

# МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОЦЕНКИ ВОЗДЕЙСТВИЯ ФАКТОРОВ РИСКА

УДК 616.98: 579.835.12

DOI: 10.21668/health.risk/2017.1.03

## ВЛИЯНИЕ *HELICOBACTER PYLORI* НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК

**А.В. Матвейчев<sup>1</sup>, М.В. Талаева<sup>1</sup>, В.Ю. Талаев<sup>1</sup>, Н.В. Неумоина<sup>1</sup>, К.М. Перфилова<sup>1</sup>, Д.Г. Лапаев<sup>2</sup>, Е.В. Мохонова<sup>1</sup>, М.И. Цыганова<sup>1</sup>, В.Н. Коптелова<sup>1</sup>, З.И. Никитина<sup>1</sup>, В.А. Лапин<sup>1,3</sup>, Д.А. Мелентьев<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной, Россия, 603950, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71

<sup>2</sup> Городская клиническая больница № 7, Россия, 170036, г. Тверь, Петербургское ш., 76/1

<sup>3</sup> Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Россия, 603022, г. Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23

*Оценка риска возникновения инфекций, вызываемых грамотрицательной бактерией Helicobacter pylori, является актуальной проблемой для здравоохранения в связи с широтой распространения возбудителя, обширным спектром вызываемых патологий, включающим злокачественные новообразования желудочно-кишечного тракта. Возбудитель склонен к длительному, хроническому персистенции, несмотря на его «хрупкость» и высокую требовательность к условиям культивирования. Проблема персистенции при этом представляет особый интерес в связи с наличием данных о способности Helicobacter pylori изменять протекание иммунного ответа у инфицированных лиц в сторону благоприятных для себя супрессивных, регуляторных форм иммунных реакций как на уровне желудка, так и на уровне всего организма в целом. Цель работы состояла в оценке способности Helicobacter pylori стимулировать дифференцировку Т-регуляторных CD4+CD25+FoxP3+клеток человека – основных медиаторов регуляции иммунного ответа – в условиях прямого контакта между бактериями и Т-клетками, без участия наиболее профессиональных антигенпрезентирующих клеток. Объектами исследования являлись клинические изоляты Helicobacter pylori и образцы Т-лимфоцитов лиц, не имевших в анамнезе Helicobacter pylori-инфекции, совместно*

© Матвейчев А.В., Талаева М.В., Талаев В.Ю., Неумоина Н.В., Перфилова К.М., Лапаев Д.Г., Мохонова Е.В., Цыганова М.И., Коптелова В.Н., Никитина З.И., Лапин В.А., Мелентьев Д.А., 2017

**Матвейчев Алексей Валерьевич** – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией иммунохимии (e-mail: aleksei\_matveichev@list.ru; тел.: 8-831-469-79-56).

**Талаева Мария Владимировна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии (e-mail: micro@sinn.ru; тел.: 8 (831) 469-79-48).

**Талаев Владимир Юрьевич** – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией клеточной иммунологии (e-mail: micro@sinn.ru; тел.: 8 (831) 469-79-48).

**Неумоина Наталья Викторовна** – кандидат медицинских наук, главный врач клиники инфекционных болезней (e-mail: micro@sinn.ru; тел.: 8 (831) 433-01-68).

**Перфилова Ксения Михайловна** – кандидат медицинских наук, заместитель главного врача по экспертной работе клиники инфекционных болезней (e-mail: micro@sinn.ru; тел.: 8 (831) 433-74-66).

**Лапаев Даниил Геннадьевич** – заведующий эндоскопическим отделением (e-mail: muz\_gb7@mail.ru; тел.: 8 (482) 255-42-72).

**Мохонова Екатерина Валерьевна** – младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии (e-mail: micro@sinn.ru; тел.: 8 (831) 469-79-56).

**Цыганова Мария Игоревна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунохимии (e-mail: micro@sinn.ru; тел.: 8 (831) 469-79-56).

**Коптелова Валентина Николаевна** – старший лаборант лаборатории иммунохимии (e-mail: micro@sinn.ru; тел.: 8 (831) 469-79-56).

**Никитина Зоя Игоревна** – младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии (e-mail: micro@sinn.ru; тел.: 8 (831) 469-79-56).

**Лапин Владислав Александрович** – препаратолог лаборатории иммунохимии, студент (e-mail: micro@sinn.ru; тел.: 8 (831) 469-79-56).

**Мелентьев Дмитрий Александрович** – студент (e-mail: unn@unn.ru; тел.: 8 (831) 462-32-02).

культивируемые в условиях *in vitro*. Изменение содержания Т-регуляторных клеток оценивали цитофлюорометрически. Установлено, что при 18-часовом сокультивировании Т-лимфоцитов и *Helicobacter pylori* в соотношениях от 1: 10 до 1: 50 в культурах повышается содержание Т-регуляторных клеток в среднем в 2,12 раза. Данный эффект не требует наличия в культуре дендритных клеток и, по-видимому, затрагивает Т-лимфоциты, исходно коммитированные в своем развитии в сторону Т-регуляторных клеток. Также, по мнению авторов, влияние на дифференцировку Т-регуляторных клеток является специфическим свойством *Helicobacter pylori*.

**Ключевые слова:** *Helicobacter pylori*, лимфоциты, Т-регуляторные клетки, дифференцировка, коstimуляция, антитела, проточная цитофлюорометрия, клеточные культуры.

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) представляет собой грамотрицательную изогнутую палочку, избирательно колонизирующую слизистую желудка и двенадцатиперстной кишки (ДПК) человека. На текущий момент *H. pylori* считается этиологическим агентом острых и хронических форм гастрита, ведущим этиопатогенетическим фактором язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, карциномы и MALT-лимфомы желудка [1, 10]. Для успешной колонизации слизистой желудка и ДПК *H. pylori* должен преодолеть множественные механизмы врожденной и адаптивной иммунной системы организма хозяина, включающие острую нейтрофильную и лимфоцитарную инфильтрацию зоны поражения, продукцию специфичных к бактерии IgM и IgA [2]. Однако, несмотря на развитие иммунного ответа, *H. pylori* может успешно персистировать в желудке в течение десятилетий [8].

Одним из механизмов, благоприятствующих длительному сохранению *H. pylori* в организме хозяина, несомненно, является повышение содержания CD4+CD25+FoxP3+ Т-регуляторных клеток, наблюдаемое, как минимум, на поздних стадиях инфицирования [9]. Т-регуляторные клетки (Т-рег) представляют собой специализированную субпопуляцию CD4+ Т-лимфоцитов, способную подавлять активность других типов лимфоидных клеток и либо предотвращать, либо снижать интенсивность врожденного и адаптивного иммунного ответа. Основной физиологической ролью Т-рег является поддержание периферической толерантности [12], отсутствие или недостаточность Т-рег ведут к развитию тяжелых патологий аутоиммунного происхождения [11]. В то же время известно, что избыточное действие Т-рег может благоприятствовать как инфекционному процессу, так и прогрессии опухолей [13, 16].

Механизм, с помощью которого *H. pylori* индуцирует повышение числа Т-рег, до сих пор точно не определен, несмотря на то что показано иммунорегуляторное действие Т-рег, индуцируемых хеликобактериозом. Так, в частности, известно, что у экспериментальных животных,

пораженных *H. pylori*, легче протекают экспериментальные аутоиммунные заболевания [5, 15]. Попытка воспроизвести генерацию Т-регуляторных клеток с помощью наиболее охарактеризованной модели индукции иммунных реакций (активации Т-лимфоцитов стимулированными хеликобактером дендритными клетками) приводила к противоречивым, разнонаправленным результатам. Происходила индукция как Т-рег, так и Т-хелперов 1-го и 17-го типов – активных стимуляторов иммунного ответа [14]. Более того, если в эксперименте одновременно детектировались сдвиги иммунного ответа как в сторону ингибирующих Т-рег, так и в сторону стимулирующих Т-хелперов 1-го и 17-го типов, то как исходные, так и современные работы отмечали смешанный иммунный ответ, без значительного превалирования какой-либо из сторон [7, 8]. По нашему мнению, имеющиеся данные свидетельствуют о наличии дополнительных механизмов, управляющих дифференцировкой Т-рег. Таковыми механизмами могут быть либо условия микроокружения желудка, либо непосредственное прямое действие на лимфоциты самого возбудителя, способного входить с ними в контакт в условиях слизистой. Гипотеза прямого контактного действия при этом является наиболее легко проверяемой и имеющей ограниченное экспериментальное подтверждение [3, 4, 6].

**Целью нашей работы** стала оценка наличия и степени выраженности влияния *H. pylori* на дифференцировку Т-рег в условиях прямого контакта между бактериями и Т-клетками, а также без участия дендритных клеток – наиболее активных антигенпрезентирующих клеток иммунной системы.

**Материалы и методы.** Объектами исследования служили образцы цельной периферической крови лиц – пациентов гастроэнтерологического профиля ( $n = 6$ ), не имевших в анамнезе и по данным объективных методов исследования *H. pylori*-инфекции, а также клинические изоляты *H. pylori*, полученные в ходе диагностических ФГС. Кровь забиралась в объеме 8–9 мл, однократно, в вакуумные пробирки,

содержащие гепарин натрия (Vacuette, Германия). Пробы брались в работу не позднее чем через 2 часа после забора. Из проб крови производилось выделение мононуклеарных клеток периферической крови (МНПК) путем центрифугирования (45 мин, 1500 об./мин) на градиенте плотности «Диаколл-1077» («ДиаЭм», Россия). Полученные МНПК методом адгезии на пластике (2 часа) разделяли на адгезивную моноцитарную и неадгезивную лимфоцитарную фракции. В дальнейшей работе использовалась только фракция лимфоцитов. *H. pylori* выделяли из биопсийного материала, полученного при диагностических ФГС из антрального отдела и тела желудка от пациентов с положительным уреазным тестом. Материал механически измельчался и высевался на колумбийский агар (Becton Dickinson, США) с добавлением 10%-ной дефибринизированной донорской крови, а также антибиотиков для подавления роста сторонней микрофлоры и грибов (10 мкг/л ванкомицина, 5 мг/л триметоприма, 2 мг/л нистатина, все – Teva, Израиль). Культивирование производили в микроаэрофильных условиях, при 37 °С, в течение 7 суток. Идентификацию хеликобактера осуществляли на основании культуральных и морфологических признаков. Для оценки влияния *H. pylori* на дифференцировку лимфоцитов в сторону Т-регуляторных клеток производилось сокультивирование лимфоцитов с различными концентрациями бактерий (использовались соотношения лимфоцитов к *H. pylori* как 1:10, 1:20, 1:50) в течение 18 часов в условиях: 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °С, среда RPMI-1640 (Gibco, США) с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки и 0,3 г/л L-глутамин («Панэко», Россия). Часть лимфоцитов сокультивировалась с бактериями в присутствии дополнительных стимуляторов – моноклональных антител к молекуле CD3 (1 мкг/мл, eBioscience, США), или смеси антител к CD3 и CD28 (1 мкг/мл, eBioscience, США и 3 мкг/мл, Beckman Coulter, Франция). Негативными контролями для всех вариантов культур служили лимфоциты без добавления *H. pylori*. Дополнительным контролем являлись лимфоциты, культивируемые с *E. coli* в соотношении 1:50, как в отсутствии, так и в присутствии антител. По истечении 18 часов в культурах цитофлюориметрически оценивалось содержание Т-регуляторных лимфоцитов как клеток фенотипа CD4+CD25+FoxP3+. Для окрашивания указанных маркеров применялись антитела к CD4, меченные FITC, антитела к CD25, меченные

APC, антитела к FoxP3, меченные PE, все – производства eBioscience, США. Пермеабиллизацию мембран, необходимую для мечения FoxP3, производили набором «Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set» (eBioscience, США) согласно инструкциям производителя. Анализ осуществляли на цитофлюориметре FACS Calibur (Beckton Dickinson, США). Для статистической обработки данных использовался критерий Ньюмена–Кейлса.

**Результаты и их обсуждение.** Данные оценки влияния *H. pylori* на дифференцировку лимфоцитов в сторону Т-рег при отсутствии в культурах дендритных клеток представлены на рис. 1 и 2. Как можно видеть, добавление *H. pylori* к культуре Т-клеток приводило к достоверному повышению числа Т-регуляторных CD4+CD25+FoxP3+ клеток через 18 часов совместного культивирования (среднее содержание Т-рег в культурах без стимуляции бактериями составляло  $6,01 \pm 0,72$  % от всех CD4+клеток, при добавлении *H. pylori* в соотношении 1:10 содержание Т-рег увеличивалось до  $15,04 \pm 1,97$  %,  $p < 0,01$ ).

Содержание клеток в культурах с соотношением лимфоцитов к бактериям 1:20 и 1:50 также было достоверно выше контрольных значений нестимулированных лимфоцитов ( $12,7 \pm 1,53$  % для 1:20 и  $10,42 \pm 1,97$  % для 1:50, отличие от контроля достоверно,  $p < 0,01$ ).

В то же время, как можно видеть, в ряду соотношений наблюдалась тенденция к обратной дозовой зависимости. Соотношение 1:10 показало наибольший прирост содержания Т-рег, который понижался при увеличении числа бактерий в культурах. Однако данная тенденция осталась статистически недостоверной. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии действия *H. pylori* на отвечающие Т-лимфоциты, не зависимо от присутствия в культуре наиболее профессиональных антигенпрезентирующих клеток – дендритных, и, по нашему мнению, опосредуемых прямым контактом между бактериями и отвечающими Т-лимфоцитами. В то же время в данных условиях эксперимента не исключена роль присутствующих в культурах В-лимфоцитов, также имеющих антигенпрезентирующие свойства. Для исключения их влияния в дальнейшем будут произведены работы с деплецией В-клеток.

Для проверки значимости кокультуры нами были поставлены дополнительные варианты культур с применением не только бактерий,

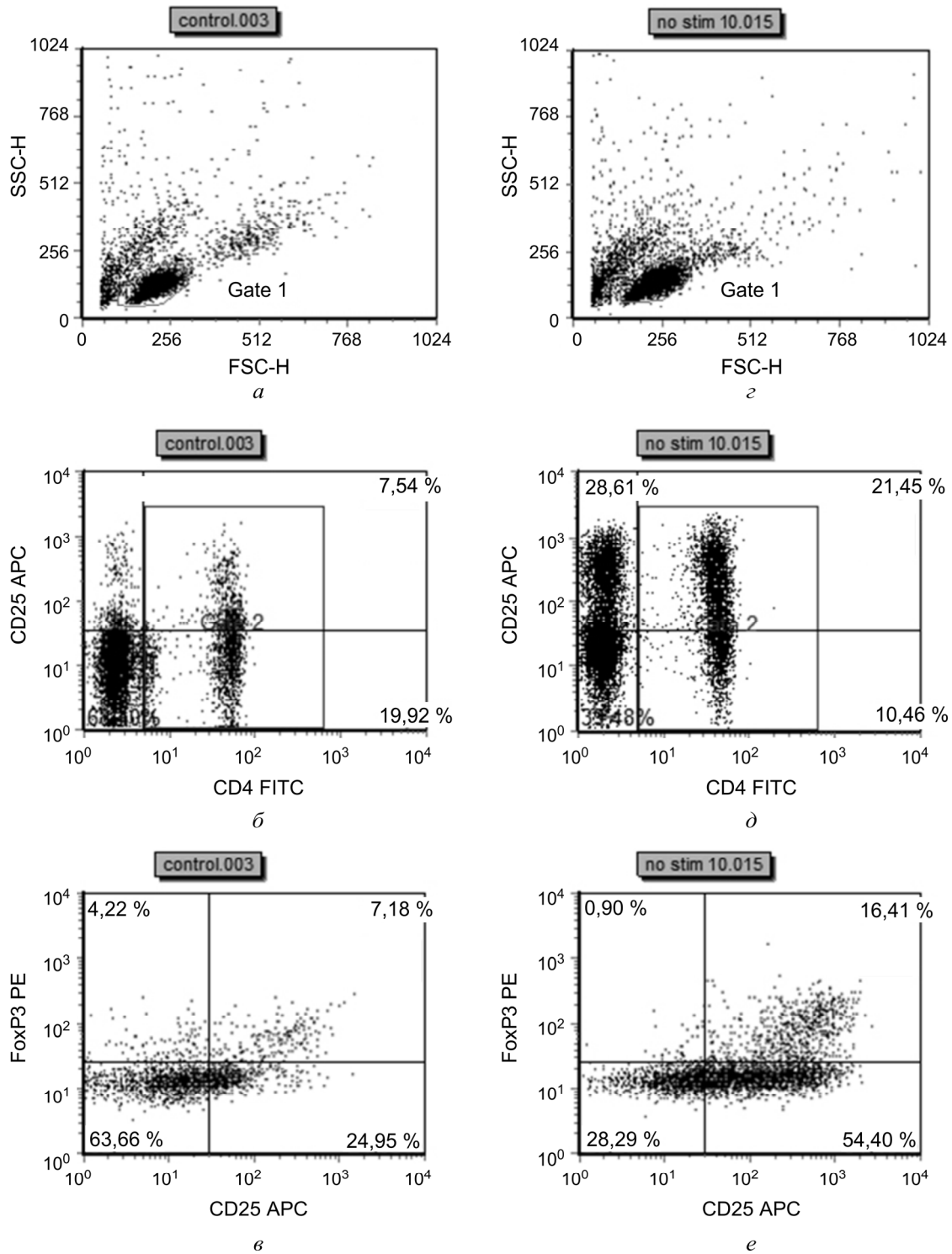


Рис. 1. *H. pylori* повышает содержание Т-регуляторных клеток при прямом сокультивировании с лимфоцитами: а – в – данные репрезентативного эксперимента, содержание Т-регуляторных клеток в контрольных культурах без *H. pylori* (а – распределение клеток по светорассеиванию, б – выделение CD4+CD25+ клеток, в – выделение FoxP3+ Т-регуляторных клеток, оцениваемая популяция находится в верхнем правом квадранте); z – e – данные репрезентативного эксперимента, содержание Т-регуляторных клеток в культурах, росших в присутствии *H. pylori* (z – распределение клеток по светорассеиванию, д – выделение CD4+CD25+ клеток, e – выделение FoxP3+ Т-регуляторных клеток, оцениваемая популяция находится в верхнем правом квадранте). Оцениваемые маркеры и регистрируемые параметры указаны по осям, процентное соотношение клеток – в углах квадрантов

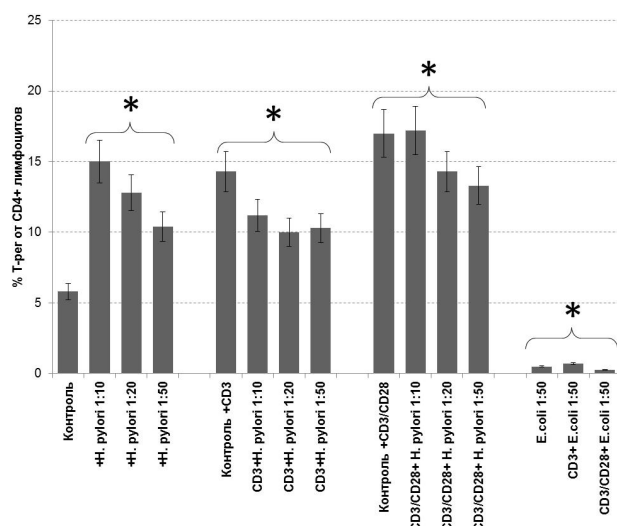


Рис. 2. Влияние *H. pylori* на дифференцировку Т-регуляторных клеток. Варианты стимуляции обозначены под диаграммой. Контроль – лимфоциты без добавления бактерий и антител; \* достоверные отличия от контрольной культуры,  $p < 0,01$

но и стимулирующих антител к CD3 и CD28, предоставляющих Т-клеткам сигнал, подобный стимуляции от АПК. Данные анализа культур с добавлением антител также приведены на рис. 2. Как можно видеть, стимуляция антителами сразу приводила к появлению в культуре достаточно высоких уровней содержания Т-рег ( $14,0 \pm 1,29$  % Т-рег для культур с добавлением только CD3 без *H. pylori*,  $16,54 \pm 2,13$  % для культур с добавлением смеси CD3 и CD28 – модель более полной стимуляции, опять же без добавления *H. pylori*). Введение в культуры *H. pylori* не приводило к увеличению содержания Т-рег (для культур с CD3 содержание Т-рег составляло  $11,25 \pm 1,06$  % для соотношения 1:10,  $10,04 \pm 1,14$  – для соотношения 1:20,  $10,28 \pm 1,54$  % – для соотношения 1:50, достоверных отличий от культуры с CD3 без *H. pylori* нет; для культур со смесью CD3 и CD28 содержание Т-рег  $16,93 \pm 3,74$  % для соотношения 1:10,  $13,95 \pm 2,13$  % – для соотношения 1:20,  $12,82 \pm 1,28$  % – для соотношения 1:50, достоверных отличий от культуры со смесью CD3+CD28 без *H. pylori* нет). Как и в случае с культурами, стимулированными только *H. pylori*, наблюдалась тенденция к обратной дозовой зависимости между дозой микроба в культуре и содержанием Т-рег.

Все значения содержания Т-рег в культурах с CD3 и CD3+CD28 достоверно отличались от содержания Т-рег в культурах лимфоцитов

без антител и *H. pylori* ( $p < 0,01$ ) и не отличались от культур, стимулированных *H. pylori* без антител. Таким образом, *H. pylori* стимулирует дифференцировку лимфоцитов в сторону Т-рег на уровне активации антителами. Отсутствие повышения числа Т-рег в культурах, стимулированных одновременно *H. pylori* и антителами, по-видимому, объясняется поликлональным характером активирующего действия антител, которые вызвали дифференцировку всех CD4+ Т-клеток, исходно имевших коммитирование к развитию в сторону Т-рег.

Для проверки специфичности действия *H. pylori* нами применялись культуры лимфоцитов, стимулированные другим микроорганизмом, обитающим в желудочно-кишечном тракте человека – *Escherichia coli* (*E.coli*).

Используемые нами культуры лимфоцитов и *E. coli* росли как в отсутствии, так и в присутствии антител к CD3 и CD28. Соотношение лимфоцитов и *E. coli* составляло 1:50. Как можно видеть из рис. 1, *E. coli* не вызывала созревания Т-рег в культурах и препятствовала стимулирующему действию антител. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что стимулирующее дифференцировку Т-рег влияние является свойством именно *H. pylori* и, по всей видимости, не опосредуется паттернами патогенов (сходными у *H. pylori* и *E.coli* – подвижных грамотрицательных микроорганизмов).

**Выводы.** Оценка способности микроорганизмов модулировать иммунный ответ, в особенности, если подобное модулирование способствует выживанию микроорганизма во внутренней среде хозяина, является актуальной фундаментальной и практической задачей. Понимание данных механизмов, несомненно, может способствовать как прогнозированию возможных рисков, обусловленных микроорганизмом, так и повышению эффективности терапевтических подходов к патологиям, обусловленным данным микроорганизмом. В представленной работе нами показана способность *H. pylori* оказывать дифференцировочное действие на Т-лимфоциты, направляющее их развитие в сторону Т-регуляторных клеток. При отсутствии в культурах дендритных клеток – популяции иммуноцитов, процесс, по современным данным, имеет наиболее выраженную способность управлять течением иммунного ответа. В пределах исследуемой группы данное действие наблюдалось при соотношениях микробов и Т-клеток от 1:10 до 1:50, не требовало присутствия в куль-

турах АПК или стимулирующих антител. В среднем рост процентного содержания Т-регуляторных CD4+CD25+FoxP3+ клеток среди CD4+лимфоцитов составлял 2,12 раза. По всей видимости, в условиях данного эксперимента воздействие *H. pylori* затрагивало клетки, исходно коммитированные к развитию в сторону Т-рег, так как поликлональная стимуляция антителами к CD28 и/или CD3 «поглощала» эффект от введения бактерий – культуры, стимулированные только антителами, а также антителами одновременно с *H. pylori*, статистически не отличались по содержанию Т-рег. Дифференцирующее действие, по всей видимости, являлось специфическим свойством именно *H. pylori*, так как стимуляция лимфоцитов с помощью другого

микроорганизма, способного длительно выживать в условиях ЖКТ – *E. coli* – не вызывала повышения содержания Т-регуляторных клеток. Таким образом, нами была принципиально продемонстрирована способность *H. pylori* оказывать влияние на дифференцировку регуляторных Т-клеток, не опосредуемая презентацией микробных антигенов дендритными клетками, но, по всей видимости, зависящая именно от прямого воздействия микроба на Т-клетки. Понимание данного механизма может позволить выделить действующее начало, индуцирующее развитие Т-рег и, таким образом, потенциально являющееся естественным толерогенным фактором, применимым в качестве лекарственного средства.

### Список литературы

1. Методы лабораторной диагностики инфекции, обусловленной *Helicobacter pylori*: пособие для врачей / А.Б. Жебрун, А.В. Сварваль, Р.С. Ферман, Л.Б. Гончарова. – СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2014. – 60 с.
2. Evidence for transepithelial dendritic cells in human *H. pylori* active gastritis / V. Necchi, R. Manca, V. Ricci, E. Solcia // *Helicobacter*. – 2009. – Vol. 14, № 3. – P. 208–222.
3. *Helicobacter pylori* induces activation of human peripheral  $\gamma\delta$ + T lymphocytes / B. Romi, E. Soldaini, L. Pancotto, F. Castellino, G. Del Giudice, F. Schiavetti // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6, № 4. – P. e19324.
4. *Helicobacter pylori* induces miR-155 in T Cells in a cAMP-Foxp3-dependent manner / L.F. Fehri, M. Koch, E. Belogolova, H. Khalil [et al.] // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5, № 3. – P. e9500.
5. *Helicobacter pylori* infection prevents allergic asthma in mouse models through the induction of regulatory T cells / I.C. Arnold, N. Dehzad, S. Reuter, H. Martin [et al.] // *Journal Clin. Invest.* – 2011. – Vol. 121, № 8. – P. 3088–3093.
6. *Helicobacter pylori* polyclonally activates murine CD4 (+) T cells in the absence of antigen-presenting cells / C. Rosenplanter, F. Sommer, P. Kleemann, A. Belkovets [et al.] // *Eur. J. Immunol.* – 2007. – Vol. 37, № 7. – P. 1905–1915.
7. Human peripheral and gastric lymphocyte responses to *Helicobacter pylori* NapA and AphC differ in infected and uninfected individuals / H.J. Windle, Y.S. Ang, V. Athie-Morales, R. McManus [et al.] // *Gut*. – 2005. – Vol. 54, № 1. – P. 25–32.
8. Involvement of Toll-like receptors on *Helicobacter pylori*-induced immunity / R. Käbisch, R. Mejías-Luque, M. Gerhard, C. Prinz // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, № 8. – P. e104804.
9. Mucosal FOXP3-expressing CD4+ CD25high regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-infected patients / A. Lundgren, E. Stromberg, A. Sjöling, C. Lindholm [et al.] // *Infect. Immun.* – 2005. – Vol. 73, № 1. – P. 523–531.
10. Pachathundikandi S.K., Müller A., Backert S. Inflammasome activation by *Helicobacter pylori* and its Implications for persistence and immunity // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2016. – Vol. 397. – P. 117–131.
11. Raghavan S., Quiding-Järbrink M. Immune modulation by regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-associated diseases // *Endocr. Metab. Immune. Disord. Drug. Targets*. – 2012. – Vol. 12, № 1. – P. 71–85.
12. Sakaguchi S., Wing K., Yamaguchi T. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg // *Eur. J. Immunol.* – 2009. – Vol. 39, № 9. – P. 2331–2336.
13. Sanchez A.M., Yang Y. The role of natural regulatory T cells in infection // *Immunol. Res.* – 2011. – Vol. 49, № 1–3. – P. 124–134.
14. Shiu J., Blanchard T.G. Dendritic cell function in the host response to *Helicobacter pylori* infection of the gastric mucosa // *Pathog. Dis.* – 2013. – Vol. 67, № 1. – P. 46–53.
15. The effect of *Helicobacter pylori* on asthma and allergy / A. Amedei, G. Codolo, G. Del Prete, M. de Bernard, M.M. D'Elis // *Journal Asthma. Allergy*. – 2010. – Vol. 3. – P. 139–147.
16. Whiteside T.L. The role of regulatory T cells in cancer immunology // *Immunotargets. Ther.* – 2015. – Vol. 4. – P. 159–171.

*Влияние Helicobacter pylori на дифференцировку Т-регуляторных клеток / А.В. Матвейчев, М.В. Талаева, В.Ю. Талаев, Н.В. Неумоина, К.М. Перфилова, Д.Г. Лапаев, Е.В. Мохорова, М.И. Цыганова, В.Н. Коптелова, З.И. Никитина, В.А. Лапин, Д.А. Мелентьев // Анализ риска здоровью. – 2017. – №1. – С. 21–28. DOI: 10.21668/health.risk/2017.1.03*

UDC 616.98: 579.835.12

DOI: 10.21668/health.risk/2017.1.03.eng

## INFLUENCE EXERTED BY HELICOBACTER PYLORI ON REGULATORY T-CELLS DIFFERENTIATION

**A.V. Matveichev<sup>1</sup>, M.V. Talaeva<sup>1</sup>, V.Yu. Talaev<sup>1</sup>, N.V. Neumoina<sup>1</sup>, K.M. Perfilova<sup>1</sup>,  
D.G. Lapaev<sup>2</sup>, E.V. Mokhonova<sup>1</sup>, M.I. Tsyganova<sup>1</sup>, V.N. Koptelova<sup>1</sup>, Z.I. Nikitina<sup>1</sup>,  
V.A. Lapin<sup>1,3</sup>, D.A. Melent'ev<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Nizhniy Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after Academician I.N. Blokhina, 71m Malaya Yamskaya Str., Nizhniy Novgorod, 603950, Russian Federation

<sup>2</sup> City clinical hospital No.7, 76/1, Peterburgskoye highway, Tver, 170036, Russian Federation

<sup>3</sup> Nizhniy Novgorod National Research State University named after N.I. Lobachevskiy, 23, Gagarina avenue, Nizhniy Novgorod, 603022, Russian Federation

*Estimating risks of infections induced by gram-negative Helicobacter pylori, is a vital problem for healthcare due to wide spread of the agent and wide range of induced pathologies which include malignant neoplasms in gastrointestinal tract. The agent is prone to long-term chronic persistence despite its "fragility" and its being greatly demanding to culturing conditions. The persistence issue is of special interest here as it is related to data on Helicobacter pylori capability to change immune response in infected people inducing suppressive regulatory immune reactions which are more favorable for the agent, both in stomach and in a whole body. Our research goal was to estimate Helicobacter pylori capability to induce differentiation of regulatory CD4+CD25+FoxP3+ human T-cells as basic mediators of immune response regulation under direct contact between bacteria and T-cells without any participation of most professional antigen-presenting cells. Our research objects were clinical isolates of Helicobacter pylori and T-lymphocytes samples taken from people who didn't have Helicobacter pylori-infection in their case history; isolates and samples were jointly cultivated in vitro. We applied cytofluorometry to estimate changes in regulatory T-cells content. We detected that if T-lymphocytes and Helicobacter pylori were jointly cultivated during 18 hours in ratios from 1:10 to 1:50, regulatory T-cells content in cultures increased 2.12 times on average. This effects doesn't require any dendritic cells in a culture and obviously affects T-lymphocytes which are originally committed to regulatory T-cells in their development. Also, in our opinion, influence exerted on regulatory T-cells differentiation is a specific feature of Helicobacter pylori.*

**Key words:** *Helicobacter pylori, lymphocytes, regulatory T-cells, differentiation, co-stimulation, antibodies, flow cytometry, cell cultures.*

© Matveichev A.V., Talaeva M.V., Talaev V.Yu., Neumoina N.V., Perfilova K.M., Lapaev D.G., Mokhonova E.V., Tsyganova M.I., Koptelova V.N., Nikitina Z.I., Lapin V.A., Melent'ev D.A., 2017

**Aleksei V. Matveichev** – Candidate of Biological Sciences, head of Immune Chemistry Laboratory (e-mail: aleksei\_matveichev@list.ru; tel.: +7 (831) 469-79-56).

**Mariya V. Talaeva** – Candidate of Biological Sciences, senior researcher at Cell Immunology Laboratory (e-mail: micro@sinn.ru; tel.: +7 (831) 469-79-48).

**Vladimir Yu. Talaev** – Doctor of Medicine, head of Cell Immunology Laboratory (e-mail: micro@sinn.ru; tel.: +7 (831) 469-79-48).

**Natal'ya V. Neumoina** – Candidate of Medical Sciences, head physician of infectious diseases clinic (e-mail: micro@sinn.ru; tel.: +7 (831) 433-01-68).

**Kseniya M. Perfilova** – Candidate of Medical Sciences, deputy to head physician of infectious diseases clinic responsible for expert work (e-mail: micro@sinn.ru; tel.: +7 (831) 433-74-66).

**Daniil G. Lapaev** – head of Endoscopy Department (e-mail: muz\_gb7@mail.ru; tel.: +7 (482) 255-42-72).

**Ekaterina V. Mokhonova** – junior researcher at Immune Chemistry Laboratory (e-mail: micro@sinn.ru; tel.: +7 (831) 469-79-56).

**Mariya I. Tsyganova** – Candidate of Biological Sciences, senior researcher at Immune Chemistry Laboratory (e-mail: micro@sinn.ru; tel.: +7 (831) 469-79-56).

**Valentina N. Koptelova** – senior tester at Immune Chemistry Laboratory (e-mail: micro@sinn.ru; tel.: +7 (831) 469-79-56).

**Zoya I. Nikitina** – junior researcher at Immune Chemistry Laboratory (e-mail: micro@sinn.ru; tel.: +7 (831) 469-79-56).

**Vladislav A. Lapin** – laboratory assistant at Immune Chemistry Laboratory, student (e-mail: micro@sinn.ru; tel.: +7 (831) 469-79-56).

**Dmitriy A. Melent'ev** – student (e-mail: unn@unn.ru; tel.: +7 (831) 462-32-02).

## References

1. Zhebrun A.B., Svarval' A.V., Ferman R.S., Goncharova L.B. Metody laboratornoi diagnostiki infektsii, obuslovennoi Helicobacter pylori: posobie dlya vrachei [Laboratory diagnostics techniques for infection induced by Helicobacter pylori: Aid for physicians]. St. Petersburg, FBUN NIIEM imeni Pastera Publ., 2014, 60 p. (in Russian).
2. Amedei A., Codolo G., Del Prete G., de Bernard M., D'Elios M.M. The effect of Helicobacter pylori on asthma and allergy. *Journal Asthma. Allergy*, 2010, vol. 3, pp. 139–147.
3. Arnold I.C., Dehzad N., Reuter S., Martin H. [et al.]. *Helicobacter pylori* infection prevents allergic asthma in mouse models through the induction of regulatory T cells. *Journal Clin. Invest*, 2011, vol. 121, no. 8, pp. 3088–3093.
4. Fehri L.F., Koch M., Belogolova E., Khalil H. [et al.]. *Helicobacter pylori* induces miR-155 in T Cells in a cAMP-Foxp3-dependent manner. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no. 3, e9500.
5. Käbisch R., Mejías-Luque R., Gerhard M., Prinz C. Involvement of Toll-like receptors on Helicobacter pylori-induced immunity. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 8, e104804.
6. Lundgren A., Stromberg E., Sjoling A., Lindholm C. [et al.]. Mucosal FOXP3-expressing CD4+ CD25high regulatory T cells in Helicobacter pylori-infected patients. *Infect. Immun*, 2005, vol. 73, no. 1, pp. 523–531.
7. Necchi V., Manca R., Ricci V., Solcia E. Evidence for transepithelial dendritic cells in human H. pylori active gastritis. *Helicobacter*, 2009, vol. 14, no. 3, pp. 208–222.
8. Pachathundikandi S.K., Müller A., Backert S. Inflammasome activation by Helicobacter pylori and its Implications for persistence and immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*, 2016, vol. 397, pp. 117–131.
9. Raghavan S., Quiding-Järbrink M. Immune modulation by regulatory T cells in Helicobacter pylori-associated diseases. *Endocr. Metab. Immune. Disord. Drug. Targets*, 2012, vol. 12, no. 1, pp. 71–85.
10. Romi B., Soldaini E., Pancotto L., Castellino F., Del Giudice G., Schiavetti F. Helicobacter pylori induces activation of human peripheral  $\gamma\delta$ + T lymphocytes. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 4, e19324.
11. Rosenplänter C., Sommer F., Kleemann P., Belkovets A. [et al.]. Helicobacter pylori polyclonally activates murine CD4 (+) T cells in the absence of antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol*, 2007, vol. 37, no. 7, pp. 1905–1915.
12. Sakaguchi S., Wing K., Yamaguchi T. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. *Eur. J. Immunol*, 2009, vol. 39, no. 9, pp. 2331–2336.
13. Sanchez A.M., Yang Y. The role of natural regulatory T cells in infection. *Immunol. Res*, 2011, vol. 49, no. 1-3, pp. 124–134.
14. Shiu J., Blanchard T.G. Dendritic cell function in the host response to Helicobacter pylori infection of the gastric mucosa. *Pathog. Dis*, 2013, vol. 67, no. 1, pp. 46–53.
15. Whiteside T.L. The role of regulatory T cells in cancer immunology. *Immunotargets. Ther*, 2015, vol. 4, pp. 159–171.
16. Windle H.J., Ang Y.S., Athie-Morales V., McManus R. [et al.]. Human peripheral and gastric lymphocyte responses to Helicobacter pylori NapA and AphC differ in infected and uninfected individuals. *Gut*, 2005, vol. 54, no. 1, pp. 25–32.

Matveichev A.V., Talaeva M.V., Talaev V.Yu., Neumoina N.V., Perfilova K.M., Lapaev D.G., Mokhonova E.V., Tsyganova M.I., Koptelova V.N., Nikitina Z.I., Lapin V.A., Melent'ev D.A. Influence exerted by helicobacter pylori on regulatory t-cells differentiation. *Health Risk Analysis*, 2017, no. 1, pp. 21–28. DOI: 10.21668/health.risk/2017.1.03.eng

Получена: 21.11.2017

Принята: 12.01.2017

Опубликована: 30.03.2017