

АНТИГЕНСПЕЦИФИЧЕСКИЕ Т-ЛИМФОЦИТЫ В ГРУППАХ CD4⁺ КЛЕТОК, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ЭКСПРЕССИИ CCR6, У ЛИЦ, ИНФИЦИРОВАННЫХ И НЕИНФИЦИРОВАННЫХ *HELICOBACTER PYLORI*

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

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

Резюме. Введение. *Helicobacter pylori* способен инфицировать слизистую оболочку желудка человека и вызывать различные патологические состояния от бессимптомной инфекции до гастрита, язвенной болезни, аденокарциномы желудка и лимфомы лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой. Предполагается, что форма заболевания зависит от вирулентности возбудителя и ответа организма хозяина, однако роль отдельных групп клеток в иммунном ответе на *H. pylori*-инфекцию до конца не установлена. Ранее было показано, что в крови пациентов, инфицированных *H. pylori*, значительно возрастает содержание зрелых CD4⁺CCR6⁺ Т-лимфоцитов, причем в этой группе лимфоцитов увеличивается доля провоспалительных Т-хелперов 1 и 17 типов. Также известно, что хемокиновый рецептор CCR6 может направлять миграцию клеток из крови в воспаленную слизистую оболочку желудка. В этой работе мы оценили *in vitro* ответ циркулирующих CD4⁺CCR6⁺ и CD4⁺CCR6⁻ Т-клеток на антигены *H. pylori* у инфицированных и неинфицированных лиц. **Материалы и методы.** Из крови обследованных выделяли моноциты и лимфоциты. Моноциты инкубировали с *H. pylori* или без него. Затем оценивали экспрессию CD14, CD80 и CD86 на моноцитах, а также использовали моноциты для стимуляции сингенных лимфоцитов. Реакцию лимфоцитов на антиген оценивали по пролиферации и экспрессии активационного маркера OX40 на CD4⁺ Т-клетках, различающихся по экспрессии CCR6. **Результаты.** В предварительных экспериментах было показано, что инкубация с *H. pylori* вызывает умеренное усиление экспрессии костимулирующих молекул CD80 и CD86 на моноцитах и небольшое увеличение способности моноцитов стимулировать пролиферацию сингенных лимфоцитов. Оценка экспрессии OX40 в модели презентации антигенов *in vitro* показала, что CD4⁺ Т-лимфоциты крови инфицированных пациентов содержат выявляемое количество клеток, реагирующих активацией на антигены *H. pylori*. У пациентов с *H. pylori*-инфекцией CD4⁺CCR6⁺ субпопуляция лимфоцитов содержит большее количество клеток, специфичных к антигенам возбудителя, по сравнению с CD4⁺CCR6⁻ субпопуляцией. У доноров группы сравнения, не имеющих *H. pylori*-инфекции, презентация антигенов возбудителя в культурах клеток крови не оказывала существенного влияния на средние показатели активации CD4⁺ Т-лимфоцитов. **Заключение.** Кровь

Адрес для переписки:

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

Contacts:

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

Для цитирования:

Талаев В.Ю., Заиченко И.Е., Светлова М.В., Воронина Е.В.,
Бабайкина О.Н., Неумоина Н.В., Перфилова К.М.
Антигенспецифические Т-лимфоциты в группах CD4⁺ клеток,
различающихся по экспрессии CCR6, у лиц, инфицированных
и неинфицированных *Helicobacter pylori* // Инфекция и иммунитет. 2024.
Т. 14, № 6. С. 1087–1096. doi: 10.15789/2220-7619-HPC-17641

Citation:

Talayev V.Yu., Zaichenko I.Ye., Svetlova M.V., Voronina E.V., Babaykina O.N.,
Neumoina N.V., Perfilova K.M. Expression of CCR6 on *Helicobacter*
pylori-specific circulating CD4⁺ T cells // Russian Journal of Infection and
Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 6, pp. 1087–1096.
doi: 10.15789/2220-7619-HPC-17641

пациентов с *H. pylori*-инфекцией содержит CD4⁺ Т-клетки, реагирующие активацией на антигены *H. pylori*. CD4⁺CCR6⁺ Т-клетки крови пациентов с *H. pylori*-инфекцией, содержат большее количество антигенспецифических лимфоцитов по сравнению с CD4⁺CCR6⁻ Т-клетками.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, гастрит, Т-клетки, иммунный ответ, активация, хемокиновые рецепторы.

EXPRESSION OF CCR6 ON *HELICOBACTER PYLORI*-SPECIFIC CIRCULATING CD4⁺ T CELLS

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

Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Nizhniy Novgorod, Russian Federation

Abstract. *Introduction.* *Helicobacter pylori* can infect human gastric mucosa and cause various pathological conditions. In the blood of *H. pylori*-infected patients, the level of mature CD4⁺CCR6⁺ T-lymphocytes, especially pro-inflammatory CCR6⁺ T-helper types 1 and 17, significantly increases. Chemokine receptor CCR6 can direct cell migration from the blood into the inflamed gastric mucosa. In this work, we assessed the in vitro response of circulating CD4⁺CCR6⁺ and CD4⁺CCR6⁻ T cells against *H. pylori* antigens in infected and intact individuals. *Materials and methods.* Monocytes and lymphocytes were isolated from blood samples. Monocytes were incubated with or without *H. pylori*. Monocyte expression of CD14, CD80 and CD86 was assessed, and monocytes were also used to stimulate syngeneic lymphocytes. Antigen-specific lymphocyte response was assessed by proliferation and expression of the activation marker OX40 on CD4⁺CCR6⁺ and CD4⁺CCR6⁻ T cells. *Results.* Preliminary experiments have shown that incubation of monocytes with *H. pylori* causes a modestly increased expression of the costimulatory molecules CD80 and CD86 on monocytes and a slightly higher level of monocyte potential to stimulate syngeneic lymphocyte proliferation. Evaluation of OX40 expression in an *in vitro* antigen presentation model showed that blood CD4⁺ T lymphocytes from infected patients contain cells that are activated by *H. pylori* antigens. In patients with *H. pylori* infection, the CD4⁺CCR6⁺ vs CD4⁺CCR6⁻ lymphocyte subset contains a larger number of *H. pylori* antigen-specific cells. In the comparison group without *H. pylori* infection, the presentation of *H. pylori* antigens in blood cell cultures did not have a significant effect on the average rates of CD4⁺ T-lymphocyte activation. *Conclusion.* The blood of patients with *H. pylori* infection contains CD4⁺ T cells that are activated in the presence of *H. pylori* antigens. Blood CD4⁺CCR6⁺ vs CD4⁺CCR6⁻ T cells from patients with *H. pylori* infection contain a greater number of antigen-specific lymphocytes.

Key words: *Helicobacter pylori*, gastritis, T cells, immune response, activation, chemokine receptors.

Введение

Инфицирование слизистой желудка человека хеликобактером широко распространено во всем мире. Проявления этой инфекции разнообразны, и она может протекать бессимптомно или приводить к развитию различных, в том числе, опасных для жизни, заболеваний. *H. pylori* является одним из наиболее важных этиологических факторов развития гастрита типа В, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, аденокарциномы желудка и лимфомы лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой [4, 17]. Считается, что развитие различных форм *H. pylori*-инфекции зависит как от вирулентности микроорганизма, так и от индивидуальных особенностей макроорганизма, в частности, характера иммунного ответа. Иммунный ответ на эту инфекцию развивается быстро [10, 15, 18, 20], но может оказаться недостаточно эффективным для устранения возбудителя. Одной из возможных причин недостаточной эффективности ответа является способность *H. pylori* сдерживать развитие иммунных реакций и уклоняться от действия защитных факторов хозяина [15, 16]. Этот микроорганизм экспрессирует модифициро-

ванный, менее иммуногенный липополисахарид, нарушает миграцию и бактерицидное действие фагоцитов, его токсины и ферменты модулируют созревание и функцию дендритных клеток, угнетают активацию Т-клеток и клональную экспансию антигенспецифических Т-лимфоцитов [15, 16]. Наконец, важным механизмом уклонения от противоинфекционного иммунного ответа является индукция регуляторных Т-клеток [6, 7, 25, 26]. Показано, что индуцированные хеликобактером регуляторные Т-клетки ограничивают развитие антимикробного ответа и способствуют персистенции возбудителя, но, одновременно с этим, ослабляют воспаление в мышинной модели хеликобактерного гастрита [11, 12]. Напротив, антигенспецифические Т-хелперные клетки обладают определенным противоинфекционным действием и ограничивают распространение хеликобактера у лабораторных животных, но, в то же время, играют важнейшую роль в манифестации признаков гастрита [9, 11, 22]. У людей при *H. pylori*-ассоциированном гастрите наблюдается инфильтрация слизистой оболочки активированными Т-клетками [27], провоспалительными Т-хелперами первого типа (Th1) [8, 19] и противовоспалительными регуляторными

Т-клетками [6, 7, 25, 26]. Обогащение инфицированной слизистой этими лимфоцитами осуществляется за счет хемотаксиса из крови в слизистую под действием хемокинов, которые продуцируются эпителиоцитами желудка в ответ на воздействие микроорганизма. По-видимому, рецепторы для этих хемокинов Т-лимфоциты приобретают при вовлечении в иммунный ответ в Пейеровых бляшках тонкого кишечника, куда поступают антигены *H. pylori* с пищевыми массами из желудка. По крайней мере, в мышинной модели хеликобактериоза Пейеровы бляшки критически необходимы для развития клеточной инфильтрации и воспаления слизистой желудка [13]. Предполагается, что после созревания антигенспецифические Т-клетки покидают Пейеровы бляшки и выходят в кровоток, чтобы направленно мигрировать в инфицированную слизистую, используя хемокиновые рецепторы, приобретенные при созревании.

Среди многочисленных хемокинов, синтез которых *H. pylori* запускает в желудке [1], наибольший рост продукции наблюдается у CCL20 и IL-8 [5, 7, 27, 28]. Соответственно, при *H. pylori*-инфекции следует ожидать интенсивную миграцию из крови в слизистую клеток, экспрессирующих рецептор CCR6/CD196, который распознает хемокин CCL20. В гетерогенную группу CCR6⁺ клеток крови входят дендритные клетки, В-лимфоциты и часть CD4⁺ Т-лимфоцитов, включая наиболее зрелую часть циркулирующих регуляторных Т-клеток, большинство Th17, часть Th1, а также малочисленные Th1/Th17 и Th22 [7, 14, 23, 28, 30]. При *H. pylori*-инфекции наблюдается обогащение слизистой желудка CCR6⁺ дендритными клетками, В-лимфоцитами, CCR6⁺ Т-клетками с фенотипом зрелых активированных клеток памяти и CCR6⁺ регуляторными Т-клетками [7, 26, 27]. Эти наблюдения подтверждают значимость CCR6-опосредованной миграции в формировании специфического сообщества клеток иммунной системы в инфицированной слизистой. В данной работе для оценки участия циркулирующих CD4⁺CCR6⁺ Т-клеток в иммунном ответе на *H. pylori* мы сравнивали количество антигенспецифических клеток среди CD4⁺CCR6⁺ и CD4⁺CCR6⁻ клеток крови людей, инфицированных и неинфицированных *H. pylori*.

Материалы и методы

Исследование проведено в соответствии с положениями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека в качестве испытуемого» и одобрено локальным эти-

ческим комитетом ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной. Все обследованные дали информированное согласие на участие в исследовании. При исследовании действия *H. pylori* на фенотип моноцитов, пролиферацию лимфоцитов и сохранение экспрессии CCR6 *in vitro* использовалась кровь 15 взрослых здоровых доноров. При оценке индуцированной антигеном экспрессии активационных маркеров обследовали взрослых больных с подтвержденной *H. pylori*-инфекцией и диагнозом гастрит (N = 13, возраст — 42,58±3,23 года, мужчин — 53,84%) и взрослых доноров группы сравнения без *H. pylori*-инфекции (N = 7, возраст — 41,29±6,2 года, мужчин — 57,14%). Критериями исключения были прием гормональных препаратов, антибиотиков, иммуностимуляторов или вакцин в течение последнего месяца, аутоиммунные заболевания. Наличие *H. pylori* у больных подтверждали уреазным тестом и обнаружением ДНК возбудителя полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Отсутствие *H. pylori* у доноров группы сравнения устанавливали по отсутствию антигенов *H. pylori* в кале и антител к возбудителю в сыворотке крови. Для поиска антигенов использовали «N&R *H. pylori*. One Step *H. pylori* Antigen Test Device» (Vegal Farmaceutica S.L., Испания). Поиск антител проводили с помощью иммуноферментных тест-систем «ИФА-Хеликобактер-IgG», «ИФА-Хеликобактер-IgA» и «ИФА-Хеликобактер CagA-антитела» (АО «ЭКОлаб», Россия).

Для иммунологических экспериментов *in vitro* использовали суспензии *H. pylori* с общим содержанием бактерий 8×10^8 , которые были любезно предоставлены заведующим лабораторией А.В. Матвейчевым. *H. pylori* хранили при температуре минус 70°C в эмбриональной телячьей сыворотке (FCS) с 10% диметилсульфоксида (DMSO). Перед использованием, бактерии размораживались, однократно отмывались центрифугированием и ресуспендировались средой RPMI-1640 (Gibco, Великобритания). Содержание возбудителя в суспензиях определяли с помощью ПЦР в реальном времени при сравнении с разведениями заранее изготовленного стандартного образца с исходной концентрацией 3×10^7 *H. pylori*/мл (рис. 1). Для выделения ДНК использовали набор ПРОБА-НК (ДНК-технология, Россия), а для выполнения реакции — набор реагентов для ПЦР *Helicobacter pylori* (ДНК-технология, Россия) и прибор «Stratagene Mx3005P» (Agilent Technologies, США) в соответствии с инструкциями производителей. Для анализа результатов использовали пакет программ MxPro qPCR (Agilent Technologies, США). Морфологическую сохранность бактерий оценивали микроскопией мазков, окрашенных по Граму.

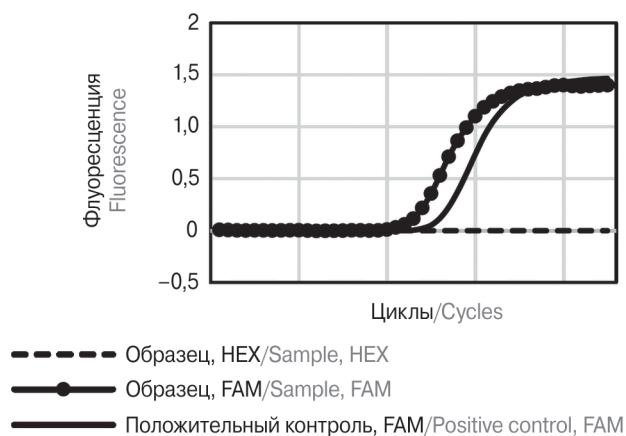


Рисунок 1. Пример результата ПЦР с ДНК из суспензии *H. pylori*

Figure 1. *H. pylori* suspension DNA PCR data

Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) выделяли центрифугированием над слоем Диаколл-1077 (Диа-М, Россия), дважды отмывали, и ресуспендировали в полной питательной среде (ППС) следующего состава: RPMI-1640 (Gibco, Великобритания) с 10% FCS (PAA Laboratories, Австрия). РВМС высевали в 48-луночные планшеты (Costar, США) по 2×10^6 клеток на лунку и инкубировали в течение 2 ч при $+37^\circ\text{C}$ и 5% CO_2 . Затем неприкрепившиеся лимфоциты собирали, подсчитывали и пересевали в свежие лунки. По разнице количества РВМС до адгезии и неприкрепившихся лимфоцитов после адгезии рассчитывали количество засеянных моноцитов. В работе использовали лунки с расчетным количеством моноцитов от 4×10^5 до 6×10^5 на лунку. Прикрепленные моноциты инкубировали в ППС без дополнительных стимуляторов или с добавлением *H. pylori* до концентраций от 10^4 до 10^7 бактерий/мл. Конечный объем среды в лунках составлял 0,5 мл. Моноциты культивировали при $+37^\circ\text{C}$ и 5% CO_2 в течение 20 или 44 ч и использовали для оценки фенотипа. Для этого клетки окрашивали флуоресцентно мечеными моноклональными антителами (mAb) к HLA-DR, CD14 (Сорбент, Россия), CD80 и CD86 (eBioscience, США). Анализ проводили на лазерном проточном цитофлуориметре «FacsCalibur» (BD, США), гейтируя моноциты по профилю прямого (FSC) и бокового светорассеивания (SSC) и наличию HLA-DR.

В других экспериментах моноциты, нагруженные антигенами *H. pylori*, использовали для стимуляции лимфоцитов в сингенной смешанной культуре. Для этого моноциты культивировали 20 ч без микроорганизмов или с *H. pylori* в концентрации 10^7 бактерий/мл, как это описано выше. Затем из культур отбирали среду с бактериями, моноциты осторожно промы-

вали теплой ППС и в каждую лунку вносили лимфоциты по 10^6 клеток в 0,5 мл ППС. Также засеивали контрольную лунку лимфоцитов без моноцитов. Клетки инкубировали 72 ч, собирали и окрашивали mAb к CD4 (Сорбент, Россия), CCR6 и CD134/OX40 (Elabscience, Китай). Затем клетки отмывали, фиксировали и анализировали на проточном цитофлуориметре «FacsCalibur», подсчитывая долю OX40⁺ клеток в гейтах CD4⁺CCR6⁺ и CD4⁺CCR6⁻ лимфоцитов.

Для оценки пролиферации лимфоциты перед засевом в смешанную культуру окрашивали эфиром карбоксифлуоресцеина сукцинимидила (CFSE). Для этого лимфоциты дважды отмывали забуференным фосфатом физиологическим раствором без Ca и Mg (PBS) и ресуспендировали в PBS до концентрации 10^7 клеток/мл. Непосредственно перед окрашиванием размораживали аликвоту 5 мМ раствора CFSE (eBioscience, США) на DMSO и разводили его стерильным PBS до концентрации 250 мкМ. К лимфоцитам добавляли CFSE до концентрации 2,5 мкМ и инкубировали 5 мин при $+37^\circ\text{C}$ и 5% CO_2 . Для остановки реакции к клеткам медленно добавляли 5 мл PBS, а затем 5 мл ППС, осторожно перемешивая. Клетки осаждали, однократно отмывали, ресуспендировали в ППС и засеивали в контрольные культуры и сингенные смешанные культуры с моноцитами, как это описано выше. Через 72 ч оценивали распределение CFSE в лимфоцитах с помощью проточного цитофлуориметра «FacsCalibur».

В отдельном эксперименте оценивали влияние моноцитов, нагруженных *H. pylori*, на сохранение рецептора CCR6 на мембране лимфоцитов. Для этого из РВМС выделяли CD4⁺CCR6⁺ Т-клетки с помощью магнитной сепарации, используя набор EasySep Human CD4⁺ T Cell Isolation Kit и реагенты CCR6⁺ Positive Selection Cocktail II, EasySep Releasable RapidSpheres 50201 и EasySep Release Buffer (Stemcell Technologies, Канада), как это было описано ранее [2]. Чистоту полученных клеток проверяли с помощью окрашивания mAb к CD4 (Сорбент, Россия) и CCR6 (Elabscience, Китай) и проточной цитофлуориметрии. Моноциты культивировали 20 ч без микроорганизмов или с *H. pylori* в концентрации 10^7 бактерий/мл, отмывали и в лунки с моноцитами вносили по $1,25 \times 10^5$ очищенных сингенных CD4⁺CCR6⁺ Т-клеток. Клетки культивировали 72 ч, окрашивали mAb к CCR6 и анализировали с помощью проточного цитофлуориметра «FacsCalibur», гейтируя лимфоциты по профилю FSC и SSC.

При статистическом анализе результатов антигенспецифической активации лимфоцитов использовали тест Фридмана для сравнения нескольких зависимых выборок и при отклоне-

нии нулевой гипотезы об отсутствии различий проводили сравнение пар выборок с помощью рангового теста согласованных пар Уилкоксона (далее в тексте — тест Уилкоксона). Кроме того использовали Т-тест Стьюдента для зависимых выборок и рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона.

Результаты

Исследовали ответ моноцитов и лимфоцитов на антигены *H. pylori* в условиях *in vitro*. Двухчасовое культивирование моноцитов крови взрослых здоровых доноров с *H. pylori* вызывало усиление экспрессии мембранных молекул CD80 и CD86, необходимых для дополнительной стимуляции Т-лимфоцитов в ходе презентации антигенов (так называемых костимулирующих молекул). Это усиление экспрессии проявлялось в росте геометрической средней интенсивности флуоресценции (GMFI) окрашенных молекул CD80 и CD86, а также в увеличении доли CD80⁺ клеток при максимальной использованной кон-

центрации *H. pylori* 10⁷ бактерий/мл (рис. 2А). Повышение GMFI образцов клеток, окрашенных в стандартных условиях, расценивалось нами как свидетельство увеличения среднего количества костимулирующих молекул на одной клетке. При культивировании часть моноцитов утрачивала свой линейный маркер CD14, однако этот процесс не зависел от наличия *H. pylori* в культуре. Также добавление *H. pylori* не влияло на экспрессию молекулы главного комплекса гистосовместимости II класса HLA-DR. Культивирование моноцитов с *H. pylori* в течение 44 ч не приводило к дополнительному росту экспрессии молекул, ассоциированных со стимуляцией лимфоцитов (рис. 2Б). В связи с этим в дальнейшей работе мы инкубировали моноциты 20 ч с *H. pylori* в концентрации 10⁷ бактерий/мл.

Для оценки пролиферации лимфоцитов использовали флуоресцентный краситель CFSE, который стойко окрашивает живые клетки и при делении разделяется между дочерними клетками, в результате чего флуоресценция потомков снижается (рис. 3А). Показано, что

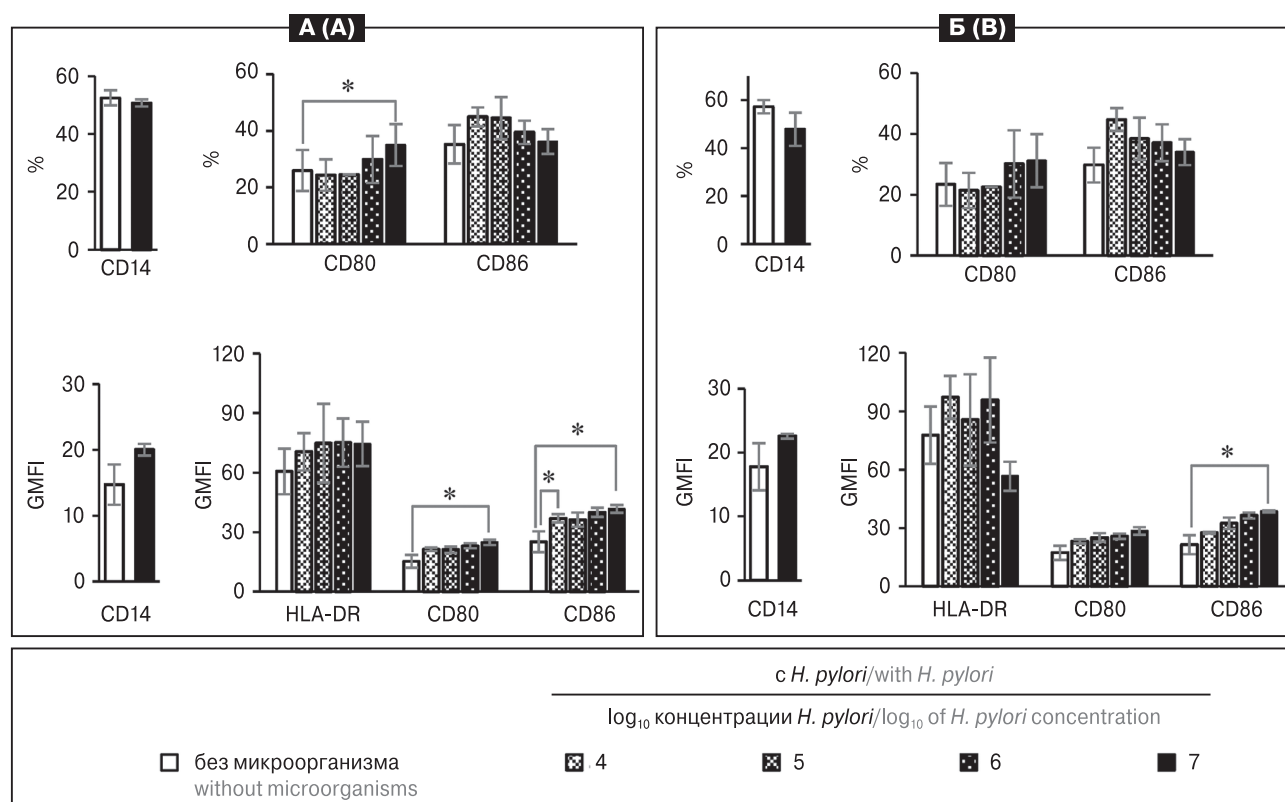


Рисунок 2. Экспрессия мембранных молекул на моноцитах через 20 (А) и 44 ч (Б) инкубирования с *H. pylori*

Figure 2. Expression of monocyte membrane molecules after 20 (A) and 44 hour (B) incubation with *H. pylori*

Примечание. Данные представлены как средняя±стандартная ошибка средней (M±SEM). Знак * показывает $p < 0,05$ в парном Т-тесте Стьюдента с поправкой Бонферрони.

Note. Data are presented as mean±standard error of the mean (M±SEM). Symbol * indicates $p < 0.05$ in paired Student's T-test with Bonferroni correction.

при культивировании лимфоцитов без моноцитов и стимуляторов в течение 72 ч в деление вступало менее 2% клеток. Совместное культивирование лимфоцитов с сингенными моноцитами более чем в 2 раза увеличивало количество делившихся лимфоцитов. Преинкубация моноцитов с *H. pylori* вызывала дополнительный небольшой, но статистически достоверный прирост количества делившихся лимфоцитов (рис. 3Б).

Поскольку в следующих экспериментах мы планировали оценить антигенспецифическую активацию Т-клеток *in vitro* в зависимости от экспрессии на них хемокинового рецептора

CCR6, мы выполнили дополнительный эксперимент, в котором показали, что культивирование Т-клеток без стимуляции или с моноцитами, нагруженными *H. pylori*, не приводит к утрате CCR6 с наружной мембраны лимфоцитов. Этот рецептор экспрессируется на значительном количестве CD4⁺ Т-лимфоцитов и на малом количестве CD8⁺ Т-клеток (рис. 3В). Для дополнительного эксперимента мы выделили CD4⁺CCR6⁺ Т-клетки с чистотой > 95% с помощью магнитной сепарации (рис. 3Г) и засеяли эти клетки в монокультуру и в смешанные сингенные культуры с моноцитами, нагруженными и не нагруженными *H. pylori*.

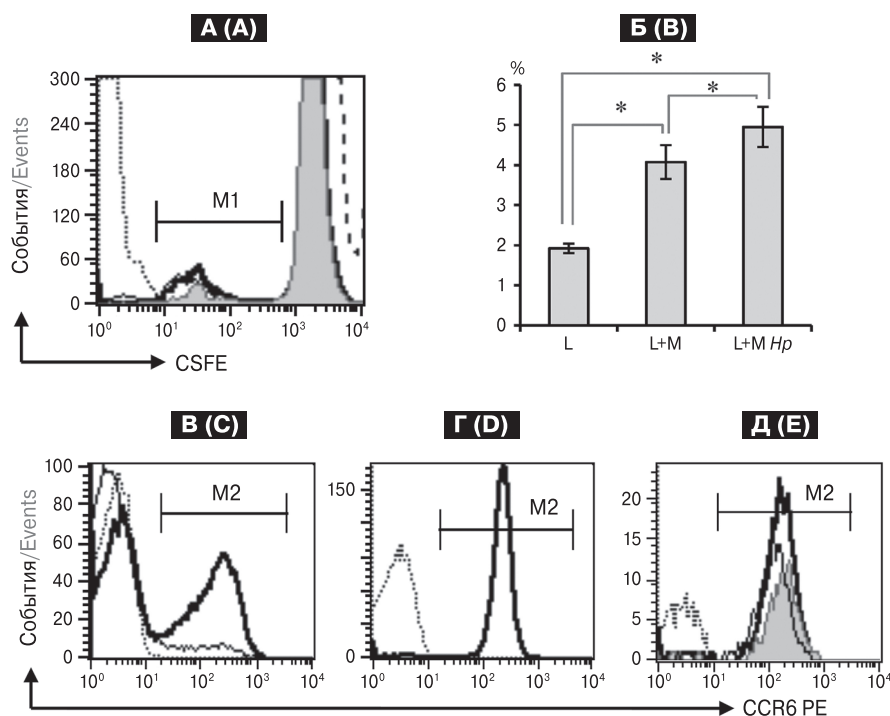


Рисунок 3. Моноциты, нагруженные *H. pylori*, усиливают пролиферацию лимфоцитов (А, Б), но не вызывают потерю рецептора CCR6 CD4⁺ Т-клетками (В-Д)

Figure 3. *H. pylori*-loaded monocytes promote lymphocyte proliferation (A, B) but cause no loss of CCR6 receptor in CD4⁺ cells (C-E)

Примечание. А) Краситель CFSE в лимфоцитах, росших без моноцитов (гистограмма с серым полем), и в лимфоцитах, росших с моноцитами, не нагруженными (тонкая черная линия) и нагруженными *H. pylori* (толстая черная линия). Отрезок M1 отмечает делившиеся клетки. Клетки, свежеекрасенные CFSE, обозначены пунктиром. Неокрашенные клетки здесь и на следующих графиках обозначены точечной линией. Б) Доля делившихся лимфоцитов в культурах лимфоцитов (L) и в смешанных культурах лимфоцитов с моноцитами, не нагруженными (L+M) и нагруженными *H. pylori* (L+M Hp). Данные представлены как M±SEM (N = 9). Знак * отмечает p < 0,01 в парном Т-тесте Стьюдента. Экспрессия CCR6 на CD4⁺ (толстая линия) и CD8⁺ (тонкая линия) лимфоцитах крови до разделения (В), на очищенных CCR6⁺CD4⁺ Т-клетках (толстая линия) непосредственно после выделения (Г) и через 3 суток культивирования без моноцитов (гистограмма с серым полем) или с моноцитами, ненагруженными (тонкая линия) и нагруженными *H. pylori* (толстая линия) (Д). Отрезки M2 отмечают CCR6⁺ клетки.

Note. A) CFSE dye in lymphocytes grown without monocytes (histogram shaded in gray) and in lymphocytes grown with unloaded (thin black line) and *H. pylori*-loaded (thick black line) monocytes. The M1 segment marks dividing cells. Cells freshly stained with CFSE are indicated by dash line. Unstained cells here and in the following plots are indicated by a dotted line. B) The percentage of dividing lymphocytes in lymphocyte cultures (L) and in mixed cultures of lymphocytes with monocytes, not loaded (L+M) and loaded with *H. pylori* (L+M Hp). Data are presented as M±SEM (N = 9). Symbol * indicates p < 0.01 in dependent Student's T-test. C) Expression of CCR6 on CD4⁺ (thick line) and CD8⁺ (thin line) blood lymphocytes before separation (C), on purified CD4⁺CCR6⁺ T cells (thick line) immediately after separation (D) and after 3 days of cultivation without monocytes (histogram with gray field) or with monocytes unloaded (thin line) and loaded with *H. pylori* (thick line) (E). The M2 segments mark CCR6⁺ cells.

Оценка фенотипа клеток через 72 ч культивирования показала, что лимфоциты полностью сохранили экспрессию CCR6 во всех трех типах культур, включая культуры с моноцитами, нагруженными *H. pylori* (рис. 3Д).

Для выявления антигенспецифических Т-клеток оценивали экспрессию маркера активации OX40 на CD4⁺CCR6⁺ и CD4⁺CCR6⁻ лимфоцитах крови при культивировании с моноцитами, нагруженными антигенами *H. pylori*. В качестве контрольных использовали культуры лимфоцитов, а также смешанные культуры лимфоцитов с моноцитами без антигенов возбудителя. В экспериментах использовались клетки крови пациентов с *H. pylori*-инфекцией и здоровых доноров, кровь которых не содержала антитела к возбудителю, а кал — антигены *H. pylori*. Показано, что в культурах клеток крови инфицированных пациентов антигены *H. pylori* увеличивали количество активированных CD4⁺ Т-лимфоцитов (рис. 4). У этих пациентов в контрольных культурах лимфоцитов маркер OX40 спонтанно экспрессировали 3,06±0,55% CD4⁺CCR6⁺ лимфоцитов и 0,55±0,18% CD4⁺CCR6⁻ лимфоцитов (здесь и далее в тексте данные приведены как M±SEM). Добавление

к лимфоцитам сингенных моноцитов без антигенов возбудителя усиливало экспрессию активационного маркера OX40. Использование моноцитов, нагруженных антигенами *H. pylori*, вызывало значительный дополнительный прирост количества OX40⁺ активированных клеток в обеих анализируемых субпопуляциях лимфоцитов инфицированных пациентов (рис. 4А). Индуцированный антигеном рост количества активированных клеток у инфицированных лиц обладал высоким уровнем статистической достоверности: вероятность отсутствия различий (показатель Р) доли активированных клеток в культурах с антигенами *H. pylori* и без них в тесте Уилкоксона составлял всего лишь p = 0,0024 для CD4⁺CCR6⁺ клеток и p = 0,0081 для CD4⁺CCR6⁻ клеток. Однако величина антиген-индуцированного прироста в двух субпопуляциях клеток заметно различалась. В субпопуляции CD4⁺CCR6⁺ лимфоцитов антигены *H. pylori* обуславливали прирост количества активированных клеток на 1,89±0,55%. В субпопуляции CD4⁺CCR6⁻ клеток этот показатель был значительно меньше (p = 0,0012 в тесте Уилкоксона) и составлял всего лишь 0,58±0,19%.

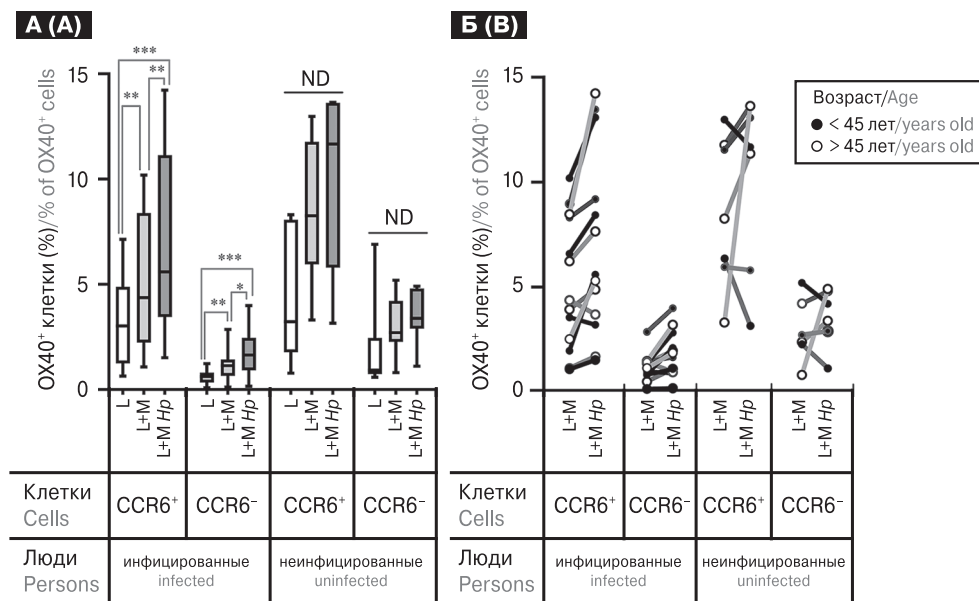


Рисунок 4. Доля активированных OX40⁺ лимфоцитов среди CD4⁺ Т-клеток, различающихся по экспрессии CCR6, в культурах лимфоцитов (L) и в смешанных культурах лимфоцитов с моноцитами, не нагруженными (L+M) и нагруженными антигенами *H. pylori* (L+M Hp)

Figure 4. Percentage of activated OX40⁺ CD4⁺ T cells with varying CCR6 expression level in lymphocyte cultures (L) and mixed lymphocyte cultures with monocytes loaded (L+M) or not with *H. pylori* antigens (L+M Hp)

Примечание. А) Медиана, нижний и верхний квартили, минимальное и максимальное значение представлены в виде коробчатой диаграммы. Результаты сравнения в ранговом тесте согласованных пар Уилкоксона показаны следующими знаками: *p < 0,01; **p < 0,005; ***p < 0,001. Б) Данные представлены в виде индивидуальных значений с разделением обследованных по возрасту.

Note. A) The box plot shows medians, lower and upper quartiles, minimum and maximum values. The comparison results in the Wilcoxon matched pairs rank test are shown by the following signs: *p < 0.01; **p < 0.005; ***p < 0.001. B) Data are presented as individual values. The subjects were divided by age.

В культурах клеток крови *H. pylori*-негативных доноров нагрузка моноцитов антигенами возбудителя не вызывала достоверного прироста количества OX40⁺ клеток ни среди CD4⁺CCR6⁺ лимфоцитов, ни среди CD4⁺CCR6⁻ лимфоцитов (рис. 4А). Анализ индивидуальных значений показал, что среди *H. pylori*-негативных доноров были люди, лимфоциты которых ответили на антигены *H. pylori* увеличением доли OX40⁺ клеток, а также люди, у которых доля активированных клеток под действием антигенов снижалась. Интересно, что у трех *H. pylori*-негативных доноров, имеющих возраст 47, 60 и 61 год, лимфоциты ответили на антиген увеличением доли OX40⁺ клеток, причем это увеличение наблюдалось в обеих анализируемых субпопуляциях лимфоцитов (рис. 4Б). Остальные неинфицированные обследованные имели возраст 40 и менее лет, и из них лишь у одного был зарегистрирован небольшой антигениндуцированный рост количества активированных клеток среди CD4⁺CCR6⁺ лимфоцитов, тогда как у остальных доноров антигены возбудителя вызывали снижение доли активированных клеток в обеих субпопуляциях лимфоцитов. В результате, в группе *H. pylori*-негативных доноров коэффициент корреляции возраста с *H. pylori*-индуцированным изменением количества активированных клеток составил 0,73 для субпопуляции CD4⁺CCR6⁺ лимфоцитов и 0,77 для субпопуляции CD4⁺CCR6⁻ лимфоцитов, что говорит о прямой связи возраста и количества CD4⁺ Т-лимфоцитов, отвечающих активацией на антигены *H. pylori*. В группе инфицированных пациентов, у подавляющего большинства обследованных наблюдался активационный ответ лимфоцитов на антигены *H. pylori*, и связь возраста и характера ответа на антиген не прослеживалась (коэффициенты корреляции: -0,18908633 для CD4⁺CCR6⁺ клеток и -0,097448579 — для CD4⁺CCR6⁻ клеток).

Обсуждение

Ранее мы показали, что при *H. pylori*-инфекции в крови значительно увеличивается содержание зрелых CD4⁺CCR6⁺ Т-лимфоцитов [3], и в этой группе лимфоцитов возрастает доля провоспалительных Th1, Th17 и Th1/Th17 [2]. Для определения вовлеченности CCR6⁺ Т-клеток в иммунный ответ на *H. pylori* в данной работе оценивали способность этих клеток распознавать антигены возбудителя. В ходе подготовительных экспериментов было показано, что моноциты реагируют на *H. pylori* небольшим усилением экспрессии костимулирующих

молекул CD80 и CD86 и ростом способности стимулировать пролиферацию сингенных лимфоцитов. Однако прирост пролиферации, индуцированный антигенами *H. pylori*, был небольшим, что затрудняло определение фенотипа активированных антигеном клеток. В связи с этим для идентификации CD4⁺ Т-клеток, реагирующих на антигены *H. pylori*, мы применили определение экспрессии молекулы OX40, которая используется в качестве маркера активации CD4⁺ Т-лимфоцитов, отдельно или в сочетании с определением других активационных молекул, таких как CD25, CD137 или PD-L1 [21, 24, 29]. В модели презентации антигенов в сингенных смешанных культурах было показано, что CD4⁺ Т-лимфоциты крови инфицированных пациентов содержат выявляемое количество клеток, реагирующих активацией на антигены *H. pylori*. Сравнение CD4⁺CCR6⁺ и CD4⁺CCR6⁻ лимфоцитов инфицированных пациентов показало, что CCR6⁺ субпопуляция содержит значительно большее количество лимфоцитов, специфичных к антигенам возбудителя. У доноров группы сравнения, не имеющих *H. pylori*-инфекции на момент обследования, презентация антигенов возбудителя не влияла на средние показатели активации CD4⁺ Т-лимфоцитов в смешанных культурах клеток крови. При этом индивидуальная реакция Т-клеток доноров на антигены *H. pylori* различалась и зависела от возраста обследованных. У лиц среднего и пожилого возраста в крови были обнаружены CD4⁺ Т-клетки, реагирующие активацией на антигены возбудителя, тогда как у доноров молодого возраста преобладало небольшое подавление активации Т-клеток в присутствии антигенов *H. pylori*. Мы предполагаем, что наличие антигенспецифических Т-клеток в крови *H. pylori*-негативных доноров среднего и пожилого возраста свидетельствует о сохранении этими лицами клеточной иммунной памяти о предшествующих контактах с *H. pylori*, несмотря на отсутствие у этих доноров антигенспецифических антител в крови. Для подтверждения этого предположения требуется проведение более масштабного и длительного исследования.

Заключение

Кровь пациентов с *H. pylori*-инфекцией содержит CD4⁺ Т-клетки, реагирующие активацией на антигены *H. pylori*. CD4⁺CCR6⁺ Т-клетки крови пациентов с *H. pylori*-инфекцией, содержат большее количество антигенспецифических лимфоцитов по сравнению с CD4⁺CCR6⁻ Т-клетками.

Список литературы/References

1. Талаев В.Ю., Бабайкина О.Н., Светлова М.В. Результаты взаимодействия эпителия желудка с *Helicobacter pylori*: повреждение клеток, участие эпителиоцитов в иммунном ответе, канцерогенез // Иммунология. 2021. Т. 42, № 5. С. 62–70. [Talayev V.Yu., Babaykina O.N., Svetlova M.V. Results of the interaction of gastric epithelium with *Helicobacter pylori*: cell damage, participation of epithelial cells in the immune response, carcinogenesis. *Immunologiya = Immunologiya*, 2021, vol. 42, no. 5, pp. 62–70. (In Russ.)] doi: 10.33029/0206-4952-2021-42-5-0-01
2. Талаев В.Ю., Светлова М.В., Заиченко И.Е., Воронина Е.В., Бабайкина О.Н., Неумоина Н.В., Перфилова К.М., Уткин О.В., Филатова Е.Н. Цитокиновый профиль CCR6⁺ Т-хелперов, выделенных из крови пациентов с язвенной болезнью, ассоциированной с *H. pylori*-инфекцией // Современные технологии в медицине. 2020. Т. 12, № 3. С. 33–40. [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 = Modern Technologies in Medicine*, 2020, vol. 12, no. 3, pp. 33–40. (In Russ.)] doi: 10.17691/stm2020.12.3.04
3. 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. [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. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 295–303. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-295-303
4. Camilo V., Sugiyama T., Touati E. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 2017, vol. 22 (suppl. 1): e12405. doi: 10.1111/hel.12405
5. Chen J.-P., Wu M.-S., Kuo S.-H., Liao F. IL-22 negatively regulates *Helicobacter pylori*-induced CCL20 expression in gastric epithelial cells. *PLoS One*, 2014, vol. 9: e97350. doi: 10.1371/journal.pone.0097350
6. Cheng H.H., Tseng G.Y., Yang H.B., Wang H.J., Lin H.J., Wang W.C. Increased numbers of Foxp3-positive regulatory T cells in gastritis, peptic ulcer and gastric adenocarcinoma. *World J. Gastroenterol.*, 2012, vol. 18, no. 1, pp. 34–43. doi: 10.3748/wjg.v18.i1.34
7. Cook K.W., Letley D.P., Ingram R.J., Staples E., Skjoldmose H., Atherton J.C., Robinson K. CCL20/CCR6-mediated migration of regulatory T cells to the *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Gut*, 2014, vol. 63, no. 10, pp. 1550–1559. doi: 10.1136/gutjnl-2013-306253
8. D’Elios M.M., Czinn S.J. Immunity, inflammation, and vaccines for *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 2014, vol. 19 (s1), pp. 19–26. doi: 10.1111/hel.12156
9. Eaton K.A., Mefford M., Thevenot T. The role of T cell subsets and cytokines in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* gastritis in mice. *J. Immunol.*, 2001, vol. 166, no. 12, pp. 7456–7461. doi: 10.4049/jimmunol.166.12.7456
10. Graham D.Y., Opekun A.R., Osato M.S., El-Zimaity H.M., Lee C.K., Yamaoka Y., Qureshi W.A., Cadoz M., Monath T.P. Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. *Gut*, 2004, vol. 53, no. 9, 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, no. 3, pp. 740–752. doi: 10.1128/IAI.01269-12
12. Kao J.Y., Zhang M., Miller M.J., Mills J.C., Wang B., Liu M., Eaton K.A., Zou W., Berndt B.E., Cole T.S., Takeuchi T., Owyang S.Y., Luther J. *Helicobacter pylori* immune escape is mediated by dendritic cell-induced Treg skewing and Th17 suppression in mice. *Gastroenterology*, 2010, vol. 138, no. 3, pp. 1046–1054. doi: 10.1053/j.gastro.2009.11.043
13. 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
14. Kleinewietfeld M., Puentes F., Borsellino G., Battistini L., Röttschke O., Falk K. CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25⁺CD4⁺ T-cell subset. *Blood*, 2005, vol. 105, no. 7, pp. 2877–2886. doi: 10.1182/blood-2004-07-2505
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, pp. 3–21. doi: 10.1080/19490976.2015.1116673
16. Lina T.T., Alzahrani 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, pp. 12753–12766. doi: 10.3748/wjg.v20.i36.12753
17. Marshall B.J., Warren J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1984, vol. 1, pp. 1311–1315. doi: 10.1016/s0140-6736(84)91816-6
18. Moyat M., Velin D. Immune responses to *Helicobacter pylori* infection. *World J. Gastroenterol.*, 2014, vol. 20, pp. 5583–5593. doi: 10.3748/wjg.v20.i19.5583
19. Müller A., Solnick J.V. Inflammation, immunity, and vaccine development for *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 2011, vol. 16 (s1), pp. 26–32. doi: 10.1111/j.1523-5378.2011.00877.x
20. 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, no. 5, pp. 2999–3006. doi: 10.1128/IAI.73.5.2999-3006.2005
21. Reiss S., Baxter A.E., Cirelli K.M., Dan J.M., Morou A., Daigneault A., Brassard N., Silvestri G., Routy J.P., Havenar-Daughton C., Crotty S., Kaufmann D.E. Comparative analysis of activation induced marker (AIM) assays for sensitive identification of antigen-specific CD4 T cells. *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 10: e0186998. doi: 10.1371/journal.pone.0186998

22. Roth K., Kapadia S., Martin S., Lorenz R. Cellular immune responses are essential for the development of *Helicobacter felis*-associated gastric pathology. *J. Immunol.*, 1999, vol. 163, no. 3, pp. 1490–1497.
23. 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
24. Tarke A., Sidney J., Methot N., Yu E.D., Zhang Y., Dan J.M., Goodwin B., Rubiro P., Sutherland A., Wang E., Frazier A., Ramirez S.I., Rawlings S.A., Smith D.M., da Silva Antunes R., Peters B., Scheuermann R.H., Weiskopf D., Crotty S., Grifoni A., Sette A. Impact of SARS-CoV-2 variants on the total CD4⁺ and CD8⁺ T cell reactivity in infected or vaccinated individuals. *Cell. Rep. Med.*, 2021, vol. 2, no. 7: 100355. doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100355
25. Wu Y.-Y., Chen J.H., Kao J.T., Liu K.C., Lai C.H., Wang Y.M., Hsieh C.T., Tzen J.T., Hsu P.N. Expression of CD25(high) regulatory T cells and PD-1 in gastric infiltrating CD4(+) T lymphocytes in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2011, vol. 18, no. 7, pp. 1198–1201. doi: 10.1128/CVI.00422-10
26. Wu Y.-Y., Hsieh C.-T., Tsay G.J., Kao J.-T., Chiu Y.-M., Shieh D.-C., Lee Y.-J. Recruitment of CCR6⁺ Foxp3⁺ regulatory gastric infiltrating lymphocytes in *Helicobacter pylori* gastritis. *Helicobacter*, 2019, vol. 24, no. 1: e12550. doi: 10.1111/hel.12550
27. Wu Y.-Y., Tsai H.-F., Lin W.-C., Hsu P.-I., Shun C.-T., Wu M.-S., Hsu P.-N. Upregulation of CCL20 and recruitment of CCR6⁺ gastric infiltrating lymphocytes in *Helicobacter pylori* gastritis. *Infect. Immun.*, 2007, vol. 75, no. 9, pp. 4357–4363. doi: 10.1128/IAI.01660-06
28. Yoshida A., Isomoto H., Hisatsune J., Nakayama M., Nakashima Y., Matsushima K., Mizuta Y., Hayashi T., Yamaoka Y., Azuma T., Moss J., Hirayama T., Kohno S. Enhanced expression of CCL20 in human *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Clin. Immunol.*, 2009, vol. 130, no. 3, pp. 290–297. doi: 10.1016/j.clim.2008.09.016
29. Zaunders J.J., Munier M.L., Seddiki N., Pett S., Ip S., Bailey M., Xu Y., Brown K., Dyer W.B., Kim M., de Rose R., Kent S.J., Jiang L., Breit S.N., Emery S., Cunningham A.L., Cooper D.A., Kelleher A.D. High levels of human antigen-specific CD4⁺ T cells in peripheral blood revealed by stimulated coexpression of CD25 and CD134 (OX40). *J. Immunol.*, 2009, vol. 183, no. 4, pp. 2827–2836. doi: 10.4049/jimmunol.0803548
30. Zhang K., Chen L., Zhu C., Zhang M., Liang C. Current knowledge of Th22 cell and IL-22 functions in infectious diseases. *Pathogens*, 2023, vol. 12, no. 2: 176. doi: 10.3390/pathogens12020176

Авторы:

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

Authors:

Talayev V.Yu., DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Cellular Immunology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Zaichenko I.Ye., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Svetlova M.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Voronina E.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;
Babaykina O.N., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific 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.