free immunochromatographic assay for the detection of streptomycin and its application to the control of milk and dairy products. *Anal. Chim. Acta.* 2011; 701 (2): 209–17.
  43. Urusov A.E., Kostenko S.N., Sveshnikov P.G., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Immunochromatographic assay for the detection of ochratoxin A. *Zhurnal analiticheskoy khimii.* 2011; 66 (8): 770–6. (in Russian)
  44. Feng S., Caire R., Cortazar B., Turan M., Wong A., Ozcan A. Immunochromatographic diagnostic test analysis using google glass. *ACS Nano.* 2014; 8 (3): 3069–79.
  45. Zvereva E.A., Byzova N.A., Sveshnikov P.G., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Cut-off on demand: adjustment of the threshold level of an immunochromatographic assay for chloramphenicol. *Anal. Methods.* 2015; 7 (15): 6378–84.
  46. Dzantiev B.B., Byzova N.A., Urusov A.E., Zherdev A.V. Immunochromatographic methods in food analysis. *Trends Anal. Chem.* 2014; 55: 81–93.

Received 02.09.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 612.017.1.08

Кудрявцев И.В.<sup>1,2</sup>, Серебрякова М.К.<sup>1,3</sup>, Тотолян А.А.<sup>4</sup>

## ЗНАЧЕНИЯ НОРМЫ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ХЕЛПЕРОВ РАЗЛИЧНОГО УРОВНЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

<sup>1</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197376, г. Санкт-Петербург, Россия; <sup>2</sup>ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», 690950, г. Владивосток, Россия; <sup>3</sup>Университет ИТМО, 197101, г. Санкт-Петербург, Россия; <sup>4</sup>ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, 197101, г. Санкт-Петербург, Россия

*Цель исследования – формирование нормативных показателей по относительному и абсолютному содержанию основных популяций Т-хелперов (Th) в периферической крови условно здоровых доноров. Было обследовано 52 практически здоровых человека (29 мужчин и 23 женщины) в возрасте 18–65 лет (медиана 30 лет). Для проведения многоцветного цитофлуориметрического анализа была использована панель из следующих антител: CD45RA-FITC, CD62L-PE, CCR4-PerCP/Cy5.5, CCR6-PE/Cy7, CXCR3-APC, CD3-APC-AF750, CD4-Pacific Blue и CXCR5-Brilliant Violet 510™. Th1 были распределены по популяциям клеток с фенотипами CXCR5-CXCR3+CCR6-CCR4-, содержащими также Th9, и CXCR5-CXCR3+CCR6+CCR4-, обозначаемых как Th1/Th17. Th2 выявлялись на основании наличия CCR4 при отсутствии всех остальных хемокиновых рецепторов. Th17, помимо указанных выше Th1/Th17, были обнаружены в составе CXCR5-CXCR3-CCR6+CCR4- и CXCR5-CXCR3-CCR6+CCR4+, причем последняя популяция также содержала Th22. Фолликулярные Th, экспрессировавшие на своей поверхности CXCR5, формировали шесть клеточных популяций со следующими фенотипами: CXCR5+CXCR3-CCR6-CCR4- (“Tfh/Tfh2”), CXCR5+CXCR3-CCR6-CCR4+ (“Tfh2”), CXCR5+CXCR3-CCR6+CCR4- (“Tfh17”), CXCR5+CXCR3-CCR6+CCR4+ (“Tfh17”), CXCR5+CXCR3+CCR6-CCR4- (“Tfh1”) и CXCR5+CXCR3+CCR6+CCR4- (“Tfh1/Tfh17”). Было определено относительное и абсолютное содержание Т-хелперов указанных фенотипов как в рамках общей популяции CD3+CD4+ лимфоцитов, так и среди “наивных” Т-хелперов (CD45RA+CD62L+), Т-хелперов центральной (CD45RA-CD62L+) и эффекторной (CD45RA-CD62L-) памяти, а также “терминально-дифференцированных” CD45RA-позитивных клеток эффекторной памяти с фенотипом CD45RA+CD62L-. Полученные результаты могут быть использованы в качестве нормативных показателей при диагностике патологических состояний иммунной системы.*

**Ключевые слова:** проточная цитометрия; хемокиновые рецепторы; субпопуляции Т-хелперов; CD45RA, CD62L.

**Для цитирования:** Кудрявцев И.В., Серебрякова М.К., Тотолян А.А. Значения нормы субпопуляций Т-хелперов различного уровня дифференцировки в периферической крови. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 61 (3): 179-184.

DOI 10.18821/0869-2084-2016-61-3-179-184.

Kudryavtsev I.V.<sup>1,2</sup>, Serebryakova M.K.<sup>1,3</sup>, Totolyan A.A.<sup>4</sup>

THE STANDARD VALUES OF SUB-POPULATIONS OF T-HELPER OF DIFFERENT LEVEL OF DIFFERENTIATION IN PERIPHERAL BLOOD

<sup>1</sup>The institute of experimental medicine, 197376 St. Petersburg, Russia; <sup>2</sup>The Far-Eastern federal university, 690950 Vladivostok, Russia; <sup>3</sup>The national research university of information technologies, mechanics and optics, 197101 St. Petersburg, Russia; <sup>4</sup>The Pasteur research institute of epidemiology and microbiology, 197101 St. Petersburg, Russia

Для корреспонденции: Кудрявцев Игорь Владимирович, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отд. иммунологии ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины", e-mail: igorek1981@yandex.ru

The study was carried out to develop standard indicators of relative and absolute content of main populations of T-helpers in peripheral blood of conditionally healthy donors. The examination was implemented to sampling of 52 healthy individuals (29 males and 23 females) aged 18-65 years (median is 30 years). The multicolor cytofluorimetric analysis was applied using panel of following antibodies: CD45RA-FITC, CD62L-PE, CCR4-PerCP/Cy5.5; CCR6-PE/Cy7, CXCR3-APC, CD3-APC-AF750, CD4-Pacific Blue and CXCR5-Brilliant Violet 510TM. The T-helpers 1 were distributed in populations of cells with phenotypes CXCR5-CXCR3+CCR6-CCR4-, also containing Th9, and CXCR5-CXCR3+CCR6+CCR4- referred as Th1/Th7. The Th2 were detected on the basis of availability of CCR4 at the absence of all other chemokine receptors. The Th7, besides Th1/Th7 mentioned above, were detected in composition of CXCR5-CXCR3-CCR6+CCR4- and CXCR5-CXCR3-CCR6+CCR4+. The last population also contained Th22. The follicular Th which expressed at their surface CXCR5, formed six cellular populations with following phenotypes: CXCR5+CXCR3-CCR6-CCR4- (Tfh/Tfh2), CXCR5+CXCR3-CCR6-CCR4+ (Tfh2), CXCR5+CXCR3-CCR6+CCR4- (Tfh17), CXCR5+CXCR3-CCR6+CCR4+ (Tfh17), CXCR5+CXCR3+CCR6-CCR4- (Tfh1) and CXCR5+CXCR3+CCR6+CCR4- (Tfh1/Tfh17). The relative and absolute content of T-helpers of mentioned phenotypes was established both within the framework of total population CD3+CD4+ of lymphocytes and among "naive" T-helpers (CD45RA-CD62L+), T-helpers of central (CD45RA-CD62L+) and effector (CD45RA-CD62L-) memory and also "terminal-differentiated" CD45RA-positive cells of effector memory with phenotype CD45RA+CD62L-. The study results can be applied as standard indicators under diagnostic of pathologic conditions of immune system.

**Key words:** flow cytometry, chemokine receptors; T-helpers sub-population; CD45RA; CD62L.

**For citation:** Kudryavtsev I.V., Serebriakova M.K., Totolyan A.A. The standard values of sub-populations of T-helpers of different level of differentiation in peripheral blood. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (3): 179-184. (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-3-179-184.

For correspondence: Kudryavtsev I.V., candidate of biological sciences, senior research assistant of department of immunology. e-mail: igorek1981@yandex.ru

**Conflict of interests.** The authors declare absence of conflict of interests.

**Financing.** The study had no sponsor support

Received 01.10.2015  
Accepted 15.12.2015

Среди всех клеток систем врожденного и приобретенного иммунитета Т-хелперы (Th) выделяются особым образом выполняемых функций, что выражается в крайне высокой гетерогенности данной популяции. Исходно на основании продукции цитокинов среди CD3+CD4+ лимфоцитов выделяли клетки, способные к синтезу интерферона-гамма (IFN $\gamma$ ) и получившие название Т-хелперов 1-го типа (Th1), и клетки, названные Т-хелперами 2-го типа (Th2) и синтезировавшие IL-4 [1]. Несколько позднее были выявлены регуляторные Т-клетки, способные к синтезу TGF $\beta$  и экспрессии транскрипционного фактора Foxp3 [2]. После обнаружения этой популяции клеток количество описанных типов Th начало неуклонно расти за счет появления новых популяций, к числу которых относятся Th17, фолликулярные Т-хелперы (Tfh), Th9, Th22. В литературе регулярно появляются работы, свидетельствующие о возможности перехода Th из одной популяции в другую в зависимости от микроокружения, типа получаемых цитокиновых сигналов и широчайшего спектра других факторов [3]. Анализ отдельных субпопуляций Th долгое время основывался на длительных и трудоемких процедурах, связанных с индукцией синтеза цитокинов в условиях *in vitro* или анализом экспрессии транскрипционных факторов, локализованных во внутриклеточных компартментах, что приводило к существенным различиям в получаемых результатах между отдельными лабораториями. Более того, оба эти подхода требовали от лабораторий определенного уровня технического оснащения, а от персонала, выполнявшего все эти многочисленные манипуляции с клетками в условиях *in vitro*, достаточно высокой квалификации и профессиональной подготовки.

Именно поэтому такое широкое применение в последнее время находит подход, основанный на определении уровня экспрессии хемокиновых рецепторов на поверхности лимфоцитов CD3+CD4+ для определения их принадлежности к тому или иному типу Th. Впервые прямая взаимосвязь между экспрессией CXCR3 и CCR4 как маркеров клеток, способных к преимущественной продукции IFN $\gamma$  и IL-4 соответственно, была установлена Rivino и соавт. [4]. При этом создатели работы специально подчеркивали, что обнаруженная взаимосвязь не является абсолютной, а популяции клеток, экспрессировав-

шие тот или иной набор хемокиновых рецепторов, были «преимущественно обогащены» клетками-продуцентами определенных цитокинов. Уже в рамках упомянутого выше исследования был описан принципиально новый тип Th, экспрессировавший CXCR5, рецепторы «хоуминга» в лимфоидную ткань CCR7 и CD62L, а также способных к синтезу IFN $\gamma$  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 [5]. Несколько позднее была обнаружена взаимосвязь между присутствием на поверхности CD3+CD4+ клеток хемокинового рецептора CCR6 и их способностью синтезировать IL-17, что позволило описать новый тип Th – Th17 [6]. Следует также отметить, что экспрессия того или иного хемокинового рецептора может быть связана с определенной стадией дифференцировки Т-хелпера. Так, «наивные» Th, покинувшие тимус и не прошедшие антиген-зависимой дифференцировки в периферических лимфоидных органах, практически не несут всех указанных выше рецепторов. По мере созревания и дифференциации эффекторные клетки должны покинуть периферическую кровь и мигрировать в ткани для реализации своих функций [7, 8]. Поэтому целью данного исследования стал анализ уровня экспрессии хемокиновых рецепторов CCR4, CCR6, CXCR3 и CXCR5 CD3+CD4+ лимфоцитами, находящимися на различных уровнях дифференцирования, выявленных на основании экспрессии CD45RA и CD62L.

**Материал и методы.** Объектом работы служила венозная кровь условно здоровых доноров, полученная путем пункции периферической вены и собранная в вакуумные пробирки с содержанием К<sub>3</sub>ЭДТА. Все исследования проводились в день взятия крови. В ходе изучения было обследовано 52 практически здоровых человека (29 мужчин и 23 женщины) в возрасте 18–65 лет (медиана 30 лет). Подготовку образцов периферической крови и настройку проточного цитофлуориметра проводили в соответствии с национальными рекомендациями [9]. Для выявления Th использовали антитела против CD3 (клон UCHT1) и CD4 (клон 13B8.2), для разделения CD3+CD4+ лимфоцитов на отдельные субпопуляции использовали антитела против CD45RA (клон 2H4LDH11LDB9 (2H4)) и CD62L

(клон DREG56). Субпопуляция «наивных» (N) Th обладала фенотипом CD45RA+CD62L+, клетки с фенотипами CD45RA-CD62L+ и CD45RA-CD62L- соответствовали Th центральной (CM) и эффекторной (EM) памяти, а «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные эффекторные Th (TEMRA) определялись как CD45RA+CD62L-. На всех указанных выше субпопуляциях CD3+CD4+ лимфоцитов, находящихся 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 [10, 11]. 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/Cy76 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 330g в течение 7 мин, после чего надосадок удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в физиологическом растворе с pH 7,2–7,4, содержащим 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). При проведении статистической обработки использовали программное обеспечение 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 процентах позитивных клеток от искомой популяции, приводили медиану и интерквартильный размах (25%; 75%).

**Результаты.** Как уже отмечалось ранее, анализ экспрессии хемокиновых рецепторов позволяет судить не только о направлении миграции Th из кровотока, но и может выступать в качестве одного из методических приемов для определения поляризации клеток CD3+CD4+ в сторону того или иного типа Th. Такой подход возможен только в случае использования многоцветного цитофлуориметрического анализа, позволяющего одновременно исследовать несколько поверхностных антигенов на одной клетке. При анализе полученных результатов, приведенных в табл. 1 и 2, все Th исходно были разделены нами на CXCR5-негативные и CXCR5-позитивные клетки, так как последние формируют отдельную и весьма гетерогенную популяцию фолликулярных Т-хелперов. На основании экспрессии оставшихся трех антигенов – CXCR3, CCR6 и CCR4 – можно выделить основные популяции Т-хелперов – Th1, Th2 и Th17.

Главным признаком Th1 является наличие на поверхности клетки CXCR3 при условии отсутствия CCR4 и CXCR5, поэтому основное количество этих клеток будет содержаться в популяции Th 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 экс-

прессии которого весьма высок на Th2. Наличие такого рода антагонистических отношений между лигандами хемокиновых рецепторов, характерных для Th1 и Th2, были положены в основу теории о ключевой роли хемокинов, синтезируемых клетками Т-зависимых зон лимфатических узлов, в регуляции поляризации «наивных» Th [12]. В рамках общей популяции Th эти клетки являются одними из самых многочисленных, составляя 11,20% (8,95; 15,77). Тогда как среди «наивных» Th обнаружено чуть более 3% клеток данного фенотипа (см. табл. 1). По мере дифференцировки Th в клетки CM, EM и TEMRA наблюдалось постепенное увеличение относительного содержания CXCR5-CXCR3+CCR6-CCR4-Th.

CCR4 экспрессируется на поверхности Th2, регуляторных Т-клеток, а также Т-клеток, мигрирующих в кожные покровы. 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 [13]. По нашим данным CCR4+ Th составляют лишь около 3% от общей популяции Th, а среди «наивных» клеток практически не обнаруживались, однако среди Т-хелперов центральной памяти они составляли около 8% (см. табл. 1). В рамках анализа популяций EM и TEMRA CXCR5-CXCR3-CCR6-CCR4+ образовали 1–2%. 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 как среди CD3+CD4+ лимфоцитов, так и в рамках Th центральной и эффекторной памяти. Считается, что именно такие клетки центральной и эффекторной памяти, но не «терминально-дифференцированные» или «наивные» Th, способны менять свою поляризацию и спектр продуцируемых цитокинов [3].

Наличие CCR6 (при отсутствии CXCR5 или ряда других хемокиновых рецепторов) на поверхности клетки обычно связано со способностью к продукции IL-17A. Поэтому Th периферической крови, экспрессирующие CCR6, традиционно рассматриваются в качестве Th17, которые являются весьма гетерогенной популяцией клеток [6]. Поэтому в рамках использованной нами панели антител против хемокиновых рецепторов Th17 могут входить в состав клеточных популяций с фенотипами CXCR5-CXCR3-CCR6+CCR4- (фенотип полностью соответствует Th17), CXCR5-CXCR3-CCR6+CCR4+ (помимо Th17, в состав этой популяции могут входить Th22, экспрессирующие еще и CCR10), а также CXCR5-CXCR3+CCR6+CCR4-. Последняя представляет наибольший интерес, так как эта группа Th способна к продукции как IL-17A, так и IFN $\gamma$ , что и послужило поводом для ее обозначения как Th1/Th17. Содержание клеток, экспрессирующих исключительно CCR6, среди всех исследованных популяций находится в пределах 1–3% (см. табл. 1). Th, экспрессирующие CCR6 и CCR4, практически отсутствуют среди клеток CD45RA+CD62L+, но утрата CD45RA сопровождается почти 16-кратным приростом содержания данной популяции, тогда как снижение экспрессии еще и CD62L приводит к увеличению количества этих клеток до 11% от общего числа EM Th. Более того, Th указанного фенотипа обнаруживаются и среди TEMRA клеток, где составляют около 6% всей популяции. Что же касается CXCR5-CXCR3+CCR6+CCR4-, то максимальное их содержание обнаружено в рамках клеток эффекторной памяти (33% от общего количества EM), тогда как среди «наивных» Th1/Th17 практически не встречаются, а в популяциях CM и TEMRA составляют около 12–14%.

Как уже отмечалось выше, 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 Th [14]. Более того, Tfh обычно несут CD62L и CCR7 –

Таблица 1

**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, Me (Q25; Q75), % от целевой популяции)**

	CD3+CD4+	N	CM	EM	TEMRA
CXCR5-CXCR3-CCR6-CCR4-	39,09 (32,44; 45,35)	91,80 (89,11; 93,31)	13,36 (10,47; 17,79)	0,71 (0,28; 1,18)	15,23 (9,74; 25,40)
CXCR5-CXCR3-CCR6-CCR4+ ("Th2")	3,20 (2,53; 4,93)	0,54 (0,32; 0,82)	7,11 (5,72; 10,03)	1,51 (0,98; 2,27)	0,96 (0,30; 1,85)
CXCR5-CXCR3-CCR6+CCR4- ("Th17")	1,95 (1,48; 2,41)	0,46 (0,36; 0,72)	2,95 (2,49; 3,98)	2,38 (1,21; 3,24)	1,65 (0,82; 3,26)
CXCR5-CXCR3-CCR6+CCR4+ ("Th17 и Th22")	5,72 (4,26; 6,94)	0,02 (0,00; 0,09)	8,09 (6,76; 8,83)	11,39 (9,31; 14,99)	5,30 (1,58; 7,85)
CXCR5-CXCR3+CCR6-CCR4- ("Th1 и Th9")	11,20 (8,95; 15,77)	3,27 (2,45; 4,28)	13,40 (11,42; 15,26)	19,73 (12,42; 30,86)	35,05 (25,95; 52,89)
CXCR5-CXCR3+CCR6-CCR4+	2,93 (2,18; 3,50)	0,06 (0,04; 0,14)	4,32 (3,56; 5,39)	5,55 (4,52; 6,60)	1,33 (0,30; 3,00)
CXCR5-CXCR3+CCR6+CCR4- ("Th1/Th17")	12,17 (7,85; 15,28)	0,06 (0,03; 0,11)	11,97 (8,64; 15,01)	33,31 (24,76; 38,28)	11,52 (4,87; 20,97)
CXCR5-CXCR3+CCR6+CCR4+	3,87 (3,11; 4,90)	0,02 (0,00; 0,03)	5,09 (4,20; 6,43)	8,82 (7,11; 10,32)	1,11 (0,48; 3,07)
CXCR5+CXCR3-CCR6-CCR4- ("Tfh/Tfh2")	3,39 (2,48; 3,81)	2,20 (1,70; 2,97)	5,61 (4,74; 6,78)	1,02 (0,72; 1,49)	3,21 (1,44; 4,76)
CXCR5+CXCR3-CCR6-CCR4+ ("Tfh2")	0,58 (0,43; 0,74)	0,02 (0,00; 0,04)	1,18 (1,04; 1,56)	0,57 (0,38; 0,78)	0,00 (0,00; 0,14)
CXCR5+CXCR3-CCR6+CCR4- ("Tfh17")	2,83 (2,38; 3,46)	0,21 (0,12; 0,34)	5,70 (4,88; 7,07)	2,08 (1,70; 2,76)	2,00 (0,83; 2,88)
CXCR5+CXCR3-CCR6+CCR4+ ("Tfh17")	1,54 (1,21; 2,04)	0,00 (0,00; 0,03)	3,02 (2,46; 4,04)	2,17 (1,51; 2,69)	0,44 (0,00; 1,01)
CXCR5+CXCR3+CCR6-CCR4- ("Tfh1")	3,74 (3,18; 4,56)	0,61 (0,45; 0,90)	7,47 (6,56; 9,04)	3,49 (2,88; 4,25)	3,68 (2,00; 5,56)
CXCR5+CXCR3+CCR6-CCR4+	0,50 (0,36; 0,74)	0,00 (0,00; 0,02)	0,84 (0,60; 1,05)	0,92 (0,68; 1,36)	0,00 (0,00; 0,14)
CXCR5+CXCR3+CCR6+CCR4- ("Tfh1/Tfh17")	1,94 (1,54; 2,46)	0,05 (0,02; 0,08)	3,74 (3,30; 4,68)	2,00 (1,61; 2,69)	0,76 (0,00; 1,43)
CXCR5+CXCR3+CCR6+CCR4+	0,46 (0,36; 0,61)	0,00 (0,00; 0,02)	0,85 (0,69; 1,14)	0,57 (0,46; 0,79)	0,00 (0,00; 0,24)

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, Me (Q25; Q75), количество клеток в 10 мкл цельной венозной крови)**

	CD3+CD4+	N	CM	EM	TEMRA
CXCR5-CXCR3-CCR6-CCR4-	3184 (2183; 4579)	2265 (1625; 3670)	423 (309; 737)	12 (5; 26)	7 (2; 15)
CXCR5-CXCR3-CCR6-CCR4+ ("Th2")	253 (197; 404)	15 (9; 20)	234 (172; 343)	30 (17; 45)	0 (0; 1)
CXCR5-CXCR3-CCR6+CCR4- ("Th17")	157 (115; 198)	13 (8; 20)	90 (71; 120)	38 (25; 64)	1 (0; 1)
CXCR5-CXCR3-CCR6+ CCR6- CCR6-CCR4+ ("Th17 и Th22")	432 (349; 585)	1 (0; 2)	237 (193; 312)	218 (159; 304)	2 (1; 3)
CXCR5-CXCR3+CCR6-CCR4- ("Th1 и Th9")	946 (639; 1498)	94 (55; 126)	408 (338; 611)	385 (211; 685)	13 (6; 38)
CXCR5-CXCR3+CCR6-CCR4+	229 (171; 308)	2 (1; 3)	137 (99; 178)	109 (67; 150)	0 (0; 1)
CXCR5-CXCR3+CCR6+CCR4- ("Th1/Th17")	946 (673; 1226)	2 (1; 3)	386 (303; 508)	618 (404; 786)	4 (2; 7)
CXCR5- CXCR3-CXCR3+CCR6+CCR4+	334 (234; 444)	0 (0; 1)	176 (131; 228)	178 (123; 220)	0 (0; 1)
CXCR5+CXCR3-CCR6-CCR4- ("Tfh/Tfh2")	252 (210; 337)	62 (38; 90)	176 (145; 236)	21 (14; 24)	1 (1; 3)
CXCR5+CXCR3-CCR6-CCR4+ ("Tfh2")	46 (38; 65)	1 (0; 1)	42 (29; 57)	10 (7; 15)	0 (0; 0)
CXCR5+CXCR3-CCR6+CCR4- ("Tfh17")	214 (166; 322)	6 (2; 10)	175 (144; 274)	44 (28; 55)	1 (0; 1)
CXCR5+CXCR3-CCR6+CCR4+ ("Tfh17")	138 (88; 180)	0 (0; 1)	103 (70; 149)	39 (25; 53)	0 (0; 0)
CXCR5+CXCR3+CCR6-CCR4- ("Tfh1")	308 (239; 367)	17 (11; 27)	245 (182; 305)	64 (55; 83)	1 (0; 2)
CXCR5+CXCR3+CCR6-CCR4+	39 (31; 59)	0 (0; 1)	25 (20; 38)	16 (13; 29)	0 (0; 0)
CXCR5+CXCR3+CCR6+CCR4- ("Tfh1/Tfh17")	157 (114; 234)	1 (1; 2)	124 (88; 179)	41 (30; 53)	0 (0; 0)
CXCR5+CXCR3+CCR6+CCR4+	38 (30; 54)	0 (0; 1)	32 (22; 42)	11 (8; 17)	0 (0; 0)

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+. Однако помимо Tfh, локализованных в лимфоидной ткани, в периферической крови обнаруживаются «циркулирующие» Tfh, способные синтезировать широкий спектр цитокинов, к числу которых, помимо IL-21, относятся IFN $\gamma$ , IL-17 и IL-4, играющие ведущую роль в процессах переключения класса синтезируемых В-клетками антител [15]. По аналогии со способностью к синтезу цитокинов, свойственных другим популяциям Т-хелперов, Tfh несут сходный 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 $\gamma$  в ответ на стимуляцию. Более того, в условиях *in vitro* эти клетки не усиливали продукцию иммуноглобулинов «наивными» В-лимфоцитами, что и послужило одной из причин для их определения как Tfh1 [15]. Чаще всего клетки данного фенотипа встречались среди CD3+CD4+ центральной памяти, где они составили около 7,5%. Дальнейшая дифференцировка Т-хелперов сопровождалась снижением Tfh1 среди EM и TEMRA (см. табл. 1).

Tfh, не экспрессирующие CXCR3 и CCR6, рассматриваются в качестве Tfh2, причем можно определить два их основных фенотипа: CXCR5+CXCR3-CCR6-CCR4- и CXCR5+CXCR3-CCR6-CCR4+. Среди «наивных» Th клетки, экспрессирующие только CXCR5, составляют чуть более 2%, однако при переходе к популяции CM их число увеличивается почти в 2 раза (см. табл. 1). Следовые количества Tfh отмечены при анализе фенотипа клеток эффекторной памяти, но среди эффекторных клеток популяции TEMRA их содержание вновь повышается. Клетки с фенотипом CXCR5+CCR4+ в основном обнаруживаются среди Т-хелперов центральной памяти, тогда как среди остальных популяций они практически не выявляются. 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. Более того, при сокультивировании CXCR3-CCR6- клеток с «наивными» В-лимфоцитами последние усиливали продукцию всех основных классов иммуноглобулиновых молекул – IgM, IgG, IgA и IgE [15].

Что же касается фолликулярных Т-хелперов, экспрессирующих одновременно CXCR5 и CCR6, то они были способны к синтезу и секреции цитокинов, свойственных Th17 (в частности, IL-17A и IL-22), а также содержали транскрипционный фактор ROR $\gamma$ T. В условиях *in vitro* Tfh17 усиливали продукцию нескольких классов синтезируемых антител «наивными» В-лимфоцитами, за исключением IgE, однако максимальный эффект имел место в случае индукции синтеза IgA [15]. В ходе проведенного исследования Tfh17 можно было отнести к популяциям с фенотипами CXCR5+CXCR3-CCR6+CCR4- и CXCR5+CXCR3-CCR6+CCR4+. Причем, максимальное содержание этих клеток было отличительной чертой CD45RA-CD62L+ Th (см. табл. 1 и 2). Более того, нами выделена группа клеток, которую можно охарактеризовать как Tfh1/Tfh17, потому что она имела фенотип CXCR5+CXCR3+CCR6+CCR4-. В рамках CM они составляли почти 4%, тогда как при переходе к EM их относительное содержание уменьшалось.

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

клинико-иммунологических и лабораторных исследований в качестве контрольной группы. Более того, в настоящее время важность изучения основных типов Т-хелперов показана при весьма широком круге заболеваний, где их содержание может являться клинически-значимым маркером для определения тяжести патологических состояний и оценки эффективности применяемой терапии [13, 16]. Так, при анализе периферической крови больных системной красной волчанкой в активной фазе заболевания отмечено почти трехкратное снижение уровня Th1 с фенотипом CXCR5-CXCR3+CCR6-CD45RA-CD4+ по сравнению с группой контроля на фоне увеличения уровня Th17 и Th2, что, по мнению авторов, может являться одним из важнейших диагностических признаков данного заболевания [17]. Что же касается Tfh у данной группы больных, то относительное содержание Tfh1 находилось в обратной зависимости от активности заболевания, тогда как уровень Tfh2 в периферической крови высоко коррелировал с индексом активности SLEDAI. При исследовании сахарного диабета 2-го типа было отмечено почти двукратное увеличение уровня Tfh с фенотипом CD4+CXCR5+ в циркуляции [18]. Более того, в рамках Tfh было отмечено резкое увеличение Tfh17 и снижение Tfh1 по сравнению со значениями, полученными для контрольной группы условно здоровых доноров. Сходные изменения в популяции фолликулярных Т-хелперов наблюдались в периферической крови пациентов с идиопатическими воспалительными миопатиями, когда относительное увеличение числа этих клеток было связано со значительным приростом клеток с фенотипами CXCR5+CXCR3-CCR6- и CXCR5+CXCR3-CCR6+, соответствовавших Tfh2 и Tfh17 [19]. При наблюдении за больными с рассеянным склерозом анализ субпопуляций Т-хелперов, экспрессирующие различные хемокиновые рецепторы (в первую очередь CXCR3 и CCR4), может служить важнейшим критерием при оценке эффективности терапии [20]. В качестве признака, характеризующего успешное применение препаратов на основе IFN $\beta$ , авторы предлагают рассматривать увеличение уровня CD4+CXCR3+ и CD4+CCR4+ лимфоцитов в периферической крови больных. 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 же 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 [21]. При ВИЧ-инфекции снижение уровня CCR6+CD4+ клеток в периферической крови тесно связано с прогрессированием заболевания [22].

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследование не имело спонсорской поддержки.*

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–6, 11–12, 14–15, 17–20, 22 см. REFERENCES)

1. Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки. *Российский иммунологический журнал*. 2014; 8 (4): 947–64.
2. 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; 57 (5): 311–8.
3. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян А.А. Стандартизованная технология "исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов". *Российский иммунологический журнал*. 2014; 8 (4): 974–92.
4. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестичетного цитофлюориметрического анализа. *Медицинская иммунология*. 2015; 17 (1): 19–26.

13. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. *Проточная цитометрия в медицине и биологии*. Екатеринбург: РИО УрО РАН; 2013.
16. Тотолян А.А. Роль хемокинов и их рецепторов в иммунорегуляции. *Иммунология*. 2001; (5): 7–15.
21. Елезов Д.С., Кудрявцев И.В., Арсентьев Н.А., Басин В.В., Эсауленко Е.В., Семенов А.В. и др. 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; 160 (8): 204–8.
11. Mahnke Y.D., Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin. Lab. Med.* 2007; 27 (3): 469–85.
12. Sallusto F., Lanzavecchia A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol. Rev.* 2000; 177: 134–40.
13. Zurochka A.V., Khaydukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshev V.A. *Flow Cytometry in Medicine and Biology. [Protochnaya tsitometriya v meditsine i biologii]*. Ekaterinburg: RIO UrO RAN; 2013. (in Russian)
14. 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; 192 (11): 1553–62.
15. Morita R., Schmitt N., Bentebibel S.E., Ranganathan R., Bourdery L., Zurawski G. et al. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity*. 2011; 34 (1): 108–21.
16. Totolyan A.A. Role of chemokines and their receptors in immunoregulation. *Immunologiya*. 2001; (5): 7–15. (in Russian)
17. 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; 8 (9): e75319.
18. 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; 123 (2): 146–51.
19. Espinosa-Ortega F., Gomez-Martin D., Santana-De Anda K., Romo-Tena J., Villasenor-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; 179 (3): 520–8.
20. Andalib A., Doulabi H., Najafi M., Tazhibi M., Rezaie A. Expression of chemokine receptors on Th1/Th2 CD4+ lymphocytes in patients with multiple sclerosis. *Iran. J. Immunol.* 2011; 8 (1): 1–10.
21. Elezov D.S., Kudryavtsev I.V., Arsent'ev N.A., Basin V.V., Esaulenko E.V., Semenov A.V. et al. The analysis of T helper memory cells populations expressing the chemokine receptors CXCR3 and CCR6 in the peripheral blood of patients with chronic hepatitis C. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2015; 160 (8): 204–8. (in Russian)
22. Lecureuil C., Combadiere B., Mazoyer E., Bonduelle O., Samri A., Auran B. et al. Trapping and apoptosis of novel subsets of memory T lymphocytes expressing CCR6 in the spleen of HIV-infected patients. *Blood*. 2007; 109 (9): 3649–57.

Поступила 01.10.15

## REFERENCES

1. Murphy K.M., Reiner S.L. The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2002; 2 (12): 933–44.
2. Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008; 133 (5): 775–87.
3. Geginat J., Paroni M., Maglie S., Alfen J.S., Kastirr I., Gruarin P. et al. Plasticity of human CD4 T cell subsets. *Front. Immunol.* 2014; 5: 630.
4. 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; 200 (6): 725–35.
5. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Ann. Rev. Immunol.* 2011; 29: 621–63.
6. Annunziato F., Cosmi L., Santarlasci V., Maggi L., Liotta F., Mazzinghi B. et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.* 2007; 204 (8): 1849–61.
7. Kudryavtsev I.V. Memory T cells: major populations and stages of differentiation. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal*. 2014; 8 (4): 947–64. (in Russian)
8. Sokhnevich 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*. 2015; 57 (5): 311–8. (in Russian)
9. Khaydukov S.V., Baydun L.A., Zurochka A.V., Totolyan A.A. The standardised technique “Study subpopulations of peripheral blood lymphocytes by using flow cytometry”. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal*. 2014; 8 (4): 974–92. (in Russian)
10. Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya immunologiya*. 2015; 17 (1): 19–26. (in Russian)

Received 01.10.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.981.455-078.33

Еремкин А.В., Елагин Г.Д., Печенкин Д.В., Фоменков О.О., Богачева Н.В., Кытманов А.А., Куклина Г.В., Тихвинская О.В.

## РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ И ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ

Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, 610017, г. Киров, Российская Федерация

Осуществлен подбор моноклональных антител, обладающих иммунохимической активностью к антигенам *Francisella tularensis*, на их основе разработаны иммуноферментная и иммунохроматографическая тест-системы для выявления возбудителя туляремии. Оценка чувствительности и специфичности разработанных тест-систем показала, что образцы обеспечивали выявление штаммов *F. tularensis* в концентрации от  $5,0 \cdot 10^5$  м.к.·см<sup>-3</sup> до  $1,0 \cdot 10^6$  м.к.·см<sup>-3</sup> и не давали ложноположительных результатов при исследовании гетерологичных микроорганизмов в концентрации  $1,0 \cdot 10^8$  м.к.·см<sup>-3</sup>.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Francisella tularensis*; моноклональные антитела; иммуноферментный анализ; иммунохроматографический анализ.

Д л я ц и т и р о в а н и я: Еремкина А.В., Елагин Г.Д., Печенкин Д.В., Фоменков О.О., Богачева Н.В., Кытманов А.А., Куклина Г.В., Тихвинская О.В. Разработка иммуноферментной и иммунохроматографической моноклональных тест-систем для выявления возбудителя туляремии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (3): 184–187. DOI 10.18821/0869-2084-2016-61-3-184-187.

Для корреспонденции: Еремкин Андрей Валентинович, мл. науч. сотр. научно-исследовательского отдела, E-mail: andreieremkin@gmail.com