

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

Талаев В. Ю. ¹,
Заиченко И. Е. ¹,
Светлова М. В. ¹,
Воронина Е. В. ¹,
Бабайкина О. Н. ¹,
Неумоина Н. В. ¹,
Перфилова К. М. ¹

¹ ФБУН Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия.

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

Talayev V. Yu. ^a,

Zaichenko I. Ye. ^a,

Svetlova M. V. ^a,

Voronina E. V. ^a,

Babaykina O. N. ^a,

Neumoina N. V. ^a,

Perfilova K. M. ^a

^a Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Russian Federal Consumer Rights Protection and Human Health Control Service.

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 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 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 антиген-специфических лимфоцитов по сравнению с CD4⁺CCR6⁻ Т-клетками.

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

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 detectable number becoming 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 donors from comparison group lacking *H. pylori* infection, the presentation of *H. pylori* antigens in blood cell cultures and no significant effect on average CD4⁺ T-lymphocyte activation rates.

Conclusion. The blood samples from patients with *H. pylori* infection contains CD4⁺ T cells becoming specifically 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.

Keywords: Helicobacter pylori, gastritis, T cells, immune response, activation, chemokine receptors.

1 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 модифицированный, 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 антиген-специфических 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, антиген-специфические Т-хелперные клетки обладают определенным противоинфекционным действием и ограничивают распространение хеликобактера у лабораторных животных, но, в то же время, играют важнейшую роль в манифестации

30 признаков гастрита [9, 11, 22]. У людей при *H. pylori*-ассоциированном
 31 гастрите наблюдается инфильтрация слизистой оболочки активированными Т-
 32 клетками [27], провоспалительными Т-хелперами первого типа (Th1) [8, 19] и
 33 противовоспалительными регуляторными Т-клетками [6, 7, 25, 26].
 34 Обогащение инфицированной слизистой этими лимфоцитами осуществляется
 35 за счет хемотаксиса из крови в слизистую под действием хемокинов, которые
 36 продуцируются эпителиоцитами желудка в ответ на воздействие
 37 микроорганизма. По-видимому, рецепторы для этих хемокинов Т-лимфоциты
 38 приобретают при вовлечении в иммунный ответ в Пейеровых бляшках тонкого
 39 кишечника, куда поступают антигены *H. pylori* с пищевыми массами из
 40 желудка. По крайней мере, в мышинной модели хеликобактериоза Пейеровы
 41 бляшки критически необходимы для развития клеточной инфильтрации и
 42 воспаления слизистой желудка [13]. Предполагается, что после созревания
 43 антиген-специфические Т-клетки покидают Пейеровы бляшки и выходят в
 44 кровоток, чтобы направленно мигрировать в инфицированную слизистую,
 45 используя хемокиновые рецепторы, приобретенные при созревании.

46 Среди многочисленных хемокинов, синтез которых *H. pylori* запускает в
 47 желудке [1], наибольший рост продукции наблюдается у CCL20 и IL-8 [5, 7,
 48 27, 28]. Соответственно, при *H. pylori*-инфекции следует ожидать
 49 интенсивную миграцию из крови в слизистую клеток, экспрессирующих
 50 рецептор CCR6/CD196, который распознает хемокин CCL20. В гетерогенную
 51 группу CCR6⁺ клеток крови входят дендритные клетки, В-лимфоциты и часть
 52 CD4⁺ Т-лимфоцитов, включая наиболее зрелую часть циркулирующих
 53 регуляторных Т-клеток, большинство Th17, часть Th1, а также малочисленные
 54 Th1/Th17 и Th22 [7, 14, 23, 28, 30]. При *H. pylori*-инфекции наблюдается
 55 обогащение слизистой желудка CCR6⁺ дендритными клетками, В-
 56 лимфоцитами, CCR6⁺ Т-клетками с фенотипом зрелых активированных клеток
 57 памяти и CCR6⁺ регуляторными Т-клетками [7, 26, 27]. Эти наблюдения
 58 подтверждают значимость CCR6-опосредованной миграции в формировании

59 специфического сообщества клеток иммунной системы в инфицированной
 60 слизистой. В данной работе для оценки участия циркулирующих CD4⁺CCR6⁺
 61 Т-клеток в иммунном ответе на *H. pylori* мы сравнивали количество антиген-
 62 специфических клеток среди CD4⁺CCR6⁺ и CD4⁺CCR6⁻ клеток крови людей,
 63 инфицированных и неинфицированных *H. pylori*.

64 2 Материалы и методы

65 Исследование проведено в соответствии с положениями Хельсинкской
 66 декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы
 67 проведения научных медицинских исследований с участием человека в
 68 качестве испытуемого» и одобрено локальным этическим комитетом ФБУН
 69 ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной. Все обследованные дали
 70 информированное согласие на участие в исследовании. При исследовании
 71 действия *H. pylori* на фенотип моноцитов, пролиферацию лимфоцитов и
 72 сохранение экспрессии CCR6 *in vitro* использовалась кровь 15 взрослых
 73 здоровых доноров. При оценке индуцированной антигеном экспрессии
 74 активационных маркеров обследовали взрослых больных с подтвержденной
 75 *H. pylori*-инфекцией и диагнозом гастрит (N=13, возраст – 42,58±3,23 года,
 76 мужчин – 53,84%) и взрослых доноров группы сравнения без *H. pylori*-
 77 инфекции (N=7, возраст – 41,29±6,2 года, мужчин – 57,14%). Критериями
 78 исключения были прием гормональных препаратов, антибиотиков,
 79 иммуностимуляторов или вакцин в течение последнего месяца, диагноз
 80 аутоиммунных заболеваний. Наличие *H. pylori* у больных подтверждали
 81 уреазным тестом и обнаружением ДНК возбудителя полимеразной цепной
 82 реакцией (ПЦР). Отсутствие *H. pylori* у доноров группы сравнения
 83 устанавливали по отсутствию антигенов *H. pylori* в кале и антител к
 84 возбудителю в сыворотке крови. Для поиска антигенов использовали «H&R *H.*
 85 *pylori*. One Step *H. pylori* Antigen Test Device» (Vegal Farmaceutica S.L.,
 86 Испания). Поиск антител проводили с помощью иммуноферментных тест-

87 систем «ИФА-Хеликобактер-IgG», «ИФА-Хеликобактер-IgA» и «ИФА-
88 Хеликобактер CagA-антитела» (АО ЭКОлаб, Россия).

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

106 Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) выделяли
107 центрифугированием над слоем Диаколл-1077 («Диа-М», Россия), дважды
108 отмывали, и ресуспендировали в полной питательной среде (ППС)
109 следующего состава: RPMI-1640 («Gibco», Великобритания) с 10% FCS (РАА
110 Laboratories, Австрия). РВМС высевали в 48-луночные планшеты (Costar,
111 США) по $2 \cdot 10^6$ клеток на лунку и инкубировали в течение 2 часов при $+37^\circ\text{C}$
112 и 5% CO_2 . Затем не прикрепившиеся лимфоциты собирали, подсчитывали и
113 пересевали в свежие лунки. По разнице количества РВМС до адгезии и не
114 прикрепившиеся лимфоцитов после адгезии рассчитывали количество
115 засеянных моноцитов. В работе использовали лунки с расчетным количеством

116 моноцитов от $4 \cdot 10^5$ до $6 \cdot 10^5$ на лунку. Прикрепленные моноциты
 117 инкубировали в ППС без дополнительных стимуляторов или с добавлением *H.*
 118 *pylori* до концентраций от 10^4 до 10^7 бактерий/мл. Конечный объем среды в
 119 лунках составлял 0,5 мл. Моноциты культивировали при $+37^\circ\text{C}$ и 5% CO_2 в
 120 течение 20 или 44 часов и использовали для оценки фенотипа. Для этого
 121 клетки окрашивали флуоресцентно мечеными моноклональными
 122 антителами (mAb) к HLA-DR, CD14 (Сорбент, Россия), CD80 и CD86
 123 (eBioscience, США). Анализ проводили на лазерном проточном
 124 цитофлуориметре FACS Calibur (BD, США), гейтируя моноциты по профилю
 125 прямого (FSC) и бокового светорассеивания (SSC) и наличию HLA-DR.

126 В других экспериментах моноциты, нагруженные антигенами *H. pylori*,
 127 использовали для стимуляции лимфоцитов в сингенной смешанной культуре.
 128 Для этого моноциты культивировали 20 часов без микроорганизмов или с *H.*
 129 *pylori* в концентрации 10^7 бактерий/мл, как это описано выше. Затем из
 130 культур отбирали среду с бактериями, моноциты осторожно промывали
 131 теплой ППС и в каждую лунку вносили лимфоциты по 10^6 клеток в 0,5 мл
 132 ППС. Также засекали контрольную лунку лимфоцитов без моноцитов. Клетки
 133 инкубировали 72 часа, собирали и окрашивали mAb к CD4 (Сорбент, Россия),
 134 CCR6 и CD134/OX40 (Elabscience, Китай). Затем клетки отмывали,
 135 фиксировали и анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Calibur,
 136 подсчитывая долю OX40⁺ клеток в гейтах CD4⁺CCR6⁺ и CD4⁺CCR6⁻
 137 лимфоцитов.

138 Для оценки пролиферации лимфоциты перед засевом в смешанную
 139 культуру окрашивали эфиром карбоксифлуоресцеина сукцинимидила (CFSE).
 140 Для этого лимфоциты дважды отмывали забуференным фосфатами
 141 физиологическим раствором без Ca и Mg (PBS) и ресуспендировали в PBS до
 142 концентрации 10^7 клеток/мл. Непосредственно перед окрашиванием
 143 размораживали аликвоту 5 мМ раствора CFSE (eBioscience, США) на DMSO и
 144 разводили его стерильным PBS до концентрации 250 мкМ. К лимфоцитам

145 добавляли CFSE до концентрации 2,5 мкМ и инкубировали 5 мин. при +37°C
146 и 5% CO₂. Для остановки реакции к клеткам медленно добавляли 5 мл PBS, а
147 затем, 5 мл ППС, осторожно перемешивая. Клетки осаждали, однократно
148 отмывали, ресуспендировали в ППС и заседали в контрольные культуры и
149 сингенные смешанные культуры с моноцитами, как это описано выше. Через
150 72 часа оценивали распределение CFSE в лимфоцитах с помощью проточного
151 цитофлюориметра FACS Calibur.

152 В отдельном эксперименте оценивали влияние моноцитов, нагруженных
153 *H. pylori*, на сохранение рецептора CCR6 на мембране лимфоцитов. Для этого
154 из РВМС выделяли CD4⁺CCR6⁺ Т-клетки с помощью магнитной сепарации,
155 используя набор EasySep Human CD4⁺ T Cell Isolation Kit и реагенты CCR6⁺
156 Positive Selection Cocktail II, EasySep Releasable RapidSpheres 50201 и EasySep
157 Release Buffer (Stemcell technologies, Канада), как это было описано ранее [2].
158 Чистоту полученных клеток проверяли с помощью окрашивания mAb к CD4
159 (Сорбент, Россия) и CCR6 (Elabscience, Китай) и проточной
160 цитофлюориметрии. Моноциты культивировали 20 часов без
161 микроорганизмов или с *H. pylori* в концентрации 10⁷ бактерий/мл, отмывали,
162 и в лунки с моноцитами вносили по 1,25·10⁵ очищенных сингенных
163 CD4⁺CCR6⁺ Т-клеток. Клетки культивировали 72 часа, окрашивали mAb к
164 CCR6 и анализировали с помощью проточного цитофлюориметра FACS Calibur,
165 гейтируя лимфоциты по профилю FSC и SSC.

166 При статистическом анализе результатов антиген-специфической
167 активации лимфоцитов использовали тест Фридмана для сравнения
168 нескольких зависимых выборок и, при отклонении нулевой гипотезы об
169 отсутствии различий, проводили сравнение пар выборок с помощью рангового
170 теста согласованных пар Уилкоксона (далее в тексте – тест Уилкоксона).
171 Кроме того использовали Т-тест Стьюдента для зависимых выборок и
172 рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона.

173 3 Результаты

174 Исследовали ответ моноцитов и лимфоцитов на антигены *H. pylori* в
175 условиях *in vitro*. Двадцатичасовое культивирование моноцитов крови
176 взрослых здоровых доноров с *H. pylori* вызывало усиление экспрессии
177 моноцитами мембранных молекул CD80 и CD86, необходимых для
178 дополнительной стимуляции Т-лимфоцитов в ходе презентации антигенов
179 (так называемых костимулирующих молекул). Это усиление экспрессии
180 проявлялось в росте геометрической средней интенсивности флюоресценции
181 (GMFI) окрашенных молекул CD80 и CD86, а также в увеличении доли CD80⁺
182 клеток при максимальной использованной концентрации *H. pylori* 10⁷
183 бактерий/мл (рис. 2А). Повышение GMFI образцов клеток, окрашенных в
184 стандартных условиях, расценивалось нами как свидетельство увеличения
185 среднего количества костимулирующих молекул на одной клетке. При
186 культивировании часть моноцитов утрачивала свой линейный маркер CD14,
187 однако этот процесс не зависел от наличия *H. pylori* в культуре. Также
188 добавление *H. pylori* не влияло на экспрессию молекулы главного комплекса
189 гистосовместимости II класса HLA-DR. Культивирование моноцитов с *H.*
190 *pylori* в течение 44 часов не приводило к дополнительному росту экспрессии
191 молекул, ассоциированных со стимуляцией лимфоцитов (рис. 2Б). В связи с
192 этим в дальнейшей работе мы инкубировали моноциты 20 часов с *H. pylori* в
193 концентрации 10⁷ бактерий/мл.

194 Для оценки пролиферации лимфоцитов использовали флюоресцентный
195 краситель CFSE, который стойко окрашивает живые клетки и при делении
196 разделяется между дочерними клетками, в результате чего флюоресценция
197 потомков снижается (рис. 3А). Показано, что при культивировании
198 лимфоцитов без моноцитов и стимуляторов в течение 72 часов в деление
199 вступало менее 2% клеток. Совместное культивирование лимфоцитов с
200 сингенными моноцитами более чем в 2 раза увеличивало количество
201 делившихся лимфоцитов. Преинкубация моноцитов с *H. pylori* вызывала

202 дополнительный небольшой, но статистически достоверный прирост
203 количества делившихся лимфоцитов (рис. 3Б).

204 Поскольку в следующих экспериментах мы планировали оценить
205 антигенспецифическую активацию Т-клеток *in vitro* в зависимости от
206 экспрессии на них хемокинового рецептора CCR6, мы выполнили
207 дополнительный эксперимент, в котором показали, что культивирование Т-
208 клеток без стимуляции или с моноцитами, нагруженными *H. pylori*, не
209 приводит к утрате CCR6 с наружной мембраны лимфоцитов. Этот рецептор
210 экспрессируется на значительном количестве CD4⁺ Т-лимфоцитов и на малом
211 количестве CD8⁺ Т-клеток (рис. 3В). Для дополнительного эксперимента мы
212 выделили CD4⁺CCR6⁺ Т-клетки с чистотой >95% с помощью магнитной
213 сепарации (рис. 3Г) и засеяли эти клетки в монокультуру и в смешанные
214 сингенные культуры с моноцитами нагруженными и не нагруженными *H.*
215 *pylori*. Оценка фенотипа клеток через 72 часа культивирования показала, что
216 лимфоциты полностью сохранили экспрессию CCR6 во всех трех типах
217 культур, включая культуры с моноцитами, нагруженными *H. pylori* (рис. 3Д).

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

231 антигенов возбудителя усиливало экспрессию активационного маркера OX40.
232 Использование моноцитов, нагруженных антигенами *H. pylori*, вызывало
233 значительный дополнительный прирост количества OX40⁺ активированных
234 клеток в обеих анализируемых субпопуляциях лимфоцитов инфицированных
235 пациентов (рис. 4А). Индуцированный антигеном рост количества
236 активированных клеток у инфицированных лиц обладал высоким уровнем
237 статистической достоверности: вероятность отсутствия различий (показатель
238 P) доли активированных клеток в культурах с антигенами *H. pylori* и без них в
239 тесте Уилкоксона составлял всего лишь $p=0,0024$ для CD4⁺CCR6⁺ клеток и
240 $p=0,0081$ для CD4⁺CCR6⁻ клеток. Однако, величина антиген-индуцированного
241 прироста в двух субпопуляциях клеток заметно различалась. В субпопуляции
242 CD4⁺CCR6⁺ лимфоцитов антигены *H. pylori* обуславливали прирост количества
243 активированных клеток на $1,89\pm 0,55\%$. В субпопуляции CD4⁺CCR6⁻ клеток этот
244 показатель был значительно меньше ($p=0,0012$ в тесте Уилкоксона) и составлял
245 всего лишь $0,58\pm 0,19\%$.

246 В культурах клеток крови *H. pylori*-негативных доноров нагрузка
247 моноцитов антигенами возбудителя не вызывала достоверного прироста
248 количества OX40⁺ клеток ни среди CD4⁺CCR6⁺ лимфоцитов, ни среди
249 CD4⁺CCR6⁻ лимфоцитов (рис. 4А). Анализ индивидуальных значений показал,
250 что среди *H. pylori*-негативных доноров были люди, лимфоциты которых
251 ответили на антигены *H. pylori* увеличением доли OX40⁺ клеток, а также люди,
252 у которых доля активированных клеток под действием антигенов снижалась.
253 Интересно, что у трех *H. pylori*-негативных доноров, имеющих возраст 47, 60 и
254 61 год лимфоциты ответили на антиген увеличением доли OX40⁺ клеток,
255 причем это увеличение наблюдалось в обеих анализируемых субпопуляциях
256 лимфоцитов (рис. 4Б). Остальные неинфицированные обследованные имели
257 возраст 40 и менее лет, и из них лишь у одного был зарегистрирован небольшой
258 антиген-индуцированный рост количества активированных клеток среди
259 CD4⁺CCR6⁺ лимфоцитов, тогда как у остальных доноров антигены возбудителя

260 вызывали снижение доли активированных клеток в обеих субпопуляциях
261 лимфоцитов. В результате, в группе *H. pylori*-негативных доноров коэффициент
262 корреляции возраста с *H. pylori*-индуцированным изменением количества
263 активированных клеток составил 0,73 для субпопуляции CD4⁺CCR6⁺
264 лимфоцитов и 0,77 для субпопуляции CD4⁺CCR6⁻ лимфоцитов, что говорит о
265 прямой связи возраста и количества CD4⁺ Т-лимфоцитов, отвечающих
266 активацией на антигены *H. pylori*. В группе инфицированных пациентов, у
267 подавляющего большинства обследованных наблюдался активационный ответ
268 лимфоцитов на антигены *H. pylori*, и связь возраста и характера ответа на
269 антиген не прослеживалась (коэффициенты корреляции: -0,18908633 для
270 CD4⁺CCR6⁺ клеток и -0,097448579 – для CD4⁺CCR6⁻ клеток).

271 4 Обсуждение

272 Ранее мы показали, что при *H. pylori*-инфекции в крови значительно
273 увеличивается содержание зрелых CD4⁺CCR6⁺ Т-лимфоцитов [3], и в этой
274 группе лимфоцитов возрастает доля провоспалительных Th1, Th17 и Th1/Th17
275 [2]. Для определения вовлеченности CCR6⁺ Т-клеток в иммунный ответ на *H.*
276 *pylori* в данной работе оценивали способность этих клеток распознавать
277 антигены возбудителя. В ходе подготовительных экспериментов было
278 показано, что моноциты реагируют на *H. pylori* небольшим усилением
279 экспрессии костимулирующих молекул CD80 и CD86 и ростом способности
280 стимулировать пролиферацию сингенных лимфоцитов. Однако прирост
281 пролиферации, индуцированный антигенами *H. pylori*, был небольшим, что
282 затрудняло определение фенотипа активированных антигеном клеток. В связи
283 с этим, для идентификации CD4⁺ Т-клеток, реагирующих на антигены *H.*
284 *pylori*, мы применили определение экспрессии молекулы OX40, которая
285 используется в качестве маркера активации CD4⁺ Т-лимфоцитов, отдельно или
286 в сочетании с определением других активационных молекул, таких как CD25,
287 CD137 или PD-L1 [21, 24, 29]. В модели презентации антигенов в сингенных
288 смешанных культурах было показано, что CD4⁺ Т-лимфоциты крови

289 инфицированных пациентов содержат выявляемое количество клеток,
290 реагирующих активацией на антигены *H. pylori*. Сравнение CD4⁺CCR6⁺ и
291 CD4⁺CCR6⁻ лимфоцитов инфицированных пациентов показало, что CCR6⁺
292 субпопуляция содержит значительно большее количество лимфоцитов,
293 специфичных к антигенам возбудителя. У доноров группы сравнения, не
294 имеющих *H. pylori*-инфекции на момент обследования, презентация антигенов
295 возбудителя не влияла на средние показатели активации CD4⁺ Т-лимфоцитов
296 в смешанных культурах клеток крови. При этом индивидуальная реакция Т-
297 клеток доноров на антигены *H. pylori* различалась и зависела от возраста
298 обследованных. У лиц среднего и пожилого возраста в крови были
299 обнаружены CD4⁺ Т-клетки, реагирующие активацией на антигены
300 возбудителя, тогда как у доноров молодого возраста преобладало небольшое
301 подавление активации Т-клеток в присутствии антигенов *H. pylori*. Мы
302 предполагаем, что наличие антигенспецифических Т-клеток в крови *H. pylori*-
303 негативных доноров среднего и пожилого возраста свидетельствует о
304 сохранении этими лицами клеточной иммунной памяти о предшествующих
305 контактах с *H. pylori*, несмотря на отсутствие у этих доноров
306 антигенспецифических антител в крови. Для подтверждения этого
307 предположения требуется проведение более масштабного и длительного
308 исследования.

309 5 Заключение

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

РИСУНКИ

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

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

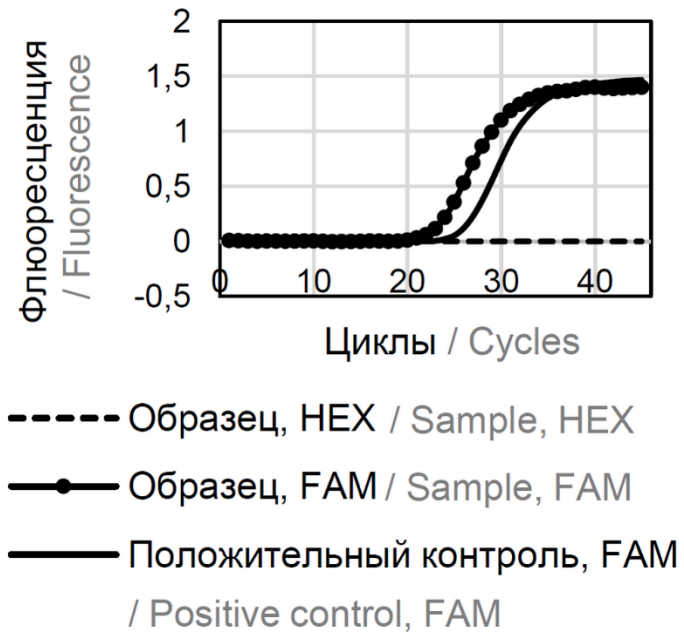
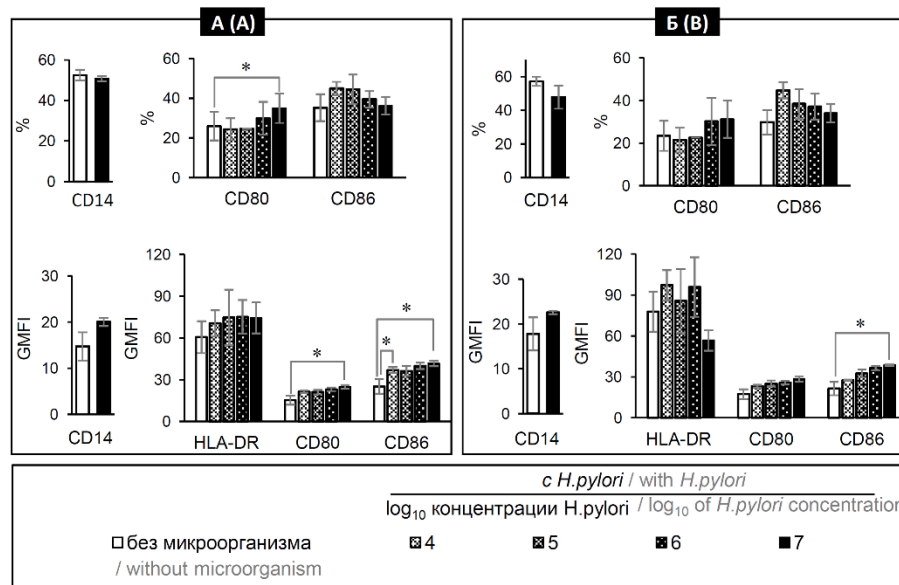


Рисунок 2. Экспрессия мембранных молекул на моноцитах через 20 (А) и 44 часа (Б) инкубирования с *H. Pylori*.

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

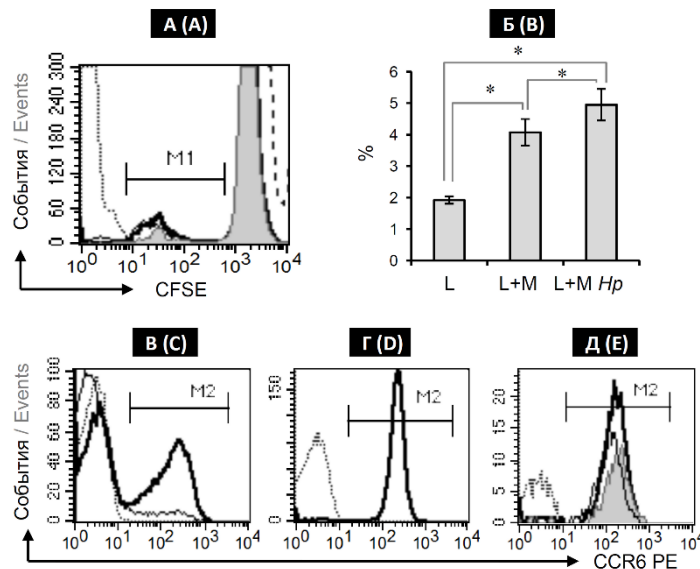


Примечание. Данные представлены как средняя \pm стандартная ошибка средней ($M \pm SEM$). Знак * показывает $p < 0,05$ в парном Т-тесте Стьюдента с поправкой Бонферрони.

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

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).



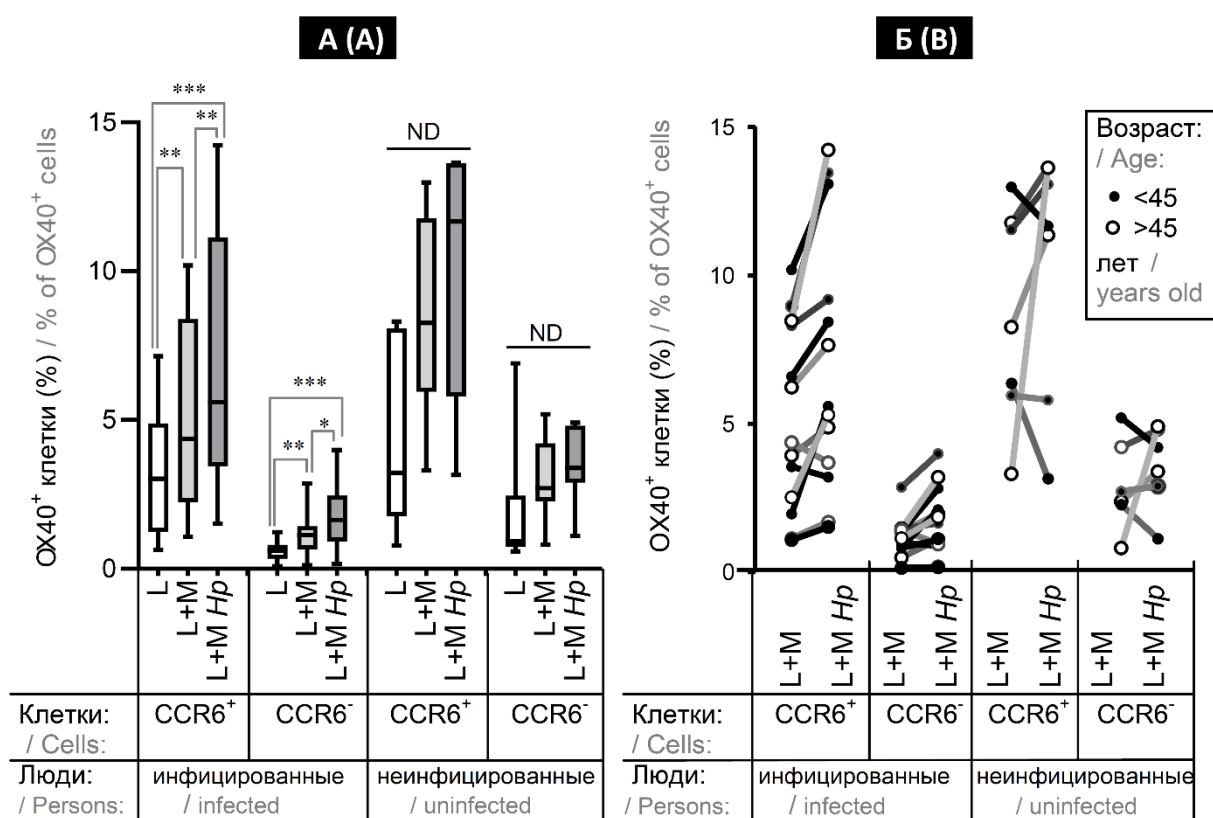
Примечание. А) Краситель CFSE в лимфоцитах, росших без моноцитов, (гистограмма с серым полем) и в лимфоцитах, росших с моноцитами, не нагруженными (тонкая черная линия) и нагруженными *H. pylori* (толстая черная линия). Отрезок М1 отмечает делившиеся клетки. Клетки, свежеекрасенные CFSE, обозначены пунктиром. 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 $M \pm SEM$ (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 М2 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.

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 квантили, 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.

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Талаев Владимир Юрьевич, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией клеточной иммунологии;

Федеральное бюджетное учреждение науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека;

адрес: ФБУН ННИИЭМ им.академика И.Н.Блохиной Роспотребнадзора, 603950, БОКС 145, г. Нижний Новгород, ул. М. Ямская, д. 71;

телефон: 8(831)469-79-48;

e-mail: talaev@inbox.ru

Talayev Vladimir Yurevich, DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Cellular Immunology;

Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Russian Federal Consumer Rights Protection and Human Health Control Service;

address: Academician I.N. Blokhina NNSRIEM of Rospotrebnadzor, 603950, BOX 145, M. Yamskaya str. 71, Nizhny Novgorod, Russia;

telephone: 8(831)469-79-48;

e-mail: talaev@inbox.ru

Блок 2. Информация об авторах

Заиченко И.Е., к.б.н., в.н.с. лаборатории клеточной иммунологии ФБУН
ННИИЭМ им.академика И.Н.Блохиной Роспотребнадзора

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

Светлова М.В., к.б.н., с.н.с. лаборатории клеточной иммунологии ФБУН
ННИИЭМ им.академика И.Н.Блохиной Роспотребнадзора

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

Воронина Е.В., к.б.н., с.н.с. лаборатории клеточной иммунологии ФБУН
ННИИЭМ им.академика И.Н.Блохиной Роспотребнадзора

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

Бабайкина О.Н., к.м.н., с.н.с. лаборатории клеточной иммунологии ФБУН
ННИИЭМ им.академика И.Н.Блохиной Роспотребнадзора

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

Неумоина Н.В., к.м.н., главный врач Клиники инфекционных болезней ФБУН
ННИИЭМ им.академика И.Н.Блохиной Роспотребнадзора

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

Перфилова К.М., к.м.н., зам. главного врача Клиники инфекционных болезней ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н.Блохиной Роспотребнадзора

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

Блок 3. Метаданные статьи

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

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

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ОТВЕТ Т-КЛЕТОК НА *H. PYLORI*
T-CELL RESPONSE TO *H. PYLORI*

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

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

Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 11, количество таблиц – 0, количество рисунков – 4.

18.04.2024

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или ее doi.
1	Талаев В.Ю., Бабайкина О.Н., Светлова М.В. Результаты взаимодействия эпителия желудка с <i>Helicobacter pylori</i> : 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 <i>Helicobacter pylori</i> : cell damage, participation of epithelial cells in the immune response, carcinogenesis. Immunologiya, 2021, vol. 42, no. 5, pp. 62-70.	[doi: 10.33029/0206-4952-2021-42-5-0-0 1]

2	<p>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.</p>	<p>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. <i>Sovremennye tehnologii v medicine</i>, 2020;vol. 12, no.3, pp. 33–40.</p>	<p>[doi: 10.17691/stm2020.12.3.04]</p>
3	<p>Талаев В.Ю., Талаева М.В., Воронина Е.В., Заиченко И.Е., Неумоина Н.В., Перфилова К.М.,</p>	<p>Talayev V.Yu., Talaeyva M.V., Voronina E.V.,</p>	<p>[doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-295-303]</p>

	<p>Бабайкина О.Н. Экспрессия хемокиновых рецепторов на Т-хелперах крови при заболеваниях, ассоциированных с <i>Helicobacter pylori</i>: хроническом гастродуодените и язвенной болезни // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 295–303.</p>	<p>Zaichenko I.Ye., Neumoina N.V., Perfilova K.M., Babaykina O.N. Chemokine receptor expression on peripheral blood T-helper cells in <i>Helicobacter pylori</i>-associated diseases: chronic gastroduodenitis and peptic ulcer disease. Russian Journal of Infection and Immunity, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 295–303.</p>	
4	<p>Camilo V., Sugiyama T., Touati E. Pathogenesis of <i>Helicobacter pylori</i> infection. <i>Helicobacte.</i>, 2017;22(Suppl 1):e12405.</p>	-	[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; 9: e97350.		[doi: 10.1371/journal.pone.0097350]
6	Cheng HH., Tseng GY., Yang HB., Wang HJ., Lin HJ., Wang WC. 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 <i>Helicobacter pylori</i> gastritis in mice. <i>J. Immunol.</i> , 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 <i>Helicobacter pylori</i> infection in human volunteers. <i>Gut</i> , 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 <i>Helicobacter pylori</i> gastritis in mice. <i>Infect. Immun.</i> , 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. <i>Helicobacter pylori</i> immune escape is mediated by dendritic cell-	-	[doi: 10.1053/j.gastro.2009.11.043]

	induced Treg skewing and Th17 suppression in mice. <i>Gastroenterology</i> , 2010; vol. 138, no.3, pp. 1046–1054.		
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. <i>Int. Immunol.</i> , 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. <i>Blood</i> , 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	-	[doi: 10.1080/19490976.2015.1116673]

	to <i>Helicobacter pylori</i> at the interface between pathogenicity and symbiosis. <i>Gut microbes</i> , 2016; vol. 7, pp. 3–21.		
16	Lina T.T., Alzahrani S., Gonzalez J., Pinchuk I.V., Beswick E.J., Reyes V.E. Immune evasion strategies used by <i>Helicobacter pylori</i> . <i>World J. Gastroenterol.</i> , 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. <i>Lancet</i> , 1984, vol 1, pp. 1311-1315.	-	[doi: 10.1016/s0140-6736(84)91816-6]
18	Moyat M., Velin D. Immune responses to <i>Helicobacter pylori</i> infection. <i>World J. Gastroenterol.</i> , 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 <i>Helicobacter pylori</i> . <i>Helicobacter</i> , 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 <i>Helicobacter pylori</i> infection in humans. <i>Infect. Immun.</i> , 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. <i>PLoS One</i> , 2017, vol. 12 (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 <i>Helicobacter felis</i> -associated gastric pathology. <i>J. Immunol.</i> , 1999, vol.163, no.3, pp. 1490–1497.	-	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10415051

23	Singh SP., Zhang H.H., Tsang H., Gardina PJ, Myers T.G., Nagarajan V. Lee CH., Farber J.M. PLZF regulates CCR6 and is critical for the acquisition and maintenance of the Th17 phenotype in human cells. <i>J Immunol.</i> , 2015, vol. 194, no.9, pp. 4350–4361.	-	[doi: 10.4049/jimmunol.1401093]
24	Tarke A., Sidney J., Methot N., Yu ED, Zhang Y., Dan J.M., Goodwin B., Rubiro P., Sutherland A., Wang E., Frazier A., Ramirez S.I., Rawlings S.A., Smith DM, 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. <i>Cell Rep Med.</i> , 2021, vol. 2, (7):100355.	-	[doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100355]
25	Wu Y-Y., Chen JH., Kao JT., Liu KC., Lai CH, Wang YM., Hsieh CT., Tzen JT., Hsu PN. Expression of CD25(high) regulatory T cells and PD-1 in gastric infiltrating CD4(+) T lymphocytes in patients with	-	[doi: 10.1128/CVI.00422-10]

	Helicobacter pylori infection. Clin Vaccine Immunol., 2011, vol. 18, no.7 , pp. 1198-1201.		
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, (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	-	[doi: 10.1016/j.clim.2008.09.016]

	Helicobacter pylori-associated gastritis. Clin Immunol., 2009, vol. 130, no. 3, pp. 290–297.		
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, pp 176.	-	[doi: 10.3390/pathogens12020176]