



ВЛИЯНИЕ *HELICOBACTER PYLORI* НА СОДЕРЖАНИЕ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ Т-КЛЕТОЧНЫХ ЦИТОКИНОВ И ПРОДУЦИРУЮЩИХ ИХ СУБПОПУЛЯЦИЙ

**М.И. Цыганова¹, М.В. Талаева¹, В.Ю. Талаев¹, Н.В. Неумоина¹,
К.М. Перфилова¹, Е.В. Мохонова¹, В.А. Лапин^{1,2}, Д.А. Мелентьев^{1,2}**

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

²Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Россия, 603022, г. Нижний Новгород, проспект Гагарина, 23

Helicobacter pylori – распространенный патогенный микроорганизм, проникающий в слизистую желудка и двенадцатиперстную кишку и способствующий развитию заболеваний желудочно-кишечного тракта, в том числе и онкологического характера. Данный возбудитель склонен к длительному хроническому персистированию в организме, часто не сопровождающемуся какими-либо выраженными симптомами, что сильно затрудняет его своевременное обнаружение. Анализ риска возникновения и развития различных патологий, ассоциированных с *Helicobacter pylori*, показывает, что значительную роль в их протекании играет характер иммунного ответа, развивающегося после инфицирования. Существуют данные, что *Helicobacter pylori* способен влиять на защитные иммунные реакции, смещающая их баланс в сторону иммуносупрессивной составляющей, например, повышения содержания Т-регуляторных клеток и вырабатываемых ими цитокинов. Однако существуют также данные о том, что параллельно *Helicobacter pylori* способен вызывать ответные реакции провоспалительного характера, включающие в себя пути, ассоциированные с Т-хелперными клетками 1-го и 17-го типа. Целью настоящей работы являлось выяснение особенностей влияния данного патогена на продукцию γ-интерферона как одного из основных продуктов Т-хелперов 1-го типа и содержание Т-хелперов 17-го типа, определяемых как клетки фенотипа CD4⁺CD161⁺ и CD4⁺IL17⁺, при прямом контакте бактерий и лимфоцитов. Объектами являлись клинические изоляты *Helicobacter pylori* и образцы крови лиц, не имевших в анамнезе хеликобактерной инфекции. Выделение лимфоцитов из мононуклеарных клеток крови, полученных фракционированием в градиенте плотности, производилось методом иммуномагнитной сепарации, содержание их оценивалось цитофлюорометрически, продукция цитокинов – методом ИФА. Показано, что при 18-часовом сокульттивировании содержание CD4⁺CD161⁺- и CD4⁺IL17⁺-клеток не изменяется под влиянием *Helicobacter pylori*, тогда как продукция γ-интерферона значительно растет. Возможно, это связано с тем, что под влиянием прямого контакта с бактериями происходит активация Т-хелперов 1-го типа. Однако активации Т-хелперов 17-го типа отмечено не было. Таким образом, можно предполагать, что действие *Helicobacter pylori* на Т-хелперы в условиях прямого контакта сопровождается ответной реакцией по типу активации Т-хелперов 1-го типа.

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

© Цыганова М.И., Талаева М.В., Талаев В.Ю., Неумоина Н.В., Перфилова К.М., Мохонова Е.В., Лапин В.А., Мелентьев Д.А., 2018

Цыганова Мария Игоревна – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией иммунохимии (e-mail: lab.imchem@nniiem.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).

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

Лапин Владислав Александрович – младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии, студент (e-mail: lab.imchem@nniemi.ru; тел.: 8 (831) 469-79-56).

Мелентьев Дмитрий Александрович – младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии студент (e-mail: lab.imchem@nniemi.ru; тел.: 8 (831) 469-79-56).

Анализ факторов и уровней риска возникновения и развития заболеваний желудочно-кишечного тракта является актуальной проблемой современной медицины. Поражениям органов пищеварения подвержены все возрастные группы населения – лица трудоспособного возраста, пожилые, дети и подростки. Большие затраты, связанные с необходимостью лечения, порой дорогостоящего, и реабилитацией пациентов, обуславливают не только медицинский, но и социальный характер проблемы профилактики и противорецидивного лечения этих патологий.

Одним из распространенных патогенных микроорганизмов, ассоциированных с заболеваниями желудочно-кишечного тракта, является *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Достоверно известно, что *H. pylori* избирательно колонизирует слизистую желудка и двенадцатиперстную кишку (ДПК) человека и считается этиологическим агентом острых и хронических форм гастрита, язвенной болезни и других заболеваний желудочно-кишечного тракта [1, 2]. Отличительной особенностью *H. pylori* является склонность к длительному персистированию в организме, нередко бессимптомному, что очень затрудняет его своевременное обнаружение и эрадикацию. Одним из механизмов, с помощью которого достигается подобный эффект, является воздействие патогена на иммунную систему хозяина, в результате которого происходит активация ее иммуносупpressorной компоненты [3, 4]. Эта гипотеза подтверждается наличием в литературе данных о том, что в некоторых случаях наличие хеликобактерной инфекции способствует менее выраженному протеканию заболеваний аутоиммунного и аллергического спектра [5, 6].

Кроме того, доказано, что *H. pylori* способствует достоверному повышению содержания FoxP3-положительных Т-регуляторных клеток (T-reg) и продуцируемых ими цитокинов в опытах на модельных животных [7, 8]. Также в литературе обсуждается способность *H. pylori* влиять на иммунные клетки непосредственно в желудке, вызывая изменения как в их активности, так и в уровнях продуцируемых ими цитокинов [9–11]. Наличие способности *H. pylori* вызывать генерацию T-reg при прямом контакте между бактериями и отвечающими лимфоцитами человека *in vitro* было отмечено в нашей предыдущей работе [12]. В то же время при попытке воспроизведения эффекта как *in vivo*, так и *in vitro* происходило повышение содержания провоспалительных цитокинов, таких как интерферон гамма (INF- γ) и интерлейкин-17A (IL-17A), а также, кроме T-reg, наблюдалась индукция Т-хеллеров 1-го и 17-го типов (Th1 и Th17) [13–15].

Роль INF- γ и IL-17A в развитии патологий гастроэнтерологического характера достаточно разнообразна. Они участвуют в элиминации инфекционных агентов нейтрофилами и макрофагами. Именно бурную ответную реакцию иммунной системы считают наиболее вероятной причиной развития острых

патологий ЖКТ при инфицировании *H. pylori* [16, 17]. Однако на данный момент IL-17 и продуцирующие их Th17 рассматриваются как наиболее вероятные кандидаты на роль основных медиаторов *H. pylori*-ассоциированного аутоиммунного гастрита [18]. Данные об участии Th1 и продуцируемых ими цитокинов в развитии аутоиммунного гастрита немногочисленны, однако достаточно полно показана их роль в развитии иных аутоиммунных патологий [19, 20]. Таким образом, отмеченная при взаимодействии с *H. pylori* индукция INF- γ и IL-17A и продуцирующих их субпопуляций может иметь следствием как развитие воспалительных патологий желудка и ДПК, так и обширный спектр экстрагастродуоденальных заболеваний, что подтверждается литературными данными [21].

Вследствие этого оценка провоспалительного действия *H. pylori* и механизмов, определяющих склонность возбудителя как к регуляторному, так и провоспалительному действию представляется актуальной научно-практической задачей. Кроме того, значительный интерес представляет предварительно показанная для *H. pylori* возможность напрямую, без участия антигенпрезентирующих клеток (АПК) влиять по крайней мере на некоторые субпопуляции Т-клеток человека.

Целью работы была оценка способности *H. pylori* стимулировать образование INF- γ , IL-17A и Th17 в условиях прямого контакта между бактериями и Т-клетками, без участия АПК.

Материалы и методы. Объектами исследования служили образцы цельной периферической крови лиц, не имевших в анамнезе и по данным объективных методов исследования *H. pylori*-инфекции ($n = 8$), а также изоляты *H. pylori*, полученные в ходе диагностических ФГС у больных с хроническим гастритом ($n = 6$). Кровь забиралась в объеме 8–9 мл однократно в вакуумные пробирки, содержащие гепарин натрия (Vacutette, 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). Из полученных МНПК методом иммуномагнитной сепарации с помощью набора Human naïve CD4+ T-cell enrichment Kit (Stemcell technologies, USA) отделяли только CD4 $^{+}$ -клетки. *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 триметопrima, 2 мг/л нистатина, все – Teva, Израиль). Культивирование производили в микроаэрофильных условиях, при

37 °C, в течение 7 суток. Идентификацию *H. pylori* осуществляли на основании культуральных и морфологических признаков.

Для оценки влияния *H. pylori* на дифференцировку лимфоцитов производилось сокульттивирование лимфоцитов с различными концентрациями бактерий (последовательно использовались соотношения лимфоцитов к *H. pylori* 1:10, 1:20, 1:50) в течение 18 часов в условиях: 5 % CO₂, 37 °C, среда RPMI-1640 (Gibco, США) с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки и 0,3 г/л L-глутамина («Панэко», Россия). Часть лимфоцитов сокульттивировалась с бактериями в присутствии дополнительных стимуляторов – моноклональных антител к молекуле CD3 (1 мкг/мл, eBioscience, США), имитирующих воздействие на Т-клеточный рецептор, или смеси антител к CD3 и CD28 (1 мкг/мл, eBioscience, США, и 3 мкг/мл, Beckman Coulter, Франция), имитирующих воздействие АПК на Т-клетки. Имелись следующие культуры: лимфоциты с добавлением *H. pylori*, но без добавления стимулирующих антител; лимфоциты с добавлением антител к CD3 и без добавления бактерий; лимфоциты с добавлением антител к CD3 и с добавлением *H. pylori*; лимфоциты с добавлением антител к CD3 и CD28, и без добавления *H. pylori*; и лимфоциты с добавлением антител к CD3 и CD28 и добавлением *H. pylori*. Последний вариант добавлялся с целью оценить степень влияния, оказываемого на характер стимуляции непосредственным присутствием возбудителя. Эксперименты для всех соотношений лимфоцитов и бактерий проводились отдельно. Негативными контролями для всех вариантов культур служили лимфоциты без добавления *H. pylori* и стимулирующих антител.

По истечении 18 часов в культурах цитофлюориметрически оценивалось содержание Th17 как клеток фенотипа CD4⁺CD161⁺ и CD4⁺IL-17A⁺. Для окрашивания указанных маркеров применялись антитела к CD4, меченные FITC, антитела к CD161, меченные PE, антитела к IL-17A, меченные PE, все – производства eBioscience, США. Пермеабилизацию мембран, необходимую для мечения IL-17A, производили набором реагентов Fix/Perm Concentrate и Perm Buffer (eBioscience, США), согласно инструкциям производителя. Анализ осуществляли на цитофлюориметре FacsCalibur (Beckton Dickinson, США). Активность Th1 определялась путем измерения концентрации INF-γ в надосадках культур методом ИФА («Вектор-Бест», Россия). Для статистической обработки данных использовался критерий Ньюмена–Кейлса.

Результаты и их обсуждение. Одним из важных моментов в реализации иммунного ответа является повышение уровня INF-γ. Как активатор макрофагов этот цитокин задействован в непосредственном ответе на инфекционные атаки, кроме того, он усиливает эффекты интерферонов α и β, способствует развитию иммунного ответа по Th1-типу и

обладает способностью стимулировать активность антигенпрезентирующих клеток [22]. Как можно видеть на рис. 1, добавление *H. pylori* к суспензии выделенных лимфоцитов как без дополнительных стимуляторов, так и в совокупности с антителами к CD3 или CD3/CD28 приводило к статистически достоверному повышению продукции INF-γ.

Если в контрольной культуре продукция составила 10,0 ± 4,08 пг/мл, то при добавлении бактерий в соотношении 1:10 она возрастила до 835,0 ± 351,4 пг/мл, при соотношении 1:20 – 745,0 ± 164,1 пг/мл, при 1:50 – 135,0 ± 121,8 пг/мл. В культурах, дополнительно стимулированных антителами, продукция INF-γ была статистически не отличима от вариантов, получивших только бактериальную стимуляцию: в культуре Т-лимфоцитов с *H. pylori* и добавлением антител к CD3 концентрация INF-γ составила при соотношении 1:10 – 610,0 ± 081,3 пг/мл, при 1:20 – 637,5 ± 189,7 пг/мл и при 1:50 – 192,5 ± 21,3 пг/мл. В варианте проб Т-лимфоцитов с добавлением *H. pylori* и дополнительной стимуляцией смесью антител (CD3 и CD28) концентрация INF-γ составила: при 1:10 – 897,5 ± 300,1 пг/мл, при 1:20 – 987,5 ± 249,1 пг/мл, при 1:50 – 502,5 ± 180,01 пг/мл. Полученные данные соотносятся с описанными в литературе, согласно которым протекание *H. pylori*-ассоциированных гастритов сопровождается накоплением Th1 и повышением уровня INF-γ в слизистой желудка [13].

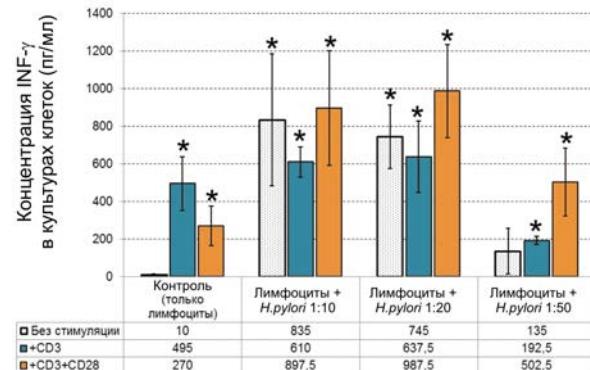


Рис. 1. Влияние *H. pylori* на продукцию INF-γ. Варианты стимуляции обозначены под диаграммой. Контроль – лимфоциты без добавления бактерий и антител, * – достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$)

Данные о влиянии *H. pylori* на дифференцировку лимфоцитов в сторону Th17 и приобретении ими фенотипа CD4⁺CD161⁺ при отсутствии в культурах дендритных клеток представлены на рис. 2 и 3.

Как можно видеть, совместное культивирование *H. pylori* и Т-клеток в течение 18 часов не приводило к повышению числа CD4⁺CD161⁺-клеток. Среднее содержание их в культурах без стимуляции бактериями составляло 20,065 ± 0,72 % от всех CD4⁺-клеток, при добавлении *H. pylori* к отвечающим лимфоцитам в соотношении 10:1 составляло 22,15 ± 1,49 %. При этом содержание этих клеток

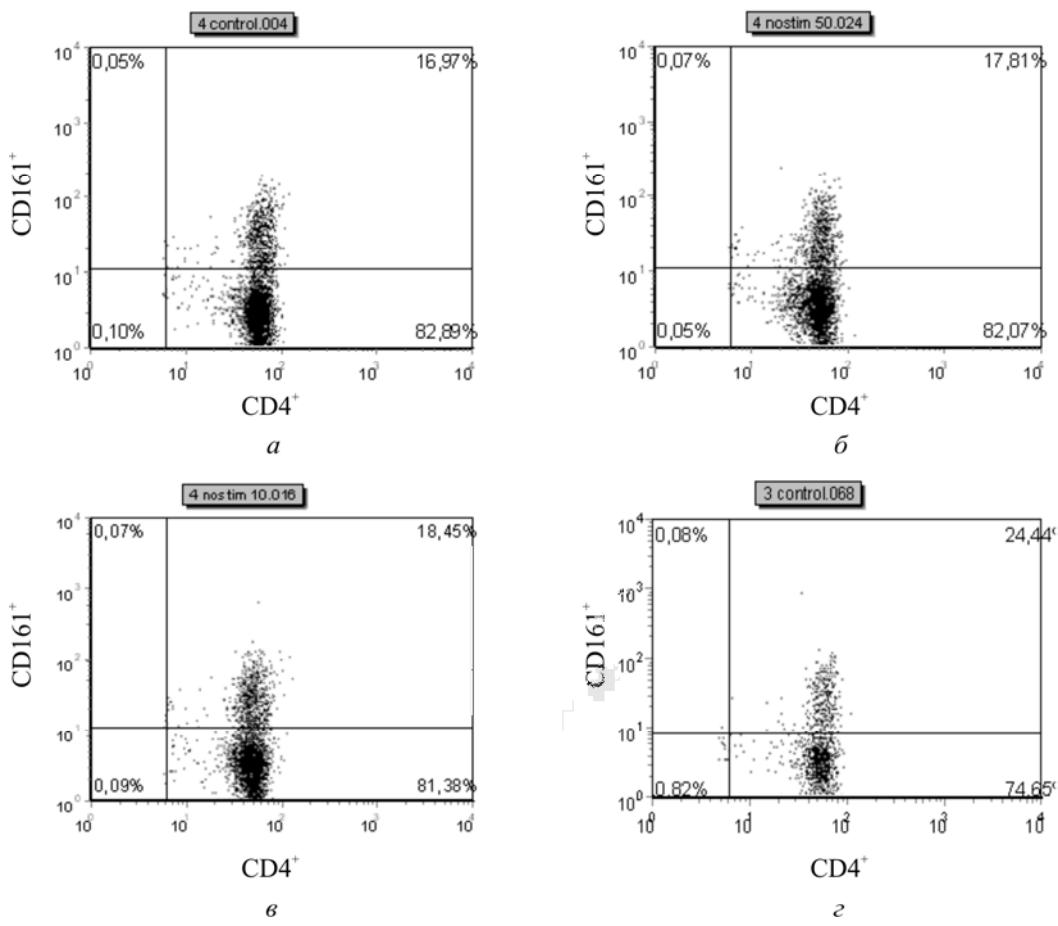


Рис. 2. Содержание $CD4^+CD161^+$ -клеток в культуре Т-лимфоцитов при прямом сокультивировании с *H. pylori* без дополнительной стимуляции, в % от общего количества $CD4^+$ клеток (данные репрезентативного эксперимента): *а* – контрольная суспензия лимфоцитов без добавления *H. pylori*, *б* – сокультивирование с *H. pylori* в соотношении 1:10, *в*, *г* – сокультивирование с *H. pylori* в соотношении 1:20 и 1:50 соответственно. Процентное содержание клеток указано в углах квадрантов

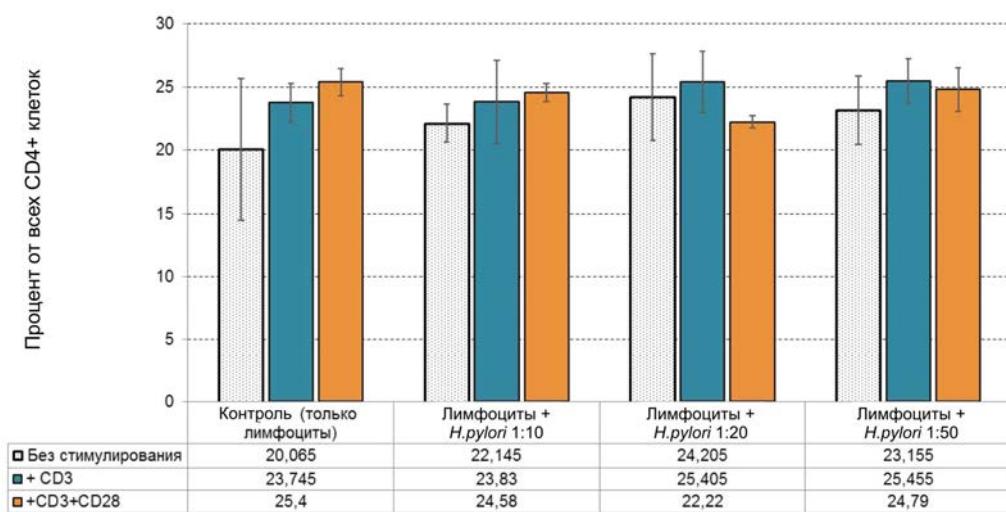


Рис. 3. Влияние *H. pylori* на содержание $CD4^+CD161^+$ -клеток. Варианты стимуляции обозначены под диаграммой. Контроль – лимфоциты без добавления бактерий и антител

**Содержание IL-17A⁺CD4⁺ клеток в условиях сокультивирования с *H. pylory*
и/или дополнительной стимуляции антителами к CD3 и CD28**

Содержание IL-17A ⁺ клеток (% от всех CD4 ⁺ клеток)	Лимфоциты без <i>H. pylori</i> (контроль)	Лимфоциты без <i>H. pylori</i> , CD3	Лимфоциты без <i>H. pylori</i> , CD3 и CD28	Лимфоциты + <i>H. pylori</i> (1:10)	Лимфоциты + <i>H. pylori</i> (1:10), CD3	Лимфоциты + <i>H. pylori</i> (1:10), CD3 и CD28
0,27 ± 0,08	0,21 ± 0,02	0,23 ± 0,033	0,43 ± 0,07	0,26 ± 0,03	0,14 ± 0,04	

в культурах с соотношением клеток 1:20 и 1:50 также было практически не отличимо от контрольных значений нестимулированных лимфоцитов (для соотношения 20:1 содержание составило 24,2 ± 3,41 %, а для соотношения 50:1 – 23,15 ± 2,73 %.).

Для проверки значимости костимуляции нами были поставлены дополнительные эксперименты с добавлением стимулирующих антител к молекулам CD3 и CD3+CD28, предоставляющих Т-клеткам сигнал, подобный стимуляции от антигенпрезентирующих клеток. В культуре Т-лимфоцитов без *H. pylori* но с добавлением антител к CD3 содержание CD4⁺CD161⁺-клеток составило 23,745 ± 7,3 %. В то же время при добавлении и *H. pylori*, и антител к CD3 содержание CD4⁺CD161⁺-клеток составило 23,83 ± 3,30 % для соотношения 1:10, 25,4 ± 2,42 % для соотношения 1:20 и 25,4 ± 1,75 % для соотношения 1:50.

Молекула CD161 при ее коэкспрессии с молекулой CD4 широко используются в мировой научной практике как маркер популяции Th17. Однако наличие мембранных фенотипических маркеров не гарантирует функциональной способности отвечающих клеток к продукции IL-17A – основной функции Th17. Также, по мнению некоторых авторов, оценка содержания Th17 по наличию внутриклеточного IL-17A или его продукции является более надежным методом, чем применение CD161. Учитывая вышеизложенное, было оценено содержание внутриклеточного IL-17A в культурах лимфоцитов, отвечающих на *H. pylori*. Для этого произвели пермеабилизацию мембран отвечающих клеток и окрашивание их моноклональными антителами к IL-17A. Было установлено, что в применяющихся условиях культивирования большинство клеток не повышают экспрессию IL-17A (таблица).

Так, ни в одном из применяемых вариантов стимуляции и соотношений отвечающих клеток и бактерий содержание IL-17A⁺-клеток не превышало 0,5 % от всех CD4⁺-клеток пробы, что не отличается от нормального содержания IL-17⁺-клеток в крови человека [23–25].

Выводы. Прямое сокультивирование выделенных Т-лимфоцитов с *H. pylori* способствует резкому повышению продукции INF- γ , что в условиях данного эксперимента может с большой вероятностью свидетельствовать об активации Th1. Однако процент содержания Th17, определяемых и как CD4⁺CD161⁺, и как CD4⁺IL17A⁺ в таких условиях сколько-нибудь значимо не изменяется. Можно предположить, что ответная реакция Т-хелперов на прямой контакт с *H. pylori* при ее провоспалительном течении проходит по Th1-типу, без существенного вовлечения Th17. Механизм же, определяющий способность *H. pylori* стимулировать активность как Th1, так и T-reg (что было показано нами ранее), требует дополнительного исследования. В целом механизмы и действующие агенты, с помощью которых может осуществляться прямое воздействие патогенов на выбор преобладающего типа иммунного ответа, по мнению авторов, представляют значительный фундаментальный и практический интерес, поскольку потенциально могут быть использованы при разработке лекарственных средств, направляющих иммунный ответ в благоприятную сторону. Также значимы они и для оценки риска развития гиперстимулированных форм иммунного ответа у пациентов, инфицированных *H. pylori*.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Inflammatory bowel diseases: review of known environmental protective and risk factors involved / K.W.J. van der Sloot, M. Amini, V. Peters, G. Dijkstra, B.Z. Alizadeh // Inflamm Bowel Dis. – 2017. – Vol. 9. – P. 1499–1509.
2. 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.
3. *Helicobacter pylori* polyclonally activates murine CD4⁺ T-cells in the absence of antigen-presenting cells / C. Rosenblünter, F. Sommer, P. Kleemann, A. Belkovets, A. Schmidt, M. Lohoff // Eur. J. Immunol. – 2007. – Vol. 37, № 7. – P. 1905–1915.
4. Microbes and viruses are bugging the gut in celiac disease. Are they friends or foes? / A. Lerner, M. Arleevskaya, A. Schmiedl, T. Matthias // Front Microbiol. – 2017. – Vol. 8. – P. 1392.
5. Chen Y., Blaser M.J. *Helicobacter pylori* colonization is inversely associated with childhood asthma // J. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 198. – P. 553–560.
6. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection is associated with lower prevalence and subsequent incidence of Crohn's disease / L.E. Bartels, P. Jepsen, L.A. Christensen, L.U. Gerdes, H. Vilstrup, J.F. Dahlerup // Journal of Crohn's and Colitis. – 2016. – Vol. 10, № 4. – P. 443–448.

7. *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, B. Becher, C. Taube, A. Mÿller // Journal Clin. Invest. – 2011. – Vol. 121, № 8. – P. 3088–3093.
8. The effect of *Helicobacter pylori* on asthma and allergy / A. Amedei, G. Codolo, G. Del Prete, M. de Bernard, M.M. D'Elios // Journal Asthma. Allergy. – 2010. – Vol. 3. – P. 139–147.
9. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T-helper cell 1 phenotype / K.B. Bamford, X. Fan, Sh.E. Crowe, J.F. Leary, W.K. Gourley, G.K. Luthra, E.G. Brooks, D.Y. Graham, V.E. Reyes, P.B. Ernst // Gastroenterology. – 1998. – Vol. 114, № 3. – P. 482–492.
10. Tarkkanen J., Kosunen T.U., Saksela E. Contact of lymphocytes with *Helicobacter pylori* augments natural killer cell activity and Induces Production of Gamma Interferon // Infection and immunity. – 1993. – Vol. 61, № 7. – P. 3012–3016.
11. Tsai H.-F., Hsu P.-N. Interplay between *Helicobacter pylori* and immune cells in immune pathogenesis of gastric inflammation and mucosal pathology // Cellular & Molecular Immunology. – 2010. – Vol. 7. – P. 255–259.
12. Влияние *Helicobacter pylori* на дифференцировку Т-регуляторных клеток / А.В. Матвеичев, М.В. Талаева, В.Ю. Талаев, Н.В. Неумоина, К.М. Перфилова, Д.Г. Лапаев, Е.В. Мохонова, М.И. Цыганова, В.Н. Коптелова, З.И. Никитина, В.А. Лапин, Д.А. Мелентьев // Анализ риска здоровью. – 2017. – № 1. – С. 21–28.
13. 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, D. Kelleher // Gut. – 2005. – Vol. 54, № 1. – P. 25–32.
14. Involvement of Toll-like receptors on *Helicobacter pylori*-induced immunity / R. Käbisch, R. MejniasLuque, M. Gerhard, C. Prinz // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 8. – P. e104804.
15. 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.
16. Interleukin-17C in human *Helicobacter pylori* gastritis / S. Tanaka, H. Nagashima, M. Cruz, T. Uchida, T. Uotani, J.A. Jiménez Abreu, V. Mahachai, R. Vilaichone, T. Ratanachu-ek, L. Tshering, D.Y. Graham, Y. Yamaoka // Infect Immun. – 2017. – Vol. 85, № 10. – P. e00389–e00417.
17. Permin H., Andersen L.P. Inflammation, immunity, and vaccines for *Helicobacter* infection // Helicobacter. – 2005. – Vol. 10, № 1. – P. 21–25.
18. Pre-differentiated Th1 and Th17 effector T cells in autoimmune gastritis: ag-specific regulatory T cells are more potent suppressors than polyclonal regulatory T cells / E.N. Huter, G.H. Stummvoll, R.J. DiPaolo D.D. Glass, E.M. Shevach // Int. Immunopharmacol. – 2009. – Vol. 9, № 5. – P. 540–545.
19. Правада Н.С., Будрицкий А.М. Комплексная терапия с применением иммунотропных препаратов при туберкулезе и система интерферона-гамма // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2015. – Т. 14, № 4. – С. 5–14.
20. Th1-Th17 ratio as a new insight in rheumatoid arthritis disease / H. Bazzazi, M. Aghaei, A. Memarian, H. Asgarian-Omrani, N. Behnampour, Y. Yasdani // Iran J. Allergy Asthma Immunol. – 2018. – Vol. 17, № 1. – P. 68–77.
21. Роль *Helicobacter Pylori* при развитии экстрагастроуденальных заболеваний / Э.А. Бардахчьян, С.Ю. Ломов, Н.Г. Харланова, Н.В. Камнева // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2005. – № 3. – С. 20–27.
22. Интерферон-γ: биологическая функция и значение для диагностики клеточного иммунного ответа / А.А. Луцкий, А.А. Жирков, Д.Ю. Лобзин, М. Рао, Л.А. Алексеева, М. Мейрер, Ю.В. Лобзин // Журнал инфектологии. – 2015. – Т. 7, № 4. – С. 10–22.
23. Percentages of CD4⁺CD161⁺ and CD4⁺CD8⁺CD161⁺ T cells in the synovial fluid are correlated with disease activity in rheumatoid arthritis / J. Miao, K. Zhang, F. Qiu, T. Li, M. Lv, N. Guo, Q. Han, P. Zhu // Mediators Inflamm. – 2015. – Vol. 2015. – P ID 563713.
24. Rheumatoid synovial fluid interleukin-17-producing CD4 T cells have abundant tumor necrosis factor-alpha co-expression, but little interleukin-22 and interleukin-23R expression / L.D. Church, A.D. Filer, E. Hidalgo, K.A. Howlett, A.M.C. Thomas, S. Rapecki, D. Scheel-Toellner, C.D. Buckley, K. Raza // Arthritis Res. Ther. – 2010. – Vol. 12, № 5. – P. R184.
25. Shen H., Goodall J.C., Hill Gaston H.J.S. Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis // Arthritis & rheumatism. – 2009. – Vol. 60, № 6. – P. 1647–1656.

Влияние *Helicobacter Pylori* на содержание провоспалительных Т-клеточных цитокинов и продуцирующих их субпопуляций / М.И. Цыганова, М.В. Талаева, В.Ю. Талаев, Н.В. Неумоина, К.М. Перфилова, Е.В. Мохонова, В.А. Лапин, Д.А. Мелентьев // Анализ риска здоровью. – 2018. – № 3. – С. 120–127. DOI: 10.21668/health.risk/2018.3.13



INFLUENCE EXERTED BY *HELICOBACTER PYLORI* ON CONCENTRATIONS OF ANTI-INFLAMMATORY T-CELL CYTOKINES AND SUBPOPULATIONS THAT PRODUCE THEM

**M.I. Tsyganova¹, M.V. Talaeva¹, V.Yu. Talaev¹, N.V. Neumoina¹, K.M. Perfilova¹,
E.V. Mokhonova¹, V.A. Lapin^{1,2}, D.A. Melent'ev^{1,2}**

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

²Nizhniy Novgorod National Research State University named after N.I. Lobachevskiy, 23 Gagarina avenue, Nizhniy Novgorod, 603022, Russian Federation

Helicobacter pylori is a widely spread pathogenic microorganism. It penetrates the mucous tunic of the stomach and the duodenum and causes diseases in the gastrointestinal tract, including oncologic ones. This agent is able to be chronically persistent in a body and frequently there are no apparent symptoms of it; therefore, it is difficult to detect this pathogen in due time. Risk analysis related to occurrence and development of various pathologies associated with *Helicobacter pylori*, revealed that their clinical course was to a great extent determined by an immune response that emerged after infection. There are data that *Helicobacter pylori* is able to influence protective immune reactions making their balance to move to an increase in immune-suppressive components, for example, increased concentrations of T-regulatory cells and cytokines produced by them. However, some data can be found on *Helicobacter pylori* ability to induce anti-inflammatory responses which include those associated with T-helpers of the 1st and 17th types. Our research goal was to reveal peculiarities of effects produced by this pathogen on γ -interferon as one of basic products by 1st type T-helpers and on contents of the 17th type T-helpers determined as cells belonging to $CD4^+CD161^+$ and $CD4^+IL17^+$ phenotypes under direct contacts between bacteria and lymphocytes. Our research objects were clinical isolates of *Helicobacter pylori* and blood samples taken from people without helicobacter infection in their case history. We extracted lymphocytes with immunomagnetic separation out of mononuclear blood cells obtained via functioning in density gradient. Their concentrations were assessed with cytofluorometry; cytokines products, with enzyme-linked immunosorbent assay. We showed that $CD4^+CD161^+$ and $CD4^+IL17^+$ cells content didn't change when they were cultivated together for 18 hours under influence exerted by *Helicobacter pylori*, while products of γ -interferon increased considerably. It can probably be related to activation of the 1st type T-helpers under effects produced by direct contact with bacteria. However, we didn't detect any activation of the 17th type T-helpers. Therefore, we can assume that effects produced by *Helicobacter pylori* on T-helpers under direct contact cause a response in a form of the 1st type T-helpers activation.

Key words: *Helicobacter pylori*, lymphocytes, T-helpers, differentiation, co-stimulation, антитела, flow cytofluorometry, cell cultures.

© Tsyganova M.I., Talaeva M.V., Talaev V.Yu., Neumoina N.V., Perfilova K.M., Mokhonova E.V., Lapin V.A., Melent'ev D.A., 2018

Mariya I. Tsyganova – Candidate of Biological Sciences, Head of Immune Chemistry Laboratory (e-mail: lab.imchem@nniemi.ru; tel.: +7 (831) 469-79-56).

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

Vladimir Yu. Talaev – Doctor of Medical Sciences, Head of Cellular Immunology Laboratory (e-mail: micro@sinn.ru; tel.: +7 (831) 469-79-48).

Natal'ya V. Neumoina – Candidate of Medical Sciences, Chief Physician at Infectious Diseases Clinic (e-mail: micro@sinn.ru; tel.: +7 (831) 433-01-68).

Kseniya M. Perfilova – Candidate of Medical Sciences, Deputy to Chief Physician responsible for expert research at Infectious Diseases Clinic (e-mail: micro@sinn.ru; tel.: +7 (831) 433-74-66).

Ekaterina V. Mokhonova – Junior researcher at Immune Chemistry Laboratory (e-mail: lab.imchem@nniemi.ru; tel.: +7 (831) 469-79-56).

Vladislav A. Lapin – Junior researcher at Immune Chemistry Laboratory, student (e-mail: lab.imchem@nniemi.ru; tel.: +7 (831) 469-79-56).

Dmitriy A. Melent'ev – Junior researcher at Immune Chemistry Laboratory, student (e-mail: lab.imchem@nniemi.ru; tel.: +7 (831) 469-79-56).

References

1. Van der Sloot K.W.J., Amini M., Peters V., Dijkstra G., Alizadeh B.Z. Inflammatory bowel diseases: review of known environmental protective and risk factors involved. *Inflamm Bowel Dis.*, 2017, vol. 9, pp. 1499–1509.
2. 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.
3. Rosenblüter C., Sommer F., Kleemann P., Belkovets A., Schmidt A., Lohoff M. *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.
4. Lerner A., Arleevskaya M., Schmiedl A., Matthias T. Microbes and viruses are bugging the gut in celiac disease. Are they friends or foes? *Front Microbiol.*, 2017, vol. 8, pp. 1392.
5. Chen Y., Blaser M.J. *Helicobacter pylori* colonization is inversely associated with childhood asthma. *J. Infect. Dis.*, 2008, vol. 198, pp. 553–560.
6. Bartels L.E., Jepsen P., Christensen L.A., Gerdes L.U., Vilstrup H., Dahlerup J.F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection is associated with lower prevalence and subsequent incidence of Crohn's disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2016, vol. 10, no. 4, pp. 443–448.
7. Arnold I.C., Dehzad N., Reuter S., Martin H., Becher B., Taube C., Müller A. *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.
8. 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.
9. Bamford K.B., Fan X., Crowe Sh.E., Leary J.F., Gourley W.K., Luthra G.K., Brooks E.G., Graham D.Y., Reyes V.E., Ernst P.B. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T-helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology*, 1998, vol. 114, no. 3, pp. 482–492.
10. Tarkkanen J., Kosunen T.U., Saksela E. Contact of lymphocytes with *Helicobacter pylori* augments natural killer cell activity and Induces Production of Gamma Interferon. *Infection and immunity*, 1993, vol. 61, no. 7, pp. 3012–3016.
11. Tsai H.-F., Hsu P.-N. Interplay between *Helicobacter pylori* and immune cells in immune pathogenesis of gastric inflammation and mucosal pathology. *Cellular & Molecular Immunology*, 2010, vol. 7, pp. 255–259.
12. 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
13. Windle H.J., Ang Y.S., Athie-Morales V., McManus R., Kelleher D. 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.
14. Käbisch R., MejíasLuque R., Gerhard M., Prinz C. Involvement of Toll-like receptors on *Helicobacter pylori*-induced immunity. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 8, pp. e104804.
15. 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.
16. Tanaka S., Nagashima H., Cruz M., Uchida T., Uotani T., Jiménez Abreu J.A., Mahachai V., Vilaichone R., Ratanachu-ek T., Tshering L., Graham D.Y., Yamaoka Y. Interleukin-17C in human *Helicobacter pylori* gastritis. *Infect Immun.*, 2017, vol. 85, no. 10, pp. e00389–e00417.
17. Permin H., Andersen L.P. Inflammation, immunity, and vaccines for *Helicobacter* infection. *Helicobacter*, 2005, vol. 10, no. 1, pp. 21–25.
18. Huter E.N., Stummvoll G.H., DiPaolo R.J., Glass. D.D., Shevach E.M. Pre-differentiated Th1 and Th17 effector T cells in autoimmune gastritis: ag-specific regulatory T cells are more potent suppressors than polyclonal regulatory T cells. *Int. Immunopharmacol.*, 2009, vol. 9, no 5, pp. 540–545.
19. Pravada N.S., Budritskii A.M. Kompleksnaya terapiya s primeneniem immunotropnykh preparatov pri tuberkuleze i sistema interferona-gamma [Complex therapy with the use of immune preparations in tuberculosis and interferon-gamma system]. *Vestnik Vitebskogo gosu-darstvennogo meditsinskogo universiteta*, 2015, vol. 14, no. 4, pp. 5–14 (in Russian).
20. Bazzazi H., Aghaei M., Memarian A., Asgarian-Omrani H., Behnampour N., Yasdani Y. Th1-Th17 ratio as a new insight in rheumatoid arthritis disease. *Iran J. Allergy Asthma Immunol.*, 2018, vol. 17, no. 1, pp. 68–77.
21. Bar-dakhchyan E.A., Lomov S.Yu., Kharlanova N.G., Kamneva N.V. Rol' *Helicobacter pylori* pri razvitiu ekstragastroduodenal'nykh zabolеваний [Role of *helicobacter pylori* in different gastroduodenal diseases]. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*, 2005, no. 3, pp. 20–27 (in Russian).
22. Lutskii A.A., Zhirkov A.A., Lobzin D.Yu., Rao M., Alekseeva L.A., Meirer M., Lobzin Yu.V. Interferon-γ: biologicheskaya funktsiya i znachenie dlya diagnostiki kletochnogo immunno-go otveta [Interferon-γ: biological function and application for study of cellular immune response]. *Zhurnal infektologii*, 2015, vol. 7, no. 4, pp. 10–22 (in Russian).
23. Miao J., Zhang K., Qiu F., Li T., Lv M., Guo N., Han Q., Zhu P. Percentages of CD4⁺CD161⁺ and CD4⁻CD8⁺CD161⁺ T cells in the synovial fluid are correlated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm.*, 2015, vol. 2015, P ID 563713.
24. Church L.D., Filer A.D., E Hidalgo., Howlett K.A., Thomas A.M.C., Rapecki S., Scheel-Toellner D., Buckley C.D., Raza K. Rheumatoid synovial fluid interleukin-17-producing CD4 T cells have abundant tumor necrosis factor-alpha co-expression, but little interleukin-22 and interleukin-23R expression. *Arthritis Res. Ther.*, 2010, vol. 12, no. 5, pp. R184.
25. Shen H., Goodall J.C., Hill Gaston H.J.S. Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism.*, 2009, vol. 60, no. 6, pp. 1647–1656.

M.I. Tsyganova, M.V. Talaeva, V.Yu. Talaev, N.V. Neumoina, K.M. Perfilova, E.V. Mokhonova, V.A. Lapin, D.A. Melent'ev. Influence exerted by helicobacter pylori on concentrations of anti-inflammatory m-cell cytokines and subpopulations that produce them. Health Risk Analysis, 2018, no. 3, pp. 120–127. DOI: 10.21668/health.risk/2018.3.13.eng

Получена: 20.06.2018

Принята: 20.09.2018

Опубликована: 30.09.2018