

СПОНТАННАЯ И СТИМУЛИРОВАННАЯ ЭКСПРЕССИЯ CD25 Т-ЛИМФОЦИТАМИ И КОЛИЧЕСТВО РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК У ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С

© 2018 г. И. А. Пашнина^{1,2}

¹ГБУЗ «Областная детская клиническая больница», Екатеринбург, Россия;

²ФГУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Поступила: 16.05.2018. Принята: 21.06.2018

Обследованы дети 6–17 лет с хроническим вирусным гепатитом С (n=24), а также условно здоровые дети соответствующего возраста (контрольная группа, n=32). Методом проточной цитометрии исследовано количество CD3⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺ и CD8⁺CD25⁺, регуляторных Т-клеток (Treg, CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low/neg}) в периферической крови и при инкубации с различными стимуляторами. У детей с хроническим гепатитом С по сравнению с контролем выявлено снижение количества CD3⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺ и Treg при стимуляции фитогемагглютинином, а также CD8⁺CD25⁺ – при стимуляции антителами к CD3 и сочетанной стимуляции антителами к CD3 и CD28.

Ключевые слова: гепатит С, лимфоциты, Treg, проточная цитометрия

DOI: 10.31857/S102872210002415-1

Адрес: 620149 Екатеринбург, ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1», Пашнина Ирина Александровна. Тел.: 8(343) 272 91 39; E-mail: irina_pashnina@list.ru

Автор:

Пашнина И. А., д.б.н., заведующая клинико-диагностической лабораторией ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1».

ВВЕДЕНИЕ

Вирусные гепатиты являются широко распространенными заболеваниями как среди взрослого, так и среди детского населения. Более 185 миллионов людей во всем мире инфицированы вирусом гепатитом С, хронический гепатит С является наиболее частой причиной развития цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [1]. У большинства больных это заболевание переходит в хроническую форму и плохо поддается лечению, что обуславливает значительный интерес к исследованию патогенеза этого заболевания и участия иммунокомпетентных клеток в данном процессе [2, 3]. Помимо клеток, непосредственно задействованных в противовирусном ответе, актуальным является исследование клеток-регуляторов иммунных функций [4, 5].

Регуляторным Т-клеткам (Treg) и продуцируемым ими цитокинам отводится ключевая роль в негативной регуляции адаптивного иммунно-

го ответа [6]. Treg элиминируют аутореактивные Т-лимфоциты, индуцируют иммунологическую толерантность и подавляют воспаление. Различают образующиеся в тимусе естественные и дифференцирующиеся на периферии индуцибельные Treg. Свои функции регуляторные Т-клетки осуществляют с помощью выработки супрессорных цитокинов IL-10 и TGF-β, экспрессии различных рецепторов, таких как CTLA4, и перфорин-гранзим-индуцированного апоптоза эффекторных Т-лимфоцитов [6, 7].

На первых этапах исследования Treg было установлено, что это одна их субпопуляций Т-хелперов, экспрессирующая CD25 (α-цепь гетеродимерного компонента высокоаффинного рецептора IL-2) и обладающая супрессорной активностью [6]. Позднее было выявлено, что ядерный транскрипционный фактор Foxp3 является ключевым для развития и функционирования Treg у человека и может служить маркерной молекулой данной субпопуляции [6]. Кроме того, регуляторные Т-клетки характеризуются слабой или отсутствующей экспрессией CD127 (рецептор IL7) [8]. Соответственно, в настоящее время для идентификации Treg наиболее часто используют определение клеток с фенотипами CD4⁺CD25⁺CD127^{low} и CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺.

Данные литературы относительно количества регуляторных Т-клеток при вирусном гепатите С достаточно противоречивы. В разных источниках сообщается как об увеличении количества Тreg при этом заболевании [9, 10], так и о снижении их числа [11], а также об отсутствии каких-либо изменений [12].

Целью настоящей работы явилась оценка количества CD25-позитивных Т-лимфоцитов и регуляторных Т-клеток у детей с хроническим гепатитом С.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследованы дети 6–17 лет: с хроническим вирусным гепатитом С (ХГС, n=24, средний стаж заболевания 5 лет), условно здоровые дети (контрольная группа, n=32). Больные с ХГС на момент обследования находились на госпитализации в гастроэнтерологическом отделении ГБУЗ СО ОДКБ№ 1, получали терапию препаратами интерферона-альфа, характеризовались умеренной биохимической активностью заболевания или находились вне активности; вирусная нагрузка (медиана и квартили) составила: 0,1 (0,1–4,1)*10⁴/мл (по данным историй болезни пациентов).

Относительное количество CD3⁺CD25⁺ (среди CD3⁺), CD3⁺CD8⁺CD25⁺ (среди CD3⁺CD8⁺), CD3⁺CD4⁺CD25⁺, CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low/neg} и CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁺ (среди CD3⁺CD4⁺) определяли методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, USA). Абсолютное количество клеток в перечисленных субпопуляциях периферической крови подсчитывали с использованием счетных частиц Flow-Count (Beckman Coulter, USA). Клетки с указанными фенотипами определяли в периферической крови, а также после инкубации *in vitro*. Перед инкубацией образцы цельной периферической крови разводили глутаминсодержащей средой RPMI-1640 (Пан-Эко, Россия) в соотношении 1:9 и инкубировали в течение 24-х часов при 37 °С, 5% CO₂ в 4-х различных вариантах: без стимулятора; с фитогемагглютинином (ФГА, Sigma) в конечной концентрации 20 мкг/мл; с агонистическими антителами к CD3, не конъюгированными с флюорохромом (aCD3, Биокон, Россия), в конечной концентрации 2 мкг/мл; с агонистическими антителами к CD3, не конъюгированными с флюорохромом (Биокон, Россия), в конечной концентрации 2 мкг/мл и агонистическими антителами к CD28 в конечной концентрации 0,8 мкг/мл

(aCD28, Beckman Coulter, США). Полученные данные анализировали с помощью ковариационного анализа. Предварительно проводили логит-преобразование (для долей) и логарифмирование (для абсолютного количества клеток). Приведение в исходную шкалу ожидаемых значений и их 95% доверительных интервалов выполняли с помощью антилогит-преобразования и потенцирования, соответственно. Для апостериорных (post hoc) сравнений в рамках ковариационного анализа использован критерий Тьюки для выборок не равного размера.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Относительное и абсолютное количество Т-лимфоцитов, Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток периферической крови, экспрессировавших CD25, а также регуляторных Т-клеток у больных с ХГС не отличалось от контрольных значений (таб.). Число активированных Т-хелперов CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁺ в периферической крови детей с вирусным гепатитом было практически в 2 раза выше, чем у клинически здоровых детей (таб.). Однако в обеих группах число этих клеток было не велико и составило не более 20% от CD25-позитивных Т-хелперов.

После инкубации без стимулятора численность исследованных субпопуляций Т-лимфоцитов мало изменилась (таб.). При этом исходные различия по количеству активированных Т-хелперов нивелировались. Добавление митогена (ФГА) в инкубационную среду, а также стимуляция клеток через Т-клеточный рецептор (изолированно, или в сочетании с костимуляцией через CD28) привели к увеличению числа CD25-позитивных Т-хелперов (включая Тreg), цитотоксических Т-клеток и, соответственно, Т-лимфоцитов в целом — как у здоровых детей, так и у больных с ХГС (таб.). Количество активированных Т-хелперов с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁺ при всех вариантах стимуляции в обеих группах не возросло. При добавлении ФГА в инкубационную среду количество Т-лимфоцитов и Т-хелперов, экспрессировавших CD25, а также Тreg, у детей с ХГС было ниже контрольного уровня (таб.). При стимуляции aCD3 и aCD3 в сочетании с aCD28, снижение числа CD25-позитивных лимфоцитов было отмечено только в популяции цитотоксических Т-клеток (таблица).

ОБСУЖДЕНИЕ

Отсутствие различий между больными с вирусным гепатитом и клинически здоровыми

Таблица. Количество Т-лимфоцитов, Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток, экспрессировавших CD25, регуляторных Т-клеток и активированных Т-хелперов у детей с хроническим гепатитом С и условно здоровых

	Группа	ХГС			Контроль		
		М	95%ДИ		М	95%ДИ	
Периферическая кровь	CD3 ⁺ CD25 ⁺ , %	7,78	6,92	8,73	6,52	5,88	7,22
	CD3 ⁺ CD25 ⁺ , *10 ⁹ /л	0,122	0,101	0,148	0,112	0,095	0,133
	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ , %	12,92	11,37	14,65	10,29	9,18	11,52
	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ , *10 ⁹ /л	0,113	0,092	0,139	0,102	0,085	0,123
	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ , %	0,68	0,37	1,23	0,38	0,23	0,64
	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ , *10 ⁹ /л	0,004	0,002	0,007	0,002	0,001	0,004
	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low/neg} , %	10,83	9,48	12,35	9,64	8,57	10,82
	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low/neg} , *10 ⁹ /л	0,095	0,076	0,118	0,096	0,079	0,116
	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁺ , %	2,53*	2,01	3,17	1,60	1,31	1,95
	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁺ , *10 ⁹ /л	0,022	0,017	0,029	0,016	0,013	0,020
Инкубация без стимулятора	CD3 ⁺ CD25 ⁺ , %	8,97	7,90	10,16	8,92	7,90	10,05
	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ , %	14,55	13,04	16,21	12,01	10,79	13,36
	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ , %	1,19	0,87	1,62	2,10	1,57	2,80
	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low/neg} , %	12,99	11,77	14,21	10,87	9,72	12,02
	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁺ , %	2,09	1,52	2,86	1,41	1,04	1,90
Инкубация с ФГА	CD3 ⁺ CD25 ⁺ , %	30,8***	25,6	36,7	50,9	44,8	56,9
	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ , %	41,5*	34,0	49,5	60,0	52,6	67,0
	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ , %	17,1***	13,5	21,6	41,1	34,9	47,7
	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low/neg} , %	40,09*	32,30	48,42	58,28	50,39	65,77
	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁺ , %	2,18	1,51	3,13	1,55	1,09	2,19
Инкубация с aCD3	CD3 ⁺ CD25 ⁺ , %	16,60	12,74	21,33	19,66	15,41	24,74
	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ , %	24,11	18,44	30,86	20,27	15,53	26,01
	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ , %	7,23**	5,13	10,10	17,67	13,16	23,32
	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low/neg} , %	21,80	16,45	28,30	18,10	13,74	23,46
	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁺ , %	1,46	1,02	2,08	1,15	0,82	1,61
Инкубация с aCD3/aCD28	CD3 ⁺ CD25 ⁺ , %	18,46	14,12	23,77	20,65	16,09	26,09
	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ , %	26,78	20,35	34,35	21,61	16,38	27,95
	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ , %	6,88**	4,64	10,07	17,78	12,70	24,34
	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low/neg} , %	24,15	17,92	31,71	18,69	13,88	24,70
	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁺ , %	1,67	1,20	2,32	1,03	0,75	1,41

Примечание: М – среднее значение; 95%ДИ – 95% доверительный интервал; различия с контролем: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001.

детьми по количеству Treg соотносится с результатами разных авторов, которые также не обнаружили изменения численности этих клеток у взрослых больных с этим заболеванием [12, 13]. Однако, в литературе сообщается и об увеличении [9, 10], и о снижении количества Treg при ХГС [11]. Возможно, количество этих клеток зависит от стадии вирусного заболевания и от ак-

тивности инфекционного процесса. Не исключено, что возраст пациентов также может играть роль, т.к. в детском и взрослом возрасте могут быть отличия по численности той, или иной субпопуляции клеток, а также могут наблюдаться особенности течения патологического процесса. Например, согласно результатам работы Pan X. с соавт. число регуляторных Т-клеток

с фенотипом $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{low}$ у пожилых лиц было ниже, чем у лиц среднего возраста, как в норме, так и при патологии [14].

При всех типах индуцирующего воздействия, использованных в нашей работе, увеличивалось количество клеток с фенотипом регуляторных Т-лимфоцитов, но не зрелых эффекторных клеток, составляющих большую часть субпопуляции $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^+$. При этом не ясно, фенотип Тreg приобретали наивные Т-лимфоциты, или другие клетки. Известно, что различные популяции Т-хелперов, такие как Th1, Th2, Th17 и Тreg могут последовательно экспрессировать ключевые для каждой субпопуляции транскрипционные факторы и «менять свою специализацию», например с провоспалительных свойств Th17 на супрессорные свойства Тreg [15]. Остается также открытым вопрос о функциональной полноценности клеток, приобретающих фенотипические характеристики Тreg в процессе стимуляции *in vitro*.

У обследованных нами детей с ХГС после стимуляции ФГА количество Тreg и $CD25^+$ -позитивных клеток в целом было ниже, чем у клинически здоровых детей. При изолированной стимуляции через ТКР и при ее сочетании с воздействием через $CD28$, число цитотоксических $CD25^+$ -позитивных Т-клеток у обследованных нами больных с ХГС также было ниже, чем в контрольной группе. То есть, стимуляция различными агентами позволила зафиксировать сниженную экспрессию $CD25$ при ХГС по сравнению с клинически здоровыми детьми, тогда как спонтанная экспрессия этой молекулы не отличалась от контрольных значений. Данные о стимулированной экспрессии $CD25$ при вирусном гепатите С в литературных источниках отсутствуют.

$CD25^+$ -позитивные цитотоксические Т-лимфоциты так же, как и Т-хелперы, могут принимать участие в негативной регуляции иммунного ответа. Тимические Т-лимфоциты с фенотипом $CD8^+CD25^+$ способны к супрессии пролиферативной активности аутологических $CD4^+CD25^-$ -лимфоцитов и экспрессируют типичные маркеры регуляторных клеток: Foxp3, GITR и CTLA-4 [16]. Цитотоксические Т-лимфоциты, экспрессирующие $CD25$, из периферической крови и неиммунных органов также могут проявлять супрессорные свойства и нести маркеры Тreg [17]. $CD8^+CD25^+$, как и $CD4^+CD25^+$ лимфоциты способны экспрессировать Foxp3 после стимуляции антителами к $CD3$ и $CD28$ *in vitro*, однако его экспрессия цитотоксическими Т-лимфоцитами

менее стабильна [18]. Возможно, физиологическая роль $CD8^+CD25^+$ лимфоцитов схожа с ролью регуляторных Т-клеток с фенотипом $CD4^+CD25^+$, однако, не исключено, что цитотоксические Т-клетки, экспрессирующие $CD25$, содержат несколько функционально различных субпопуляций.

Определение количества $CD25^+$ -позитивных Т-клеток широко используется при иммунологическом обследовании для оценки ранней активации Т-лимфоцитов. Однако данная популяция клеток весьма разнородна, поскольку, как показано выше рецептор $CD25$ может экспрессироваться и на Т-хелперах, и на цитотоксических лимфоцитах. Кроме того, субпопуляция $CD25^+$ -позитивных Т-хелперов, в свою очередь делится на регуляторные Т-клетки и эффекторные $CD25^+CD127^+$ лимфоциты. Даже при одинаковом количестве $CD3^+CD25^+$, состав этих клеток в норме и при патологии может весьма варьировать, что определяет низкую клиническую значимость определения общего пула $CD25^+$ -позитивных Т-лимфоцитов. У обследованных нами здоровых и больных детей большинство Т-клеток, экспрессировавших $CD25$, принадлежали к субпопуляции Тreg. Соответственно, интерпретировать повышение количества $CD3^+CD25^+$ как признак активации иммунной системы, не вполне правомерно, поскольку Тreg, составляющие основную долю этой субпопуляции, являются негативными регуляторами иммунного ответа.

Таким образом, у детей с хроническим вирусным гепатитом С не выявлено различий с клинически здоровыми детьми по спонтанной экспрессии $CD25$ на Т-хелперах, цитотоксических Т-клетках и в общем пуле Т-лимфоцитов периферической крови. Количество регуляторных Т-клеток также не отличалось от контрольного уровня, тогда как число активированных Т-хелперов было выше, чем у здоровых детей. После стимуляции ФГА количество Тreg, $CD25^+$ -позитивных Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток, а также общее число $CD3^+CD25^+$, у больных с ХГС было меньше, чем у здорового контроля. После изолированной стимуляции через Т-клеточный рецептор и сочетанной стимуляции через ТКР и корцепторную молекулу $CD28$ выявлено снижение числа цитотоксических Т-клеток, экспрессировавших $CD25$. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что стимуляция различными агентами в условиях *in vitro* является перспективным подходом для исследования экспрессии $CD25$ в норме и при патологии,

и может способствовать выявлению закономерностей, не проявляющихся при исследованиях клеток в цельной крови. В целом, выявленное снижение количества регуляторных Т-клеток и CD25-позитивных цитотоксических Т-клеток при стимуляции различными агентами может указывать на скрытую недостаточность супрессорных популяций у детей с ХГС. Нарушения негативной регуляции иммунного ответа против возбудителя инфекции могут приводить к утрате контроля за развитием воспалительного процесса, повреждению ткани печени и развитию печеночной недостаточности.

Работа выполнена в рамках госзадания ИИФ УрО РАН (Регистрационный номер НИОКТР № АААА-А18–118020590108–7).

Автор искренне благодарит врача Областной детской клинической больницы № 1 (г. Екатеринбург) Салохину Е. Н. за подбор пациентов для исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/ REFERENCES

1. Akhtar F., Rehman S.A. Public Health Analysis on Gaps in Disease Monitoring and Opportunities for Improved Care for the Management of Hepatitis B and C. *Cureus*. 2018, 16;10(1): e2077.
2. Chachá S. G. F., Rodrigues J. P. V., Araújo R. C., Pereira L. R. L., Villanova M. G., Souza F. F., de Carvalho Santana R., de Lourdes Candolo Martinelli A. First-wave protease inhibitors for hepatitis C genotype 1 treatment: a real-life experience in Brazilian patients. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2018, 51(2), 146–154.
3. Hall E. W., Rosenberg E. S., Sullivan P. S. Estimates of state-level chronic hepatitis C virus infection, stratified by race and sex, United States, 2010. *BMC Infectious Diseases* 2018, 18:224.
4. Fenoglio D., Dentone C., Signori A., Di Biagio A., Pardi A., Kalli F., Nasi G., Curto M., Cenderello G., De Leo P., Bartolacci V., Orofino G., Nicolini L. A., Taramasso L., Fiorillo E., Orru V., Traverso P., Bruzzone B., Ivaldi F., Mantia E., Guerra M., Negrini S., Giacomini M., Bhagani S., Filaci G. CD8⁺CD28⁻CD127^{lo}CD39⁺ regulatory T-cell expansion: A new possible pathogenic mechanism for HIV infection? *Allergy Clin. Immunol.* 2017, 28. pii: S0091–6749(17)31474–4.
5. Rios D. A., Valva P., Casciato P. C., Frias S., Caldarella M. S., Gaillard M. I., Bezrodnik L., Bandi J., Galdame O., Ameigeiras B., Krasniansky D., Brodersen C., Mullen E., De Matteo E. N., Preciado M. V. Chronic hepatitis C liver microenvironment: role of the Th17/Treg interplay related to fibrogenesis. *Scientific Reports* 2017, 16, 7(1):13283.
6. Sakaguchi S. Regulatory T Cells: History and Perspective. *Methods in Molecular Biology* 2011, 707, 3–17.
7. Ishigame H., Zenewicz L. A., Sanjabi S., Licona-Limón P., Nakayama M., Leonard W. J., Flavell R. A. Th1 responses due to the absence of TGF- β signaling cause autoimmune diabetes and dysregulated Treg cell homeostasis. *PNAS* 2013, 110, 6961–6966.
8. Fazekas de StGroth B., Zhu E., Asad S., Lee L. Flow cytometric detection of human regulatory T cells. *Methods and protocols in Molecular Biology* 2011, 707, 273–279.
9. Moorman J. P., Wang J. M., Zhang Y., Ji X. J., Ma C. J., Wu X. Y., Jia Z. S., Wang K. S., Yao Z. Q. Tim-3 Pathway Controls Regulatory and Effector T Cell Balance during Hepatitis C Virus Infection. *The Journal of Immunology* 2012, 189, 755–766.
10. Yoshizawa K., Abe H., Kubo Y., Kitahara T., Aizawa R., Matsuoka M., Aizawa Y. Expansion of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells in hepatitis C virus – related chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research* 2010, 40, 179–187.
11. Aggan H. A. E., Farahat N., Younis L., ElYamany A., Mostafaet D. The Balance Between T Helper 17 And Foxp3⁺ T Regulatory Cells In Patients With Chronic Hepatitis C: Relation To Disease Activity And Hepatic Fibrosis. *Gut* 2012, 61, http://gut.bmj.com/content/61/Suppl_2/A29.1.full.pdf+html.
12. Goncalves L., Albarran B., Salmen S., Borges L., Fields H., Montes H., Soyano A., Diaz Y., Berrueta L. The non-response to hepatitis B vaccination is associated with impaired lymphocyte activation. *Virology* 2004, 326, 20–28.
13. Селькова М. С., Селютин А. В., Сельков С. А. Особенности содержания Т-регуляторных лимфоцитов и NK-клеток у пациентов с хроническим гепатитом С. *Инфекция и иммунитет* 2012, 2, 4, 715–722. [Selkova M. S., Selutin A. V., Selkov S. A. Patterns of regulatory T-cells and NK-cells levels in patients with hepatitis C virus infection. *Infekc. Immun.* 2012, 2, 4, 715–722].
14. Pan X., Mao Y., Zhu L., Li J., Xie Y., Wang L., Zhang G.-B. Changes of regulatory T cells and FoxP3 gene expression in the aging process and its relationship with lung tumors in humans and mice. *Chin. Med. J.* 2012, 125(11), 2004–2011.
15. Coomes S. M., Pelly V. S., Wilson M. S. Plasticity within the ab⁺CD4⁺ T-cell lineage: when, how and what for? *Open Biol* 2013, 3, 120–157.
16. Cosmi L., Liotta F., Lazzeri E., Francalanci M., Angeli R., Mazzinghi B., Santarlasci V., Manetti R., Vanini V., Romagnani P., Maggi E., Romagnani S., Annunziato F. Human CD8⁺CD25⁺ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4⁺CD25⁺ regulatory thymocytes. *Blood* 2003, 102, 4107–4114.
17. Chaput N., Louafi S., Bardier A., Charlotte F., Vaillant J.-C., Menegaux F., Rosenzweig M., Lemoine F., Klatzmann D., Taieb J. Identification of CD8⁺CD25⁺ Foxp3⁺ suppressive T cells in colorectal cancer tissue. *Gut* 2009, 58, 520–529.
18. Kmiecik D. M., Gowda M., Graham L., Godder K., Bear H. D., Maricola F. M., Manjili M. H. Human T cells express CD25 and Foxp3 upon activation and exhibit effector/memory phenotypes without any regulatory/suppressor function. *Journal of Translational Medicine* 2009, 7, <http://www.translational-medicine.com/content/7/1/89>.

**SPONTANEOUS AND STIMULATED CD25 EXPRESSION
ON T-LYMPHOCYTES AND THE AMOUNT OF REGULATORY
T-CELLS IN CHILDREN WITH CHRONIC HEPATITIS C**

© 2018 I. A. Pashnina^{1,2}

¹Regional Children's Clinical Hospital № 1, Yekaterinburg, Russia,

²Institute of Immunology and Physiology, Urals Branch of the Russian Acad. Sci.,
Yekaterinburg, Russia

Received: 16.05.2018. **Accepted:** 21.06.2018

Children of 6–17 years old with viral chronic hepatitis C (n=24) and conditionally healthy controls of corresponding age (n=32) were examined. The amount of CD3⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺ и CD8⁺CD25⁺ and regulatory T-cells (Treg, CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low/neg}) were investigated by flow cytometry. In children with chronic hepatitis C the number of phytohemagglutinin-stimulated CD3⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺ and Treg was decreased, the amount of CD8⁺CD25⁺ in conditions of stimulation by antibodies to CD3 and combined stimulation by antibodies to CD3 and CD28 was too decreased.

Key words: hepatitis C, lymphocytes, flow cytometry, Treg

Author:

Pashnina I. A., ✉ PhD, chief of clinical diagnostics laboratory, Regional Children's Clinical Hospital № 1, Yekaterinburg, Russia. 620149 Yekaterinburg, Regional Children's Clinical Hospital № 1. Phone: 8(343) 272 91 39; **E-mail:** irina_pashnina@list.ru.