

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ CCR6⁺ Т-ХЕЛПЕРОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНЬЮ, АССОЦИИРОВАННОЙ С *H. pylori*-ИНФЕКЦИЕЙ

DOI: 10.17691/stm2020.12.3.04

УДК 62.01:612.112.94:577.27:616–002.44

Поступила 21.02.2020 г.



В.Ю. Талаев, д.м.н., профессор, зав. лабораторией клеточной иммунологии;
М.В. Светлова, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии;
И.Е. Заиченко, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии;
Е.В. Воронина, к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии;
О.Н. Бабайкина, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии;
Н.В. Неумоина, к.м.н., главный врач клиники инфекционных болезней;
К.М. Перфилова, к.м.н., зам. главного врача клиники инфекционных болезней;
О.В. Уткин, к.б.н., зав. лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии;
Е.Н. Филатова, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии

Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора,
 ул. М. Ямская, 71, Н. Новгород, 603950

Ранее мы обнаружили, что при *H. pylori*-ассоциированной язвенной болезни в крови увеличивается содержание CCR6⁺ Т-хелперов с фенотипом эффекторов/эффекторных Т-клеток памяти. Зрелый фенотип и экспрессия хемокинового рецептора CCR6, участвующего в миграции лимфоцитов в воспаленную слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта, наводят на мысль о вовлечении этих клеток в иммунный ответ при исследуемом заболевании. Для оценки патогенетической роли данных клеток требуется исследование их функциональных свойств: в частности, продукции провоспалительных цитокинов, вовлеченных в патогенез заболевания.

Цель исследования — оценить изменения содержания в крови провоспалительных типов зрелых CCR6⁺ Т-хелперов при *H. pylori*-ассоциированной язвенной болезни.

Материалы и методы. CCR6⁺ Т-хелперы выделяли с помощью модифицированного для выполнения данного исследования метода иммуномагнитной сепарации. Количество Т-хелперов 1-го и 17-го типов (Tx1 и Tx17) и клеток со смешанными свойствами Tx1 и Tx17 (Tx1/Tx17) определяли с помощью метода оценки внутриклеточных цитокинов.

Результаты. Исходно мы планировали активировать неразделенные мононуклеарные клетки периферической крови *ex vivo* и оценить содержание продуцентов цитокинов в группе зрелых CCR6⁺ Т-хелперов, выделенных в гейт при анализе результатов проточной цитометрии. Однако существенные изменения фенотипа Т-хелперов не позволили надежно идентифицировать исследуемую группу клеток после активации. В дальнейшем мы использовали двухэтапную иммуномагнитную сепарацию, с помощью которой из крови выделяли функционально активные зрелые CCR6⁺ Т-хелперы с чистотой более 90%. Выход этих клеток из крови пациентов с *H. pylori*-ассоциированной язвенной болезнью в 9 раз превышал выход из крови здоровых доноров. Активация очищенных CCR6⁺ Т-хелперов выявила повышенное содержание Tx1, Tx17 и Tx1/Tx17 в этой группе клеток при язвенной болезни. Из 1 мл крови больных выделялось в 18,1 раза больше CCR6⁺ Tx1, в 19,4 раза больше CCR6⁺ Tx17 и в 21,1 раза больше CCR6⁺ Tx1/Tx17 по сравнению с кровью здоровых доноров.

Заключение. Содержание зрелых CCR6⁺ Т-хелперов с провоспалительной активностью значительно возрастает в крови пациентов с *H. pylori*-ассоциированной язвенной болезнью.

Ключевые слова: Т-лимфоциты хелперы; CCR6; иммуномагнитная сепарация; рецепторы хемокинов; цитокины; язвенная болезнь.

Как цитировать: Talayev V.Yu., Svetlova M.V., Zaichenko I.E., Voronina E.V., Babaykina O.N., Neumoina N.V., Perfilova K.M., Utkin O.V., Filatova E.N. Cytokine profile of CCR6⁺ T-helpers isolated from the blood of patients with peptic ulcer associated with *Helicobacter pylori* infection. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2020; 12(3): 33–40, <https://doi.org/10.17691/stm2020.12.3.04>

Для контактов: Талаев Владимир Юрьевич, e-mail: talaev@inbox.ru

Cytokine Profile of CCR6⁺ T-Helpers Isolated from the Blood of Patients with Peptic Ulcer Associated with *Helicobacter pylori* Infection

V.Yu. Talayev, MD, PhD, Professor, Head of the Laboratory of Cellular Immunology;
 M.V. Svetlova, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunology;
 I.E. Zaichenko, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Cellular Immunology;
 E.V. Voronina, PhD, Researcher, Laboratory of Cellular Immunology;
 O.N. Babaykina, MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunology;
 N.V. Neumoina, MD, PhD, Chief Physician, Clinic of Infectious Diseases;
 K.M. Perfilova, MD, PhD, Deputy Chief Physician, Clinic of Infectious Diseases;
 O.V. Utkin, PhD, Head of the Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology;
 E.N. Filatova, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology

Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor (Russian Federal Consumer Rights Protection and Human Health Control Service), 71 Malaya Yamskaya St., Nizhny Novgorod, 603950, Russia

We previously found that the number of CCR6⁺ T-helpers with the phenotype of effector/effector memory T cells increases in the blood of patients with *H. pylori*-associated peptic ulcer. The mature phenotype and the expression of the chemokine receptor CCR6, which is involved in migration of lymphocytes to the inflamed mucous membrane of the gastrointestinal tract, suggests that these cells are involved in the immune response observed in this clinical condition. To better understand the pathogenetic role of these cells, it is necessary to study their functional activity, specifically, the production of pro-inflammatory cytokines involved in the pathogenesis of the disease.

The aim of the study was to evaluate changes in the blood level of pro-inflammatory types of mature CCR6⁺ T-helpers in *H. pylori*-associated peptic ulcer disease.

Materials and Methods. CCR6⁺ T-helpers were isolated from the blood by using immuno-magnetic separation adapted to this study. The number of T-helpers of types 1 and 17 (Th1 and Th17) and cells with mixed properties of Th1 and Th17 (Th1/Th17) was determined by intracellular cytokine assay.

Results. Initially, we planned to activate unseparated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) *ex vivo* and evaluate the number of cytokine producers among mature CCR6⁺ T-helper cells by gating them during the flow cytometry. However, dramatic changes in the phenotype of T-helpers upon activation did not allow us to reliably identify the cells of interest. Subsequently, we used a two-stage immunomagnetic separation procedure to obtain functionally active mature CCR6⁺ T-helpers with a purity of >90%. The quantitative yield of these cells from the blood of patients with gastric and duodenal peptic ulcer associated with *H. pylori* was 9 times higher than that from the blood of healthy donors. Activation of CCR6⁺ T-helpers purified from blood of ulcer patients revealed an increased content of Th1, Th17, and Th1/Th17. One ml of the patient's blood yielded 18.1 times more CCR6⁺ Th1, 19.4 times more CCR6⁺ Th17, and 21.1 times more CCR6⁺ Th1/Th17 compared with the blood of healthy subjects.

Conclusion. The content of mature CCR6⁺ T-helper cells with pro-inflammatory activity significantly increases in the blood of patients with peptic ulcer associated with *H. pylori* infection.

Key words: T-helper lymphocytes; CCR6; immuno-magnetic separation; chemokine receptors; cytokines; gastric and duodenal peptic ulcer.

Введение

В данной работе исследовали CCR6⁺ Т-хелперы, содержание которых в крови увеличивается при язвенной болезни, ассоциированной с *H. pylori*-инфекцией [1]. *H. pylori* способен длительно персистировать в желудке и на участках желудочной метаплазии в двенадцатиперстной кишке человека, вызывая различные формы инфекции — от бессимптомного инфицирования до гастрита типа В и язвенной болезни, а также провоцируя развитие аденокарциномы желудка и MALT-лимфомы [2–4]. Иммунный ответ на инфицирование *H. pylori* развивается быстро [5, 6], однако этой реакции оказывается недостаточно для эффективной борьбы с микроорганизмом, заселяющим

весьма специфические ниши [7, 8], малодоступные для эффекторов иммунитета. В частности, слабость трансэпителиального транспорта IgA в желудке [9] не позволяет создать концентрацию секреторного IgA, достаточную для устранения *H. pylori* из защитного слоя слизи желудка и с поверхности эпителия [10–12]. Клеточный иммунный ответ на *H. pylori* также обладает ограниченным защитным эффектом. Более того, эксперименты на животных позволяют предположить, что клеточный иммунный ответ, а именно активность провоспалительных Т-хелперов, вносит важный вклад в развитие симптомов гастрита [12], наряду с прямым действием токсинов *H. pylori*. Так, при отсутствии полноценно функционирующих Т-хелперов *H. pylori* вызывает массивную, но бессимптомную инфекцию

у мышей, тогда как восстановление иммунитета этих мышей за счет введения им нормальных Т-хелперов ведет к уменьшению бактериальной нагрузки и одновременно к развитию выраженного воспалительного поражения слизистой оболочки желудка [13, 14]. Основными цитокинами, индуцирующими воспаление в моделях *H. pylori*-ассоциированного гастрита, являются ключевой цитокин Тх1 интерферон- γ (IFN- γ) и цитокин Тх17 интерлейкин-17А (IL-17А) [13], причем созревание Тх17 и продукция ими IL-17А служит обязательным условием роста продукции IFN- γ [15, 16]. Вклад иммунных механизмов в формирование язвенной болезни исследован недостаточно.

Ранее [1] мы обнаружили, что при *H. pylori*-ассоциированной язвенной болезни в крови в 2 раза повышается содержание зрелых Т-хелперов, экспрессирующих хемокиновый рецептор CCR6, тогда как при гастродуодените количество этих клеток увеличивается незначительно. CCR6 направляет миграцию Т-лимфоцитов из кровотока в кожу, пейеровы бляшки, а также в воспаленную слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта [17, 18]. Экспрессия CCR6 характерна для Тх17, хотя количество CCR6⁺ Т-хелперов значительно превышает количество зрелых Тх17 [19]. По нашему мнению, рост содержания зрелых CCR6⁺ Т-хелперов происходит за счет клеток, вовлеченных в иммунный ответ на *H. pylori*-инфекцию. Покинув после созревания вторичные лимфоидные органы и оказавшись в кровотоке, эти клетки могут направленно мигрировать в воспаленную слизистую оболочку, где будут продуцировать цитокины в соответствии с типом цитокинопродукции, приобретенным в ходе созревания. Для оценки возможной патогенетической роли CCR6⁺ Т-хелперов следует определить содержание среди этих клеток зрелых Тх1, Тх17, а также клеток со смешанными свойствами Тх1 и Тх17 в норме и при изучаемой патологии.

Цель исследования — оценить изменения содержания в крови провоспалительных типов зрелых CCR6⁺ Т-хелперов при *H. pylori*-ассоциированной язвенной болезни.

Материалы и методы

Исследование проведено в соответствии с положениями Хельсинкской декларации (2013) и одобрено локальным этическим комитетом Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора. Все пациенты и доноры дали информированное согласие на участие в исследовании. Обследовали взрослых больных (n=7) с язвенной болезнью желудка или двенадцатиперстной кишки, ассоциированной с *H. pylori*-инфекцией, при поступлении в стационар в связи с обострением основного заболевания. Наличие *H. pylori* подтверждали с помощью быстрого уреазного теста и обнаружения ДНК *H. pylori* с использованием полимеразой цепной реакции [20]. Взрослые практически

здоровые доноры были привлечены для отработки методов (n=4) и формирования группы сравнения (n=15).

Активация неразделенных мононуклеарных клеток периферической крови. Мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК) выделяли из гепаринизированной венозной крови традиционным способом с помощью центрифугирования над слоем Hystopaque-1077 (Sigma, США). Затем их засеивали в 24-луночные планшеты (Costar, США) по $2 \cdot 10^6$ клеток на лунку в 1 мл среды RPMI-1640 (Gibco, Великобритания) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки — ЭТС (PAA Laboratories, Австрия) и активаторами: 25 нг/мл форбол-12-миристан-13-ацетата — ФМА (Serva, Германия) и 1 мкг/мл иономицина (Sigma). Клетки культивировали 4 или 22 ч при +37°C и 5% CO₂, причем в обоих случаях — с добавлением 5 мкг/мл брифелдина А (BioLegend, США) на последние 4 ч культивирования. Затем клетки окрашивали флуоресцентными конъюгатами антител к молекулам CD4 («Сорбент», Россия), CD45RO, CCR6 (BioLegend) и CCR7 (eBioscience, США), фиксировали 4% параформальдегидом, пермеабелизировали мембраны 0,1% сапонином и окрашивали цитокины конъюгатами антител к IFN- γ и IL-17А (eBioscience), как это описано ранее [21]. Пробы анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD Biosciences, США), оценивая количество продуцентов IFN- γ и IL-17А в CD4⁺, CD4⁺CD45RO⁺ и CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺CCR7⁻ клетках.

Иммуномагнитная сепарация CCR6⁺ Т-хелперов. На первом этапе сепарации из МНПК выделяли CD4⁺ Т-хелперы путем негативной селекции, используя набор EasySep Human CD4⁺ T Cell Isolation Kit (STEMCELL Technologies, Канада) согласно инструкции производителя. На втором этапе из состава Т-хелперов выделяли клетки CCR6⁺ позитивной селекцией, используя отдельные реагенты STEMCELL Technologies. Для этого Т-хелперы, выделенные из 18 мл крови, помещали в круглодонную полистироловую пробирку диаметром 12 мм и высотой 75 мм, однократно отмывали и ресуспендировали в 350 мкл среды для магнитных бус следующего состава: забуференный фосфатами физиологический раствор с 2% ЭТС и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты. Затем в пробирку добавляли 9 мкл реагента EasySep Human CCR6⁺ Positive Selection Cocktail II (STEMCELL Technologies), связывающего CCR6 с поверхностью бус. После 5 мин инкубации при комнатной температуре и плавном перемешивании добавляли 70 мкл суспензии магнитных бус EasySep Releaseable RapidSpheres 50201 и инкубировали еще 5 мин. Доводили объем средой для бус до 2,5 мл, перемешивали и помещали в магнит EasySep. Через 5 мин сливали жидкость из пробирки, не вынимая ее из магнита. Затем пробирку извлекали из магнита, оставшиеся на стенках бусы с клетками ресуспендировали в 2,5 мл среды для бус. Пробирку вновь помещали

в магнит и через 5 мин сливали жидкость, не вынимая пробирку из магнита. Затем ее доставали, добавляли 175 мкл среды для бус, обмывая стенки, добавляли 35 мкл буфера для снятия бус (EasySep Release Buffer) и инкубировали 5 мин. Далее пробирку ставили в магнит и через 5 мин сливали в стерильную пробирку жидкость, содержащую CCR6⁺ Т-хелперы. Чистоту конечного продукта сепарации и проб, отобранных на этапах очистки, определяли с помощью проточной цитометрии клеток, окрашенных конъюгатами антител к CD4, CD45RO и CCR6.

Активация очищенных Т-хелперов. Очищенные клетки отмывали и засевали в лунки круглодонных 96-луночных планшетов (Costar) по $2,5 \cdot 10^4$ клеток в 100 мкл среды RPMI-1640 с 10% ЭТС. Клетки культивировали от 22 до 118 ч при +37°C и 5% CO₂. Активацию проводили, добавляя 25 нг/мл ФМА и 1 мкг/мл иономицина на последние 4 или 22 ч культивирования. Брифелдин А (5 мкг/мл) добавляли на последние 4 ч культивирования. После культивирования клетки собирали, окрашивали внутриклеточные цитокины, как это описано выше, и анализировали на цитофлуориметре.

Статистическая обработка данных. Результаты цитометрии обрабатывали программой Diva (BD Biosciences). Статистический анализ проводили с использованием t-теста Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Исходно мы планировали активировать неразделенные МНПК, а затем оценить содержание продуцентов IFN-γ и IL-17A в исследуемой группе CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺CCR7⁻ Т-хелперов, выделенных в гейт при анализе результатов цитометрии. Однако мы были вынуждены отказаться от этого подхода в связи с существенным изменением фенотипа клеток при активации. Так, при 4-часовой активации МНПК наблюдалось снижение экспрессии CD4 и CD45RO и заметный рост экспрессии CCR6 (рис. 1, а). При 22-часовой активации экспрессия CCR6 увеличивалась многократно, в результате чего эту молекулу несли практически все Т-хелперы. Эти сильные изменения фенотипа не позволили выделить объект нашего исследования, а именно содержащуюся в исходных

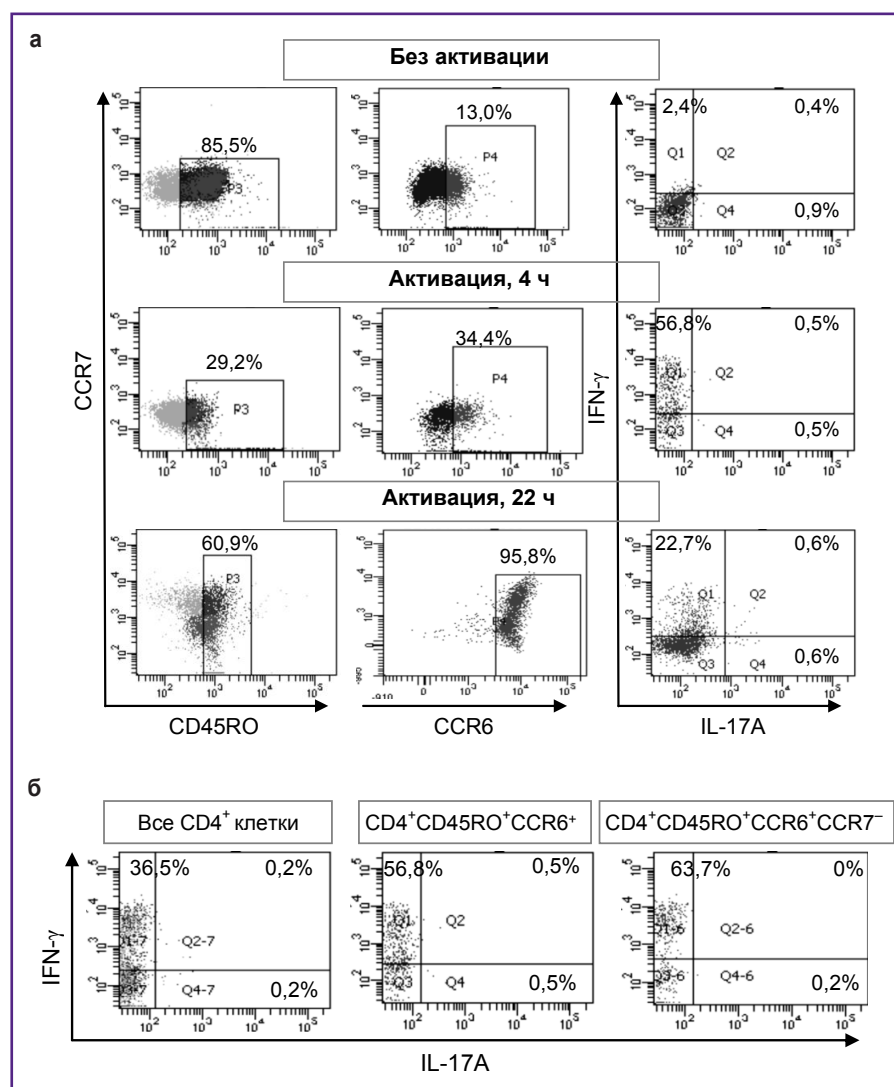


Рис. 1. Изменение фенотипа CD4⁺ Т-хелперов в зависимости от условий активации неразделенных МНПК:

а — МНПК культивировали без активации или активировали ФМА и иономицином в течение 4 или 22 ч. При цитометрическом анализе выделяли в гейт CD4⁺ Т-лимфоциты, а затем, из их состава — CD45RO⁺ Т-хелперы (гейт P3) и CCR6⁺ Т-хелперы (гейт P4). Количество этих клеток указано над гейтами как процент от всех Т-хелперов. Справа показана экспрессия IFN-γ и IL-17A CD45RO⁺ Т-хелперами в тех же условиях активации. Доля IFN-γ⁺IL-17A⁻ клеток (%) указана в квадрантах Q1, IFN-γ⁺IL-17A⁺ — в Q2, IFN-γ⁻IL-17A⁺ — в Q4;

б — экспрессия IFN-γ и IL-17A при 4-часовой активации МНПК и последующем выделении из гейты Т-хелперов с различным фенотипом (указан над графиками)

образцах крови малочисленную группу зрелых CCR6⁺ Т-хелперов. Вместо этого мы выделяли в гейт большое количество Т-хелперов, исходно лишенных молекулы CCR6 и экспрессирующих ее в процессе активации. По продукции IFN- γ и IL-17A эти клетки не отличались от общей группы зрелых CD4⁺CD45RO⁺ Т-хелперов: большинство продуцентов являлись Th1, синтезирующими IFN- γ , тогда как количество продуцентов IL-17A было ничтожным (рис. 1, б).

В результате мы отказались от этого метода и приняли решение выделять целевую группу клеток из состава МНПК с помощью магнитной сепарации и лишь затем подвергать очищенные клетки активации. Поскольку коммерческих наборов для выделения зрелых CCR6⁺ Т-хелперов не существует, нам пришлось модифицировать метод очистки, используя набор для выделения CD4⁺ Т-хелперов и отдельные реагенты из набора для обогащения Th17.

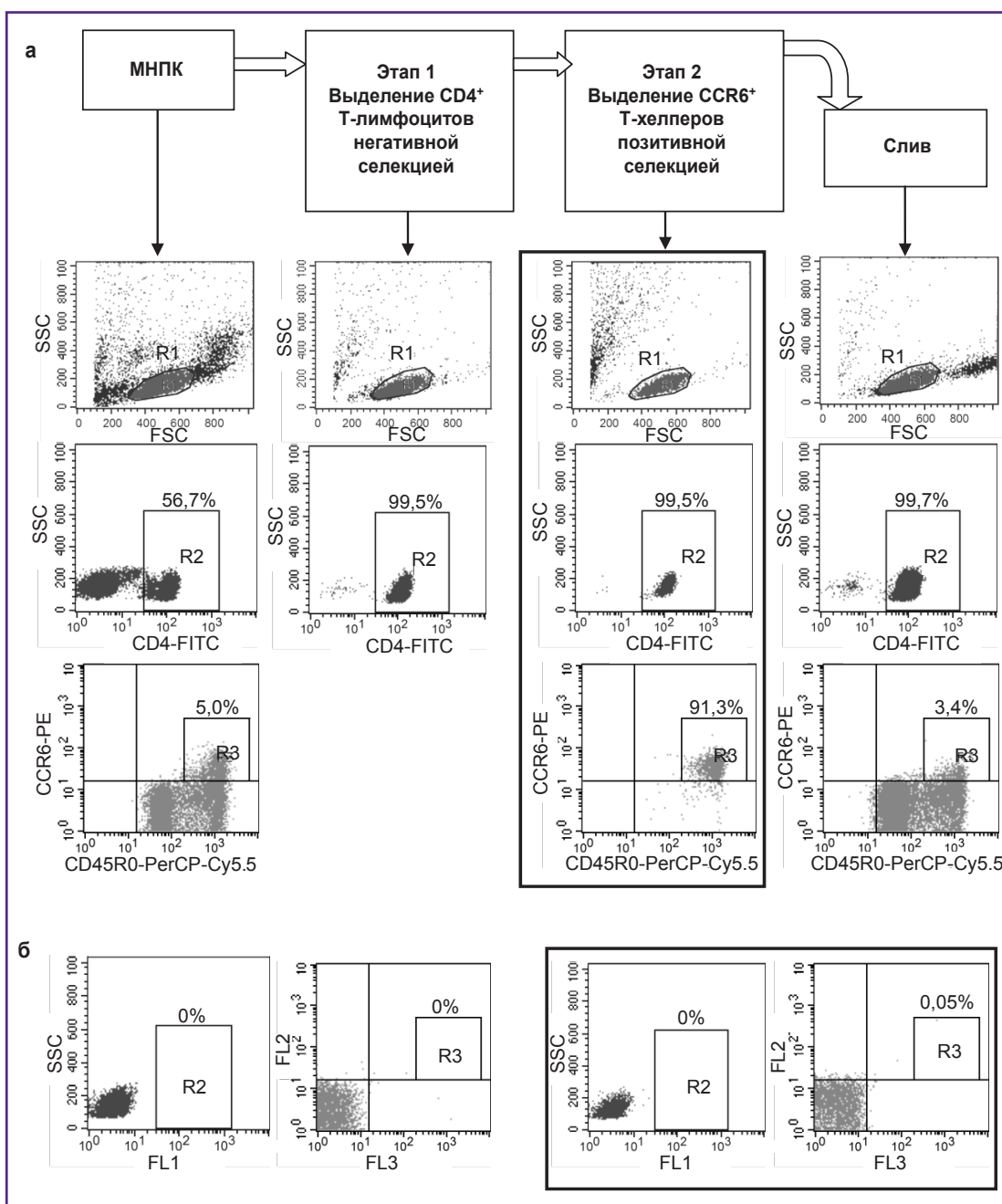


Рис. 2. Схема сепарации CCR6⁺ Т-хелперов:

а — фенотип клеток, полученных на этапах очистки; фенотип конечного продукта очистки — зрелых CCR6⁺ Т-хелперов — выделен в рамку; б — контроль окрашивания МНПК и конечного продукта очистки (в рамке). Клетки последовательно гейтированы: лимфоциты — в гейт R1, затем CD4⁺ лимфоциты — в гейт R2, затем CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺ лимфоциты — в гейт R3. Над гейтами указана доля клеток с соответствующим фенотипом в процентах от общего числа лимфоцитов

Использованная нами схема очистки была следующей. На первом этапе сепарации из МНПК выделяли CD4⁺ Т-хелперы негативной селекцией. При этом все клетки, отличные от Т-хелперов, с помощью антител к линейным маркерам связывали с магнитными бусами и отделяли на магните, а свободные от бус Т-хелперы собирали для следующего этапа разделения. На втором этапе из состава Т-хелперов выделяли CCR6⁺ клетки, связывая их с бусами при помощи соответствующих антител. Меченные бусами клетки выделяли на магните, снимали с них бусы и получали конечный продукт — CCR6⁺ Т-хелперы. Фенотипический анализ показал, что данный способ эффективно позволяет выделять группу Т-хелперов с высоким уровнем экспрессии CCR6, тогда как слив содержит CCR6⁻ Т-хелперы и остаточное количество Т-хелперов с низким уровнем экспрессии CCR6 (рис. 2). Поскольку выраженной экспрессией CCR6 обладают исключительно зрелые Т-клетки [1], конечный продукт сепарации содержал практически чистую группу зрелых клеток с фенотипом CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺. Чистота выделения CD4⁺ клеток уже после первого этапа сепарации превышала 99%, чистота CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺ клеток после второго этапа сепарации превышала 90% (см. рис. 2). Таким образом, клетки, выделенные с помощью данного метода, соответствуют объекту исследования — зрелым циркулирующим CCR6⁺ Т-хелперам.

Для отработки метода оценки функциональных свойств очищенные CCR6⁺ Т-хелперы здоровых доноров активировали смесью ФМА и иономицина в течение 4 или 22 ч. Контролем служили клетки без активаторов. Для накопления продуцируемых цитокинов внутри клеток во все культуры добавляли ингибитор внутриклеточного транспорта брифелдин А на последние 4 ч культивирования. Окрашивание IFN- γ и IL-17A показало, что зрелые циркулирующие CCR6⁺ Т-хелперы не продуцируют эти цитокины без активации (рис. 3, а). Краткосрочная активация вызывала накопление IFN- γ и IL-17A в двух различных группах клеток — Тх1 и Тх17 соответственно. Также обнаружилось небольшое количество клеток со смешанными свойствами — Тх1/Тх17. При активации клеток в течение 22 ч с добавлением брифелдина

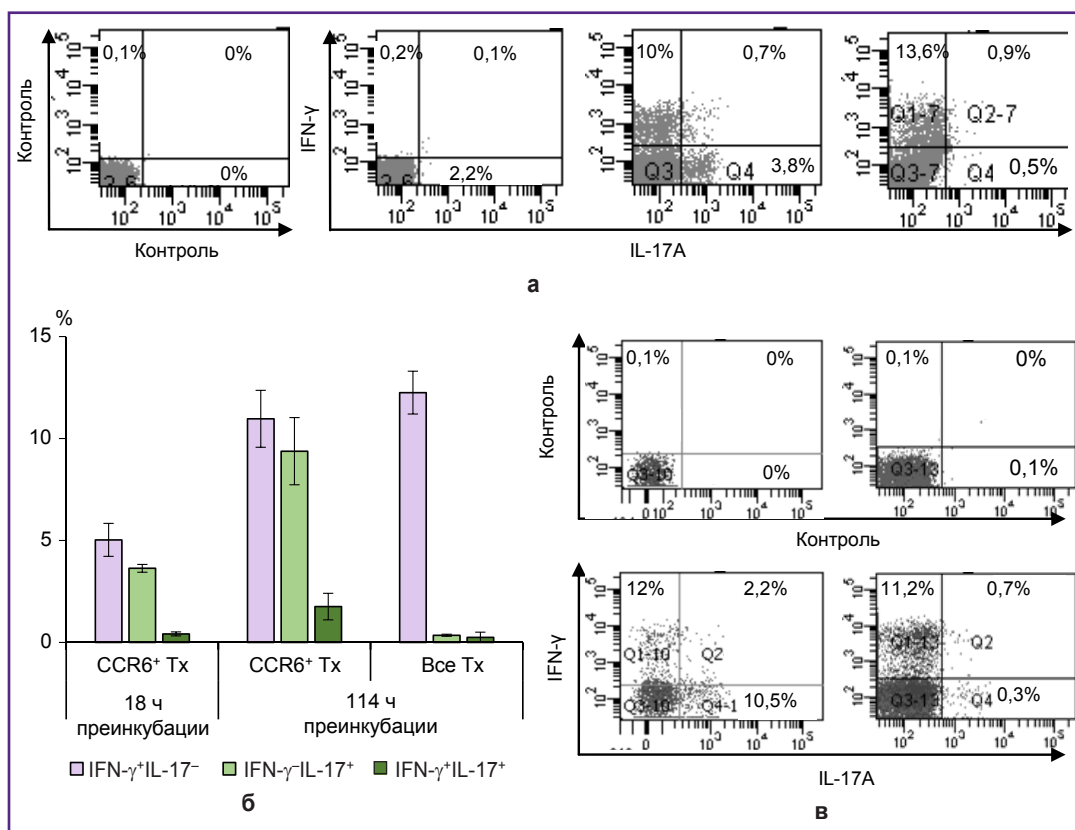


Рис. 3. Экспрессия IFN- γ и IL-17A очищенными зрелыми CCR6⁺ Т-хелперами доноров в зависимости от условий активации:

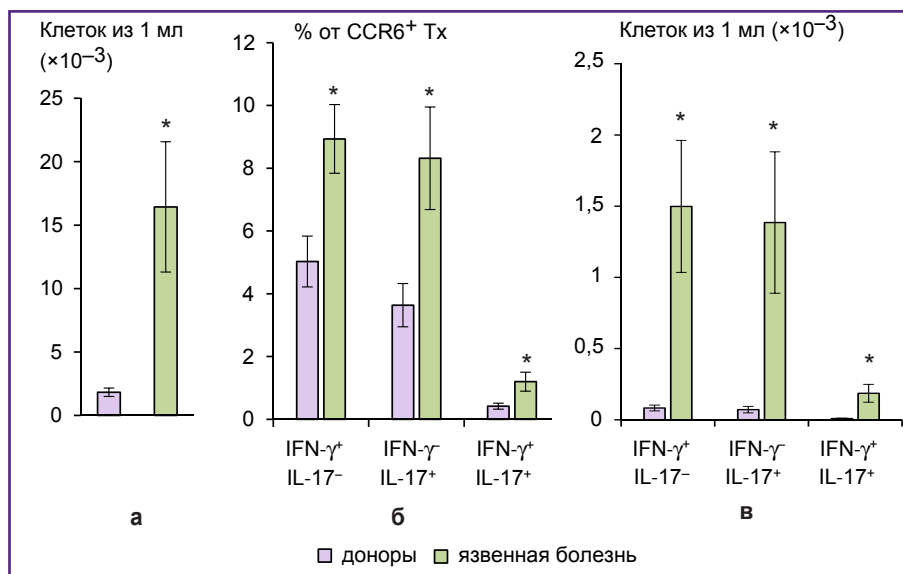
а — слева направо: контроль окрашивания; клетки, культивированные 4 ч без активации; активация в течение 4 ч; активация в течение 22 ч;

б — доля клеток, продуцирующих IFN- γ , IL-17A и оба цитокина одновременно, в культурах зрелых CCR6⁺ Т-хелперов (CCR6⁺ Тх) и неразделенных Т-хелперов (все Тх), активированных в течение 4 ч после 18 или 114 ч преинкубации;

в — репрезентативный результат экспрессии IFN- γ и IL-17A в клетках культур зрелых CCR6⁺ Т-хелперов (левая пара графиков) и неразделенных Т-хелперов (правая пара графиков). Верхний ряд графиков — контроль окрашивания

Рис. 4. Выход зрелых CCR6⁺ Т-хелперов из крови здоровых доноров (n=15) и больных язвенной болезнью (n=7) и продукция цитокинов этими клетками:

а — выход зрелых CCR6⁺ Т-хелперов из 1 мл крови;
б — доля продуцентов цитокинов в культурах зрелых CCR6⁺ Т-хелперов;
в — выход зрелых CCR6⁺ Т-хелперов, продуцирующих цитокины, из 1 мл крови. Комбинация цитокинов — под гистограммами;
 * — статистически значимые отличия от доноров в t-тесте (p<0,05)



А на последние 4 ч культивирования количество выявляемых Тх1 существенно не изменялось, тогда как Тх17 практически переставали обнаруживаться. Следует предположить, что Тх17, входящие в состав зрелых CCR6⁺ Т-хелперов крови, после активации быстро начинают продуцировать IL-17A, но полностью заканчивают продукцию к 18 ч, тогда как Тх1 сохраняют продукцию IFN-γ в течение всего срока культивирования.

Неактивированные очищенные клетки оказались способны переносить длительное культивирование без утраты своих функциональных свойств. Мы культивировали эти клетки в среде без активаторов ночь (18 ч) или 114 ч, а затем активировали их в течение 4 ч в присутствии брифелдина А. При 18-часовой преинкубации в культурах было обнаружено сходное количество Тх1 и Тх17 и незначительное количество Тх1/Тх17 (рис. 3, б). При 114-часовой преинкубации количество клеток, демонстрирующих свойства Тх1, Тх17 и Тх1/Тх17, не снижалось и даже имело тенденцию к росту. Т-хелперы, не разделенные по наличию и отсутствию CCR6 (клетки, полученные на первом этапе очистки), в аналогичных условиях активации преимущественно демонстрировали свойства Тх1 (см. рис. 3, б, рис. 3, в).

Для сравнения CCR6⁺ Т-хелперов крови в норме и при язвенной болезни эти клетки выделяли магнитной сепарацией, преинкубировали в течение 18 ч и активировали ФМА и иономицином в присутствии брифелдина А в течение 4 ч. Выход очищенных зрелых CCR6⁺ Т-хелперов у здоровых доноров составляет 0,13±0,02% от исходного количества МНПК, а у больных язвенной болезнью — 1,04±0,31% (p=0,02). Количество зрелых CCR6⁺ Т-хелперов, выделяемое из 1 мл крови пациентов с язвенной болезнью, было в 9 раз больше, чем у здоровых доноров (рис. 4, а). Выделенные у больных CCR6⁺ Т-хелперы содержали в своем составе достоверно большие доли Тх1,

Тх17 и Тх1/Тх17 по сравнению с аналогичными клетками здоровых доноров (рис. 4, б). Расчет выхода провоспалительных типов Т-хелперов из крови показал, что из 1 мл крови больных выделяется в 18,1 раза больше CCR6⁺ Тх1 (p=0,02), в 19,4 раза больше CCR6⁺ Тх17 (p=0,03) и в 21,1 раза больше CCR6⁺ Тх1/Тх17 (p=0,03) по сравнению с кровью здоровых доноров (рис. 4, в).

Заключение

С использованием иммуномагнитной сепарации получены пробы функционально активных зрелых CCR6⁺ Т-хелперов крови с чистотой более 90%. Выход этих клеток из крови пациентов с *H. pylori*-ассоциированной язвенной болезнью в 9 раз превышает их выход из крови здоровых доноров. Активация очищенных CCR6⁺ Т-хелперов *ex vivo* выявляет повышенное содержание Тх1, Тх17 и Тх1/Тх17 в этой группе клеток при язвенной болезни. Рост содержания зрелых CCR6⁺ Т-хелперов крови и их повышенная провоспалительная активность согласуются с предположением о патогенетическом значении этой группы клеток при *H. pylori*-ассоциированной язвенной болезни.

Финансирование исследования. Работа выполнена за счет средств проекта Российского фонда фундаментальных исследований №18-015-00028-а (в части модификации метода сепарации CCR6⁺ Т-хелперов), отраслевой научно-исследовательской программы «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» (в части исследования *H. pylori*-инфекции).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Литература/References

1. Талаев В.Ю., Талаева М.В., Воронина Е.В., Заиченко И.Е., Неумоина Н.В., Перфилова К.М., Бабайкина О.Н. Экспрессия хемокиновых рецепторов на Т-хелперах крови при заболеваниях, ассоциированных с *Helicobacter pylori*: хроническом гастродуодените и язвенной болезни. *Инфекция и иммунитет* 2019; 9(2): 295–303, <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-2-295-303>.

Talayev V.Y., Talaeva M.V., Voronina E.V., Zaichenko I.Y., Neumoina N.V., Perfilova K.M., Babaykina O.N. Chemokine receptor expression on peripheral blood T-helper cells in *Helicobacter pylori*-associated diseases: chronic gastroduodenitis and peptic ulcer disease. *Infektsiya i immunitet* 2019; 9(2): 295–303, <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-2-295-303>.

2. Danesh J. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: systematic review of the epidemiological studies. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13(7): 851–856, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.1999.00546.x>.

3. Amieva M., Peek R.M. Jr. Pathobiology of *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer. *Gastroenterology* 2016; 150(1): 64–78, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.09.004>.

4. Kusters J.G., van Vliet A.H.M., Kuipers E.J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(3): 449–490, <https://doi.org/10.1128/CMR.00054-05>.

5. Graham D.Y., Opekun A.R., Osato M.S., El-Zimaity H.M.T., Lee C.K., Yamaoka Y., Qureshi W.A., Cadoz M., Monath T.P. Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. *Gut* 2004; 53(9): 1235–1243, <https://doi.org/10.1136/gut.2003.037499>.

6. Nurgaliev Z.Z., Conner M.E., Opekun A.R., Zheng C.Q., Elliott S.N., Ernst P.B., Osato M., Estes M.K., Graham D.Y. B-cell and T-cell immune responses to experimental *Helicobacter pylori* infection in humans. *Infect Immun* 2005; 73(5): 2999–3006, <https://doi.org/10.1128/IAI.73.5.2999-3006.2005>.

7. Eaton K.A., Suerbaum S., Josenhans C., Krakowka S. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun* 1996; 64(7): 2445–2448.

8. Tan S., Tompkins L.S., Amieva M.R. *Helicobacter pylori* usurps cell polarity to turn the cell surface into a replicative niche. *PLoS Pathog* 2009; 5(5): e1000407, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000407>.

9. Isaacson P. Immunoperoxidase study of the secretory immunoglobulin system and lysozyme in normal and diseased gastric mucosa. *Gut* 1982; 23(7): 578–588, <https://doi.org/10.1136/gut.23.7.578>.

10. Velin D., Bachmann D., Bouzourene H., Michetti P. Reduction of *Helicobacter* infection in IL-10^{-/-} mice is dependent on CD4⁺ T cells but not on mast cells. *Helicobacter* 2008; 13(5): 361–369, <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2008.00614.x>.

11. Moyat M., Velin D. Immune responses to *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2014; 20(19): 5583–5593, <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i19.5583>.

12. Kronsteiner B., Bassaganya-Riera J., Philipson C., Viladomiu M., Carbo A., Abedi V., Hontecillas R. Systems-wide

analyses of mucosal immune responses to *Helicobacter pylori* at the interface between pathogenicity and symbiosis. *Gut Microbes* 2016; 7(1): 3–21, <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1116673>.

13. Eaton K.A., Ringler S.R., Danon S.J. Murine splenocytes induce severe gastritis and delayed-type hypersensitivity and suppress bacterial colonization in *Helicobacter pylori*-infected SCID mice. *Infect Immun* 1999; 67(9): 4594–4602.

14. Gray B.M., Fontaine C.A., Poe S.A., Eaton K.A. Complex T cell interactions contribute to *Helicobacter pylori* gastritis in mice. *Infect Immun* 2013; 81(3): 740–752, <https://doi.org/10.1128/IAI.01269-12>.

15. Caruso R., Fina D., Paoluzi O.A., Del Vecchio Blanco G., Stoffi C., Rizzo A., Caprioli F., Sarra M., Andrei F., Fantini M.C., MacDonald T.T., Pallone F., Monteleone G. IL-23-mediated regulation of IL-17 production in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *Eur J Immunol* 2008; 38(2): 470–478, <https://doi.org/10.1002/eji.200737635>.

16. Shi Y., Liu X.F., Zhuang Y., Zhang J.Y., Liu T., Yin Z., Wu C., Mao X.H., Jia K.R., Wang F.J., Guo H., Flavell R.A., Zhao Z., Liu K.Y., Xiao B., Guo Y., Zhang W.J., Zhou W.Y., Guo G., Zou Q.M. *Helicobacter pylori* induced Th17 responses modulate Th1 cell responses, benefit bacterial growth, and contribute to pathology in mice. *J Immunol* 2010; 184(9): 5121–5129, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901115>.

17. Wang C., Kang S.G., Lee J., Sun Z., Kim C.H. The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. *Mucosal Immunol* 2009; 2(2): 173–183, <https://doi.org/10.1038/mi.2008.84>.

18. Villablanca E.J., Cassani B., von Andrian U.H., Mora J.R. Blocking lymphocyte localization to the gastrointestinal mucosa as a therapeutic strategy for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011; 140(6): 1776–1784, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.02.015>.

19. Singh S.P., Zhang H.H., Tsang H., Gardina P.J., Myers T.G., Nagarajan V., Lee C.H., Farber J.M. PLZF regulates CCR6 and is critical for the acquisition and maintenance of the Th17 phenotype in human cells. *J Immunol* 2015; 194(9): 4350–4361, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401093>.

20. Перфилова К.М., Неумоина Н.В., Бутина Т.Ю., Кузнецова И.В., Шутова И.В., Ларионова Т.В., Ефимова Е.И. Опыт использования метода полимеразной цепной реакции для исследования маркеров *Helicobacter pylori*. *Медицинский альманах* 2016; 2: 52–56.

Perfilova K.M., Neumoina N.V., Butina T.Yu., Kuznetsova I.V., Shutova I.V., Larionova T.V., Efimova E.I. Experience of application of polymerase chain reaction methods for the study of *Helicobacter pylori* markers. *Medicinskij al'manah* 2016; 2: 52–56.

21. Talayev V.Yu., Zaichenko I.Ye., Babaykina O.N., Lomonova M.A., Talayeva E.B., Nikonova M.F. *Ex vivo* stimulation of cord blood mononuclear cells by dexamethasone and interleukin-7 results in the maturation of Interferon γ -secreting effector memory T cells. *Clin Exp Immunol* 2005; 141(3): 440–448, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02863.x>.