

ЭКСПРЕССИЯ ХЕМОКИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА Т-ХЕЛПЕРАХ КРОВИ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ, АССОЦИИРОВАННЫХ С *HELICOBACTER PYLORI*: ХРОНИЧЕСКОМ ГАСТРОДУОДЕНИТЕ И ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНИ

В.Ю. Талаев, М.В. Талаева, Е.В. Воронина, И.Е. Заиченко, Н.В. Неумоина, К.М. Перфилова, О.Н. Бабайкина

ФБУН Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

Резюме. *Helicobacter pylori* вызывает хроническую инфекцию приблизительно у половины населения планеты. Проявления инфекции, вызываемой этим микроорганизмом, варьируют от бессимптомного инфицирования до гастрита и язвенной болезни. Предполагается, что манифестные формы этой инфекции ассоциированы с утратой иммунорегуляции и усилением провоспалительного клеточного иммунного ответа, индукторами которого являются специфические к *H. pylori* Т-хелперы. В этой работе мы оценивали степень зрелости CD4⁺ Т-лимфоцитов крови и экспрессию на них хемокиновых рецепторов, участвующих в миграции в желудочно-кишечный тракт (CCR9 и CCR6), Т- и В-клеточные зоны лимфоидных органов (CCR7 и CXCR5). Показано, что при манифестных формах *H. pylori*-инфекции наблюдается изменение экспрессии хемокиновых рецепторов на Т-хелперах, которое зависит от формы заболевания. При хроническом гастродуодените в крови увеличивается содержание зрелых CD4⁺CD45RO⁺ клеток с рецептором CCR9, и незрелых CD4⁺CD45RO⁻ клеток, несущих рецептор CXCR5. При сочетании хронического гастродуоденита с язвенной болезнью наблюдается усиление активации зрелых Т-хелперов, что проявляется в увеличении количества CD4⁺CD45RO⁺ICOS⁺ клеток. Также у этих пациентов увеличивается содержание зрелых Т-хелперов, несущих рецептор CCR6 (в основном за счет наиболее зрелых CD4⁺CD45RO⁺CCR7⁻CCR6⁺ клеток) и клеток с фенотипом фолликулярных Т-хелперов, появляется минорная группа CD4⁺CD45RO⁺CXCR5⁺CCR6⁺ клеток. В то же время у пациентов с язвенной болезнью отсутствует увеличение количества CD4⁺CCR9⁺ лимфоцитов в крови. Полученные данные свидетельствуют о различиях в управлении тканеспецифической миграцией Т-хелперов при данных заболеваниях.

Ключевые слова: Т-лимфоциты, рецепторы хемокинов, язвенная болезнь, гастрит, дуоденит.

Адрес для переписки:

Талаев Владимир Юрьевич
603950, Россия, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71,
ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной.
Тел.: 8 (831) 469-79-48.
E-mail: talaev@inbox.ru

Contacts:

Vladimir Yu. Talayev
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod,
Malaya Yamskaya str., 71, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod
Research Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (831) 469-79-48.
E-mail: talaev@inbox.ru

Библиографическое описание:

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. Т. 9, № 2. С. 295–303. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-295-303

Citation:

Talayev V.Yu., Talaeva M.V., Voronina E.V., Zaichenko I.Ye., 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 // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 295–303. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-295-303

CHEMOKINE RECEPTOR EXPRESSION ON PERIPHERAL BLOOD T-HELPER CELLS IN *HELICOBACTER PYLORI*-ASSOCIATED DISEASES: CHRONIC GASTRODUODENITIS AND PEPTIC ULCER DISEASE

Talayev V.Yu., Talaeva M.V., Voronina E.V., Zaichenko I.Ye., Neumoina N.V., Perfilova K.M., Babaykina O.N.

I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Abstract. *Helicobacter pylori* represents a pathogen causing chronic infection in around a half of the global human population, which manifestations vary from asymptomatic infection to developing gastritis and peptic ulcer. The data accumulated suggest that overt clinical types of this infection are associated with lost immunoregulation and increased pro-inflammatory cell-mediated immune response triggered by *H. pylori*-specific T helper cells. Here, we examined the degree of peripheral blood CD4⁺ T cell maturity and related expression of chemokine receptors involved in migration to gastrointestinal tract (CCR9 and CCR6), as well as T- and B-cell zones of lymphoid organs (CCR7 and CXCR5). It was shown that overt *H. pylori*-infection was coupled to changes in expression pattern of chemokine receptors on T helper cells. In particular, percentage of mature CD4⁺CD45RO⁺ T cells bearing CCR9 and immature CD4⁺CD45RO⁻ T cells expressing CXCR5 was increased in peripheral blood of patients with chronic gastroduodenitis. However, increased amount of activated mature CD4⁺CD45RO⁺ICOS⁺ T cells was observed in patients with chronic gastroduodenitis comorbid with peptic ulcer that was also associated with elevated amount of mature CCR6⁺ T helpers (mainly CD4⁺CD45RO⁺CCR7⁻CCR6⁺ cells) and follicular T helper cells as well as emerging minor CD4⁺CD45RO⁺CXCR5⁺CCR6⁺ T cell subset, not affecting CD4⁺CCR9⁺ T cells. Thus, the data obtained evidence that tissue-specific T-helper cell migration is controlled separately in of *H. pylori*-associated diseases.

Key words: T lymphocytes, chemokine receptors, peptic ulcer disease, gastritis, duodenitis.

Введение

Helicobacter pylori — грамтрицательная спиралевидная подвижная микроаэрофильная бактерия, способная персистировать в желудке и на участках желудочной метаплазии в двенадцатиперстной кишке человека. *H. pylori* является одним из наиболее важных этиологических факторов развития гастрита и язвенной болезни, а также провоцирует развитие аденокарциномы желудка и лимфомы лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми желудка, однако у 85% зараженных этот микроорганизм вызывает длительное бессимптомное инфицирование [7, 15, 20]. Длительная персистенция *H. pylori* в желудке, по-видимому, обусловлена особенностью этого биотопа, разнообразием зон размножения микроорганизма и регуляторным действием его факторов патогенности на иммунную систему [15, 18, 23]. При инфицировании, подвижный и продуцирующий муколитические ферменты *H. pylori* внедряется в слой слизи, покрывающий эпителий желудка, и размножается в этом защитном слое. Около 20% микроорганизмов адгезируется на апикальной поверхности эпителия, а также проникает в железы желудка и использует эти зоны как дополнительные репликативные ниши. При этом контактные и секреторируемые токсины *H. pylori* повреждают эпителиальные клетки, что приводит к нарушению секреции HCl и продукции провоспалительных цитокинов. Уже через 2 недели после инфицирования

добровольцев наблюдаются признаки иммунного ответа и воспаления: инфильтрация слизистой желудка лейкоцитами, локальный рост продукции IL-1, IL-6 и IL-8, появление антител к *H. pylori* в крови [10, 24]. Несмотря на быстрое развитие, иммунный ответ оказывается недостаточно эффективным для устранения инфекции. Гуморальный иммунный ответ не оказывает значительного действия на *H. pylori*, поскольку репликативные ниши микроорганизма недоступны для IgM и IgG, а малое количество полимерного иммуноглобулинового рецептора в желудке и связанный с этим недостаток секреции IgA не позволяет полностью устранить *H. pylori* с поверхности эпителия [23]. Провоспалительный клеточный иммунный ответ, по-видимому, сдерживает размножение *H. pylori*, но при этом вносит решающий вклад в развитие симптомов гастрита [15]. По крайней мере, заражение хеликобактером мышей с отсутствием Т-лимфоцитов или антигенспецифических Т-хелперов вызывает пожизненную массивную, но бессимптомную инфекцию, тогда как введение этим мышам нормальных Т-хелперов вызывает уменьшение бактериальной нагрузки и, в то же время, развитие острого гастрита [8, 11].

С течением времени характер иммунного ответа изменяется, и провоспалительный компонент компенсируется растущей активностью регуляторных Т-клеток (Treg). В результате воспаление переходит на стабильно слабый уровень, симптомы острого гастрита исче-

зают, и у большинства пациентов инфекция становится бессимптомной на годы или десятилетия [23]. Нарушение равновесия в системе «микроорганизм — сдерживающий его провоспалительный иммунный ответ — противовоспалительная регуляторная реакция» ведет к усилению воспаления и развитию хронического гастрита и дуоденита. Нарушение баланса секреции защитных и агрессивных факторов в желудке в сочетании с высокой ферментативной активностью *H. pylori* у отдельных пациентов приводят к локальному разрушению защитного слоя слизи, повреждению слизистой желудочным соком и токсинами микроба и формированию язвы.

При персистентной *H. pylori*-инфекции и хроническом воспалении слизистая желудка инфильтрирована Т- и В-лимфоцитами, моноцитами, макрофагами, эозинофильными и нейтрофильными гранулоцитами, тучными клетками и дендритными клетками (DC), причем Т-, В-лимфоциты и DC организованы в лимфоидные фолликулы, что свидетельствует о постоянной антигенной презентации [28]. Основными индукторами воспаления являются IL-17A и, особенно, IFN γ , который при *H. pylori*-инфекции продуцируется различными типами клеток [11]. При этом, продукция IFN γ зависит от IL-17A — ключевого цитокина Т-хелперов-17 (Th17) [26], и от IL-23 [6] — цитокина дендритных клеток, основной функцией которого является стимулирование Th17 [13]. Кроме того, продукция IFN γ , IL-17A и развитие воспаления в модели *H. pylori*-инфекции у мышей нуждается в IL-21 — цитокине, который продуцируют фолликулярные Т-хелперы (Tfh), а также Th17 и NKT-клетки [5], причем у инфицированных мышей наблюдается накопление Tfh в мезентериальных лимфатических узлах и lamina propria желудка [17]. Таким образом, в провоспалительном клеточном иммунном ответе на *H. pylori* могут синергично участвовать не только «профессиональные» стимуляторы воспаления: Th17 и различные IFN γ -продуцирующие клетки, но и Tfh, основной функцией которых является стимуляция гуморального иммунного ответа [19].

Для реализации своих провоспалительных функций перечисленные выше клетки должны проникнуть в инфицированную слизистую. Вовлечение наивных Т-хелперов в иммунный ответ и их дифференцировка в зрелые эффекторы происходит во вторичных лимфоидных органах. В частности, в ходе дифференцировки происходит изменение набора адгезивных молекул и хемокиновых рецепторов, что приводит к передислокации созревших Т-лимфоцитов в зону выполнения их специфических функций, причем в лимфоидных органах, ассоциированных с определенным типом ткани, Т-лимфоциты могут получать специфический набор молекул, способствующий их миграции в соответствующий тип ткани. Так, при *H. pylori*-инфекции у мышей способность к миграции в желудочно-кишечный тракт приобретают Т-лимфоциты, вовлеченные в иммунный ответ в Пейеровых бляшках тонкого кишечника. Соответственно, у мышей, лишенных Пейеровых бляшек, развивается массивная *H. pylori*-инфекция без существенного воспаления и клеточной инфильтрации желудка, несмотря на генерацию провоспалительных *H. pylori*-специфичных Т-хелперов [14]. В данной работе в крови у пациентов с язвенной болезнью желудка и хроническим гастродуоденитом, ассоциированными с *H. pylori*-инфекцией, исследовали содержание и степень зрелости Т-хелперов с хемокиновыми рецепторами CCR6, CCR9, CCR7 и CXCR5, участвующими в миграции в лимфоидные органы или в слизистую желудочно-кишечного тракта. CCR7 отвечает за миграцию наивных Т-клеток и центральных Т-клеток памяти в Т-клеточные зоны лимфоидных органов и утрачивается в ходе их дифференцировки в эффекторы. CXCR5 экспрессируется на В-лимфоцитах и Tfh и обеспечивает встречу этих клеток в В-клеточной зоне лимфоидных органов при запуске гуморального иммунного ответа [19]. Рецептор CCR6, участвует в миграции Т-лимфоцитов в кожу и желудочно-кишечный тракт, где продуцируется его лиганд — хемокин CCL20 [30]. В норме в желудочно-кишечном тракте CCL20 продуцируется в Пейеровых бляшках, а при патологии — также в воспаленной слизистой [29]. Рецептор CCR9 участвует в миграции Т-лимфоцитов в желудочно-кишечный тракт, преимущественно в тонкий кишечник, в слизистой которого продуцируется лиганд рецептора — хемокин CCL25 [16, 29].

Материалы и методы

Материалы и методы

Обследовали взрослых больных с манифестными формами *H. pylori*-инфекции (N = 17, возраст от 32 до 57 лет, средний возраст 48,5 лет) и взрослых практически здоровых доноров группы сравнения (N = 12, возраст от 28 до 55 лет, средний возраст 40,6 лет). Больные с *H. pylori*-инфекцией разделялись на 2 группы в зависимости от клинических проявлений заболевания. Первую группу больных составляли пациенты с язвенной болезнью (N = 8, возраст от 32 до 57 лет, средний возраст 45,7 лет). Все пациенты этой группы страдали заболеваниями желудка и/или двенадцатиперстной кишки в течение 7–20 лет и наряду с диагнозом язвенной болезни имели диагнозы хронического гастрита и хронического дуоденита. Язвы были локализованы в двенадцатиперстной кишке

(5 человек), в антруме желудка (2) и в средней трети тела желудка (1). Сопутствующими заболеваниями были: хронический холецистит (5 пациентов), хронический панкреатит (5), гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (4). Вторую группу составляли пациенты с диагнозом хронического гастрита и хронического дуоденита (далее — гастродуоденит) без признаков атрофии слизистой и без язвенной болезни (N = 9, возраст от 45 до 55 лет, средний возраст 50,4 года). Сопутствующими заболеваниями были: рефлюкс-эзофагит (2 человека) и дуоденогастральный рефлюкс (3 человека).

Больные обследовались при поступлении в стационар в связи с обострением основного заболевания. Исследование проводилось до начала лечения. Наличие *H. pylori*-инфекции у всех больных было подтверждено с помощью быстрого уреазного теста и обнаружения ДНК *H. pylori* полимеразой цепной реакцией, как это описано ранее [1]. Для определения фенотипа Т-лимфоцитов с помощью проточной цитометрии применяли панели антител и стратегию гейтирования, использованные нами ранее [3]. Для этого клетки крови больных обеих групп и доноров группы сравнения окрашивались ме-

ченными моноклональными антителами к молекулам CD4 (Сорбент, Москва, Россия), CD45RO, CCR6, CCR9 (eBiosciences, США), CCR7, CXCR5 и ICOS (eBiosciences, США). Затем лизировали эритроциты раствором BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences, США), клетки отмывали и фиксировали 1% параформальдегидом. Анализ проводили на лазерном проточном цитофлуориметре FacsCalibur (BD Biosciences, США), последовательно гейтируя лимфоциты, CD4⁺ лимфоциты, CD45RO⁻ и CD45RO⁺ Т-клетки. Затем рассчитывали количество клеток, несущих комбинации исследуемых маркеров, как долю (%) от общего количества лимфоцитов. Результаты цитометрии обрабатывали с помощью программы CellQuest (BD Biosciences, США). Статистический анализ проводили с использованием критерия Ньюмена–Кейлса (при множественном сравнении) и t-теста Стьюдента (при сравнении здоровых доноров с общей группой больных). Данные представлены в виде M±m. Достоверность отличий на рисунках отмечена по критерию Ньюмена–Кейлса.

Результаты

Исследовали фенотип Т-хелперов крови и экспрессию на них хемокиновых рецепторов у пациентов с язвенной болезнью в сочетании с хроническим гастродуоденитом (далее — группа с язвенной болезнью) и у пациентов с хроническим гастродуоденитом без язвенной болезни (далее — группа с гастродуоденитом). Содержание CD4⁺ лимфоцитов при этих формах *H. pylori*-инфекции не изменяется (рис. 1А). Содержание зрелых CD4⁺CD45RO⁺ Т-хелперов увеличивается незначительно (рис. 2А), и достоверный прирост количества этих клеток выявляется только при сравнении группы здоровых доноров с общей группой больных с *H. pylori*-инфекцией (21,9±1,7% CD4⁺CD45RO⁺ клеток у здоровых и 27,6±2,3% у больных; p = 0,03 в t-тесте).

Существенные отличия больных с язвенной болезнью от пациентов с гастродуоденитом и здоровых доноров были обнаружены при анализе экспрессии индуцибельного рецептора костимулирующего сигнала ICOS. При язвенной болезни наблюдался значительный рост содержания CD4⁺CD45RO⁺ICOS⁺ Т-клеток, тогда как при гастродуодените без язвенной болезни увеличения количества ICOS⁺ Т-хелперов не обнаружено (рис. 1Б).

Оценка экспрессии хемокиновых рецепторов показала, что рецептор CCR6 в норме и при исследуемых патологиях экспрессируется исключительно на зрелых CD4⁺CD45RO⁺ Т-хелперах (рис. 2). У больных с язвенной болезнью наблюдается значительный рост со-

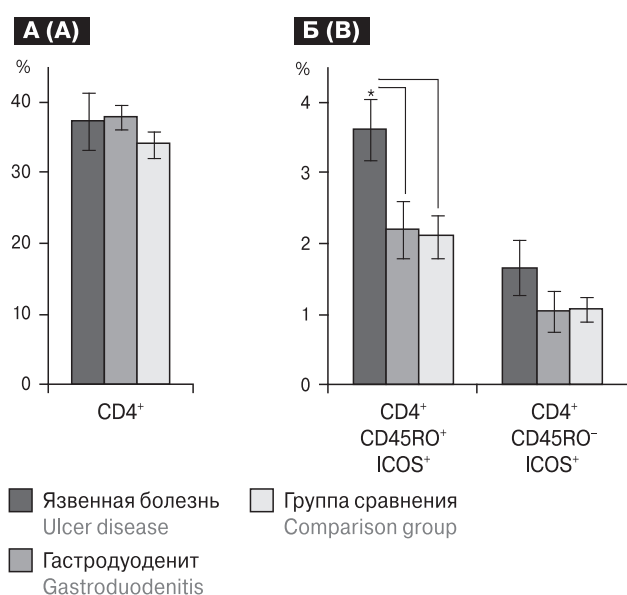


Рисунок 1. Содержание CD4⁺ лимфоцитов (А), CD4⁺CD45RO⁺ICOS⁺ и CD4⁺CD45RO⁻ICOS⁺ лимфоцитов (Б) в крови больных с язвенной болезнью, гастродуоденитом и у доноров группы сравнения (% от всех лимфоцитов)

Figure 1. Percentage of peripheral blood CD4⁺ T cell subsets (A), CD4⁺CD45RO⁺ICOS⁺ and CD4⁺CD45RO⁻ICOS⁺ lymphocytes (B) detected in patients with peptic ulcer, gastritis and volunteers in comparison group (% of total lymphocytes)

Примечание. *Достоверные отличия при p < 0,05.

Note. *p < 0.05.

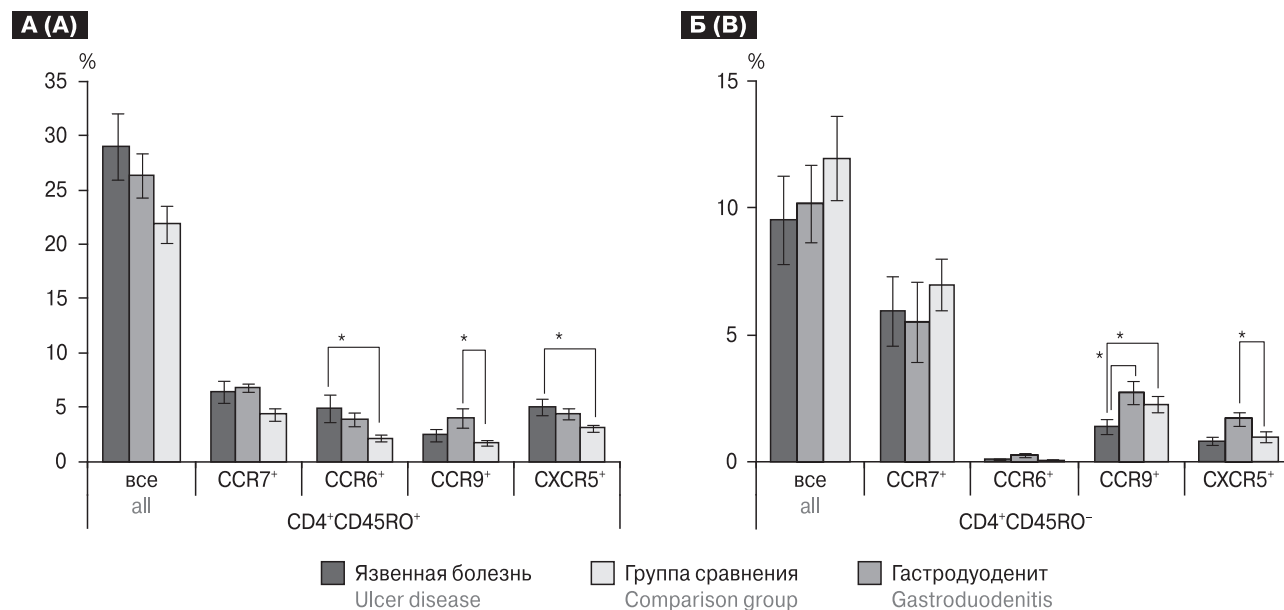


Рисунок 2. Содержание CD4⁺CD45RO⁺ (А) и CD4⁺CD45RO⁻ лимфоцитов (Б), экспрессирующих хемокиновые рецепторы CCR7, CCR6, CCR9 и CXCR5, в крови больных с язвенной болезнью, гастродуоденитом и у лиц группы сравнения (% от всех лимфоцитов)

Figure 2. Percentage of peripheral blood CD4⁺CD45RO⁺ (A) and CD4⁺CD45RO⁻ CD4⁺ T cell subsets expressing chemokine receptors CCR7, CCR6, CCR9 and CXCR5 in patients with peptic ulcer, gastroduodenitis and volunteers in comparison group (% of total lymphocytes)

Примечание. *Достоверные отличия при $p < 0,05$.

Note. * $p < 0.05$.

держания CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺ клеток, тогда как у больных с гастродуоденитом увеличение количества этих клеток менее выражено и статистически недостоверно (рис. 2А). Рост количества CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺ лимфоцитов при язвенной болезни происходит, в основном, за счет наиболее зрелых клеток с фенотипом CCR7⁻ эффекторов/эффекторных Т-клеток памяти (рис. 3А). Их количество увеличивается в 2,4 раза или на 2,1% от общего количества лимфоцитов, что составляет 78,94% всего увеличения CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺ клеток. Содержание малой группы CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺CCR7⁺ клеток также достоверно увеличивается в 2,6 раза или на 0,57% от общего количества лимфоцитов. Анализ экспрессии CCR6 и молекул ICOS на CD4⁺CD45RO⁺ Т-хелперах показывает, что при язвенной болезни активация равномерно затрагивает как CCR6⁻, так и CCR6⁺ Т-хелперы (12,95% активированных ICOS⁺ клеток в CCR6⁻ группе клеток и 12,94% — в CCR6⁺ группе). Результатом этого является достоверный рост количества ICOS⁺CCR6⁻ и появление в кровотоке малой группы ICOS⁺CCR6⁺ клеток (рис. 3Б).

В крови пациентов с язвенной болезнью наблюдается увеличение содержания CD4⁺CD45RO⁺CXCR5⁺ клеток (рис. 2А). Анализ распределения молекул CCR7 и CXCR5 показывает, что увеличение экспрессии CXCR5 при

язвенной болезни происходит за счет наиболее зрелой группы клеток с фенотипом Tfh — CD4⁺CD45RO⁺CXCR5⁺CCR7⁻ (рис. 3В).

При гастродуодените достоверный рост содержания CXCR5⁺ клеток наблюдается в незрелой субпопуляции CD45RO⁻ Т-хелперов (рис. 2Б), тогда как в субпопуляции зрелых CD45RO⁺ Т-хелперов рост количества CXCR5⁺ клеток невелик и при множественном сравнении статистически недостоверен (рис. 2А).

Анализ распределения рецепторов CCR6 и CXCR5 свидетельствует, что большинство CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺ клеток и CD4⁺CD45RO⁺CXCR5⁺ клеток представляют две различные группы Т-хелперов (рис. 3Г). В норме два этих рецептора практически не экспрессируются на одних и тех же клетках, но при язвенной болезни в крови появляется группа клеток, экспрессирующих эти рецепторы одновременно. Несмотря на свою малочисленность эти CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺CXCR5⁺ клетки надежно определяются с помощью цитометрии (рис. 4). Учитывая набор хемокиновых рецепторов можно предположить, что эти клетки способны мигрировать в В-клеточные зоны лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой кишечника.

При хроническом гастродуодените наблюдается существенный рост содержания зрелых CD4⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов, несущих ре-

цептор CCR9 (рис. 2А). При язвенной болезни количество $CD4^+CD45RO^+CCR9^+$ лимфоцитов не увеличивается, а количество $CD4^+CD45RO^+CCR9^-$ лимфоцитов достоверно снижается по сравнению с контрольной группой и группой больных с гастродуоденитом (рис. 2Б).

Обсуждение

Анализ фенотипа Т-клеток крови выявил небольшой прирост содержания зрелых $CD4^+CD45RO^+$ Т-клеток при манифестных формах *H. pylori*-инфекции, причем у больных с язвенной болезнью, в отличие от больных с гастродуоденитом, наблюдался существенный рост количества зрелых Т-хелперов, экспрессирующих молекулу ICOS. Поскольку эта молекула

отсутствует на покоящихся Т-клетках и экспрессируется после стимуляции антигеном [12], рост количества $ICOS^+$ клеток свидетельствует об интенсификации вовлечения Т-хелперов в иммунный ответ при язвенной болезни.

Также при язвенной болезни наблюдалось значительное увеличение содержания зрелых Т-хелперов, несущих рецептор CCR6, в основном за счет наиболее зрелых $CD4^+CD45RO^+CCR7^-CCR6^+$ клеток. При обсуждении этих результатов следует отметить связь экспрессии CCR6 с субпопуляцией Th17. Поскольку индукторами экспрессии гена CCR6 являются мастер-регуляторы созревания Th17 — ядерные факторы ROR γ t и PLZF [27], следует предположить, что зрелые $CCR6^+$ Т-хелперы являются Th17 или клетками, вступавшими на путь

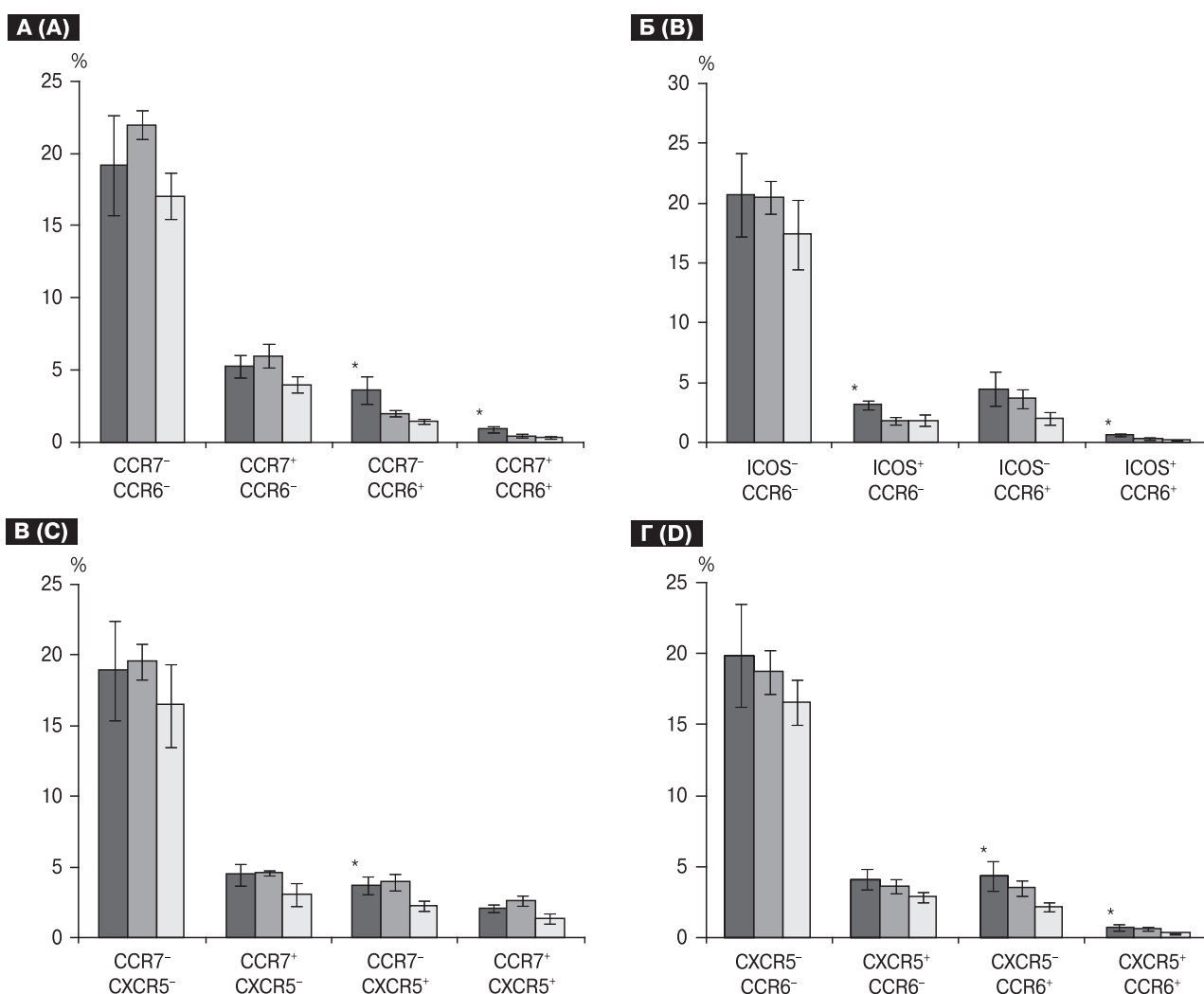


Рисунок 3. Содержание зрелых $CD4^+CD45RO^+$ лимфоцитов с различными наборами мембранных молекул при исследуемых заболеваниях (% от всех лимфоцитов крови)

Figure 3. Percentage of diverse peripheral blood mature $CD4^+CD45RO^+$ T cell subsets in patients with *H. pylori*-associated diseases (% of total lymphocytes)

Примечание. Набор анализируемых молекул — под гистограммами. *Достоверные отличия от группы сравнения при $p < 0,05$.

Note. Surface markers examined in the study are denoted in the plots. * $p < 0.05$.

созревания Th17, но изменившими направленные дифференцировки в силу пластичности. Таким образом, рост экспрессии CCR6 может отражать активизацию программы созревания Th17 при язвенной болезни, ассоциированной с *H. pylori*-инфекцией.

Еще одной группой клеток, увеличивающих свое содержание в крови при язвенной болезни, являлись лимфоциты с фенотипом Tfh, возможная роль которых в патогенезе *H. pylori*-инфекции обсуждалась во введении. При гастродуодените достоверного увеличения содержания Tfh не обнаружено, но в крови выявляется повышенное содержание CXCR5⁺ клеток с менее зрелым фенотипом: CD4⁺CD45RO⁻CXCR5⁺. Функциональный статус этих лимфоцитов при гастродуодените неизвестен, но в норме клетки с таким фенотипом практически не отличаются от типичных наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов [2].

При гастродуодените обнаружено существенное увеличение количества зрелых Т-хелперов, экспрессирующих хемокиновый рецептор CCR9. Поскольку этот рецептор отвечает за миграцию Т-хелперов в слизистую тонкого кишечника [16, 29], увеличение содержания CCR9⁺ Т-хелперов в крови при гастродуодените представляется вполне ожидаемым проявлением усиления миграции лимфоцитов гематогенным путем в слизистую тонкого кишечника. Неожиданным оказалось отсутствие роста содержания CD4⁺CD45RO⁺CCR9⁺ лимфоцитов и достоверное уменьшение количества CD4⁺CD45RO⁻CCR9⁺ лимфоцитов у пациентов с язвенной болезнью, несмотря на то что все пациенты этой группы имели гастродуоденит в качестве сопутствующего заболевания.

Различия экспрессии CCR9 на циркулирующих Т-клетках может быть обусловлено балансом двух процессов — созреванием DC и синтезом all-trans ретиноевой кислоты (ПК), которая является индуктором экспрессии CCR9 [22]. Ретиноевая кислота образуется из поступающего с пищей витамина А в эпителии и в DC слизистых желудка и тонкого кишечника [4]. После созревания и миграции в лимфоидные органы эти DC будут снабжать контактирующие с ними Т-лимфоциты ретиноевой кислотой и тем самым индуцировать на них экспрессию CCR9. Как известно, воспаление усиливает созревание и миграцию DC. В то же время *H. pylori* способен угнетать синтез ПК в желудке [4], причем степень подавления синтеза ПК коррелирует с выраженностью воспаления [21]. В соответствии с этим можно предположить, что при гастродуодените индуцированная воспалением активность DC превалирует над ослаблением синтеза ПК, что приводит к усилению экспрессии CCR9 на Т-лимфоцитах, тогда как при яз-

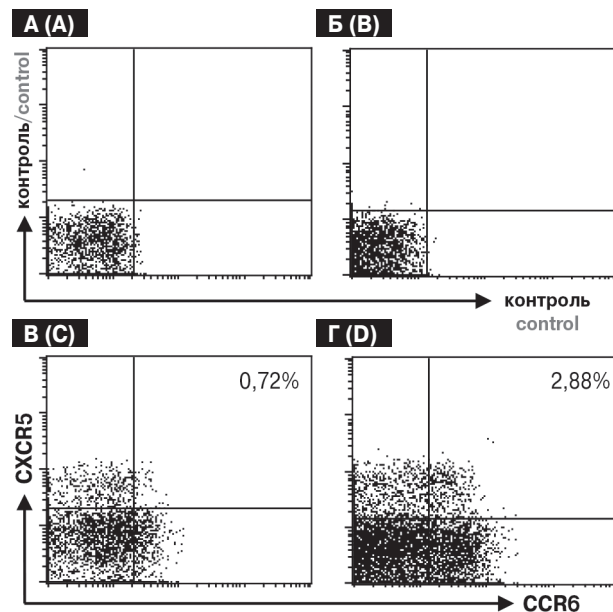


Рисунок 4. Экспрессия CCR6 и CXCR5 на CD4⁺CD45RO⁺ лимфоцитах у здорового донора (А, В) и больного с язвенной болезнью желудка (Б, Г)

Figure 4. Expression of CCR6 and CXCR5 on CD4⁺CD45RO⁺ T cells in representative volunteer (A, C) vs. patient with peptic ulcer disease (B, D)

Примечание. Верхний ряд — негативные контроли окрашивания. В верхнем правом квадранте обозначена доля CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺CXCR5⁺ клеток от CD4⁺CD45RO⁺ лимфоцитов.

Note. Top row — negative staining control. Upper right quadrant: a proportion of CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺CXCR5⁺ cells gated on CD4⁺CD45RO⁺ T cells is indicated.

венной болезни мощное воспаление вызывает глубокое подавление синтеза ПК, что приводит к отмене индукции CCR9 на созревающих Т-хелперах.

По субпопуляционному составу CD4⁺CCR9⁺ лимфоциты, циркулирующие в крови здорового человека, являются весьма гетерогенной группой, которая, по сравнению с CD4⁺CCR9⁻ лимфоцитами, содержит повышенное количество активированных клеток, провоспалительных Th1 и противовоспалительных Treg [25]. У мышей CCR9 также экспрессируется на Т-клетках эффекторах и на Treg, причем в субпопуляции FoxP3⁺ Treg доля CCR9⁺ клеток больше, чем у эффекторов [9]. Таким образом, Treg могут вносить существенный вклад в изменения количества CCR9⁺ клеток при исследуемых патологиях, и для установления патофизиологического значения этих изменений необходимо провести дополнительные исследования баланса эффекторов и Treg в группе CCR9⁺ клеток при гастродуодените и язвенной болезни.

Заключение

При *H. pylori*-инфекции наблюдаются изменения экспрессии хемокиновых рецепторов Т-хелперов, зависящие от клинической формы заболевания. При хроническом гастродуодените в крови увеличивается содержание зрелых CCR9⁺ Т-хелперов и незрелых CD45RO⁻ Т-хелперов, несущих рецептор CXCR5. При язвенной болезни наблюдается усиление активации

зрелых Т-хелперов, увеличивается содержание зрелых CCR6⁺ Т-хелперов и клеток с фенотипом фолликулярных Т-хелперов, а также появляется минорная группа CD4⁺CD45RO⁺CXCR5⁺CCR6⁺ клеток. Роста экспрессии CCR9 на CD4⁺ Т-лимфоцитах при язвенной болезни не наблюдается. Полученные данные свидетельствуют о различиях в управлении тканеспецифической миграцией Т-хелперов при данных заболеваниях.

Список литературы/References

1. 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. Т. 42, № 2. С. 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 method for study of *Helicobacter pylori* markers. *Meditsinskiy al'manakh = Medical Almanac*, 2016, vol. 42, no. 2, pp. 52–56. (In Russ.)]
2. Талаев В.Ю., Плеханова М.В., Бабайкина О.Н., Воронина Е.В. Характеристика малой субпопуляции наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов, несущих хемокиновый рецептор CXCR5 // Иммунология. 2015. Т. 36, № 1. С. 9–13. [Talayev V.Yu., Plehanova M.V., Babaykina O.N., Voronina E.V. Characterization of a small subpopulation of naïve CD4 T-lymphocytes bearing chemokine receptor CXCR5. *Immunologiya = Immunology*, 2015, vol. 36, no. 1, pp. 9–13. (In Russ.)]
3. Талаев В.Ю., Талаева М.В., Воронина Е.В., Талаева Е.Б., Заиченко И.Е., Бабайкина О.Н. Содержание и фенотип CCR6⁺ и CCR9⁺ Т-хелперов периферической крови у подростков с болезнью Крона // Иммунология. 2017. Т. 38, № 6. С. 313–320. [Talayev V.Yu., Talaeva M.V., Voronina E.V., Talayeva E.B., Zaichenko I.Ye., Babaykina O.N. Content and phenotype of blood CCR6⁺ and CCR9⁺ T-helper cells in adolescents with Crohn's disease. *Immunologiya = Immunology*, 2017, vol. 38, no. 6, pp. 313–320. (In Russ.)]
4. Bimczok D., Kao J.Y., Zhang M., Cochran S., Mannon P., Peter S., Wilcox C.M., Mönkemüller K.E., Harris P.R., Grams J.M., Stahl R.D., Smith P.D., Smythies L.E. Human gastric epithelial cells contribute to gastric immune regulation by providing retinoic acid to dendritic cells. *Mucosal Immunol.*, 2016, vol. 8, no. 3, pp. 533–544. doi: 10.1038/mi.2014.86
5. Carbo A., Olivares-Villagomez D., Hontecillas R., Bassaganya-Riera J., Chaturvedi R., Piazuelo M.B., Delgado A., Washington M.K., Wilson K.T., Algood H.M. Systems modeling of the role of interleukin-21 in the maintenance of effector CD4⁺ T cell responses during chronic *Helicobacter pylori* infection. *MBio*, 2014, vol. 5: e01243-14. doi: 10.1128/mBio.01243-14
6. Caruso R., Fina D., Paoluzi O.A., Del Vecchio Blanco G., Stolfi 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, vol. 38, pp. 470–478. doi: 10.1002/eji.200737635
7. Danesh J. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: systematic review of the epidemiological studies. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 1999, vol. 13, pp. 851–856. doi: 10.1038/sj.bjc.6690444
8. 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, vol. 67, no. 9, pp. 4594–4602.
9. Evans-Marin H.L., Cao A.T., Yao S., Chen F., He C., Liu H., Wu W., Gonzalez M.G., Dann S.M., Cong Y. Unexpected regulatory role of CCR9 in regulatory T cell development. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 7: e0134100. doi: 10.1371/journal.pone.0134100
10. Graham D.Y., Opekun A.R., Osato M.S., El-Zimaity H.M., Lee C.K., Yamaoka Y., Qureshi W.A., Cadzow M., Monath T.P. Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. *Gut*, 2004, vol. 53, pp. 1235–1243. doi: 10.1136/gut.2003.037499
11. 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, vol. 81, pp. 740–752. doi: 10.1128/IAI.01269-12
12. Hutloff A., Dittrich A.M., Beier K.C., Eljaschewitsch B., Kraft R., Anagnostopoulos I., Kroczeck R.A. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*, 1999, vol. 397, no. 6716, pp. 263–266. doi: 10.1038/16717
13. Khamri W., Walker M.M., Clark P., Atherton J.C., Thursz M.R., Bamford K.B., Lechler R.I., Lombardi G. *Helicobacter pylori* stimulates dendritic cells to induce interleukin-17 expression from CD4⁺ T lymphocytes. *Infect. Immun.*, 2010, vol. 78, pp. 845–853. doi: 10.1128/IAI.00524-09
14. Kiriya K., Watanabe N., Nishio A., Okazaki K., Kido M., Saga K., Tanaka J., Akamatsu T., Ohashi S., Asada M., Fukui T., Chiba T. Essential role of Peyer's patches in the development of *Helicobacter*-induced gastritis. *Int. Immunol.*, 2007, vol. 19, no. 4, pp. 435–446. doi: 10.1093/intimm/dxm008
15. 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, vol. 7, no. 1, pp. 3–21. doi: 10.1080/19490976.2015.1116673
16. Kunkel E.J., Campbell J.J., Haraldsen G., Pan J., Boisvert J., Roberts A.I., Ebert E.C., Vierra M.A., Goodman S.B., Genovese M.C., Wardlaw A.J., Greenberg H.B., Parker C.M., Butcher E.C., Andrew D.P., Agace W.W. Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *J. Exp. Med.*, 2000, vol. 192, no. 5, pp. 761–768. doi: 10.1084/jem.192.5.761

17. Leber A., Abedi V., Hontecillas R., Viladomiu M., Hoops S., Ciupe S., Caughman J., Andrew T., Bassaganya-Riera J. Bistability analysis of CD4+ T follicular helper and regulatory cells during *Helicobacter pylori* infection. *J. Theor. Biol.*, 2016, vol. 398, pp. 74–84. doi: 10.1016/j.jtbi.2016.02.036
18. Lina T.T., Alzahani S., Gonzalez J., Pinchuk I.V., Beswick E.J., Reyes V.E. Immune evasion strategies used by *Helicobacter pylori*. *World J. Gastroenterol.*, 2014, vol. 20, no. 36, pp. 12753–12766. doi: 10.3748/wjg.v20.i36.12753
19. Ma C.S., Deenick E.K., Batten M., Tangye S.G. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J. Exp. Med.*, 2012, vol. 209, no. 7, pp. 1241–1253. doi: 10.1084/jem.20120994
20. Marshall B.J., Warren J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1984, vol. 1, no. 8390, pp. 1311–1315. doi: 10.1016/S0140–6736(84)91816-6
21. Matsumoto M., Yokoyama H., Suzuki H., Shiraishi-Yokoyama H., Hibi T. Retinoic acid formation from retinol in the human gastric mucosa: role of class IV alcohol dehydrogenase and its relevance to morphological changes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2005, vol. 289, no. 3, pp. G429–433. doi: 10.1152/ajpgi.00502.2004
22. Mora J.R., Iwata M., von Andrian U.H. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, vol. 8, no. 9, pp. 685–698. doi: 10.1038/nri2378
23. Moyat M., Velin D. Immune responses to *Helicobacter pylori* infection. *World J. Gastroenterol.*, 2014, vol. 20, no. 19, pp. 5583–5593. doi: 10.3748/wjg.v20.i19.5583
24. Nurgalieva 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, vol. 73, pp. 2999–3006. doi: 10.1128/IAI.73.5.2999-3006.2005
25. Papadakis K.A., Landers C., Prehn J., Kouroumalis E.A., Moreno S.T., Gutierrez-Ramos J.C., Hodge M.R., Targan S.R. CC chemokine receptor 9 expression defines a subset of peripheral blood lymphocytes with mucosal T cell phenotype and Th1 or T-regulatory 1 cytokine profile. *J. Immunol.*, 2003, vol. 171, no. 1, pp. 159–165. doi: 10.4049/jimmunol.171.1.159
26. 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, vol. 184, pp. 5121–5129. doi: 10.4049/jimmunol.0901115
27. 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, vol. 194, no. 9, pp. 4350–4361. doi: 10.4049/jimmunol.1401093
28. Suzuki T., Kato K., Ohara S., Noguchi K., Sekine H., Nagura H., Shimosegawa T. Localization of antigen-presenting cells in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *Pathol. Int.*, 2002, vol. 52, pp. 265–271.
29. 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, vol. 140, no. 6, pp. 1776–1784. doi: 10.1053/j.gastro.2011.02.015
30. 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, vol. 2, pp. 173–183. doi: 10.1038/mi.2008.84

Авторы:

Талаев В.Ю., д.м.н., профессор, зав. лабораторией клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Талаева М.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Воронина Е.В., младший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Заиченко И.Е., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Неумоина Н.В., к.м.н., главный врач Клиники инфекционных болезней ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Перфилова К.М., к.м.н., зам. главного врача Клиники инфекционных болезней ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;
Бабайкина О.Н., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия.

Authors:

Talayev V.Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Cellular Immunology, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Talaeva M.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Voronina E.V., Junior Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Zaichenko I.Ye., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Neumoina N.V., PhD (Medicine), Head Physician, Infectious Diseases Clinic, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Perfilova K.M., PhD (Medicine), Deputy Head Physician, Infectious Diseases Clinic, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Babaykina O.N., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

Поступила в редакцию 18.06.2018
 Отправлена на доработку 13.03.2019
 Принята к печати 26.03.2019

Received 18.06.2018
 Revision received 13.03.2019
 Accepted 26.03.2019