

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ»**

На правах рукописи

**БАРКОВСКАЯ МАРГАРИТА ШАМИЛЕВНА**

**Длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом и  
субпопуляционный состав Т-клеток памяти при бронхиальной  
астме**

14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология»

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук,  
профессор, академик РАН  
Козлов В. А.

Новосибирск 2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	15
1.1. Бронхиальная астма .....	15
1.1.1. Распространенность бронхиальной астмы.....	15
1.1.2. Фенотипическая классификация бронхиальной астмы.....	17
1.1.3. Современные представления о патогенезе бронхиальной астмы.....	21
1.1.3.1. Патогенетические механизмы бронхиальной астмы, связанной с участием Т-хелперов 2 типа.....	22
1.1.3.2. Патогенетические механизмы бронхиальной астмы без активного участия Т-хелперов 2 типа.....	23
1.1.3.3. Роль генетических, эпигенетических и других факторов в патогенезе бронхиальной астмы .....	25
1.2. Клетки памяти .....	28
1.2.1. Фенотипические и функциональные характеристики Т-клеток памяти .....	29
1.2.2. Механизмы поддержания численности Т-клеток памяти .....	31
1.2.3. Клетки памяти при иммунопатологических заболеваниях.....	34
1.3. Теломеры в норме и при патологии .....	36
1.3.1. Структура и поддержание длины теломер в клетках человека .....	37
1.3.2. Современные методы изучения длины теломер .....	42
1.3.3. Средняя длина теломер и длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом .....	45
1.3.4. Влияние генетических и средовых факторов на длину теломер .....	49
1.3.5. Изменение длины теломер при основных заболеваниях человека.....	51
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	55
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	67
3.1. Разработка программного обеспечения .....	67
3.1.1. Нормировка и коррекция изменений интенсивности сигналов Q-FISH .....	69
3.1.2. Выделение изображений хромосом.....	70

3.1.3. Выделение изображений теломер .....	71
3.1.4. Определение принадлежности теломер к хромосомам .....	71
3.1.5. Измерение интенсивности отдельных сигналов с теломер .....	72
3.2. Модификация условий Q-FISH .....	73
3.3. Валидизация программного обеспечения и модифицированной методики Q-FISH для оценки длины теломерных последовательностей на индивидуальных хромосомах у пациентов с иммунопатологией .....	74
3.3.1. Валидизация процедуры выравнивания интенсивности сигнала Q-FISH.....	75
3.3.2. Сравнение способов оценки интенсивности фонового сигнала .....	76
3.3.3. Валидизация методических условий .....	78
3.4. Характеристика длины теломер при бронхиальной астме .....	81
3.4.1. Особенности распределения теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом у пациентов с бронхиальной астмой и здоровых доноров .....	82
3.4.2. Длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом в зависимости от формы и длительности течения бронхиальной астмы .....	87
3.4.3. Укорочение теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом с возрастом .....	93
3.5. Характеристика Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов при бронхиальной астме.....	97
3.5.1. Фенотипический состав Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов при бронхиальной астме .....	97
3.5.2. Фенотипический состав Т-клеток памяти при различных формах бронхиальной астмы .....	100
3.5.3. Фенотипический состав Т-клеток памяти в зависимости от длительности течения бронхиальной астмы .....	103
3.5.4. Взаимосвязь между длиной теломер отдельных хромосом и содержанием Т-клеток памяти .....	107
3.5.5. Изменение субпопуляционного состава Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в ответ на поликлональную стимуляцию <i>in vitro</i> .....	109

## 3.5.6. Пролиферативная активность Т-клеток памяти и наивных

Т-лимфоцитов при поликлональной активации <i>in vitro</i> .....	114
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	118
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	137
ВЫВОДЫ .....	140
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	142
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	144

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

Бронхиальная астма — распространенное заболевание, которое хорошо охарактеризовано клинически и сопровождается повторяющимися эпизодами свистящих хрипов, одышки, кашля и чувством заложенности в груди, особенно в ночные и ранние утренние часы. Клинические проявления бронхиальной астмы вызваны обструкцией дыхательных путей, обратимой спонтанно или под действием лечения [1]. В настоящее время в мире насчитывается около 300 млн. больных с верифицированным диагнозом бронхиальной астмы во всех возрастных категориях. Существующая ступенчатая медикаментозная терапия астмы предполагает достижение полного контроля над заболеванием, тем не менее ежегодно в мире от астмы и её последствий умирает 250 000 человек [2]. Несмотря на эпидемиологические исследования последних лет, которые показывают сокращение роста возникновения новых случаев бронхиальной астмы в развитых странах, распространенность заболевания во всем мире продолжает оставаться высокой, а также ожидается прирост его случаев в ближайшие годы, связанный с активным процессом урбанизации в развивающихся странах [3, 4]. Перечисленные особенности бронхиальной астмы в сочетании с социальным и экономическим бременем, возлагаемым данным заболеванием на общество и систему здравоохранения, делают его глобальной проблемой [1].

С точки зрения патогенеза бронхиальная астма представляет собой хроническое иммуноопосредованное заболевание дыхательных путей, в котором принимают участие различные иммунокомпетентные клетки и их медиаторы. Ключевая роль в патогенезе бронхиальной астмы отводится Т-лимфоцитам, которые являются регуляторами процессов эозинофильного воспаления и выработки IgE В-лимфоцитами [1, 5]. Участие различных видов Т-лимфоцитов в развитии бронхиальной астмы связывают с клинической неоднородностью данного заболевания [6, 7]. Также сформировано мнение о существовании разных

фенотипов бронхиальной астмы в зависимости от возраста манифестации заболевания и выраженности эозинофильного воспаления [8, 9].

Главной способностью Т-лимфоцитов является развитие иммунного ответа на антигенные стимулы в виде пролиферации специфического клона клеток с последующим его сокращением и формированием иммунологической памяти. Иммунологическая память реализуется центральными клетками памяти ( $CD45R0^{+}CCR7^{+}$ ), которые за счет экспрессии молекул хоуминга на своей поверхности занимают Т-зоны вторичных лимфоидных органов и могут осуществлять пролиферацию и дифференцировку в эффекторные клетки в ответ на повторное воздействие антигена. Также иммунологическая память опосредована эффекторными Т-лимфоцитами памяти ( $CD45R0^{+}CCR7^{-}$ ) благодаря их способности к миграции и выполнению эффекторных функций на периферии. Кроме того, выделяют субпопуляцию терминально-дифференцированных Т-лимфоцитов памяти ( $CD45RA^{+}$ ), среди которых преобладают  $CD8^{+}$ -клетки с высоким содержанием перфорины [10]. С возрастом количество клеток памяти увеличивается в норме, тогда как численность наивных Т-лимфоцитов ( $CD45R0^{-}$ ) уменьшается. Это происходит за счет снижения выхода тимических предшественников из-за возрастной инволюции тимуса и вследствие перехода наивных Т-лимфоцитов в клетки с фенотипом центральных Т-лимфоцитов памяти в процессе гомеостатической пролиферации (ГП) [11]. Поддержание соотношения центральных, эффекторных Т-лимфоцитов памяти и наивных Т-клеток может нарушаться не только с возрастом, но и при иммунопатологии, в том числе при бронхиальной астме [12] и ревматоидном артрите [13]. Последние экспериментальные данные показали, что резидентные аллерген-специфичные Т-клетки памяти могут накапливаться в легочной ткани в результате сенсibilизации и, возможно, приводить к развитию бронхиальной астмы [14]. Также у пациентов с астмой обнаружено повышенное содержание  $CD4^{+}$  эффекторных Т-клеток памяти, которое сопровождается такими функциональными изменениями, как повышение продукции IL-5, IL-17 и снижение синтеза IFN- $\gamma$  [15]. Одним из функциональных показателей Т-клеток

памяти является их пролиферативный потенциал, который снижен по сравнению с наивными Т-лимфоцитами [16]. Снижение пролиферативного потенциала центральных Т-клеток памяти подтверждается данными о снижении средней длины теломер в  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-лимфоцитах памяти по сравнению с наивными Т-клетками [16, 17].

Теломеры – это нуклеопротеиновые структуры, которые находятся на концах хромосом и служат защитой от «репликативного старения» в результате деления клетки [18, 19]. Длина теломер в соматических клетках является важным показателем, так как отражает пролиферативную историю клетки. Несмотря на способность к продукции теломеразы, в лимфоцитах периферической крови с возрастом длина теломер уменьшается [20]. Также показано снижение средней длины теломер в лимфоцитах периферической крови при ревматоидном артрите, atopическом дерматите и бронхиальной астме [21, 22]. Ряд авторов находит связь между уменьшением средней длины теломер и формой бронхиальной астмы, а также её тяжестью и продолжительностью [23–25]. К настоящему моменту известен факт, что количество теломерных повторов в клетке распределено неравномерно и отличается на плечах различных хромосом [26]. Это позволяет задуматься о роли укороченных теломер индивидуальных хромосом в патогенезе иммуноопосредованных заболеваний. Распределение длины теломер на плечах индивидуальных хромосом получило название теломерного профиля, который является индивидуальной наследуемой величиной [27]. Однако исследований длины теломерных последовательностей на отдельных плечах индивидуальных хромосом при различных заболеваниях человека в мировой литературе мало. Ранее была продемонстрирована связь уменьшения длины теломерных последовательностей отдельных хромосом с некоторыми онкологическими заболеваниями и ревматоидным артритом [28–30]. При бронхиальной астме такие данные отсутствуют. В связи с чем представляется актуальным изучение данного показателя в сопоставлении с субпопуляционным составом и пролиферативной активностью Т-клеток памяти у пациентов с различными формами и длительностью течения бронхиальной астмы.

Недостаточное количество работ по исследованию теломерного профиля человека отчасти может объясняться тем, что среди множества существующих методик для определения длины теломер, провести количественную оценку теломерных последовательностей на всех плечах индивидуальных хромосом позволяет лишь методика Q-FISH [20]. Данный метод основан на связывании высокоспецифичной PNA-пробы, меченой флуорохромом, с теломерными T2AG3-повторами метафазных хромосом. Неотъемлемым этапом Q-FISH является проведение детального цитогенетического анализа для идентификации хромосом. Качество последнего и сила сигнала, получаемого от теломерных последовательностей, зависят от выбранной температуры и времени денатурации ДНК. Также для методики Q-FISH необходимо корректное проведение регистрации микроизображений метафазных хромосом и их компьютерная обработка [31]. Ввиду вышесказанного представляется целесообразным оптимизировать методику Q-FISH и разработать программное обеспечение, позволяющее с высокой точностью и воспроизводимостью оценить длину теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом у пациентов с иммунопатологией.

### **Цель работы:**

Изучить длину теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом и охарактеризовать изменения субпопуляционного состава и пролиферативной активности наивных Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти при бронхиальной астме.

В соответствии с целью были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать программное обеспечение и модифицировать методику Q-FISH для определения длины теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом у пациентов с иммунопатологией;
2. Определить длину теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом Т-лимфоцитов у пациентов с бронхиальной астмой в сравнении со здоровыми донорами;



3. Исследовать содержание Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов и изменение их субпопуляционного состава в периферической крови и при поликлональной активации *in vitro* у пациентов с бронхиальной астмой и здоровых доноров;

4. Изучить пролиферативную активность Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в ответ на поликлональную активацию *in vitro* при бронхиальной астме;

5. Сопоставить выявленные изменения длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом Т-лимфоцитов и субпопуляционного состава Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов с клиническими характеристиками бронхиальной астмы (форма и длительность заболевания).

### **Научная новизна работы**

В разработанном программном обеспечении использованы новые способы выравнивания сигнала флуоресценции с целью коррекции неравномерного освещения при микроскопии и регистрации изображений метафазных хромосом. Это позволяет проводить более точную оценку длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом.

Впервые были определены особенности укорочения теломер на отдельных хромосомах у пациентов с бронхиальной астмой (БА) в сравнении со здоровыми донорами. Было обнаружено, что у пациентов с БА происходит достоверное укорочение теломерных повторов br, 9p, 9q, 11q и 13q плеч индивидуальных хромосом.

Впервые был сделан вывод о связи длины теломер индивидуальных хромосом с клинической неоднородностью и длительностью течения данного заболевания. При экзогенной форме БА показано достоверное укорочение длины теломер на различных плечах индивидуальных хромосом (1p, 4q, 5q, 6p, 9p, 9q, 11q, 12q, 13q, 14q, 15q, 20q), тогда как при эндогенной форме БА длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом не отличалась от доноров. А также показано, что в дебюте экзогенной БА укорочены теломерные повторы на

обоих плечах 9 хромосомы, тогда как при длительно текущей экзогенной БА укорочение теломер происходит уже на многих плечах индивидуальных хромосом (4q, 5p, 5q, 6p, 7q, 9p, 9q, 10q, 11q, 12q, 13p, 13q, 14q, 15p, 15q, 17p, 18p, 20q, 22q).

Впервые был проанализирован теломерный профиль у пациентов с БА, который определялся как длина теломерных последовательностей индивидуальных хромосом относительно средней длины теломер во всех метафазах. Было показано, что хромосомоспецифическое распределение количества T2AG3-повторов теломерного профиля пациентов с БА отличается от такового у здоровых доноров.

Наиболее полно, по сравнению с предыдущими исследованиями, были охарактеризованы изменения содержания Т-клеток памяти при БА. Было установлено, что содержание клеток памяти зависит от формы и длительности заболевания. Установлено, что содержание CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти повышено при экзогенной форме БА, а CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти – в дебюте заболевания. При этом у пациентов с экзогенной формой БА происходит перераспределение субпопуляционного состава Т-клеток памяти в пользу субпопуляций CD4<sup>+</sup>Tem62L<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Tem62L<sup>+</sup>, а при дебюте БА – только в пользу CD4<sup>+</sup>Tem62L<sup>+</sup>.

Впервые была проведена комплексная оценка содержания Т-клеток памяти и длины теломер при БА. Было показано наличие значимых корреляций снижения длины теломер на р-плече 5 и q-плечах 12 и 20 хромосом с повышением содержания Т-клеток памяти в популяции CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов периферической крови.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные результаты дополняют представления о характере укорочения теломер при БА. Выявлены особенности укорочения теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом при экзогенной форме БА, которые связаны с длительностью течения заболевания. Установленные данные об изменении содержания CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти и субпопуляционного состава Т-клеток памяти при БА расширяют современное понимание о различном характере функционирования иммунной системы при экзогенной и эндогенной формах БА.

С практической точки зрения, данные об укорочении теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом в комплексе с данными об изменении содержания Т-клеток памяти и их отдельных субпопуляций при экзогенной форме БА могут послужить признаком индивидуальной предрасположенности к аллергическим заболеваниям. Что актуально с точки зрения персонифицированной медицины, так как эти данные можно использовать для дальнейшего поиска маркеров или предикторов неблагоприятного исхода бронхиальной астмы, связанных с длиной теломер и клетками памяти.

Практическая значимость исследования связана также с разработкой программного обеспечения и модифицированного протокола Q-FISH, который обладает высокой воспроизводимостью и может с достаточной точностью определить длину теломерных повторов на плечах индивидуальных хромосом при сохранении морфологии последних. Это позволяет получить качественное дифференциальное DAPI-окрашивание метафазных хромосом для их последующей идентификации. Созданное программное обеспечение «MeTeLen» позволяет проводить процедуру сегментации флуоресцентных объектов (теломер и хромосом) и более корректно вычислять длину теломер с учетом времени экспозиции снимка. Также «MeTeLen» учитывает дополнительную информацию, получаемую с помощью флуоресцентных бус для корректировки неравномерного освещения поля зрения, которое может быть вызвано оптическими aberrациями и некорректными настройками флуоресцентного микроскопа. Методика опубликована в журналах, на программное обеспечение получено свидетельство о

государственной регистрации программы для ЭВМ № 2016614696 «Оценка длины теломерных районов хромосом (MeTeLen) / Measurement of telomere length on chromosome (MeTeLen)».

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Экзогенная форма бронхиальной астмы характеризуется укорочением теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом: в дебюте укорочены теломеры только на плечах девятой хромосомы, а при увеличении стажа заболевания укорачиваются теломерные повторы 4q, 5p, 5q, 6p, 7q, 9p, 9q, 10q, 11q, 12q, 13p, 13q, 14q, 15p, 15q, 17p, 18p, 20q, 22q плеч индивидуальных хромосом.

2. Отличием экзогенной формы бронхиальной астмы от эндогенной является накопление  $CD4^+$  клеток памяти и изменение субпопуляционного состава  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-лимфоцитов памяти в периферической крови, которое проявляется увеличением содержания  $CD4^+62L^+$  и  $CD8^+62L^+$  эффекторных клеток памяти.

### **Апробация материалов диссертации**

Материалы диссертации были доложены и обсуждены на Международной научной конференции Научного Парка СПбГУ «Трансляционная биомедицина: современные методы междисциплинарных исследований в аспекте внедрения в практическую медицину» (г. Санкт-Петербург, 2015), на IX Отчетной научной сессии НИИФКИ "Фундаментальные и клинические аспекты иммунологии" (г.Новосибирск, 2016), на IX Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2017), на Европейском конгрессе ревматологов (EULAR-2017, Мадрид, Испания, 2017), на 5 Европейском иммунологическом конгрессе (ECI-2018, Амстердам, Нидерланды, 2018). Апробация диссертации состоялась 4 сентября 2019 года на семинаре клинического отдела НИИФКИ (протокол № 15).

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Материал изложен на 179 страницах машинописного текста, включающего 6 таблиц и 25 рисунков. Прилагаемая библиография содержит ссылки на 285 литературных источников, в том числе 271 зарубежный.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, включая 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертационных работ, 2 из которых индексируются в базе Web of Science, и свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2016614696.

### **Степень достоверности и личное участие автора**

Работа выполнена на базе лаборатории клинической иммунопатологии, отделения ревматологии и отделения аллергологии клиники иммунопатологии НИИФКИ. Исследования выполнены в рамках плана научно-исследовательских работ НИИФКИ 2013–2016 гг. по теме 040 «Молекулярно-генетические и эпигенетические механизмы регуляции иммунной системы в норме и при патологии», № гос. регистрации 01201356997. Раздел работы, посвященный разработке программного обеспечения «MeTeLen» и модификации методики Q-FISH выполнен при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-15-00346).

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточной выборкой исследования, использованием современных иммунологических, молекулярно-биологических методов и адекватных методов статистической обработки данных. Большинство экспериментов, а также статистическая обработка результатов и интерпретация экспериментальных данных выполнены лично автором. Подготовка основных публикаций по выполненной работе

проведена лично автором или при его непосредственном участии. Программное обеспечение «MeTeLen» было разработано под руководством Рубцова Н. Б. и в сотрудничестве с Богомоловым А. Г., лаборатория морфологии и функции клеточных структур ФИЦ ИЦиГ СО РАН.

### **Благодарности**

Автор работы выражает глубокую признательность центру коллективного пользования НИИФКИ за возможность использования оборудования (флуоресцентный микроскоп «Axioscop 40», ZEISS, Германия). А также выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю д.м.н., академику Козлову В. А. за помощь и поддержку, оказанную при работе над диссертацией, лично д.б.н., профессору Рубцову Н. Б. за консультативную поддержку при проведении цитогенетического анализа и помощь в создании программного обеспечения, к.б.н. Карамышевой Т. В. за поддержку при постановке методики Q-FISH, Богомолову А. Г. за совместную работу над программным обеспечением и Алешиной Т. Е. за советы по работе с флуоресцентным микроскопом.

## **ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1. Бронхиальная астма**

По оценкам ВОЗ бронхиальная астма (БА) составляет 1% от общего всемирного ущерба от болезней, а доля пациентов с тяжелой формой БА составляет не менее 20% [1]. При этом социальный и экономический ущерб от БА предполагает как прямые медицинские затраты (стоимость госпитализаций и медикаментов), так и не прямые (преждевременная смерть от БА, число дней нетрудоспособности) [1]. Разработанная в настоящее время ступенчатая стратегия терапии БА является патогенетической. Однако достижение стойкой ремиссии БА по-прежнему затруднительно. На европейской когорте пациентов было показано, что только 20% больных имеют контролируемое течение БА, тогда как у 35% отмечается частично контролируемое, а у 45% - неконтролируемое течение заболевания. Считается, что ежегодно почти 25% пациентов нуждаются в экстренной медицинской помощи, 44% используют системные глюкокортикостероиды, а более 50% прибегают к приему антимикробных препаратов [32]. Мультицентровое исследование, проведенное в России, выявило сопоставимые с европейскими показатели контроля над БА, что определяет важность дальнейшего изучения этого вида иммунопатологии [33].

#### **1.1.1. Распространенность бронхиальной астмы**

Распространённость БА в разных странах составляет от 1% до 18% [1]. В большинстве регионов мира распространенность БА возрастает с 1950-х годов и по настоящее время [4]. Тем не менее, данные исследований последних лет противоречат друг другу в этом вопросе. Например, по результатам ISAAC, в период с 1996 по 2006 гг. произошел глобальный рост частоты БА среди детей и подростков [34]. Причем в отдельных популяциях подобный рост прослеживается вплоть до 2016 г [35]. Аналогичные данные получены в различных

исследованиях, проводимых среди взрослого населения [36]. Тогда как другие исследования показывают, что не происходит роста числа заболевших БА, а в последнее время даже наметилась тенденция к снижению частоты БА в некоторых странах [3]. Среди причин таких неоднозначных результатов могут быть лучшая осведомленность пациентов и медицинского персонала о заболевании, а также более ранняя диагностика и эффективная терапия БА. Несмотря на это, общепринятым является мнение, что распространенность этого заболевания в ближайшем будущем будет возрастать в странах, где активно развивается процесс урбанизации [3, 4].

По статистическим данным Министерства Здравоохранения на 2017 г. общая заболеваемость БА в РФ относительно невысока и составляет среди детей 10,3 и среди взрослых 10,2 на 1000 населения. Причем в Новосибирской области показатели заболеваемости существенно выше, чем в среднем по России - 30 и 14,6 на 1000 среди детей и взрослых соответственно. Однако считается, что анализ заболеваемости, проводимый на основе обращаемости за медицинской помощью, приводит к недооценке распространенности БА за счет гиподиагностики легкой и среднетяжелой формы заболевания [37, 38]. Так, по эпидемиологическим данным ISAAC, БА страдают до 11% детского и подросткового населения России [34]. Истинные показатели распространенности и первичной заболеваемости БА во взрослой популяции России также существенно выше и составляют от 3,1 до 7,3% в зависимости от региона. По данным эпидемиологического исследования общая заболеваемость БА в Новосибирске составляет 6,4%, что сопоставимо со средними показателями по РФ [38]. Эти факты делают актуальным исследование БА не только для РФ в целом, но и для Новосибирского региона.



### 1.1.2. Фенотипическая классификация бронхиальной астмы

Термин «бронхиальная астма» объединяет целый комплекс респираторных симптомов, таких как затрудненное дыхание, одышка, кашель, свистящие хрипы и заложенность в груди. Сформировавшееся представление о БА как о патологии, связанной с гиперреактивностью бронхиального дерева, воспалением и обратимой обструкцией дыхательных путей, привело к формированию патогенетического подхода к терапии стероидными противовоспалительными средствами и бронхолитиками. Однако появляющиеся знания о патогенетических механизмах БА и попытки внедрения таргетной анти-IgE терапии в клинику в 2000 гг. привели к новому пониманию неоднородности данного заболевания [39]. Поэтому в настоящее время БА считается гетерогенной патологией, что подтверждается существованием множества различных фенотипов астмы.

К сожалению, до сих пор не существует единой классификации фенотипов БА. Это связано с отсутствием достоверных и хорошо идентифицируемых маркеров данных фенотипов. Наиболее часто предлагается классифицировать фенотипы БА по следующим параметрам: по ведущим триггерам, по клиническим проявлениям и по характеру воспаления [40]. По триггерному фактору прежде всего выделяют аллергическую (атопическую) и неаллергическую (неатопическую) БА, которая также соответствует экзогенному и эндогенному фенотипу заболевания, а в некоторых источниках понимается как Th2- и Th1-опосредованная БА соответственно [41]. Аллергическая БА – один из наиболее часто выделяемых фенотипов этого заболевания, который ассоциирован с наследственным анамнезом БА, atopической предрасположенностью и подтверждается наличием сенсibilизации к причинно-значимым аллергенам с помощью кожных проб или обнаружения специфического IgE в ПК. В отличие от неаллергической БА, эта форма чаще манифестирует в детском возрасте и у молодых людей и лучше поддается терапии. В частности, таргетные препараты, направленные против IgE, IL-5, IL-13, тимического стромального лимфопоэтина (TSLP), рецепторов к IL-4 и IL-5 рассчитаны на применение именно при

аллергической форме БА [42]. Некоторые авторы отдельно выделяют инфекционно-зависимый фенотип БА, который, однако, во многом совпадает с эндогенной формой БА [43]. Также к отдельным фенотипам БА относятся иные, менее распространенные формы БА. Например, астма физического усилия, которая чаще возникает у профессиональных спортсменов как бронхоконстрикция после тяжелой и длительной физической нагрузки. Этот фенотип имеет общие черты с бронхообструкцией в ответ на воздействие таких неспецифических факторов, как холодный и сухой воздух, у пациентов с другими формами БА [44]. Ещё одним примером является ассоциированная с ожирением БА, которая так же, как ишемическая болезнь сердца (ИБС), является коморбидным состоянием ожирения [45]. Отдельный интерес для клиницистов представляет аспириновая БА, вызываемая непереносимостью препаратов пиразолонового ряда [43].

По характеру воспаления принято выделять эозинофильную и нейтрофильную БА. Идентификация этих фенотипов связана с обнаружением соответствующих форменных элементов крови в бронхиальных биоптатах, индуцируемой мокроте и ПК. Считается, что обнаружение у пациентов, не получавших ГКС, 2% и более эозинофилов в мокроте и от 2 до 4% у пациентов, находящихся на терапии ГКС, достаточно для определения эозинофильной БА [43]. В связи с тем, что исследование мокроты не всегда доступно, чаще для идентификации данного фенотипа используют эозинофилию ПК. Считается даже, что эозинофильные лейкоциты ПК являются лучшим предиктором ответа на таргетную анти-IL-5 терапию, чем эозинофилия в мокроте [46]. Более того, выделяют два субтипа эозинофильной БА – с ранним и поздним началом. Эозинофильная БА с ранним началом существенно перекрывается с аллергическим фенотипом БА, характеризуется более легким течением и лучше поддается контролю. Тогда как эозинофильная БА с поздним началом не ассоциирована с атопией и чаще является резистентной к терапии ингаляционными ГКС [43]. Нейтрофильное воспаление характерно преимущественно для пациентов пожилого возраста с персистирующей БА.

Данная форма заболевания менее чувствительна к терапии ГКС, чем эозинофильная БА и определяется наличием от 41% до 61% нейтрофильных лейкоцитов в мокроте. Тем не менее, характер воспалительного процесса не является надежным критерием и может приводить к ошибочной классификации фенотипов из-за таких факторов как респираторная инфекция, гиперчувствительность к аспергиллу, гастроэзофагальная рефлюксная болезнь, прием ГКС и др. [43].

По клиническим проявлениям выделяют БА с частыми обострениями, которая характеризуется серьезными эпизодами ухудшения заболевания с госпитализацией в специализированное отделение более 2-3 раз за год. При этом, во время обострения врач вынужден назначать системные ГКС для предотвращения неблагоприятного исхода [47]. Персистирующая БА охарактеризовывается в виде еще одного фенотипа, который сопровождается ограничением функции внешнего дыхания (ФВД), не полностью обратимого под влиянием бронходилататоров. Однако, данная ситуация может частично улучшаться после воздействия системных ГКС. Чаще данная форма астмы является неатопической, наблюдается у взрослых пациентов и сопровождается слабо выраженной дневной симптоматикой и персистирующей эозинофилией в мокроте [9]. Следует отметить, что по возрасту дебюта принято разделять БА на астму с ранним и поздним началом. Показано, что пациенты с поздним началом имеют чаще неатопическую форму, более тяжелое, нестабильное течение заболевания с преобладанием нейтрофильного воспаления [48]. Тогда как раннее начало БА, напротив, характеризуется atopическим анамнезом, контролируемым течением заболевания с менее быстрым снижением ФВД, даже при большей его длительности [8]. Несмотря на выявляющиеся различия, полногеномный анализ показал, что в основе взрослой БА и БА детского возраста лежат частично общие генетические механизмы [49].

В последнее время особое внимание уделяется тяжелой БА, так как она сопровождается существенным снижением качества жизни пациента, выраженным ограничением ФВД, частыми обострениями и которая требует

особого подхода к терапии. На основании этого некоторые авторы выделяют тяжелую БА в отдельный фенотип [50]. В том числе в отдельный субфенотип выделяют тяжелую БА у детей. Эта форма БА чаще встречается у мальчиков с атопической формой заболевания и поливалентной сенсibilизацией, подтвержденной проведением кожных проб. Предпринимаются попытки выделить молекулярные механизмы и стратифицировать терапию тяжелой БА [51]. Показано, что большинство взрослых пациентов с тяжелой БА, напротив, имеют неатопическую форму заболевания, которая сопровождается персистирующим эозинофильным воспалением дыхательных путей [50]. Ведется активный поиск возможных маркеров тяжелой БА, среди которых рассматриваются уровень оксида азота в выдыхаемом воздухе, периостин, сывороточный эозинофильный нейротоксин и другие [52, 53]. Поскольку тяжелая БА существенно перекрывается с такими фенотипами, как неатопическая персистирующая БА, астма с поздним началом, то сомнительно, что она является отдельной формой заболевания. Также известно, что частые обострения заболевания приводят к более быстрому снижению ФВД. Поэтому плохо контролируемая, с частыми обострениями астма может переходить в персистирующую и тяжелую формы заболевания [43].

Таким образом становится очевидным, что под маской одного диагноза может скрываться несколько фенотипов астмы, имеющих в одно и то же время, как общие, так и различные механизмы развития. Чтобы описать биологический путь, который реализуется в виде конкретного фенотипа был введен термин «эндотип» [39]. Однако, для определения эндотипов БА, как и в случае с фенотипом, в настоящее время нет хорошо изученных патофизиологических путей, доказанных биомаркеров, генетических маркеров, согласованных клинических и физиологических характеристик. Кроме того, ряд коморбидных состояний, таких как ожирение, курение, гормональный статус, наличие вирусной или бактериальной инфекции может существенно повлиять на иммунопатогенетические процессы, которые лежат в основе того или иного эндотипа и привести к неверной оценке фенотипа у отдельно взятого пациента

[39]. Тем не менее, учитывая развитие персонифицированного подхода к терапии астмы, от клинициста требуется новое понимание патогенетических механизмов БА с целью её успешного лечения.

### **1.1.3. Современные представления о патогенезе бронхиальной астмы**

Классические представления о патогенезе БА связаны с дихотомией  $CD4^+$  Т-лимфоцитов на Т-хелперы 1 и 2 типов и вырабатываемыми ими цитокинами, которые направляют иммунный ответ. Поскольку традиционно БА считалась преимущественно аллергическим заболеванием, то её патогенез рассматривался в непосредственной связи с функцией Th2-лимфоцитов как последовательность иммунологической, патохимической и патофизиологической стадий аллергического ответа, обусловленных повышенным синтезом специфического IgE. А патогенез инфекционно-зависимой или неатопической БА связывался преимущественно с активностью Th1-клеток [41].

По современным представлениям с патогенетической точки зрения принято выделять БА с активным участием Th2-лимфоцитов (Th2-high подтип заболевания) и с незначительным участием Th2-лимфоцитов (Th2-low подтип заболевания). Такой подход, при котором БА делится на 2 основных молекулярных подтипа в зависимости от степени Th2- воспаления, связан с развитием представлений о клинических фенотипах БА и подтверждается анализом экспрессии генов [41].

### **1.1.3.1. Патогенетические механизмы бронхиальной астмы, связанной с участием Т-хелперов 2 типа**

Известно, что развитие Th2-ответа происходит при аллергической БА и начинается под влиянием сигнальных молекул (IL-25, IL-33, TSLP), которые выделяются клетками эпителия в ответ на воздействие аллергенов и других повреждающих факторов. Данные цитокины активируют антиген-презентирующие клетки, которые в свою очередь, индуцируют Th2– иммунный ответ. Последний подразумевает дифференцировку наивных Т-лимфоцитов в Т-хелперы 2 типа. Процесс дифференцировки Th2-лимфоцитов зависит от дозы антигена и наличия локальных стимулов. Ключевым фактором для поляризации лимфоцитов в Th2- клетки является секреция IL-4 [54]. В дальнейшем Th2- клетки мигрируют в эпителий и слизистую оболочку дыхательных путей, где реализуют свои функции, синтезируя IL-5, IL-9 и IL-13. Перечисленные цитокины играют ключевую роль в патогенезе аллергической БА. Так, IL-4 приводит к «переключению» В-лимфоцитов на синтез иммуноглобулинов класса Е (IgE) в ответ на воздействие аллергена. В последствии IgE связывается с высокоаффинными рецепторами на тучных клетках. Такие сенсibilизированные тучные клетки способны активироваться после специфического взаимодействия с аллергеном и выделять ряд факторов, например, простагландин D<sub>3</sub>, которые привлекают эозинофилы в слизистую оболочку дыхательных путей [55]. Эозинофилы, в свою очередь, являются основными продуцентами IL-5, который обеспечивает в очаге аллергического воспаления выживание и созревание собственно эозинофилов, а также базофилов и тучных клеток [56]. Роль IL-13 в патогенезе БА многофункциональна, так как он оказывает влияние на синтез IgE В-лимфоцитами, гиперсекрецию слизи и гиперплазию бокаловидных клеток дыхательных путей, обеспечивает их гиперреактивность, совместно с IL-4 приводит к фиброзу и ремоделированию бронхов [57]. IL-9 стимулирует пролиферацию не только активированных Т-лимфоцитов, но и тучных клеток и,

наряду с IL-13, повышает продукцию IgE В-клетками, вызывает гиперсекрецию слизи и гиперреактивность дыхательных путей [58].

Таким образом, классический патогенетический путь при Th2-high БА опосредуется цитокинами, источником которых изначально служат Т-хелперы 2 типа. Однако в последнее время было показано, что цитокины Th2-типа выделяются и другими клетками иммунной системы, такими как клетки врожденной иммунной системы 2 типа (ILC2-клетки), NK-клетки, инвариантные Т-клетки, предшественники эозинофилов. Появляются новые данные о Th9-клетках и факторах, влияющих на их дифференцировку и созревание в процессе аллергического воспаления [59]. Также получены данные о роли регуляторных Т-клеток (Treg) и Th17-клеток в патогенезе БА, которые не укладываются полностью в концепцию Th2- и Th1- воспаления при БА.

### **1.1.3.2. Патогенетические механизмы бронхиальной астмы без активного участия Т-хелперов 2 типа**

В отличие от Th2-high иммунного ответа, который имеет место при аллергической БА, развитие Th2-low иммунного ответа, по всей вероятности, включает в себя несколько эндотипов БА. Например, недавно была описана продукция ILC2-клетками IL-4, IL-5 и IL-13 под влиянием IL-25, IL-33 и TSLP, которые высвобождаются из эпителиальных клеток в результате повреждения поллютантами и бактериальными агентами. Данный механизм играет роль при эозинофильной неаллергической БА [60]. Также было показано, что предшественники клеток врожденной иммунной системы в некоторых условиях способны дифференцироваться в ILC-клетки 3 типа, которые регулируют хронические воспалительные процессы при участии Th17-клеток [61]. Помимо этого, охарактеризована роль Treg-лимфоцитов ( $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ ), продуцирующих IL-10, в патогенезе аллергической и неаллергической БА ввиду их способности подавлять иммунные реакции, ассоциированные как с Th2-, так и с Th17-лимфоцитами [62, 63].

Th17- клетки играют важную роль в патогенезе неэозинофильной БА. Считается, что повышенный уровень IL-17, который секретируется этими клетками, ассоциирован со стероидорезистентностью, гиперреактивностью и обструкцией бронхов при тяжелой БА. Известно также, что Th 17 типа являются продуцентами ФНО- $\alpha$ , который вовлечен в индукцию ряда провоспалительных цитокинов при тяжелой БА. А также в исследованиях пациентов с БА и в опытах, проводимых на мышинных моделях, показано, что Th17- клетки могут приводить к нейтрофильной инфильтрации дыхательных путей [6]. Считается, что именно изолированное персистирующее нейтрофильное воспаление преобладает в группе пациентов с поздним началом неатопической БА и недостаточным ответом на терапию ГКС [64]. Накоплено много данных о нарушении функций нейтрофилов у пациентов с БА по сравнению со здоровыми лицами, которое может повышать чувствительность к инфекциям и способствовать эпизодам обострения БА [65]. В связи с этим дополнительным механизмом БА, протекающей без участия Th2-лимфоцитов, является колонизация слизистой дыхательных путей бактериями. Тем не менее, данные об эффективности терапии нейтрофильной БА азитромицином по результатам двойных слепых плацебо-контролируемых исследований противоречивы [66, 67]. В целом, биологические маркеры и патогенетические механизмы, лежащие в основе БА без активного участия Th2-лимфоцитов охарактеризованы меньше, чем при БА с участием Th2-лимфоцитов. Однако следует предполагать, что эти различные типы иммунного ответа могут сменять друг друга в динамике заболевания. Это может быть связано с присущей Т-хелперам пластичностью, в частности Th17- и Treg- клетки способны к реполяризации. Пластичность проявляется в генерации подмножеств Th2-клеток, которые одновременно экспрессируют цитокины и факторы транскрипции, специфичные для разных типов Т-хелперов [68]. Так, при БА открыт новый субтип Т-клеток, которые одновременно секретируют IL-4 и IL-17 (Th2/Th17 клетки) [69]. Показано, что пациенты с преобладанием данного субтипа клеток в бронхиальной слизистой страдают более тяжелой формой БА [70]. Кроме того, свойство пластичности Т-хелперов поддерживает представление, согласно



которому различные фенотипы БА могут сосуществовать у пациента одновременно.

### **1.1.3.3. Роль генетических, эпигенетических и других факторов в патогенезе бронхиальной астмы**

Патогенез БА представляет сложную сеть различных факторов, которые взаимодействуют между собой на различных уровнях – от генетического и клеточного до организменного. Это дополнительно осложняется воздействием факторов окружающей среды, коморбидными заболеваниями и образом жизни. Например, наличие в качестве сопутствующего заболевания аллергического ринита сопровождается более тяжелым течением БА [71]. БА, ассоциированная с ожирением и рассматриваемая как отдельный фенотип заболевания, связана с целым рядом нарушений, которые утяжеляют БА. К ним относятся сниженная чувствительность к ГКС, ночное апноэ, гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, повышение уровня провоспалительных цитокинов. При этом, снижение веса сопровождается снижением частоты обострений, уменьшением симптомов заболевания и улучшением ФВД [71]. Такой фактор, как курение усиливает ремоделирование дыхательных путей и увеличивает тяжесть симптомов БА посредством оксидативного стресса, усиления нейтрофильной инфильтрации дыхательных путей и снижения чувствительности рецепторов к ГКС. Часть данных изменений, в свою очередь, обратима при отказе от курения [72].

Наследственная предрасположенность к БА известна давно в виде семейной склонности к развитию аллергических заболеваний, которая получила название атопии [73]. За последние два десятилетия было проведено много полногеномных исследований с целью идентификации генов, ассоциированных с БА. Обнаружен ряд однонуклеотидных замен (SNP), расположенных в различных локусах. Большинство SNP, ассоциированных с БА, выявлено в генах иммунной системы, например, IL33, IL1RL1 / IL18R1, HLA-DQ, TSLP, GSDMB и ORMDL3. Полиморфизм данных генов может вызывать скрытые нарушения функции

эпителиального барьера, врожденного и приобретенного иммунного ответа, которые способствуют развитию астмы [74].

Не все данные полногеномных исследований полностью воспроизводятся в независимых исследованиях [49]. При этом интересно, что проведенный недавно метаанализ обнаружил дополнительно полиморфизм еще для 9 локусов, которые тоже могут оказаться значимыми с клинической точки зрения [74]. Несмотря на выявление большого количества генов, ассоциированных с БА, пока не удалось использовать их в качестве предиктора развития БА или связать обнаруженные SNP с клиническими маркерами заболевания. Это говорит о том, что генетические факторы нельзя рассматривать изолированно.

Помимо генетических механизмов, важной составляющей иммунного ответа является эпигенетическая регуляция, которая является центральным механизмом, руководящим дифференцировкой Т-клеток и выполнением ими иммунных функций. Например, повышенный уровень метилирования лизина в 27 положении гистона H3 (H3K27me3) ассоциирован с репрессией генов IFN- $\gamma$  в Th2-лимфоцитах и IL4 и Gata3 в Th1-лимфоцитах. Известно также, что метилирование ДНК утрачивается у энхансеров в генетическом локусе Th2 во время дифференцировки Т-лимфоцитов в Т-хелперы 2 типа. Кроме того, метилирование ДНК участвует в контроле локуса Foxp3, который экспрессируется в Treg-лимфоцитах и является специфичным фактором, отвечающим за их развитие и функционирование [68].

Некоторые факторы окружающей среды вызывают эпигенетические модификации и таким образом, посредством влияния на экспрессию генов, изменяют функциональные характеристики Т-клеток. Например, у детей пассивное курение в сочетании с воздействием поллютантов повышает метилирование ДНК и снижает экспрессию IFN- $\gamma$  в Т-лимфоцитах эффекторах и Foxp3 в Treg. По мнению авторов данный механизм может играть роль в патогенезе БА [75]. Существуют также работы, которые исследуют влияние микроорганизмов и лекарственных препаратов на эпигенетическую регуляцию Т-клеток у пациентов с БА и в мышинных моделях заболевания [68].

При БА эпигенетическое влияние совпадает с генетической предрасположенностью к БА. Показано, что у пациентов с БА энхансеры, которые получают метку H3K27me2 в процессе дифференцировки Th2-лимфоцитов несут также SNP, ассоциированные с БА [76]. Недавнее исследование Kogan и соавт. выявило при БА 12 генов, имеющих SNP, статистически достоверно связанные с уровнем метилирования данных генов. Эти данные демонстрируют существующее взаимодействие между генетическими и эпигенетическими механизмами, которое может играть роль в патогенезе БА [77].

Несмотря на существование большого количества работ по исследованию эпигенетических механизмов при БА, проведенный недавно метаанализ свидетельствует о необходимости дальнейших исследований, которые позволят определить роль эпигенетических факторов в патофизиологии и гетерогенности различных форм БА [78]. Одним из эпигенетических механизмов может считаться длина теломер, так как получены данные о повышении уровня экспрессии генов под влиянием укорочения теломерных районов ДНК [79, 80]. Известно, что средняя длина теломер снижена в Т-лимфоцитах при БА, а также показано, что уменьшение средней длины теломер происходит прежде всего в Т-лимфоцитах памяти [16, 24, 25]. В связи с этим, а также в свете новых представлений о пластичности Т-клеток интересно, что при БА была обнаружена субпопуляция Th2-клеток памяти (CD62L<sup>-</sup>CXCR3<sup>-</sup>), которые ответственны за продукцию IL-5. Данная субпопуляция имеет высокий уровень метилирования H3K27me3 на промоторе гена IL-5, что является свидетельством эпигенетической регуляции синтеза данного цитокина [81]. В последствии было показано, что воздействие IL-33 на Th2-клетки индуцирует ремоделирование хроматина гена IL-5 без участия антигенной стимуляции. Этот механизм приводит к активации Th2-клеток и стимулирует процессы эозинофильного воспаления при БА. В целом, эти данные хорошо укладываются в концепцию существования при БА патогенетической субпопуляции Th2-клеток памяти, которые обладают определенной патогенной активностью и антигенной специфичностью и регулируются различными

эпигенетическими процессами [68]. Однако не известно, связан ли этот механизм развития БА с укорочением длины теломер в клетках памяти.

## 1.2. Клетки памяти

Сложные процессы положительной и отрицательной селекции в тимусе позволяют минорной фракции незрелых тимоцитов с низким сродством к аутологичным пептидам в контексте главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) выживать и дифференцироваться в зрелые Т-клетки [82]. После выхода из тимуса эти Т-лимфоциты образуют долгоживущий пул наивных Т-клеток (Tnaive), которые рециркулируют в пределах периферических лимфоидных тканей. Посттимические лимфоциты сохраняют низкую степень аутореактивности, которая недостаточна для того, чтобы вызвать аутоиммунный процесс, но необходима для выживания наивных Т-клеток, а также повышает чувствительность Т-клеточных рецепторов к чужеродным антигенам [83]. В процессе первичного иммунного ответа воздействие чужеродных антигенов вызывает массивную экспансию наивных Т-клеток с последующим приобретением ими эффекторных функций. После элиминации патогенного агента большинство эффекторных клеток погибает, но небольшой пул Т-лимфоцитов становится долгоживущими Т-клетками памяти [84].

Процесс дифференцировки Т-лимфоцитов и развитие иммунного ответа сопровождается сменой изоформ молекулы CD45. Поэтому наивные Т-лимфоциты имеют фенотип  $R0^- (RA^+)$ , а клетки памяти -  $R0^+ (RA^-)$ . Молекула CD45 является тирозинфосфатазой, которая играет ключевую роль в регулировке силы сигнала с Т-клеточного рецептора и, соответственно, имеет значение для развития иммунного ответа на антиген и возникновения аутоиммунных процессов [85]. Однако в настоящее время известно, что Т-клетки памяти не являются однородной группой клеток.

### 1.2.1. Фенотипические и функциональные характеристики Т-клеток памяти

На основе экспрессии хемокинов и рецепторов хоуминга Т-клетки памяти подразделяются на множество субпопуляций. Sallusto F. и соавт. обнаружили, что так же, как и наивные Т-лимфоциты, Т-клетки памяти занимают Т-зоны лимфоузлов и экспрессируют рецепторы CD62L и CCR7, которые дают возможность клеткам проникать через сосудистый эндотелий и мигрировать во вторичные лимфоидные органы. Эти Т-клетки памяти ( $CD62L^+CCR7^+$ ) были названы центральными клетками памяти ( $T_{cm}$ ). Они способны к хоумингу в лимфатических узлах, обладают более длинными теломерами и продуцируют значительные количества IL-2 [10]. По сравнению с  $T_{naive}$ ,  $T_{cm}$  имеют более высокую чувствительность к антигенной стимуляции, при этом менее зависимы от ко-стимуляторного влияния и в большей степени активируют молекулу CD40L, обеспечивая себе более эффективное взаимодействие с дендритными клетками и В-лимфоцитами [86].

По сравнению со второй субпопуляцией Т-клеток памяти ( $CD62L^-CCR7^-$ ),  $T_{cm}$  экспрессируют на более низком уровне эффекторные цитокины (IL-4, IL-5 и IFN- $\gamma$ ) и цитотоксические молекулы. Поэтому  $CD62L^-CCR7^-$  Т-клетки памяти вследствие значительно более выраженных эффекторных функций были названы эффекторными клетками памяти ( $T_{em}$ ) [10]. Тем не менее, после активации через Т-клеточный рецептор  $T_{cm}$  продуцируют IL-2, эффективно пролиферируют и дифференцируются в эффекторные клетки, которые продуцируют большие количества IFN- $\gamma$  или IL-4 [86]. В 2001 году Masopust D. и соавт. в опытах на мышах показали, что  $CD8^+$  Т-клетки памяти, обнаруживаемые в периферических тканях обладают более сильной цитотоксической активностью, чем клетки памяти, локализованные во вторичных лимфоидных органах [87]. Это дополнительно подтвердило представление о существовании основных субпопуляций  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток памяти – центральной и эффекторной.

При сравнении Тсм и Тем последние характеризуются не только более сильной, но и более быстрой эффекторной функцией. И CD4<sup>+</sup>, и CD8<sup>+</sup> Тем продуцируют IFN- $\gamma$ , IL-4 и IL-5 в течение нескольких часов после антигенной стимуляции, а CD8<sup>+</sup>Тем содержат большое количество перфорины. Некоторые CD8<sup>+</sup> Тем, которые экспрессируют молекулу CD45RA и несут наибольшее количество гранул перфорины, определяются как Темга [86]. Таким образом, пул Тем содержит Т-хелперы 1 и 2 типа, а также цитотоксические Т-лимфоциты. Относительное содержание CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Тсм и Тем в периферической крови различно. Так, CD4<sup>+</sup> клетки преобладают в субпопуляции Тсм, а CD8<sup>+</sup> клетки - среди Тем лимфоцитов. В органах и тканях распределение Тсм и Тем соответствует выполняемым клетками функциям: в периферических лимфоидных органах находятся преимущественно Тсм, тогда как ткани легкого, кишечника и печени и др. содержат преимущественно Тем [87].

Помимо описания двух основных субпопуляций Т-лимфоцитов памяти, существуют данные об экспрессии различных молекул адгезии, хемокиновых рецепторов и костимуляторных молекул, которые свидетельствуют об их функциональной гетерогенности. Отмечается, что CD8<sup>+</sup> Т-клетки памяти различаются по экспрессии маркеров CD27 и CD28. Это костимуляторные молекулы, которые содержатся в норме на Tnaïve, но также могут содержаться и на некоторых клетках памяти, за исключением Темга [88]. Тем не менее, обнаружена субпопуляция Темга, которая обладает фенотипом CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, сходным как с Tnaïve, так и с Тем [89].

По экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR5 Тсм можно отнести к фолликулярным Т-лимфоцитам, которые являются неполяризованными хелперами. Поскольку CXCR5 является рецептором к лиганду CXCL13, который представляет собой хемокин В-лимфоцитов, то Тсм участвуют в развитии гуморального иммунного ответа. Аналогичные CXCR5<sup>+</sup>CD40L<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>Тсм также обнаруживаются в миндалинах [86]. Более того, по экспрессии CXCR3 и CCR4 Тсм определяются как предшественники Th1 и Th2 эффекторов, соответственно. В свою очередь, Тем могут быть разделены на Th1 и Th2 лимфоциты не только по

цитокиновому профилю, но и по экспрессии характерных хемокиновых рецепторов. Так, CCR5 и CXCR6 характерны для Th1 и цитотоксических эффекторов памяти, тогда как CCR3, CCR4 – являются маркерами исключительно Th2-клеток памяти, а CXCR3 - Th1-клеток памяти [86]. Показано, что одновременная экспрессия хемокиновых рецепторов и молекул адгезии делает эффекторные Т-клетки памяти тканеспецифичными. Например, одновременная экспрессия CCR4 и CLA присуща Т-клеткам памяти кожи, а молекул  $\alpha 4\beta 7$  и CCR9 – Т-клеткам памяти кишечника [86, 90]. Кроме того, показано, что некоторые CD4<sup>+</sup>Tem могут экспрессировать молекулу CD62L [10]. Последнее может быть важно для хоуминга Tem в периферические ткани в условиях воспаления, когда эндотелиальные клетки экспрессируют соответствующие хемокины [86].

### **1.2.2. Механизмы поддержания численности Т-клеток памяти**

Известно, что с возрастом количество клеток памяти возрастает, тогда как наивных Т-лимфоцитов – уменьшается. Это происходит по различным причинам: в связи с постепенной дифференцировкой Tnaïve в клетки памяти благодаря постоянному воздействию различных антигенов окружающей среды; за счет снижения выхода Tnaïve из тимуса в виду его возрастной инволюции; вследствие перехода Tnaïve в клетки с фенотипом Tsm в процессе гомеостатической пролиферации (ГП) [11, 84]. Несмотря на возрастное изменение соотношения Tnaïve и Т-клеток памяти, общий размер пула Т-клеток у взрослых лиц остается постоянным в течение жизни. Гомеостаз Т-лимфоцитов возможен благодаря процессам дифференцировки, выживания и пролиферации, которые регулируются сложными механизмами, различными для наивных Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти.

Экспериментально показано, что лимфопения, возникающая под воздействием цитотоксических препаратов или облучения, индуцирует пролиферацию и восстановление нормального уровня Т-клеток. Этот процесс

получил название гомеостатической пролиферации (ГП). ГП не зависит от антигенной стимуляции Т-лимфоцитов и протекает не только под влиянием лимфопении, но и конститутивно, для поддержания численности Т-клеток. Основную роль в процессе ГП играют цитокины с общей  $\gamma$ -цепью (IL-2, IL-4, IL-7, IL-15), особенно IL-7 и IL-15. IL-7 синтезируется стромальными и эпителиальными клетками костного мозга и тимуса, где является необходимым фактором лимфопоэза. А во вторичных лимфоидных органах IL-7 находится в составе внеклеточного матрикса и необходим для локального поддержания зрелых Т-лимфоцитов [11]. IL-15, источником которого являются дендритные и некоторые другие виды клеток, также является необходимым ростовым фактором для лимфоцитов. Он функционирует сходным образом с IL-2, более того, для проведения сигнала в клетку IL-15 использует часть рецептора IL-2. Этот цитокин интересен также тем, что передает сигнал в клетку путем транс-презентации. Механизм транс-презентации заключается в том, что IL-15 и  $\alpha$ -субъединица его рецептора экспрессируются и презентуются совместно клетке, которая содержит  $\gamma$ -цепь рецептора IL-15 и  $\beta$ -цепь рецептора IL-2. Таким образом, IL-15 является клеточно-ассоциированным цитокином, по этой причине растворимый IL-15 практически не обнаруживается в плазме [91].

Показано, что для поддержания стабильного количества Tnaïve после выхода из тимуса им необходим контакт на периферии не только с IL-7, но и с молекулами ГКГ. Взаимодействие с этими факторами обеспечивает проведение сигнала в клетку, который позволяет Tnaïve сохранить жизнеспособность в стадии интерфазы клеточного цикла. Для этого клеткам необходимо мигрировать во вторичные лимфоидные органы. Поскольку именно стромальные клетки вторичных лимфоидных органов, получившие название ретикулярных фибробластов, являются источником IL-7 и секретируют молекулу CCL19, которая является лигандом для CCR7 [92].

В отличие от наивных Т-лимфоцитов клетки памяти, как покоящиеся клетки, подвергаются периодическому делению, которое происходит один раз в 2-3 недели. По-видимому, такая скорость пролиферации соответствует



естественной гибели клеток. При этом, Tcm не нуждаются в контакте с аутологичными молекулами ГКГ, но зависят от IL-7 и IL-15. Аналогично Tcm, Tem подвергаются медленной пролиферации под влиянием IL-15 [84]. Таким образом, клетки памяти медленно подвергаются делению в отсутствие антигенной стимуляции.

Антигензависимая стимуляция клеток памяти *in vitro* продемонстрировала, что Tnaive, Tcm и Tem имеют высокую отвечаемость. Тем не менее, пролиферативный потенциал в ответ на антиген снижается в ряду Tnaive, Tcm и Tem, и самый низкий наблюдается у Temra [93]. Снижение пролиферативной способности коррелирует с уменьшением длины теломер Tem и с повышенной склонностью к апоптозу [10]. Пролиферативный ответ на цитокины имеет обратную тенденцию: наиболее сильно пролиферируют Temra, а наиболее слабо - Tnaive [94].

В работах J. Geginat и соавт. продемонстрировано, что цитокин-индуцированная пролиферация приводит к активной дифференцировке Tcm в Tem и Temra, в ходе которой Tcm утрачивают молекулу CCR7 и приобретают маркер CCR5, а также способность синтезировать высокие уровни IFN- $\gamma$  и IL-4, сопоставимые с эффекторными Т-клетками. Тогда как в аналогичных условиях дифференцировка Tnaive носит весьма ограниченный характер. Это дополнительно свидетельствует о гетерогенности субпопуляции Tcm и говорит о том, что Temra могут образовываться в отсутствие антигенной стимуляции непосредственно из Tcm [94].

CD4<sup>+</sup>Tcm являются неполяризованной субпопуляцией Т-хелперов. Тем не менее часть Tcm способна при культивировании в нейтральных условиях спонтанно дифференцироваться в IFN- $\gamma$  и IL-4 продуцирующие клетки. Тогда как другая часть – остается в первоначальном, неэффекторном состоянии. А также в условиях стимуляции под влиянием IL-12 и IL-4 Tcm могут дифференцироваться в Th1- и Th2- клетки, соответственно. Такая гибкость Tcm связана с гипометилированным статусом генов цитокинов [95]. Таким образом, субпопуляция Tcm содержит клетки-предшественники Т-хелперов 1 и 2 типов.

Последние могут быть идентифицированы по экспрессии хемокинов CXCR3 и CCR4 [86].

CD4<sup>+</sup>Tem являются заведомо поляризованными клетками и при стимуляции в нейтральных условиях сохраняют фенотип Th1 или Th2. Однако при стимуляции в условиях противоположной поляризации большинство Tem может экспрессировать альтернативный цитокин. То есть, Th1- клетки сохраняют способность продуцировать IFN- $\gamma$ , но также способны продуцировать IL-4. Аналогичным образом, большинство Th2- клеток поддерживают выработку IL-4 и приобретают свойство продуцировать IFN- $\gamma$ , что свидетельствует о пластичности эффекторных Т-клеток памяти [95].

### **1.2.3. Клетки памяти при иммунопатологических заболеваниях**

Описанный выше механизм ГП является необходимым фактором поддержания иммунной системы в течение длительного времени после угасания функции тимуса. Однако ГП может иметь и обратную сторону. В опытах на животных моделях показано, что лимфопения может быть фактором развития аутоиммунных заболеваний и этот риск ассоциирован с действием ГП [96]. Последнее связано с образованием особой субпопуляции клеток, которые обладают фенотипом, подобным клеткам памяти (MPC - memory-like phenotype cells). Поскольку на периферии для выживания Tnaive необходим контакт TCR с аутологичным пептидом в составе молекулы ГКГ, то это позволяет более активно пролиферировать клеткам с более высоким аффинитетом к аутоантигенам [97]. В пользу этой гипотезы свидетельствуют исследования на мышах, в которых показано, что в отсутствии антигенной стимуляции повышено образование аутореактивных клеток памяти. Подобные MPC могут накапливаться с возрастом и у людей не только в результате лимфопении, но и вследствие естественных процессов ГП [11]. Таким образом, накопление MPC в результате ГП служит одним из механизмов утраты ауто толерантности на периферии. В целом, это согласуется с исследованием субпопуляционного состава Т-клеток памяти при

ревматоидном артрите (РА). Показано, что количество  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Tcm достоверно повышено при РА по сравнению со здоровыми донорами, что может быть связано с их ускоренным образованием из Tnaive при РА. Тогда как количество  $CD8^+$  Tem снижено, что авторы связывают с повышенным апоптозом этих клеток [13].

Изучению Т-клеток памяти при БА посвящен ряд работ, однако с клинической точки зрения, данные этих исследований неоднозначны. В большинстве исследований клетки памяти типизируются как  $CD45RO^+$  или  $CD45RA^-$ , без определения субпопуляционного состава. Исследования, проведенные на взрослых лицах, отмечают повышенное содержание Т-клеток памяти у пациентов с БА в сравнении со здоровыми лицами, которое ассоциировано со степенью тяжести данного заболевания [98]. Также повышение количества Т-клеток памяти связывают с изменением их функциональной активности (повышение продукции IL-5, IL-17 и снижение синтеза IFN- $\gamma$ ) и существованием различных эндотипов БА [15]. По данным других авторов, происходит снижение количества Tnaive ( $CD45RA^+$ -клеток) у лиц пожилого возраста, причем у больных БА оно выражено сильнее, чем у здоровых [12]. В недавнем исследовании было показано, что у взрослых пациентов с БА повышается содержание  $CD4^+$ Tcm по сравнению с донорами [99]. Кроме того, экспериментальные данные свидетельствуют, что в легочной ткани в результате сенсibilизации накапливаются резидентные аллерген-специфичные Т-клетки памяти, которые могут приводить к развитию БА [14]. Таким образом, существующие данные об изменении субпопуляционного состава Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов косвенно свидетельствуют о более раннем старении иммунной системы при БА. Дополнительным признаком старения клеток памяти является длина теломер, так как показано, что происходит уменьшение средней длины теломер в  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-лимфоцитах памяти по сравнению с длиной теломер наивных Т-лимфоцитов [16]. При этом наиболее выраженное снижение средней длины теломер обнаружено в антиген-специфичных Т-клетках, что является следствием клональной экспансии,

сопровождается снижением пролиферативного потенциала Т-клеток памяти и свидетельствует о пролиферативном стрессе [100]. Таким образом, укорочение теломер, наряду с изменением субпопуляционного состава клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов периферической крови, может служить маркером БА.

### **1.3. Теломеры в норме и при патологии**

Термин «теломера», от греческих слов «telos» - конец и «meros» - часть, впервые ввел в литературу Н. Muller для обозначения концевых участков хромосом. Независимо друг от друга В. McClintock, которая работала с кукурузой, и Н. Muller в опытах с дрозофилой показали, что под воздействием рентгеновского излучения происходят разрывы хромосом. Образовавшиеся в результате повреждения участки хромосом, за исключением собственно концевых участков, демонстрировали тенденцию к слиянию и часто деградировали при делении клетки. На основании этого оба исследователя предположили, что на концах хромосом имеются специальные структуры, необходимые для стабильности хромосом и точного разделения генетического материала при митозе [101, 102].

Позже было показано, что при переносе линейной молекулы ДНК в ядро эукариотической клетки, она вступает в рекомбинацию с геномом последней [103]. Это происходит вследствие включения в клетке механизмов репарации двуцепочечных и одноцепочечных разрывов ДНК, которые в норме восстанавливают целостность генома клетки [104]. Очевидно, что концы хромосом защищены теломерами, и по этой причине избегают воздействия системы репарации ДНК. В противном случае они могли бы быть расценены как двухцепочечные разрывы, что повлекло бы за собой неизбежные хромосомные перестройки вследствие слияния нитей ДНК, и привело бы к гибели клетки [105].

Другими исследованиями, которые предвосхитили открытие теломер, были работы Л. Hayflick и Р. Moorhead, которые в 1960-х годах на фибробластах человека продемонстрировали, что количество делений нормальных

соматических клеток в культуре ограничено [18]. Данный феномен назвали «пределом Хейфлика», он ограничивает пролиферацию диплоидных клеток млекопитающих количеством 60-90 делений и получил подтверждение в дальнейших экспериментах на других клетках. Первым ученым, который связал обнаруженное L. Hayflick запрограммированное прекращение деления клеток с теломерами, был А.М. Оловников [106]. В 1971 г. он предположил, что при делении клетки существует «проблема концевой недорепликации ДНК». Синтез молекулы ДНК начинается с РНК-праймера, комплементарного 3'-концу нити ДНК и после его удаления ДНК-полимераза не способна достроить цепь размером 12-20 п.н. Поэтому в дочерней цепи ДНК 3'-концевые участки оказываются одноцепочечными, а их 5'-концевые участки недореплицированными. Таким образом, А.М. Оловников выдвинул «теорию маргинотомии», согласно которой соматические клетки человека не в состоянии исправить укорочение хромосом, наступающее вследствие репликации ДНК. Поэтому на концах хромосом должны существовать повторяющиеся нуклеотидные последовательности, которые будут служить буфером для защиты расположенных следом генов. Кроме того, он предположил, что длина этих повторяющихся последовательностей может определить возможное количество циклов репликации ДНК. То, что однонаправленный характер репликации ДНК создает проблему для полной репликации концов хромосом, также было признано Дж. Уотсоном [107].

### **1.3.1. Структура и поддержание длины теломер в клетках человека**

Таким образом, структура теломер была неизвестна вплоть до 1980-х годов, когда Е. Blackburn были выделены концевые последовательности хромосомной ДНК, представляющие собой теломеры. Это стало возможным благодаря работе с инфузорией *Tetrahymena*, в макронуклеусе которой содержится большое количество теломерных повторов [108]. В дальнейшем выяснилось, что у млекопитающих, в том числе у человека, теломерная последовательность

представлена гексаповтором TTAGGG [19]. Кроме того, Е. Blackburn и С. Greider удалось описать механизм поддержания длины теломер. Они установили, что ДНК теломер достраивается специальным ферментом, относящимся к обратным транскриптазам, который получил название теломеразы [109]. Клетки, которые экспрессируют теломеразу, могут восполнять недостающие, вследствие полуконсервативной репликации, теломерные повторы.

В настоящее время известно, что теломеры - это нуклеопroteиновые структуры, которые находятся на концах хромосом и защищают их от укорочения в процессе репликативного старения клетки. Сложно организованная структура теломер имеет важное значение для выполнения ими своих биологических функций. Повторяющиеся тандемные повторы теломерной ДНК у человека достигают 20 тысяч п.н. и заканчиваются G-богатым концом, который в среднем выступает на 130-210 п.н. на конце каждой теломеры [110]. Считается, что на конце теломер однонитевой фрагмент ДНК образует 2 петли. При этом сперва он загибается назад, образуя t-петлю, а потом замещает одну из цепочек ДНК в двунитевой части теломеры и образует d-петлю [111]. Такая структура служит защитой конца хромосомы от распознавания системой репарации ДНК как двуцепочечного разрыва. Последними исследованиями с использованием микроскопии сверхвысокого разрешения, которая позволяет визуализировать t-петлю, в динамике показана роль данной структуры в защите от АТМ – независимого пути активации системы репарации ДНК [112].

У млекопитающих теломерные последовательности связаны с белковым комплексом, который называется shelterin и состоит из 6 субъединиц [113]. Белки shelterin-комплекса высокоспецифично связываются с определенными участками теломер. Так, субъединицы TRF-1 и TRF-2 взаимодействуют с двухцепочечной теломерной ДНК, а POT-1 – с однонитевым 3'-концом. Белок RAP-1 функционирует совместно с TRF-2 и предотвращает независимое от теломеразы удлинение теломер. Компоненты TIN-2 и TPP-1 связывают белки в единый комплекс, который венчает конец хромосомы. Таким образом, shelterin-комплекс «запечатывает» концы хромосом, что необходимо для их защиты от

распознавания системой репарации как двунитевых и однонитевых разрывов ДНК и предотвращает гомологичную рекомбинацию и концевые слияния теломер [113]. В различных исследованиях путем делеции компонентов shelterin-комплекса показано каким образом каждая субъединица взаимодействует с системой репарации ДНК [114].

Помимо tandemных повторов TTAGGG и белков shelterin-комплекса, в состав теломер входит TERRA (Telomeric repeat-containing RNA). Это фрагменты молекулы РНК, которые транскрибируются в клетке с теломерных последовательностей, имеют различные размеры и продолжительность жизни. Роль TERRA в регуляции теломерного гомеостаза и поддержании функций теломер весьма многообразна. Последние работы свидетельствуют, что TERRA принимают активное участие в метилировании теломерного хроматина и поддержании целостности теломер [115, 116]. Считается, что теломерная РНК, посредством регулирования длины теломер, вовлечена в процессы туморогенеза, так как она является ингибитором теломеразы [117, 118]. Недавними исследованиями также было показано, что TERRA транскрибируются с теломер разных хромосомных плеч в разном количестве [119]. Последний факт может быть вызван неравномерным распределением длины теломерных последовательностей на отдельных плечах индивидуальных хромосом.

Длина теломерных повторов в клетках разных видов отличается, в соматических клетках человека она составляет 5-15 тыс. п.н. [19]. Защищая смысловые последовательности ДНК от укорочения в результате концевой недорепликации, теломеры сами обречены на деградацию. Однако эукариоты эволюционировали по пути поддержания длины теломер в соматических и половых клетках. Следует отметить, что однонитевой участок теломеры удлиняется с помощью специального фермента, теломеразы, ещё до основного раунда репликации. После чего обычным способом, с помощью ДНК-полимеразы, реплицируется вся ДНК, включая двунитевой участок теломер [120]. Теломераза служит основным инструментом, который защищает теломеры от укорочения в процессе деления клетки. А также показано, что теломераза принимает участие в

репарации двойных разрывов ДНК, предотвращая хромосомные перестройки в клетке [121].

С современной точки зрения теломераза представляет собой сложный ферментный комплекс. В его состав входит несколько субъединиц: TERT (telomerase reverse transcriptase) - обладает активностью обратной транскриптазы, TERC (telomerase RNA component) - теломеразная РНК-матрица, дискерин (DKC1) -модулирует активность теломеразы путем влияния на уровень TERC в клетке [122–124]. Вплоть до настоящего времени появляются исследования, которые открывают новые компоненты теломеразного комплекса и факторы, влияющие на активность теломеразы [125, 126].

Теломераза активна далеко не во всех клетках. Известно, что она функционирует в зародышевых и половых клетках человека. В норме, в постэмбриональном периоде активность теломеразы в дифференцированных соматических клетках снижается или вовсе не определяется [127]. Однако клетки могут реактивировать теломеразу в процессе онкологической трансформации. Показано, что теломераза активируется в 90% опухолевых клеток, в которых она удлиняет теломеры и способствует тем самым их высокой выживаемости [128]. Поэтому в терапии онкологических заболеваний особое значение имеет подавление теломеразной активности. Для этого используют таргетную иммунотерапию, которая направлена на выключение субъединицы теломеразы h-TERT. [129].

Исключением являются клетки, которые должны поддерживать высокую пролиферативную активность на протяжении всей жизни индивидуума – стволовые клетки и клетки иммунной системы. Теломераза экспрессируется в предшественниках гемопоэтических клеток и затем количество её снижается по мере дифференцировки клеток [130]. В зрелых клетках миелоидного ряда активность теломеразы уже не определяется. Тогда как в лимфоидных клетках она увеличивается после стимуляции антигеном. Однако высокая активность теломеразы после первичной стимуляции также постепенно снижается. Таким образом, индукция теломеразы в лимфоцитах поддерживает способность Т-клеток



к делению в процессе иммунного ответа, но не способна сохранять длину теломер на одном уровне все время [131]. Интересно, что уровень активности теломеразы выше в  $CD4^+$  Т-лимфоцитах, чем  $CD8^+$  Т-лимфоцитах. Благодаря чему  $CD4^+$  Т-клетки *in vitro* способны делиться дольше, чем  $CD8^+$ . С этим может быть связано более быстрое укорочение теломер в Т-эффекторах по сравнению с Т-хелперами [132]. Для В-лимфоцитов также показана максимальная активность теломеразы в герминативных центрах лимфатических узлов, которая связана с развитием гуморального иммунного ответа [133].

Существуют и другие способы, не связанные с активностью теломеразы, которые участвуют в регуляции длины теломер [134]. Одним из таких механизмов является альтернативное удлинение теломер (ALT – alternative telomere lengthening). Главным его признаком служит наличие в активно делящейся клетке длинных теломер при отсутствии теломеразы. Удлинение теломер с помощью ALT наблюдается преимущественно в опухолевых клетках человека, хоть и не так часто, как удлинение с помощью теломеразы. Считается, что клетка при достижении критически короткой длины теломер претерпевает репликативное старение и кризис, после чего подвергается апоптозу. Однако, те клетки, которые смогли преодолеть репликативный кризис, за счет активации теломеразы или ALT, выживают и иммортализируются [135]. Механизмы ALT по-прежнему до конца не ясны. Но есть мнение, что ALT происходит по принципу гомологичной рекомбинации, в которой участвуют белки shelterin-комплекса. Кроме того, существуют доказательства, что в нормальных и опухолевых клетках человека реализуются разные механизмы ALT, которые не всегда сопровождаются значительным удлинением теломер, но могут протекать при их укорочении [136].

Ещё одним способом, который направлен на укорочение длины теломерных последовательностей, является механизм быстрого укорочения теломер (telomere trimming) [137]. Скорее всего, тримминг теломер является механизмом, который позволяет ограничивать избыточное удлинение теломер теломеразой в плюрипотентных стволовых клетках человека [138]. Однако по последним

данным, механизм тримминга теломер является также отличительной чертой опухолей нейроэктодермального происхождения [139].

### 1.3.2. Современные методы изучения длины теломер

Все методы определения длины теломер основываются на комплементарном связывании специфичного праймера или нуклеиновой пробы с теломерной последовательностью. Первой методикой, которая позволила определять среднюю длину теломер, был анализ фрагментов рестрикции теломер (TRF – telomere restriction fragment analysis). Метод основан на том, что обычные ферменты рестрикции, расщепляя геномную ДНК, не могут использовать теломерные повторы в качестве субстрата. Полученная таким образом теломерная ДНК разделяется с помощью электрофореза и метится специфичным зондом с целью детекции теломерного мазка в Саузерн-блот-реакции [140]. Средний размер теломер определяется при помощи маркера заведомо известного размера. Недостатком этого метода является его низкая разрешающая способность и необходимость иметь относительно большое количество материала для исследования. Тем не менее, благодаря своей простоте и скорости он по-прежнему остается референсной методикой определения длины теломер. Если использовать предварительную сортировку хромосом, то на основе TRF можно определять длину теломер отдельных хромосом без учета хромосомных плеч, за исключением 1-2 и 9-12 хромосом, которые невозможно выделить отдельно [141].

Ещё два метода основаны на ПЦР-реакции. Это STELA (single telomere length analysis), который позволяет определить длину единичной теломерной последовательности и количественная ПЦР (Q-PCR – quantitative telomere chain reaction), которая используется для оценки средней длины теломер [142]. В Q-PCR учитывается непосредственно количество продукта ПЦР-реакции. Благодаря этому метод не требует много времени, но нуждается в большом количестве материала. В STELA же амплифицированный продукт сперва разделяется с помощью гель-электрофореза и затем его количество подсчитывается с помощью

Саузерн-блотт гибридизации [143]. Если использовать хромосомоспецифический праймер к субтеломерной ДНК, то можно установить длину определенной теломеры в небольшом количестве клеток или даже в единичной клетке. Несмотря на высокую точность, STELA является трудоемким методом. Еще одним недостатком этого метода является то, что он ограничен теми хромосомами, для которых существуют хромосом-специфические праймеры. В настоящее время на основе принципов Q-PCR предложен более чувствительный метод, который позволяет оценить длину коротких теломер –TeSLA [144].

Следующие два метода основаны на реакции флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH – fluorescent *in situ* hybridization) с теломер-специфичным зондом. Flow-FISH предназначен для оценки средней длины теломер с использованием проточной цитофлуориметрии [143]. Тогда как с помощью Q-FISH (quantitative fluorescent *in situ* hybridization) измеряют длину теломер на отдельных плечах метафазных хромосом [31]. В обеих методиках используется прямо меченная флуорохромом PNA (peptide nucleic acid)-проба, которая связывается с денатурированной теломерной ДНК и служит хорошей альтернативой ДНК-пробе [145]. Flow-FISH позволяет измерить среднюю длину теломер в различных клетках, в том числе в редких субпопуляциях, если они предварительно мечены антителами или выделены с помощью сортирования. Поэтому Flow-FISH является методом выбора для оценки длины теломер определенных клеточных субпопуляций в клинических и научных исследованиях.

Как следует из вышесказанного, Q-FISH на данный момент является единственной методикой, которая позволяет оценить длину всех теломерных последовательностей на плечах индивидуальных хромосом. Реакция гибридизации проводится на препаратах метафазных хромосом и полученный флуоресцентный сигнал с PNA-пробы регистрируется с помощью микроскопа. Описанные особенности методики создает ряд требований, которые необходимо соблюдать для получения корректного результата. Прежде всего, методика связана с проведением цитогенетического анализа. Это значит, что необходимо получение достаточного количества метафазных пластинок с хорошим качеством

распластывания хромосом. Для этого используются первичные культуры стимулированных клеток. Несмотря на хорошо описанные протоколы приготовления препаратов метафазных хромосом, для метода необходима индивидуальная адаптация и создание специальных условий в лаборатории [31, 146]. Другой проблемой может оказаться получение качественного дифференциального окрашивания хромосом, которое используется для последующего кариотипирования. Как правило при проведении Q-FISH используется DAPI-бэндинг. Однако качество его может снижаться вследствие денатурации ДНК в процессе гибридизации и постгибридизационных отмывок, что может потребовать отдельного подбора оптимальных условий гибридизации [31, 147].

В методике Q-FISH особенно важно корректно получить изображения хромосом и провести цифровую обработку сигнала флуоресценции. Поскольку метод является количественным, то для получения точного результата все образцы при съемке должны быть нормированы на объект, обладающий постоянной флуоресценцией. Чаще всего в роли последнего выступают микросферы с карбоксилированной поверхностью, конъюгированной с соответствующим флуорохромом [31]. Для корректной обработки флуоресцентного сигнала программное обеспечение должно быть снабжено адекватными способами определения границ изучаемых объектов – теломер и хромосом [148, 149], а также алгоритмами оценки фонового сигнала [31]. Существуют различные подходы к оценке фонового сигнала на Q-FISH изображениях. Как правило, все они базируются на анализе гистограммы интенсивности, построенной по точкам, принадлежащим маскам хромосом или интерфазных ядер [150–152].

### **1.3.3. Средняя длина теломер и длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом**

Несмотря на существование весьма эффективных способов поддержания длины теломер, к настоящему моменту известно, что длина теломер у человека снижается при старении и ряде патологических состояний, включая иммуноопосредованные заболевания [153, 154]. L. Hayflick и P. Moorhead первыми ввели термин «старение», чтобы описать феномен необратимого ареста клеточного цикла диплоидных клеток человека после серии пассажей в культуре. В 1986 году, H. Cooke и B. Smith сделали первые наблюдения, которые связали старение с теломерами. Они заметили, что средняя длина теломерных повторов половых хромосом в сперматозоидах, была на 5 тыс. п.н. больше, чем в клетках крови, полученных от тех же доноров. Авторы предположили, что это связано с дефицитом теломеразы в зрелых соматических клетках [155]. Исследования, которые были проведены в последующие годы, установили, что в фибробластах по мере увеличения количества делений средняя длина теломер уменьшается, а также показали укорочение теломер с возрастом [156, 157]. Позже в двух независимых исследованиях была показана возможность удлинения теломер и увеличения продолжительности жизни соматических клеток после восстановления в них активности теломеразы путем повышения экспрессии гена hTERT [158, 159]. Таким образом, эти эксперименты доказали, что укорочение теломер ассоциировано с процессом старения. В настоящее время считается, что белки shelterin-комплекса также принимают участие в репликативном старении [160]. Однако до сих пор не понятно, какие механизмы отвечают за снижение экспрессии теломеразы в дифференцированных клетках.

Скорость укорочения теломер за один раунд репликации составляет 21-50 п.н. на одно плечо хромосомы. В конечном итоге это может приводить к критическому укорочению теломер, их последующему слиянию вследствие негомологичной рекомбинации и гибели клетки [161]. Считается, что такой механизм клеточной смерти, связанный с репликативным старением, служит

естественным барьером от злокачественного перерождения клеток. Этот процесс может быть условно разделен на 2 стадии. На первом этапе происходит потеря теломерных последовательностей и нарушение структуры теломерного комплекса. Второй этап считается критическим. В это время включаются механизмы гомологичной и негомологичной рекомбинации ДНК, которые, как упоминалось выше, распознают незащищенные теломерные концы как разрывы ДНК. Это приводит к слиянию концов хромосом и образованию хромосом-дицентриков, которые в процессе последующего деления создают дальнейшие разрывы. По последним данным, дицентрические хромосомы, образуемые в процессе укорочения теломер могут участвовать в процессе туморогенеза путем хромотрипсиса [162]. В результате такого цикла, который получил название «разрыв-мост-слияние», генерируются анеуплоидные клетки, происходят дупликации, транслокации и другие хромосомные перестройки [163]. В большинстве случаев такие перестройки приводят к гибели клетки путем апоптоза. Однако, если клеткам удастся преодолеть эту стадию, например, путем реактивации теломеразы или механизмом ALT, то они выживают и могут инициировать туморогенез. Таким образом, укорочение теломер может быть как защитой, так и инициатором опухолевого роста [164].

Исходя из вышесказанного, следует, что для репликативного старения клетки имеет значение не средняя длина теломер, а наиболее короткие теломеры, которые и будут приводит к хромосомным перестройкам и апоптозу [165]. Действительно, было показано сперва на мышах, что длина теломер значительно варьирует на разных хромосомах и даже хромосомных плечах. При этом на сестринских хроматидах показатель длины теломер практически не отличается [166]. В 1996 г. две научные группы, используя Q-FISH, независимо друг от друга впервые показали гетерогенность длины теломер на разных плечах отдельных хромосом [26, 134]. После этого, используя аналогичный подход, P. Slijepcevic и др. установили, что длина теломер короче на р-плечах хромосом, чем на q-плечах [167]. Авторы работы связали это с хромосомными территориями, занимаемыми

хромосомами в интерфазном ядре. Чуть позже была обнаружена аналогичная ассоциация между длиной теломер и размером хромосомы [141].

Затем методом Q-FISH была установлена длина теломер на всех плечах индивидуальных теломер у человека и показано, что на р-плече 17 хромосомы, как правило, находится самая короткая теломера [168]. Ещё позже исследования J. Graakjaer и его коллег, проводимые с участием монозиготных близнецов показали, что длина теломер на разных хромосомах человека не только различается, но и имеет индивидуальные черты, которые передаются по наследству и поддерживаются в течение всей жизни человека [169, 170]. Такое неравномерное распределение длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом получило название теломерного профиля. Однако эти исследования не учитывали разницу между аллельными вариантами длины теломер отдельных хромосом, так как при проведении анализа не разделялись родительские гомологи. Проблема разделения гомологичных хромосом была частично решена применением специфических субтеломерных проб дополнительно к теломерной PNA-пробе. И было показано, что в лимфоцитах периферической крови и фибробластах кожи человека гомологичные хромосомы не только обладают разной длиной теломер, но и сохраняют эту разницу при условии недлительного культивирования *in vitro*. При длительном культивировании клеток или активации экзогенной теломеразы разница в длине теломер между гомологами исчезала [171]. Эти данные, с одной стороны, подтверждают наследственный характер теломерного профиля, а с другой, свидетельствуют о наличии механизма поддержания длины теломер на отдельных хромосомах, который не зависит напрямую от длины теломер.

Количество работ по исследованию длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом ограничено. Тем не менее из них следует, что длина теломер в клетках укорачивается неравномерно. Важным биологическим эффектом, который возникает вследствие укорочения теломер на индивидуальных хромосомах является повышение экспрессии генов, которые локализованы в субтеломерных районах. Этот эффект носит название

позиционного эффекта теломер (TPE – telomere position effect). Впервые этот эффект был обнаружен у дрожжей, позже – показан для клеток человека [79]. В пользу этой гипотезы Y. Ning с соавт. показал неравномерное укорочение теломер на разных хромосомах в процессе репликативного старения и связал это с измененной экспрессией генов в них [161]. Например, для q-плеча 16 хромосомы, которой свойственна частая потеря гетерозиготности при раке молочной железы, описано повышение экспрессии генов субтеломерного региона в стареющих клетках, которые прошли более 55 пассажей *in vitro* [161]. Также было показано, что с возрастом повышается экспрессия генов, отвечающих за трансформацию гетерохроматина, которые локализованы в субтеломерном регионе (на расстоянии от 100-300 тыс. п.н.) от теломеры. Авторы работы связывают это с явлением TPE в процессе клеточного старения [172].

Длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом при заболеваниях человека изучена слабо. Нашими предыдущими работами показано, что для РА характерно снижение вариабельности длины теломер и укорочение длины теломерной последовательности на p-плече 4 хромосомы [30]. Последующий анализ экспрессии генов p-плеча 4 хромосомы по сравнению со здоровыми донорами выявил тенденцию к повышению экспрессии гена СТВР1 в группе пациентов с РА и достоверное повышение экспрессии гена TLR2 в группе пациентов с высокой активностью РА, что может быть ассоциировано с укорочением длины теломеры p-плеча 4 хромосомы [173].

Остальные работы по определению длины теломер индивидуальных хромосом касаются онкологических заболеваний. Было показано, что являющиеся конститутивно короткими, теломерные районы 17p и 12q укорочены у пациентов с раком пищевода относительно здоровых доноров [29]. В другом исследовании выявлено, что при раке молочной железы у женщин, находящихся в пременопаузе, достоверно укорочены по сравнению со здоровыми донорами теломерные последовательности на p-плечах 15 и X-хромосомы [28]. Интересным является факт, что в клетках хронического миелоидного лейкоза длина теломер на плечах десяти различных хромосом повышена. При этом на шести из них она



является относительно высокой и в норме. Авторы связывают такие изменения длины теломер с наличием опухолевого клона, который происходит от общего предшественника, содержащего длинные теломеры на плечах некоторых хромосом. Последние удлиняются ещё сильнее на ранних стадиях малигнизации [174]. Это, однако, не противоречит укорочению теломер при опухолевой трансформации клеток. Так как показано, что для формирования хромосомы-дицентрика и запуска последующей опухолевой трансформации клетки достаточно потери всего одной теломеры [175].

#### **1.3.4. Влияние генетических и средовых факторов на длину теломер**

Так как длина теломер в лейкоцитах крови ассоциирована с возраст-зависимыми заболеваниями, считается, что биологический возраст лиц, обладающих более короткими теломерами, выше, чем у их сверстников с более длинными теломерами. Недавними исследованиями было показано, что длина теломер детерминирована генетически и, по-видимому, определяется ещё до рождения ребенка. По данным мета-анализа, проведенного более, чем на 19 000 лиц, у детей средняя длина теломер ассоциирована с возрастом обоих родителей, но имеет склонность наследоваться больше по материнской, чем по отцовской линии [176]. Последние исследования, в целом, согласуются с этими данными. А также свидетельствуют, что в XX веке имеется тенденция к укорочению теломер у детей, рожденных от родителей последних поколений по сравнению с предыдущими [177, 178]. Известно, что после рождения длина теломер укорачивается с возрастом неравномерно, максимально интенсивное укорочение теломер приходится на первую декаду жизни с последующим выравниванием темпа укорочения теломер [17, 179]. Длительные проспективные исследования на монозиготных близнецах и сиблингах показали высокий вклад наследственности в процесс возрастного укорочения теломер [180]. Влияние генетических факторов на длину теломер подтверждается также локусами, обнаруженными с помощью полногеномных исследований, которые отвечают за длину теломер [181].

Несмотря на роль наследственности, считается, что длина теломер находится также под влиянием условий окружающей среды и образа жизни. Воздействие основных экзогенных факторов на длину теломер суммировано в таблице 1 по результатам обзора K.J. Turner и соавт., 2019г. [164].

Таблица 1 - Влияние некоторых средовых факторов на длину теломер

Воздействие фактора	Длина теломер
Повышенный уровень психологического стресса	Способствует укорочению теломер и снижению активности теломеразы.
Высокий уровень физических нагрузок	Ассоциирован с более длинными теломерами
Ожирение	Длина теломер отрицательно коррелирует с индексом массы тела
Курение	Длина теломер снижена у курильщиков в сравнении с некурящими
Прием алкоголя	Отрицательно коррелирует с длиной теломер, отмечается дозозависимый эффект

Среди факторов, отрицательно влияющих на длину теломер, особенно хотелось бы отметить ожирение. Поскольку оно связано с повышенным содержанием свободных форм кислорода и оксидативным стрессом, ряд заболеваний, ассоциированных с ожирением, связан также с укорочением длины теломер. В частности, ожирение является коморбидным состоянием астмы, выделяют даже отдельный клинический вариант БА, ассоциированный с ожирением [45].

### 1.3.5. Изменение длины теломер при основных заболеваниях человека

Поскольку укорочение теломер связано с репликативным старением клеток, то неизбежным стал вопрос о роли укороченных теломер в развитии различных заболеваний человека, особенно ассоциированных со старением. Хотя механизмы участия теломер в патогенезе этих заболеваний не вполне ясны, в последние годы количество исследований, посвященных длине теломер при основных патологиях человека, неуклонно растет. Методологически наиболее доступно исследование средней длины теломер в лимфоцитах периферической крови, поэтому в большинстве работ по оценке риска заболеваемости и исходов болезней, используется именно этот подход.

Известно, что средняя длина теломер снижена при ряде наследственных заболеваний, таких как врожденный дискератоз, прогерия, атаксия-телеангиэктазия и некоторые другие. Эти наследственные синдромы являются редкими, связаны с мутациями компонентов теломеразы, белков shelterin-комплекса или системы репарации ДНК. Они манифестируют рано и поэтому рассматриваются как болезни, связанные с преждевременным старением клеток [164].

Большинство самых распространенных заболеваний человека также оказались ассоциированы с укорочением теломер в клетках ПК. Но они имеют, очевидно, другие патогенетические механизмы по сравнению с группой наследственных синдромов. Частота их увеличивается с возрастом и поэтому их принято считать возраст-ассоциированными заболеваниями. Наиболее часто в связи со сниженной длиной теломер рассматриваются сердечно-сосудистые заболевания. Было проведено множество исследований, которые доказали обратную зависимость между длиной теломер и риском сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе инфаркта миокарда, ишемической болезни сердца, артериальной гипертензии (подробно обобщено в обзоре С.Л. Fasching) [182]. Некоторые авторы связывают укороченную длину теломер с развитием атеросклероза коронарных сосудов [183]. В сумме эти данные позволяют

применять показатель длины теломер лимфоцитов ПК в качестве клинического биомаркера сердечно-сосудистых заболеваний [182]. В 2018 году был даже предложен подход, к индивидуальной оценке длины теломер, позволяющий спрогнозировать риск осложнений после операций на сердце [184].

Ещё одним широко распространенным возрастозависимым заболеванием является сахарный диабет 2 типа (СД 2). Несколько проспективных исследований показали, что укорочение теломер повышает риск развития СД2 [185]. Другое проспективное шестилетнее наблюдение выявило более высокий риск смертности у пациентов СД 2, которые имеют укороченные теломеры [186]. В сумме, полученные данные указывают на умеренную ассоциацию длины теломер и СД 2 типа [182].

Не меньший интерес со стороны исследователей проявляется в отношении роли теломер при онкологических заболеваниях. В проспективном исследовании 15-летней длительности было показано, что частота онкологических заболеваний у лиц со сниженной длиной теломер практически в 2 раза выше, чем у лиц с относительно длинными теломерами. А также выяснилось, что смертность от рака достоверно выше в группе пациентов с короткими теломерами [187]. Мета-анализ 2011 года, основанный на 21 исследовании связи онкологических заболеваний и длины теломер, установил, что наличие коротких теломер является маркером, который определяет склонность к онкологическим заболеваниям [188]. Более недавние исследования, проведенные на больших когортах, дают несколько противоречивую картину. Так, данные, полученные М. Weischer и соавт., оспаривают данную зависимость в отношении повышенной заболеваемости, но не смертности от рака [189]. L.Rode, напротив, подтверждает связь укороченных теломер и повышенную частоту развития онкологических заболеваний [190].

Теломерам отводится также особое место в патогенезе иммуноопосредованных заболеваний. Основная роль клеток иммунной системы заключается в развитии иммунного ответа с целью удаления причинно-значимого антигена. При аутоиммунных и аллергических заболеваниях иммунный ответ направлен на аутоантигены или аллергены, которые потенциально не могут быть

элиминированы. Это вызывает постоянную пролиферацию клеток, принимающих участие в иммунной реакции, что приводит к их преждевременному старению, связанному с укорочением теломер [154]. Такие изменения могут сопровождаться снижением антиген-распознающего репертуара Т-лимфоцитов [191] и их повышенным апоптозом [192]. В подтверждение этой точки зрения показано, что при РА снижена средняя длина теломер [193] и это сопровождается недостатком теломеразы в CD4<sup>+</sup> наивных Т-лимфоцитах [194]. А также выявлено укорочение длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом при РА [30]. Недавний мета-анализ суммирует данные 9 исследований по длине теломер и подтверждает их укорочение при РА [195].

Данными наших предыдущих исследований было показано снижение средней длины теломер в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитах при атопическом дерматите и БА [22]. Более того, у пациентов с различными формами БА укорочение теломер происходило в разных клеточных субпопуляциях, что может иметь отношение к патогенезу этого заболевания [23]. Это согласуется с другими исследованиями, которыми установлено, что у пациентов с БА и ХОБЛ снижена средняя длина теломер и наблюдается положительная корреляция между этим показателем и функцией внешнего дыхания при обеих патологиях [196].

В последнее время появляется все больше свидетельств ускоренного старения иммунной системы и респираторного тракта при БА и других хронических бронхолегочных заболеваниях. Так, в опытах на мышинных моделях показано укорочение теломер и повышение маркеров повреждения ДНК в стареющем легком. У людей с ХОБЛ также обнаруживаются фокусы повреждения теломерной ДНК в эпителии мелких дыхательных путей [197]. Поскольку возникновение хронических воспалительных заболеваний дыхательных путей ассоциировано с курением и доказано влияние курения на снижение длины теломер, то следует отметить, что при заболеваниях легких укорочение теломер, по-видимому, является самостоятельным фактором и происходит вне зависимости от курения. Во-первых, в недавнем проспективном исследовании было показано, что более быстрое по сравнению со сверстниками

укорочение теломер у здоровых лиц в возрасте 30-43 лет ассоциировано с ухудшением функции легких у них в возрасте 50 лет, вне зависимости от курения, а также пола, социального статуса и наличия воспалительных маркеров [198]. Во-вторых установлено, что у лиц, страдающих эмфиземой и ХОБЛ, снижение длины теломер происходит быстрее, чем у здоровых курильщиков [199, 200]. В недавнем исследовании было также показано, что ассоциированная с укорочением теломер обструкция дыхательных путей у пациентов с ХОБЛ, в том числе в исходе БА, не зависит от курения [201]. Таким образом, приведенные выше данные доказывают роль укорочения теломер как самостоятельного патогенетического фактора, связанного с развитием основных заболеваний человека, в том числе, БА.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Реагенты, использованные в исследовании

ЭДТА (MP Biomedicals, Германия), тиенам (Мерк Шарп и Доум Б.В., Нидерланды), гентамицин (Дальхимфарм, Россия), FBS (Fetal Bovine Serum, HyClone, Германия), среда для разделения лейкоцитов фиколл-верографин (Sigma, США), среда RPMI 1640 (ФГУП ГНЦ ВБ Вектор, Россия), L-глутамин (ФГУП ГНЦ ВБ Вектор, Россия), фитогемагглютинин (Phytohemagglutinin P) (Sigma, США), колхицин (Sigma, США, (сухой)), ледяная уксусная кислота (Реахим, Россия), параформальдегид (Sigma, США), пепсин (Fluka, США), твин-20 (Sigma, США), трис-HCl (Sigma, США), хлорид калия (Sigma, США), соляная кислота (Sigma, США), ЭДТА (MP Biomedicals, Германия), этанол (ОАО Кемеровская фармацевтическая фабрика, Россия), антифэйд Pro Long Gold (Invitrogen MP, США), Cy<sup>3</sup> -PNA зонд (CCCTAA)<sub>3</sub> Peptide Nucleic Acid (Eurogenetec Ltd, Бельгия), DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол) (Fluka, США), DMSO (диметилсульфоксид) (Riedel-deHaën, Германия), BSA (бычий сывороточный альбумин) (Sigma, США), формамид (Sigma, США), CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) (Molecular probe, USA), NaN<sub>3</sub> (натрия азид) (ОАО Вектор, Россия), флуоресцентные бусы (Fluospheres 0,2 мкм, LifeTechnologies, США), моноклональные антитела к поверхностным маркерам CD4-PE (Сорбент, Россия), CD3-PerCP/Cy5.5 (BioLegend, San Diego, CA, USA), CD62L-APC (BioLegend, San Diego, CA, USA), CD45R0-APC/Cy7 (или PE-Cy7 BioLegend, San Diego, CA, USA), CD197 (CCR7)-PE-Cy7 (или APC/Cy7 Beckman Coulter, USA).

### **Растворы и буферы, использованные в исследовании**

PBS буфер (0.13 M NaCl; 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7.2)

Забуференный физиологический раствор (ЗФР) (0,1% BSA; 2% ЭДТА, 20% NaN<sub>3</sub> в PBS буфере)

Гипотонический раствор KCl 75mM (0.56%)

Фиксатор (этанол: ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1)

Гибридизационный раствор (5 mM Tris HCl (pH=7.4), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 70% формамида деионизованного, 10% бычьего сывороточного альбумина, теломерный PNA- зонд, меченный Cy<sup>3</sup> в конечной концентрации 250 нг/мл)

Отмывочный раствор №1 (10mM Tris HCl, 50% формамида деионизованного, 0.1% БСА, pH=7.4 при 25C°)

Отмывочный раствор №2 (0.1 M Tris HCl (pH=7.4), 0.15 M NaCl, 0.1% Твин-20)

Красящий раствор (CFSE в конечной концентрации 1 мкМ в RPMI 1640)

### **Характеристика лиц, включенных в исследование**

Для исследования была набрана группа пациентов с БА в количестве 31 человека (25 женщин и 6 мужчин), в возрасте от 23 до 60 лет (средний возраст 44,13±1,7 года). Группа условно-здоровых доноров составила 30 человек (24 женщин и 6 мужчин), в возрасте от 24 до 60 лет (средний возраст 44,6±1,7 года). Для валидации методических условий Q-FISH и программного обеспечения были использованы мононуклеарные клетки, выделенные из периферической крови (МНК ПК), полученные от 3 пациентов с РА. Диагноз РА выставлялся врачами клиники иммунопатологии НИИФКИ в соответствии с клиническими критериями ACR/EULAR-2010. Забор материала у пациентов и условно-здоровых доноров производился с их предварительного информированного письменного согласия.



Все пациенты с БА на момент забора материала находились на лечении в клинике иммунопатологии НИИФКИ г Новосибирска. Критерием включения считалось наличие диагноза БА средней и тяжелой степени, выставляемого в соответствии с клиническими критериями GINA-2016. Диагноз экзогенной БА во всех случаях подтверждался сенсibilизацией к аэроаллергенам, установленной по результатам скарификационных тестов.

При отборе пациентов с БА критериями исключения служили наличие острого инфекционного заболевания или тяжелых инфекций (гепатита, пневмонии, герпес зостер и др.) в предшествующие исследованию 3 месяца; наличие прогрессирующих заболеваний печени, сердечно-сосудистой системы, почек, системы крови, а также эндокринного и церебрального происхождения; наличие любого злокачественного новообразования в анамнезе; алкоголизм или наличие признаков алкогольного поражения печени; наличие аутоиммунного заболевания. Также из исследования исключались женщины детородного возраста при наличии беременности и лица, вакцинированные в предшествующие забору материала 3 месяца.

### **Получение МНК периферической крови**

Периферическую венозную кровь, стабилизированную гепарином, разбавляли ЗФР и центрифугировали в градиенте плотности фиколл-верографин в течение 20 минут при 2,7 тыс. об/мин в центрифуге СМ-6М. Образовавшееся кольцо МНК собирали и отмывали дважды ЗФР при 1 тыс об/мин в течение 5 мин. Клеточный осадок ресуспендировали в ЗФР, подсчитывали количество клеток в камере Горяева. Клетки для последующего анализа фенотипического состава клеток памяти хранили в FBS с 10% DMSO в морозильной камере при -80° С. Исследование длины теломерных повторов, а также пролиферативной активности клеток памяти проводилось на свежевыделенных МНК ПК.

### **Протокол активации Т-лимфоцитов периферической крови**

Клетки, предназначенные для определения длины теломерных последовательностей, ресуспендировали в полной среде RPMI 1640 с содержанием L-глутамина (0,3 мг/мл), гентамицина (50 мкг/мл), тиенама (25 мкг/мл) и 10% фетальной бычьей сыворотки (FCS HyClone, UK) и культивировали в течение 72 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе, при 37°C. В качестве стимулятора митоза Т-лимфоцитов добавляли фитогемагглютинин (ФГА) в конечной концентрации 30 мкг/мл. Клетки культивировали в 24-луночном плоскодонном планшете в объеме 2 мл, концентрация клеток составляла 1,5 млн на 1 мл полной среды.

С целью определения субпопуляционного состава и пролиферативной активности Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в ответ на стимуляцию культивирование МНК проводилось таким же способом, как указано выше, но в меньшем объеме: культивировали в 96-луночных плоскодонных планшетах, в дублях, по 150 тыс. клеток на 100 мкл среды. Также в качестве контроля были проанализированы клетки, культивированные в полной RPMI 1640 без добавления ФГА. Для оценки пролиферации перед культивированием клетки окрашивали витальным красителем сукцинимидным эфиром карбоксифлюоресцеина (CFSE) с конечной концентрацией 1 мкМ в RPMI 1640 в течение 15 мин при 37°C. Избыток красителя удаляли путем добавления эквивалентного объема FCS.

### **Гипотонизация и фиксация ядер**

По истечении времени культивирования к клеткам на 20 минут добавляли колхицин в конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Затем суспензию клеток переносили в пробирки, центрифугировали, сливали надосадок. Гипотоническую обработку проводили в течение 10 минут в 75мМ растворе KCl на водяной бане с температурой 37°C. Для этого к клеточному осадку аккуратно добавляли 2 мл

гипотонического раствора KCl, осторожно взбалтывая пробирку, а затем доводили гипотонический раствор до общего объема 9 мл. После окончания гипотонии проводили предфиксацию: к клеточной суспензии добавляли 200 мкл фиксатора, аккуратно перемешивали и выдерживали 10 мин в холодильнике при +4°C. Затем клетки центрифугировали 6 мин при 1,1 тыс. об/мин и сливали надосадочную жидкость. Клеточный осадок аккуратно «капля-за-каплей» заливали 5 мл свежеприготовленного охлажденного до – 20°C фиксатора и оставляли для фиксации на 45 мин в морозильной камере при – 20°C. По истечении времени фиксации клетки тщательно ресуспендировали и осаждали (6 мин при 1,1 тыс. об/мин). После чего к осадку добавляли свежий фиксатор в объеме 5 мл, переносили в пластиковые пробирки и хранили в морозильной камере при – 20°C до момента приготовления препаратов.

### **Приготовление препаратов метафазных хромосом**

Приготовление препаратов проводили по стандартным протоколам [31, 202]. Для приготовления препаратов использовали обезжиренные предметные стекла (76×26×1 мм, Menzel GmbH + Co KG), которые до момента раскапывания хранились в дихромате калия. Стекла непосредственно перед приготовлением препаратов тщательно промывали водопроводной и дистиллированной водой. Затем помещали в стакан с дистиллированной водой и охлаждали при -4°C. Препараты готовили без выжигания. Для этого суспензию ядер центрифугировали, ресуспендировали в небольшом объеме (200-400 мкл) свежеприготовленного, охлажденного до -20°C фиксатора. На влажное предметное стекло наносили 2 капли по 13 мкл суспензии хромосом, сверху капали 25 мкл фиксатора и выдерживали стекло при +50°C на водяной бане до полного высыхания. После приготовления препаратов метафазных хромосом стекла выдерживали в течение 1 часа при 60°C и оставляли на ночь при комнатной температуре.

### Обработка препаратов пепсином

В качестве предгибридизационной подготовки стекла обрабатывали пепсином (рабочий раствор 1мг/мл в 0,01 N HCl (pH=2.0)), в течение 10 мин при 37°C с предварительной регидратацией препаратов путем их погружения на 15 мин при комнатной температуре в 150 мл PBS (pH=7.4). Затем слайды двукратно отмывали по 5 мин в PBS и фиксировали в течение 2 мин в 1% растворе параформальдегида. В завершении препараты ещё раз двукратно отмывали по 5 мин в растворе PBS и проводили через серию растворов этилового спирта возрастающей концентрации (70%, 90%, 96%), после чего высушивали при комнатной температуре. Готовые препараты хранили до момента проведения гибридизации при -20°C. Их качество контролировали под фазово-контрастным микроскопом: для гибридизации отбирали слайды с достаточным количеством метафаз и оптимальным распластыванием хромосом.

### Количественная флуоресцентная гибридизация *in situ* (Q-FISH)

Поскольку для количественной оценки теломерных повторов необходимы идентичные условия Q-FISH, то гибридизацию *in situ* в парах пациент – донор проводили одновременно. Перед проведением гибридизации *in situ* отобранные препараты повторно дегидратировали в растворах этилового спирта возрастающей концентрации (70%, 90%, 96%). Затем тщательно обдували грушей и окончательно высушивали при комнатной температуре в течение 20 минут. На сухую поверхность препарата наносили 2 капли (по 10 мкл каждая) гибридизационного раствора под покровное стекло размером 22×50 мм. Денатурацию ДНК проводили на термостойке (БИС М-209, Россия) при 75°C в течение 2 мин. Далее переносили препараты во влажную камеру и гибридизировали 4 часа при температуре 37°C в темноте. После гибридизации покровное стекло удаляли и препараты отмывали 1 раз в течение 8 мин в отмывочном растворе №1 и 3 раза по 5 мин в отмывочном растворе №2, все

отмывки проводили на шейкере. Затем препараты дегидратировали в растворах этилового спирта возрастающей концентрации (70%, 90%, 96%) с последующим высушиванием грушей. Препараты для получения дифференциального окрашивания заключали в раствор DAPI (1,5мкг/мл) в антифэйде – 2 капли (по 10 мкл) под покровное стекло (22×50 мм). Окрашивание проводили в темноте в течение 20 мин. Препараты до микроскопии хранили в темноте при температуре +4°C.

### **Приготовление препаратов флуоресцентных бус**

С целью нормировки осветительной системы микроскопа использовали флуоресцентные бусы с оранжевым спектром флуоресценции (540/560 нм), которые предварительно приготавливали следующим образом: бусы разводились в 100 раз в смеси PBS и FBS (1:1). Затем 3 мкл полученной суспензии микросфер наносились на край покровного стекла (22\*50 мм) и краем предметного стекла бусы равномерно распределялись по покровному стеклу (по типу мазка крови). Полученное покровное стекло подсушивалось в темноте в течение 15 минут, после чего на него наносилось 5 мкл антифэйда без DAPI и сверху помещалось стандартное предметное стекло. Стекла скрепляли клеем и до проведения съемки хранили при температуре +4°C в холодильнике

### **Микроскопия и регистрация изображений**

Микроскопию и регистрацию изображения проводили на микроскопе «Axioscop 40» (ZEISS, Германия), оснащенном ртутной лампой высокого давления HBO 50W, комплектом интерференционных фильтров фирмы Zeiss (№49 для DAPI и №20 для Cy3) и монохромной CCD-камерой «AxioCam 503 mono» (разрядность АЦП 14 бит, матрица сенсора 1936\*1460). Запись микроскопических изображений хромосом и Q-FISH сигналов теломер проводили в отдельных каналах используя программное обеспечение «ZEN-2012» (ZEISS,

Германия). Время экспозиции для каждого снимка подбиралось таким образом, чтобы профиль интенсивности наиболее яркого сигнала в пределах метафазы не выходил за границу 90% динамического диапазона камеры, что составляло 600-800 мсек для DAPI и 3000-5000 мсек для Су<sup>3</sup>. Регистрация изображений проводилась отдельно для каждого канала, цифровое изображение сохранялось в формате TIFF. При экспорте изображения конвертировались в 8-битный формат, на который рассчитана программа для количественного анализа теломерных повторов. В течение каждой сессии производилась периодическая съемка препарата с флуоресцентными бусами таким образом, чтобы для нормировки изображений метафазных пластинок, полученных от одного образца, было не менее 15 изображений бус.

### **Анализ изображений**

Цифровая обработка изображений проводилась в специально созданной программе «MeTeLen» для определения количества теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом с учетом времени экспозиции, процедур нормировки и выравнивания, как описано ниже. Диплоидная клетка содержит два гомолога аутосом и две половые хромосомы. В большинстве случаев идентификация гомологов, имеющих отцовское и материнское происхождение, была невозможна. Поэтому результаты измерения интенсивности флуоресцентного сигнала относили к теломерам короткого и длинного плеча соответствующей хромосомы без разделения на гомологи. Для идентификации хромосом и их районов согласно международной номенклатуре метафазных хромосом человека (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2013) использовали инвертированный DAPI-бэндинг. Номера хромосомам присваивали в программе «MeTeLen» интерактивно.

Всего для каждого индивидуума, вовлеченного в исследование, проводился анализ 5 метафазных пластинок. Так как плечо метафазных хромосом состоит из двух сестринских хроматид, то для теломеры соответствующего хромосомного

плеча в каждой клетке проводилось четыре измерения. Поэтому показатель интенсивности ее сигнала вычислялся как среднее арифметическое этих измерений в пяти метафазах. В зависимости от эксперимента, длина теломер конкретного плеча хромосомы выражалась в единицах интенсивности флуоресценции (фл. ед.), которые представляют собой суммарную интенсивность регистрируемого сигнала с теломерной последовательности (IFI), выраженную в уровнях серого по 256-битной шкале или в относительных единицах (отн.ед.), которые представляют собой IFI, нормированную на время экспозиции и интенсивность флуоресцентного сигнала с бус.

### **Анализ фенотипа и пролиферативной активности Т-клеток памяти**

Клетки для анализа фенотипического состава Т-клеток памяти размораживали и двукратно отмывали ЗФР в течение 5 минут при 1000 об/мин. Для анализа пролиферативной активности Т-клеток памяти использовали свежевыделенные клетки, культивированные в условиях поликлональной активации ФГА и без добавления ФГА в течение 72 часов культивирования. Клеточный осадок ресуспендировали и добавляли моноклональные антитела к поверхностным маркерам центральных и эффекторных Т-клеток-памяти. Количество антител брали в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Для каждого человека, участвующего в исследовании, окрашивали  $6 \times 10^5$  клеток, окрашивание проводили в течение 20 мин при комнатной температуре, в темноте. После окрашивания клетки двукратно отмывали ЗФР с азидом натрия, осадок ресуспендировали, добавляли 300 мкл ЗФР и подвергали анализу. Для анализа фенотипического состава Т-клеток памяти применялась следующая панель (CD4-PE, CD3-PerCP/Cy5.5, CD62L-APC, CD45R0-PE-Cy7, CD197(CCR7)-APC/Cy7. Для анализа субпопуляционного состава и пролиферативной активности Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов после стимуляции ФГА использовалась аналогичная комбинация антител, за исключением CD45R0- и CD197(CCR7)- антител, которые были

конъюгированы с APC/Cy7 или PE-Cy7CD197 соответственно. Для анализа CD62L и CD197-маркеров применялся FMO-контроль (fluorescence minus one), который включал всю панель, за исключением антител к указанным антигенам. В качестве внутреннего контроля флуоресценции применялись клетки, не меченые антителами.

Анализ фенотипа Т-клеток проводился на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD, USA) с использованием программного обеспечения FACS Diva (BD, USA). Стратегия гейтирования клеток памяти представлена на рисунке 1. Субпопуляции с фенотипом  $CD3^+CD4^{+/-}CD45RO^-CD62L^{+/-}CD197(CCR7)^+$  оценивались как «наивные» Т-клетки хелперы или цитотоксические лимфоциты соответственно. Центральным клеткам памяти соответствовал фенотип  $CD3^+CD4^{+/-}CD45RO^+CD62L^{+/-}CD197(CCR7)^+$ . Эффекторные Т-лимфоциты памяти распознавались как  $CD3^+CD4^{+/-}CD45RO^+CD62L^{+/-}CD197(CCR7)^-$ ;  $CD45RO^-$  эффекторные Т-клетки с фенотипом  $CD3^+CD4^{+/-}CD197(CCR7)^-$  определялись как субпопуляции терминально-дифференцированных эффекторных Т-лимфоцитов (Temra) с различной экспрессией CD62L. Анализ пролиферативной активности заключался в определении относительного числа пролиферирующих клеток, окрашенных CFSE, по уровню их флуоресценции, и не включал в себя пик неделящихся клеток (рисунок 1Д).



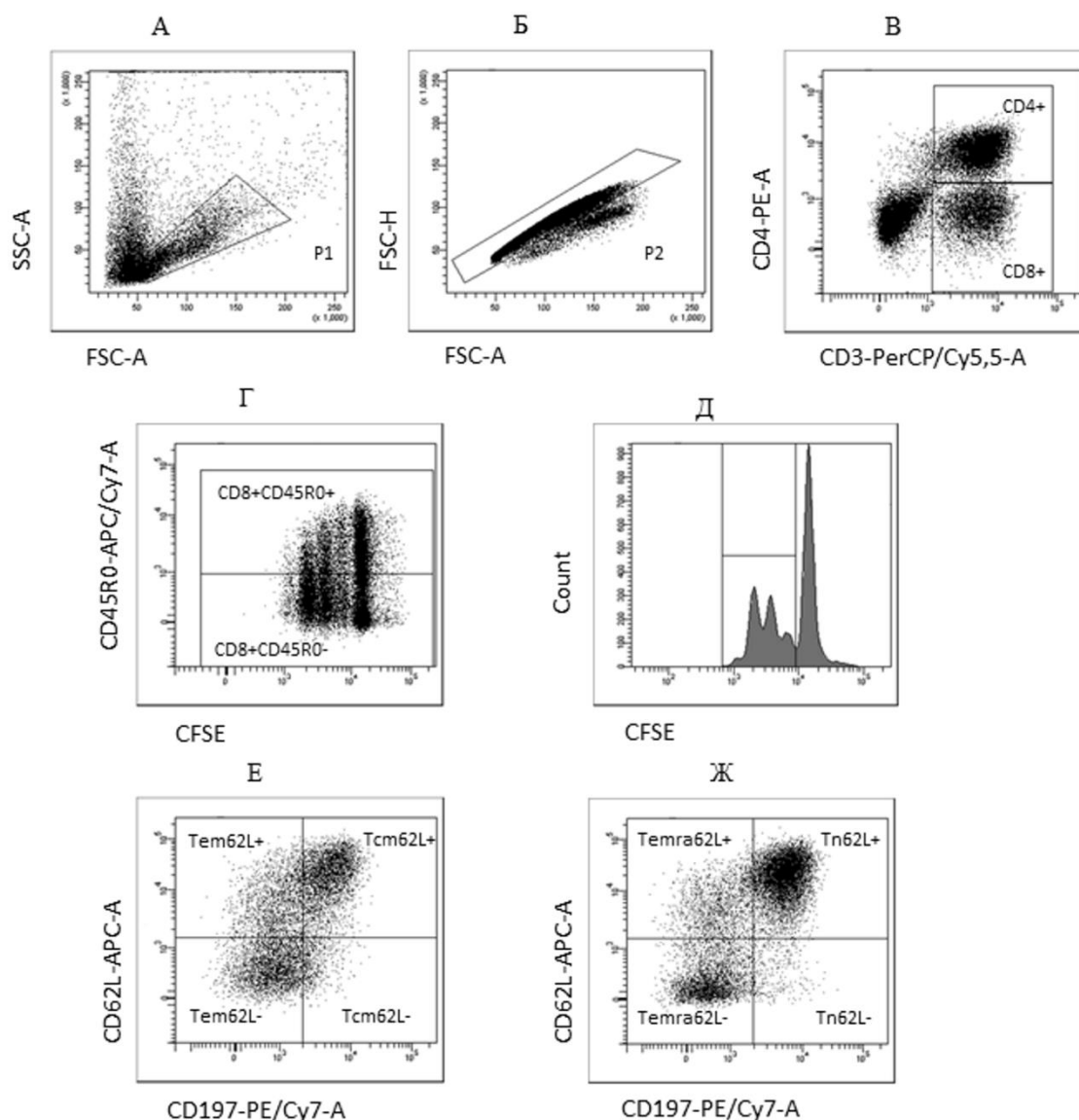


Рисунок 1 - Схема гейтирования наивных Т-лимфоцитов, центральных, эффекторных Т-клеток-памяти и терминально-дифференцированных Т-лимфоцитов на примере цитотоксических Т-лимфоцитов, культивированных 72 часа в присутствии ФГА *in vitro*

Примечание: Здесь и далее: Tnaive – «наивные» Т-лимфоциты с фенотипом  $CD45RO^-CD62L^{+/-}CD197(CCR7)^+$ ; Tcm – клетки центральной памяти с фенотипом  $CD45RO^+CD62L^{+/-}CD197(CCR7)^+$ ; Tem – клетки эффекторной памяти с фенотипом  $CD45RO^+CD62L^{+/-}CD197(CCR7)^-$ ; Temra – терминально-дифференцированные Т-клетки памяти с фенотипом  $CD45RO^-CD62L^{+/-}CD197(CCR7)^-$ . (А) Выделение лимфоцитов периферической крови на основании показателей прямого (FSC) и бокового светорассеяния (SSC). (Б) Удаление из лимфоцитарного гейта дуплетов и триплетов клеток на основании анализа площади и ширины

прямого светорассеяния. (В) Выявление Т-лимфоцитов хелперов и киллеров на основании экспрессии маркеров CD3 и CD4. (Г) Разделение цитотоксических Т-лимфоцитов на субпопуляции «наивных» лимфоцитов и клеток памяти по экспрессии маркера CD45RO. (Д) Гистограмма флуоресценции цитотоксических Т-лимфоцитов, окрашенных CFSE, прошедших 4 деления *in vitro*. (Е) Разделение цитотоксических Т-клеток памяти на субпопуляции Tcm и Tem по экспрессии маркеров CD62L и CD197(CCR7). (Ж) Выделение субпопуляций Tnaive и Temra по экспрессии маркеров CD62L и CD197(CCR7).

### **Статистическая обработка**

Статистический анализ данных проводился с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft). Распределение параметров в группах отличалось от нормального, поэтому применялись методы непараметрической статистики. Для оценки значимости различий между группами больных и здоровых доноров использовался критерий Манна-Уитни, для сравнения двух связанных групп применялся критерий Уилкоксона. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Множественное сравнение связанных групп проводилось однофакторным дисперсионным анализом (метод Краскер-Уоллиса). Корреляционный анализ проводился методом ранговой корреляции Спирмена.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1. Разработка программного обеспечения

Для количественной оценки размера теломер большое значение имеет корректная регистрация интенсивности сигнала и последующая его обработка. Многочисленные факторы, влияющие на интенсивность регистрируемого сигнала, делают необходимым проведение его нормировки. Поэтому под руководством Рубцова Н. Б. и в сотрудничестве с Богомоловым А. Г., лаборатория морфологии и функции клеточных структур ФИЦ ИЦиГ СО РАН, было разработано специальное программное обеспечение «MeTeLen» (Measurement of Telomere Length of chromosomes), предназначенное для оценки количества теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом.

Созданное программное обеспечение обрабатывает 2 типа изображений: фотографии флуоресцентных бус и изображения метафазных хромосом в 24-битном формате. Программа «MeTeLen» состоит из нескольких блоков:

*а* - предобработка данных;

*б* - определение границ биологических объектов;

*в* - оценка длины теломер на плечах индивидуальных хромосом (рисунок 2).

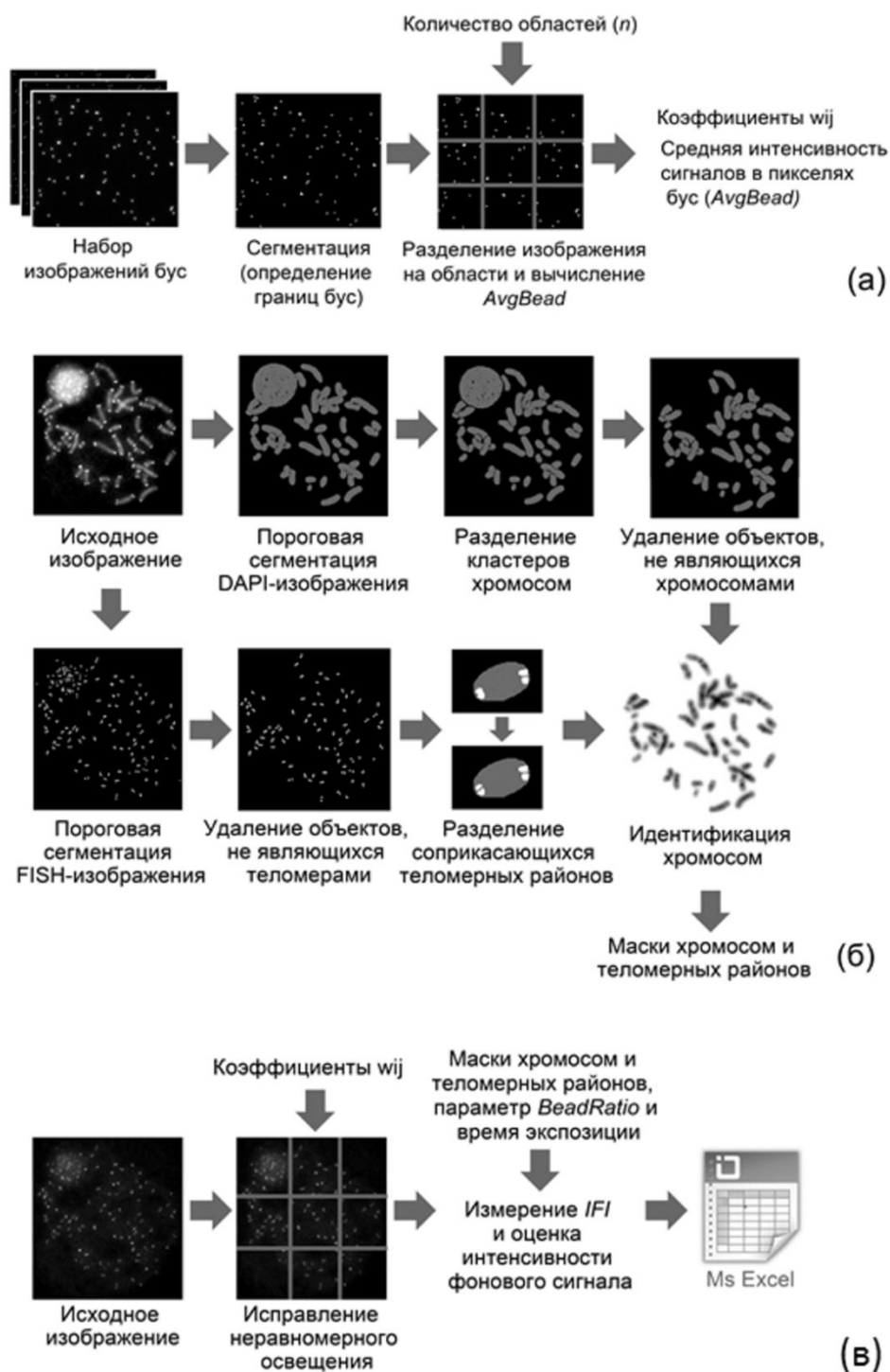


Рисунок 2 - Блок-схема анализа Q-FISH изображения метафазных хромосом в программе «MeTeLen»

Примечание: (а) - блок предобработки данных; (б) – блок анализа изображений метафазных хромосом; (в) – блок измерения интенсивности Q-FISH- сигнала

Первый блок использует средние значения интенсивности флуоресценции нормировочных бус для калибровки сигналов с целью сравнения экспериментов между собой и для исправления неравномерности освещения при микроскопировании. Второй блок служит для анализа микроизображений метафазных хромосом, который проводится по следующей схеме: обнаружение и идентификация хромосом, обнаружение теломер, определение принадлежности теломер к хромосомам. Третий блок предназначен для выравнивания, нормировки FISH-сигналов и определения суммарного сигнала PNA-пробы в отдельных теломерных регионах.

### **3.1.1. Нормировка и коррекция изменений интенсивности сигналов Q-FISH**

Результат регистрации интенсивности FISH-сигнала зависит от настройки осветительной системы микроскопа и параметров регистрации микроизображения. Он может серьезно варьировать от эксперимента к эксперименту, особенно если съемка проводится в разные дни. Поскольку набор достаточного количества материала в данном исследовании невозможно было провести одномоментно, то была необходима нормировка интенсивности сигналов. Поэтому в каждый эксперимент было включено стекло с нормировочными бусами, флуоресценция которых является стабильной. Это позволило проводить нормировку сигналов на микроизображениях метафазных хромосом и компенсировать возможную неравномерность освещения, обусловленную недостатками оптической системы.

Области локализации бус на изображениях выделялись с помощью метода пороговой сегментации [203]. Для того, чтобы провести нормировку флуоресцентных сигналов с теломер, полученных во время разных съемочных сессий, использовался коэффициент BeadRatio. Данный коэффициент вычислялся как отношение средних значений интенсивности сигналов на бусах для этой

съемочной сессии ( $AvgBead_x$ ) к самому первому эксперименту, относительного которого проводилась нормировка ( $AvgBead_1$ ).

Из-за существующих геометрических aberrаций и нестабильного освещения при использовании ртутной лампы высокого давления в качестве источника света, интенсивность получаемого сигнала флуоресценции может существенно варьировать в пределах поля зрения. Чтобы провести корректировку этих недостатков оптической системы флуоресцентного микроскопа, использовалась процедура выравнивания. Для этого изображения бус разбивались на  $n \times n$  фрагментов. Для каждого фрагмента ( $f_{ij}$ ) вычислялась средняя интенсивность сигнала бус ( $AvgBead(i,j)$ ). Далее, разделив значения  $AvgBead(i,j)$  на значения  $AvgBead$  в центральном фрагменте, получали коэффициент выравнивания  $w_{ij}$  для каждого фрагмента изображения. Коррекция неравномерности интенсивности сигнала для последующих метафазных пластинок проводилась путем разбиения изображений хромосом на  $n \times n$  фрагментов и уменьшение интенсивности сигнала в фрагментах  $f_{ij}$  в  $w_{ij}$  раз.

### 3.1.2. Выделение изображений хромосом

Определение границ метафазных хромосом в программе осуществлялось с помощью метода, предложенного S.S. Poop и его коллегами [203], модифицированного применением автоматической пороговой сегментации [150, 204]. При необходимости выбранный в программе порог сегментации может быть интерактивно исправлен. После проведения сегментации микроизображение хромосом может нуждаться в дополнительной обработке: исключение посторонних объектов (ядра клеток, не полностью вошедшие в кадр хромосомы, и т.д.), разделение наложенных и соприкасающихся хромосом. Программное обеспечение дает возможность проводить эти процедуры полуавтоматически. Так, объекты, площадь которых 5-кратно превышает или в 10 раз меньше, чем средняя площадь хромосом, автоматически распознаются программой, как ложные.

### 3.1.3. Выделение изображений теломер

Для определения границ теломер ранее использовался метод, основанный на фильтре средней разности [203], что приводило к исключению из вычислений теломер с низкой интенсивностью флуоресценции. Чтобы избежать таких потерь, в «MeTeLen» при сегментации использовали более низкий порог, чем предложено в первоисточнике [203].

Результаты первичной сегментации часто содержали дополнительные посторонние объекты, обычно с низкой интенсивностью сигнала. Для их полуавтоматического исключения в «MeTeLen» используются такие характеристики, как площадь объектов, их расположение относительно хромосом, интенсивность сигнала. Например, яркие объекты, расположенные вне концов хромосом или слишком большие по размеру (если площадь объекта в три раза больше, чем средняя площадь теломерного сигнала), могут удаляться полуавтоматически. Также автоматически удаляются объекты, средняя интенсивность которых меньше, чем фоновый уровень сигнала или которые не содержат ярких точек.

### 3.1.4. Определение принадлежности теломер к хромосомам

Чтобы идентифицировать хромосому, содержащую теломерный район, в программе было реализовано несколько способов. Во-первых, теломеру можно отнести к соответствующей хромосоме, если большая часть ее сигнала локализована на этой хромосоме. Более сложным случаем является расположение теломеры за границей маски хромосомы. В этом случае рассчитываются следующие евклидовы расстояния: расстояние между центрами масс теломеры и хромосом, расстояние между центром масс теломеры и крайними точками хромосом, расстояние между центрами масс теломер. Если ближайшим объектом является хромосома, то теломера относится к ней. Если ближайшим объектом

является теломера, то обе теломеры рассматриваются как теломеры двух сестринских хроматид, принадлежащих одной хромосоме.

### 3.1.5. Измерение интенсивности отдельных сигналов с теломер

Стоит отметить, что общий сигнал ДНК-пробы в теломерных районах представляет собой сумму FISH-сигналов теломерных последовательностей и фонового сигнала. Поэтому длина каждой теломерной последовательности характеризовалась по суммарной интенсивности регистрируемого сигнала (IFI) во всех точках, принадлежащих данному теломерному району за вычетом фонового сигнала.

В программе «MeTeLen» были реализованы следующие способы оценки интенсивность фонового сигнала:

1. Средняя интенсивность сигнала в точках, лежащих близко к теломере (NearPoints). Рассматривались точки внутри окружности в два раза превышающие радиус теломеры (радиус равен расстоянию от центра масс до самой крайней точки теломеры). Точки, относящиеся к теломерам не учитывались;

2. Средняя интенсивность сигнала в точках, принадлежащих хромосоме (AvgOfChr). Для каждой теломеры уровень фонового сигнала оценивался по точкам, принадлежащим хромосоме, к которой относится соответствующая теломера. При этом из вычисления исключались точки, принадлежащие теломерам;

3. Средняя интенсивность сигнала в точках, принадлежащих всем хромосомам (AvgOfImg). В отличие от предыдущей характеристики, фоновый сигнал оценивался не по конкретной, а по всем хромосомам на изображении.

Таким образом, общая формула для вычисления IFI в теломерном районе имеет вид:

$$IFI = \frac{1000 * (\sum I(x,y) - S * Background)}{Exp * BeadRatio} \quad (1),$$



где  $I(x,y)$  – интенсивность регистрируемого сигнала в точке  $(x,y)$ , принадлежащих теломере;  $S$  – площадь (количество пикселей в теломерном районе);  $Background$  – интенсивность фонового сигнала;  $Exp$  – время экспозиции в текущем эксперименте в миллисекундах;  $BeadRatio$  – отношение средних значений интенсивности сигналов на бусах для этой серии изображений к эксперименту относительного которого проводится нормировка.

### 3.2. Модификация условий Q-FISH

Для успешной оценки длины индивидуальных теломер необходимо получение как стабильного и воспроизводимого сигнала Q-FISH, так и надежной идентификации хромосом и хромосомных районов. Несмотря на применение различных методов идентификации хромосом и хромосомных районов одновременно с FISH [147], в данном случае было достаточно DAPI-бэндинга. Так как качество DAPI-бэндинга зависит температуры и продолжительность денатурации ДНК при проведении FISH, была проведена модификация метода, предложенного S.S. Poen и P.M. Lansdorp [31]: температура денатурации ДНК хромосом была снижена до 75°C, время денатурации уменьшено до 2-х минут. При использовании PNA пробы это не влияло на качество Q-FISH, но существенно улучшило морфологию хромосом (рисунок 3).

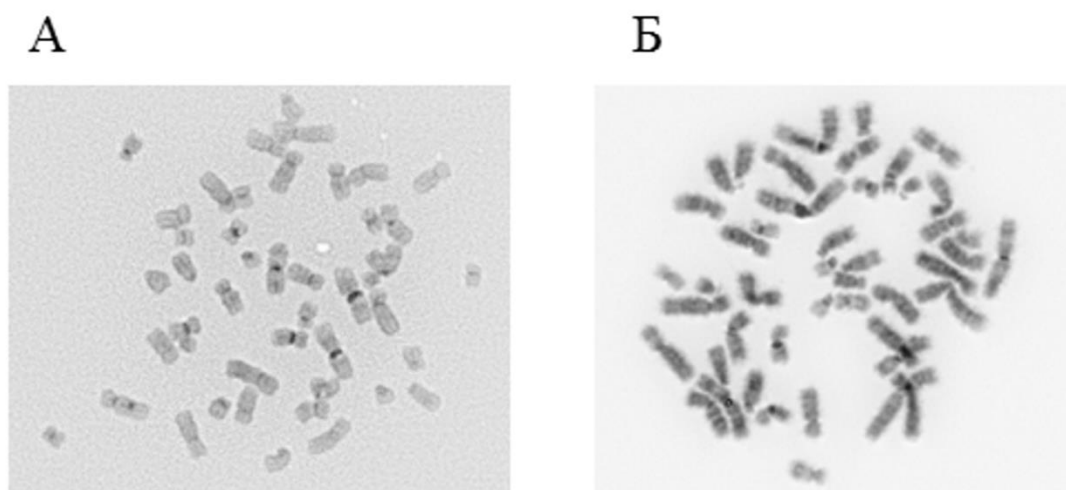


Рисунок 3 - Качество инвертированного DAPI-бэндинга метафазных хромосом после проведения Q-FISH стандартным (А) и модифицированным (Б) способом

Примечание: (А) - метафазная пластинка после традиционного варианта Q-FISH (80°C в течение 3 мин) демонстрирует отсутствие DAPI-дифференциального окрашивания хромосом; (Б) - метафазная пластинка после модифицированного варианта Q-FISH (75°C в течение 2 мин) демонстрирует отчетливое DAPI- дифференциальное окрашивание хромосом

### **3.3. Валидизация программного обеспечения и модифицированной методики Q-FISH для оценки длины теломерных последовательностей на индивидуальных хромосомах у пациентов с иммунопатологией**

Валидизация модифицированной методики Q-FISH проводилась на пациентах с иммунопатологией. Для этого были получены препараты метафазных хромосом от 3 пациентов с РА, на которых была проведена Q-FISH согласно стандартному и модифицированному протоколу. Для валидизации разработанного ПО также использовалось стекло с флуоресцентными бусами.

### 3.3.1. Валидизация процедуры выравнивания интенсивности сигнала Q-FISH

Процедура выравнивания сигнала Q-FISH на изображениях метафазных хромосом зависит от числа изображений, содержащих нанесенные на стекло бусы и от количества элементов, на которое разбиваются изображения. Разбивка изображения на большее число элементов позволяет вычислять коэффициенты выравнивания  $w_{ij}$  для меньших по размеру участков, а увеличение числа изображений дает более точное значение  $w_{ij}$ . Как отмечалось ранее, процедура выравнивания включает в себя построение матрицы размером  $n \times n$ , каждый элемент которой характеризуется значением AvgBead.

Для оценки оптимального количества анализируемых изображений вычислялась средняя разница ( $\Delta$ ) между значениями AvgBead, подсчитанных для разного количества изображений бус ( $k$ ). В рамках данного эксперимента было получено 20 изображений бус. Изображения выбирались случайно. После выбора очередного изображения пересчитывалось значение AvgBead с учетом нового изображения и оценивалась разница  $\Delta$ . Процедура выбора 20 изображений повторялась 100 раз. На рисунке 4 показано изменение  $\Delta$  в зависимости от выбранного количества изображений бус.

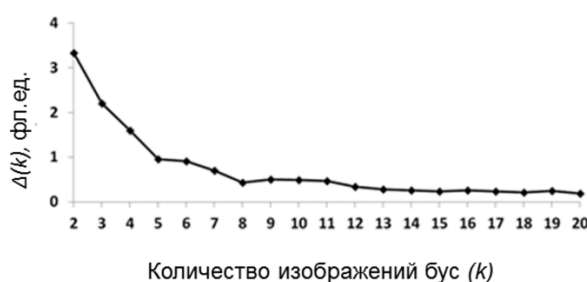


Рисунок 4 - График  $\Delta(k)$ , усредненный для ста случаев

Примечание: Изображения разбивались на  $50 \times 50$  фрагментов; ( $k$ ) - количество изображений бус, фл. ед. – флуоресцентные единицы.

Из графика видно, что чем больше количество изображений используется для построения матрицы, тем точнее описываются вариации интенсивности сигналов при использовании конкретного микроскопа в момент проведения эксперимента. Исходя из данного эксперимента, оптимальным является использование 15-20 изображений бус в каждой съемочной сессии для проведения процедуры выравнивания.

Целью следующего эксперимента была оценка количества фрагментов, на которое нужно разбить изображение при проведении выравнивания интенсивности флуоресцентного сигнала. Для симуляции неравномерного освещения был получен набор изображений одной и той же метафазной пластинки, снятой в разных положениях за счет перемещения предметного столика. Двадцать теломерных районов были случайно выбраны на изображениях и проанализированы, для каждой теломеры были рассчитаны отдельные значения IFI. После применения процедуры коррекции по бусам отдельные значения IFI были снова рассчитаны. Коэффициент вариации (CV) значений флуоресценции рассчитывали для каждого набора измерений. Было обнаружено, что при использовании количества фрагментов от 5 до 21, достигается оптимальное среднее значение CV. При этом разделение изображений на  $9 \times 9$  областей привело к минимальным средним значениям CV после процедуры коррекции. Также было обнаружено, что значения  $n$  больше 21 ухудшают результаты выравнивания интенсивности флуоресцентного сигнала. Ухудшение результатов при больших значениях  $n$  связано с увеличением количества фрагментов, не содержащих бус, а также случаев неполного попадания бус в фрагменты изображения.

### **3.3.2. Сравнение способов оценки интенсивности фонового сигнала**

Для сравнения способов оценки интенсивности фонового сигнала было снято 23 изображения метафазных пластинок, полученных от пациента с РА. На каждом изображении определялись маски теломер на 1-ой и 2-ой хромосомах и

вычислялась IFI в найденных районах. Результаты сравнения представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Сравнение способов оценки фонового сигнала

Локализация теломеры	Способы определения фонового сигнала		
	Средняя интенсивность сигнала в точках, расположенных рядом с теломерами (NearPoints)	Средняя интенсивность сигнала в точках, принадлежащих данной хромосоме (AvgOfChr)	Средняя интенсивность сигнала в точках, принадлежащих всем хромосомам (AvgOfImg)
1p	512,38±126,57	563,9±139,96	557,98±140,45
1q	376,04±96,71	407,65±112	402,47±113,87
2p	486,9±133,41	534,03±153,34	536,98±155,23
2q	353±95	376,98±107,96	380,65±101,9

Примечание: В таблице указаны значения IFI (единицы измерения – отн. ед.) для коротких и длинных плеч 1 и 2 хромосомы с исключением интенсивности фонового сигнала. Данные представлены в виде mean±sd.

Существенных различий между значениями, рассчитанными разными методами, обнаружено не было. Небольшие различия между результатами AvgOfChr и AvgOfImg могут быть объяснены различиями между фоновой флуоресценцией в G- и R-полосах хромосом после проведения Q-FISH. G- и R-полосы характеризуются различными уровнями компактизации хроматина и, как

результат, имеют разные уровни расчетной фоновой флуоресценции. Поскольку человеческие хромосомы отличаются друг от друга обогащением материала G- или R-полос, то различия между значениями фоновой флуоресценции, рассчитанные с помощью AvgOfImg и AvgOfChr, зависят от того, какая хромосома содержит интересующую теломеру. В отличие от этих двух методов, метод NearPoints вычисляет среднее значение флуоресценции в пикселях, расположенных вокруг интересующей теломеры. Поэтому, полученные этим методом, данные не зависят от расположения хромосом анализируемой теломеры. Исходя из этого, метод NearPoints может быть методом выбора для определения интенсивности фонового сигнала.

### 3.3.3. Валидизация методических условий

Считается, что теломеры, находящиеся на сестринских хроматидах содержат примерно одинаковое количество T2AG3-повторов и сигналы флуоресценции, полученные от таких пар после проведения Q-FISH, должны коррелировать с высокой степенью [26]. Зарегистрированное различие может быть получено из-за технических проблем или в результате альтернативного удлинения теломер (ALT) [205]. Следует отметить, что ALT было описано в основном в опухолевых клетках человека или immortalized линиях, культивируемых *in vitro*. Информации об ALT в лимфоцитах пациентов с иммунопатологией нет. Условно было принято, что в лимфоцитах пациентов с РА нет ALT и, следовательно, длина теломер в сестринских хроматидах должна иметь минимальные различия.

Для подтверждения корректности проведения модифицированной методики было получено 2 стекла от одного и того же пациента с РА. Препараты были приготовлены в один день, для стекла № 1 температура и время денатурации ДНК составили 75°C и 2 мин, тогда как для стекла №2 была проведена денатурация при 80°C в течение 3 мин, все остальные этапы гибридизации соответствовали описанному выше протоколу. Для обоих вариантов гибридизации был

осуществлен анализ 28 метафазных пластинок, в которых была измерена интенсивность флуоресцентных сигналов теломер, находящихся на сестринских хроматидах. Некоторые сигналы после проведения Q-FISH визуально выглядят как один, что связано с распластыванием материала на стекле, а не с качеством гибридизации. Поэтому такие «слившиеся» сигналы нами не разделялись, и в анализе участвовали только те сигналы, которые программа самостоятельно распознавала как отдельные. Общее количество проанализированных пар теломер в сестринских хроматидах составило 2427 для модифицированного варианта гибридизации и 2471 для традиционного варианта.

В результате эксперимента была обнаружена сильная корреляция для значений IFI теломер, которые принадлежали сестринским хроматидам. Значение коэффициента ранговой корреляции Спирмена для модифицированной методики составляло 0,75 ( $p < 0,0001$ ), что сопоставимо со значением коэффициента корреляции для традиционного протокола Q-FISH (рисунок 5). Эти результаты свидетельствуют о пропорциональном связывании PNA-зонда с теломерными повторами в модифицированном Q-FISH. Полученное высокое значение коэффициента корреляции флуоресцентного сигнала с теломер на сестринских хроматидах дает возможность сравнивать длину теломер отдельных хромосом между группами пациентов с иммунопатологией и здоровых доноров после модификации методики.

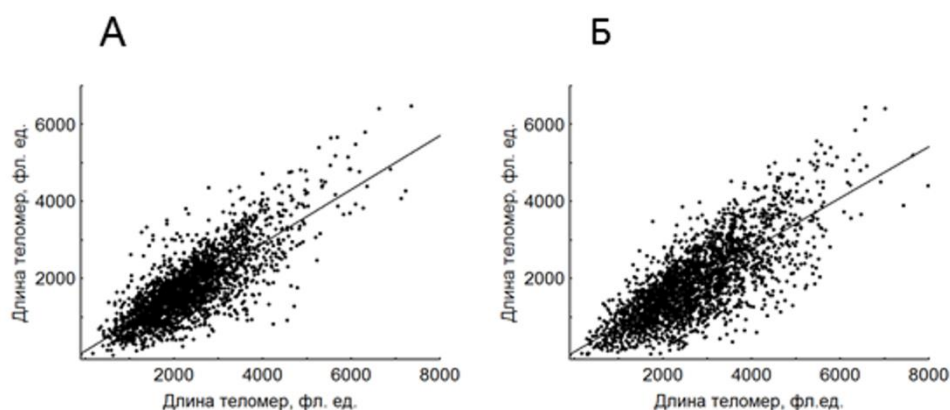


Рисунок 5 - Корреляции длины теломер на сестринских хроматидах

Примечание: Представлены данные корреляции длины теломер, принадлежащих сестринским хроматидам, фл.ед – флуоресцентные единицы. (А) – проведение Q-FISH по модифицированному протоколу,  $R=0,75$ ,  $p<0,0001$ ; (Б) - проведение Q-FISH традиционным способом,  $R=0,74$ ,  $p<0,0001$

Поскольку метод Q-FISH может быть использован для определения не только относительной, но и абсолютной длины отдельных теломер, то возникает вопрос об уровне воспроизводимости этого метода. Для того, чтобы ответить на этот вопрос, были получены клетки от одного из пациентов с РА и подготовлены в соответствии со стандартным протоколом, включая выделение клеток, культивирование, обработку колхицином, гипотоническую обработку и фиксацию смесью этанол/уксусная кислота. Фиксированную клеточную суспензию хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Препараты метафазных хромосом были получены в разное время и до момента проведения гибридизации хранились при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение различного периода (от 1 до 4 месяцев). Всего было получено 4 препарата, которые подвергались гибридизации по модифицированному протоколу одновременно. Для каждого из полученных стекол было проанализировано разное количество метафазных пластинок (от 9 до 25 метафаз). Оценка длины теломер, проведенная на разных слайдах, дала одинаковые значения для теломер, локализованных в отдельных плечах хромосом (рисунок 6). Таким образом,



данные эксперимента свидетельствуют о высокой воспроизводимости метода, даже при условии разной продолжительности хранения препаратов метафазных хромосом. Последнее особенно важно при наборе групп пациентов и контроля, которые не могут быть проведены одномоментно

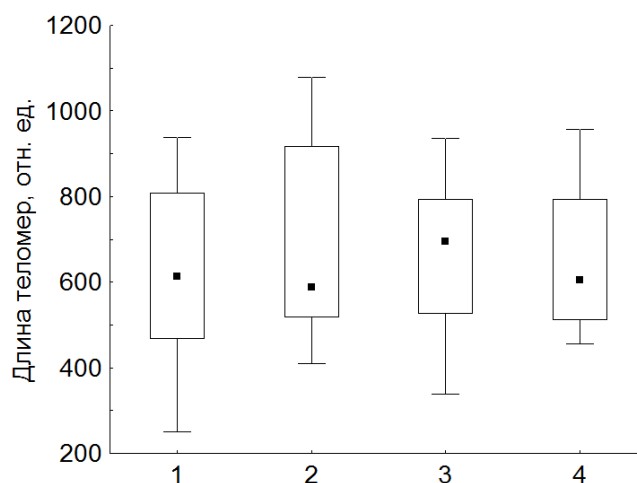


Рисунок 6 - Длина теломер р-плеча 2-ой хромосомы при одновременной постановке реакции гибридизации

Примечание: Рисунок иллюстрирует на примере р-плеча 2 хромосомы достоверное отсутствие различий в длине теломер при одновременном проведении гибридизации на стеклах, полученных в разное время. Данные представлены в виде медианы, интерквартильного размаха (25- и 75- перцентили) и минимальных и максимальных значений; отн. ед. — относительные единицы; 1-4 — порядковые номера стекол. Уровень статистической значимости  $p=0,94$  (критерий Краскер-Уоллиса).

### 3.4. Характеристика длины теломер при бронхиальной астме

Как упоминалось выше, средняя длина теломер является важной характеристикой клеток иммунной системы при различных видах патологии [154]. Показано, что при БА снижена средняя длина теломер в Т- и В-лимфоцитах, гранулоцитах [23]. Известно, что длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом лимфоцитов различается [27]. Последнее

может иметь значение для иммунопатогенеза БА, однако в литературе данные о длине теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом при БА в настоящий момент отсутствуют.

В работу по определению длины теломер на индивидуальных хромосомах вошло 18 пациентов с БА (15 женщин и 3 мужчин) в возрасте от 32 до 57 лет (средний возраст  $44,38 \pm 1,7$  года). Учитывая, что количество теломерных повторов уменьшается в клетках иммунной системы в течение жизни индивидуума, группа доноров подбиралась строго с учетом пола и возраста и составила 18 человек (15 женщин и 3 мужчин), в возрасте от 32 до 57 лет (средний возраст  $44,27 \pm 1,7$  года). Показатель длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом определялся модифицированным методом Q-FISH (подробно описано в разделе «Материалы и методы»). Методика Q-FISH дает возможность вычислять среднюю длину теломер для каждого лица, включенного в исследование, как среднее арифметическое длины всех теломерных последовательностей во всех метафазных пластинках, исследованных для данного индивидуума. Поэтому показатель средней длины теломер также определялся в данном исследовании.

### **3.4.1. Особенности распределения теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом у пациентов с бронхиальной астмой и здоровых доноров**

Распределение теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом получило название теломерного профиля. Считается, что теломерный профиль сильно детерминирован генетически но, вместе с тем, имеет индивидуальные особенности в распределении длины теломер у разных лиц [27]. Чтобы оценить распределение количества теломерных повторов, в группе пациентов и доноров были определены достоверно более короткие и более длинные теломерные районы индивидуальных хромосом относительно средней длины теломер во всех метафазах (применялся тест Вилкоксона, уровень статистической значимости  $p < 0,05$ ). Анализ показал, что и в группе пациентов, и

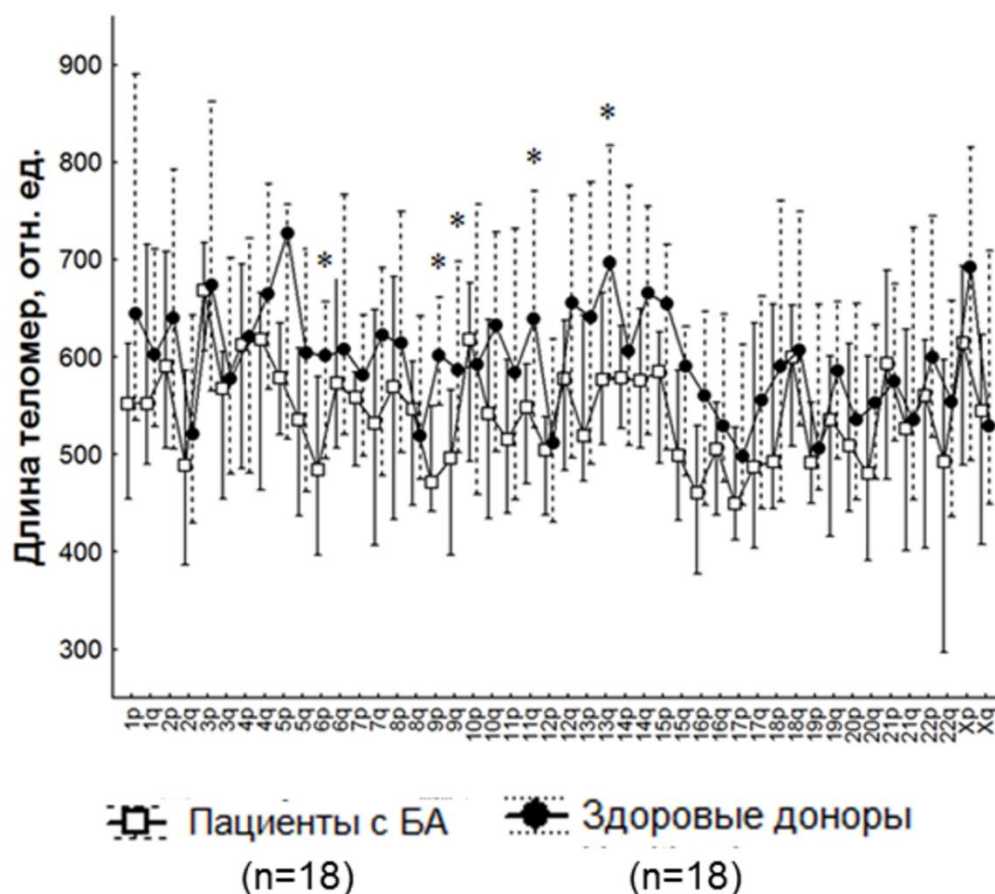
в группе здоровых доноров теломеры на q-плече 4 хромосомы и на p-плечах 3 и X-хромосомы достоверно более длинные по сравнению со средней длиной теломер. А теломеры, локализованные на q-плечах 2, 17, 20, 22 хромосом и p-плечах 12, 16, 17 и 19 хромосом – достоверно более короткие (таблица 3). В группе здоровых доноров также оказались достоверно более короткими теломерные районы на p-плече 20 и q-плече 22 хромосомы и более длинными - на q-плечах 13 и 14 хромосом. Тогда как в группе пациентов длина данных теломерных районов не изменена относительно средней длины теломер (таблица 3). Несмотря на выявленные между пациентами и донорами сходства в распределении количества теломерных повторов, при БА были обнаружены теломеры, которые отличаются по характеру изменения длины от группы здоровых доноров. Так, теломерные районы 4p, 5p, 6q, 18q были более длинными, а 6p, 9p, 9q и 15 q – более короткими у пациентов с БА, но не изменялись в группе здоровых доноров относительно средней длины теломер в метафазе (таблица 3). Ещё одной отличительной чертой БА является большее количество относительно укороченных или удлиненных теломер по сравнению с группой здоровых доноров (19 vs 15).

Таблица 3. - Характеристика отдельных плеч индивидуальных хромосом с укороченными и удлинёнными теломерными повторами у пациентов с БА и здоровых доноров

Отдельные плечи индивидуальных хромосом	Пациенты с БА	р-критерий статистической значимости	Здоровые доноры	р-критерий статистической значимости
2q	↓	p=0,001	↓	p=0,004
3p	↑	p=0,0003	↑	p=0,0006
4p	↑	p=0,002	-	
4q	↑	p=0,04	↑	p=0,01
5p	↑	p=0,03	-	
6p	↓	p=0,01	-	
6q	↑	p=0,02	-	
9p	↓	p=0,02	-	
9q	↓	p=0,01	-	
12p	↓	p=0,04	↓	p=0,0001
13q	-		↑	p=0,0002
14q	-		↑	p=0,009
15q	↓	p=0,02	-	
16p	↓	p=0,003	↓	p=0,007
17p	↓	p=0,0007	↓	p=0,0006
17q	↓	p=0,04	↓	p=0,0008
18q	↑	p=0,04	-	
19p	↓	p=0,006	↓	p=0,009
20p	-		↓	p=0,0002
20q	↓	p=0,01	↓	p=0,02
21q	-		↓	p=0,04
22q	↓	p=0,04	↓	p=0,003
Xp	↑	p=0,003	↑	p=0,005

Примечание: В таблице представлены теломеры, локализованные на плечах отдельных хромосом, которые удлинены (↑) или укорочены (↓) по сравнению со средней длиной теломер в метафазе; р-критерий статистической значимости определяли в тесте Вилкоксона.

Исходя из высокого сходства распределения длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом, все графики индивидуальных теломерных профилей, построенные для отдельных лиц, включенных в исследование, имели схожий вид. Поэтому были построены общие теломерные профили для групп здоровых доноров и пациентов (представлены на рисунке 7). В последующем анализе представлялось интересным выявить изменение длины теломерных районов отдельных плеч индивидуальных хромосом у пациентов с БА по сравнению со здоровыми донорами. Сравнение между группами проводилось с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ). Результаты показали, что у пациентов с БА по сравнению со здоровыми донорами достоверно укорочены теломерные районы на следующих хромосомных плечах: 6p, 9p, 9 q, 11q, 13q (рисунок 7). Ни на одном из плеч исследуемых хромосом теломерные повторы у пациентов с БА не были удлинены по сравнению со здоровыми донорами. При этом показатель средней длины теломер не был снижен у пациентов с БА по сравнению с выборкой здоровых людей.



\*- достоверные отличия,  $p < 0,05$ , Манна-Уитни U-тест

Рисунок 7 - Теломерные профили пациентов с БА и здоровых доноров

Примечание: Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (25- и 75- процентиля), отн. ед. – относительные единицы, \*- указаны достоверные различия между соответствующими группами ( $p < 0,05$ , критерий Манна-Уитни).

Таким образом, с одной стороны, показано сходство в распределении теломерных повторов между пациентами и здоровыми донорами, которое говорит о детерминированности теломерного профиля и, возможно, его частичной сохранности у больных БА. А с другой стороны, у пациентов с БА обнаружено большое количество хромосом с измененной длиной теломерных повторов относительно средней длины теломер в метафазе. И выявлено достоверное укорочение теломер на плечах отдельных хромосом у пациентов с БА в сравнении со здоровыми донорами. Данные изменения свидетельствуют о нарушении поддержания длины теломер в Т-лимфоцитах при БА.

### **3.4.2. Длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом в зависимости от формы и длительности течения бронхиальной астмы**

Данными предшествующих исследований установлено, что средняя длина теломер укорачивается при различных клинических вариантах БА по-разному [23]. В связи с этим представлялось интересным изучить не только среднюю длину теломер, но и длину теломерных повторов индивидуальных хромосом в зависимости от формы БА. Несмотря на существование большого разнообразия фенотипов БА, основными клинико-патогенетическими формами по-прежнему остаются экзогенная и эндогенная БА [39]. Были выделены 2 соответствующие группы пациентов – с экзогенной ( $n=12$ ) и эндогенной ( $n=6$ ) формой БА. Средний возраст в группе пациентов с экзогенной формой БА составил  $44,8 \pm 2,2$  года, с эндогенной –  $43,5 \pm 3,2$  года. Показатель возраста в группах пациентов не отличался достоверно от возраста в группе здоровых доноров ( $44,27 \pm 1,7$  года), (сравнение по Манна-Уитни,  $r$ -критерий достоверности для экзогенной и эндогенной БА - 0,91 и 0,87 соответственно). Средняя длина теломер и длина теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом сравнивалась в указанных группах пациентов с группой доноров. Результаты анализа показали, что при эндогенной форме БА не было изменения длины теломерных повторов ни на одном из плеч индивидуальных хромосом. При экзогенной же форме БА длина теломерных повторов укорочена на следующих плечах индивидуальных хромосом: 1p, 4q, 5q, 6p, 9p, 9q, 11q, 12q, 13q, 14q, 15q, 20q (рисунок 8). Интересно, что удлинения теломерных повторов в группе больных экзогенной БА не было отмечено. Также не было обнаружено укорочения средней длины теломер ни в одной из групп пациентов по сравнению со здоровыми донорами.

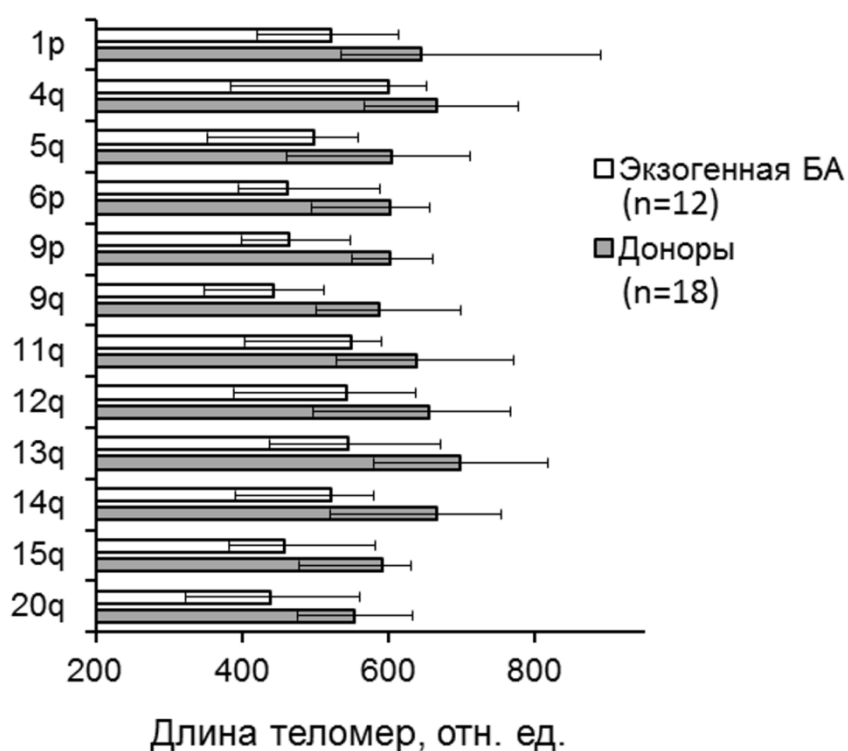


Рисунок 8 - Длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом при экзогенной форме БА.

Примечание: Данные приведены в виде медианы и интерквартильных размахов (25- и 75- процентиля; отн. ед. – относительные единицы; Уровень статистической значимости  $p < 0,05$  (критерий Манна-Уитни).

Известно, что даже при адекватной терапии длительно текущая БА сопровождается прогрессирующим снижением функции внешнего дыхания и необратимым ремоделированием дыхательных путей [206, 207]. В связи с этим было актуально сопоставить длину теломерных повторов не только с формой, но и с длительностью течения БА. В группу пациентов с дебютом вошли 11 человек (рисунок 9А) и в группу с длительным течением БА – 7 человек (рисунок 9Б). Было принято, что у пациентов в дебюте длительность течения заболевания составила от 0 до 2 лет ( $0,85 \pm 0,25$ ), во второй группе длительность течения была от 2 лет и выше ( $17,45 \pm 4,42$ ). Средний возраст пациентов в группе дебюта был  $44,7 \pm 2,4$  года, в группе пациентов с длительным течением БА –  $44,2 \pm 2,5$  года.



Достоверных отличий исследуемых групп от группы здоровых доноров по возрасту не было (сравнение по Манна-Уитни,  $p$ -критерий статистической достоверности 0,98 для группы с длительным течением и 1,0 для группы дебюта).

Средняя длина теломер в обеих выделенных группах не отличалась от данного показателя в группе здоровых доноров. Сравнение длины теломер индивидуальных хромосом показало, что в группе дебюта по сравнению с группой здоровых доноров было уменьшено количество теломерных повторов только на  $p$ -плече 9 хромосомы (рисунок 9А). Тогда как при длительном течении БА укорочение теломер отмечалось на 17 плечах индивидуальных хромосом: 4q, 5p, 5q, 6p, 7q, 9p, 9q, 10q, 11p, 11q, 13p, 13q, 15p, 15q, 17p, 18p, 20q (рисунок 9Б).

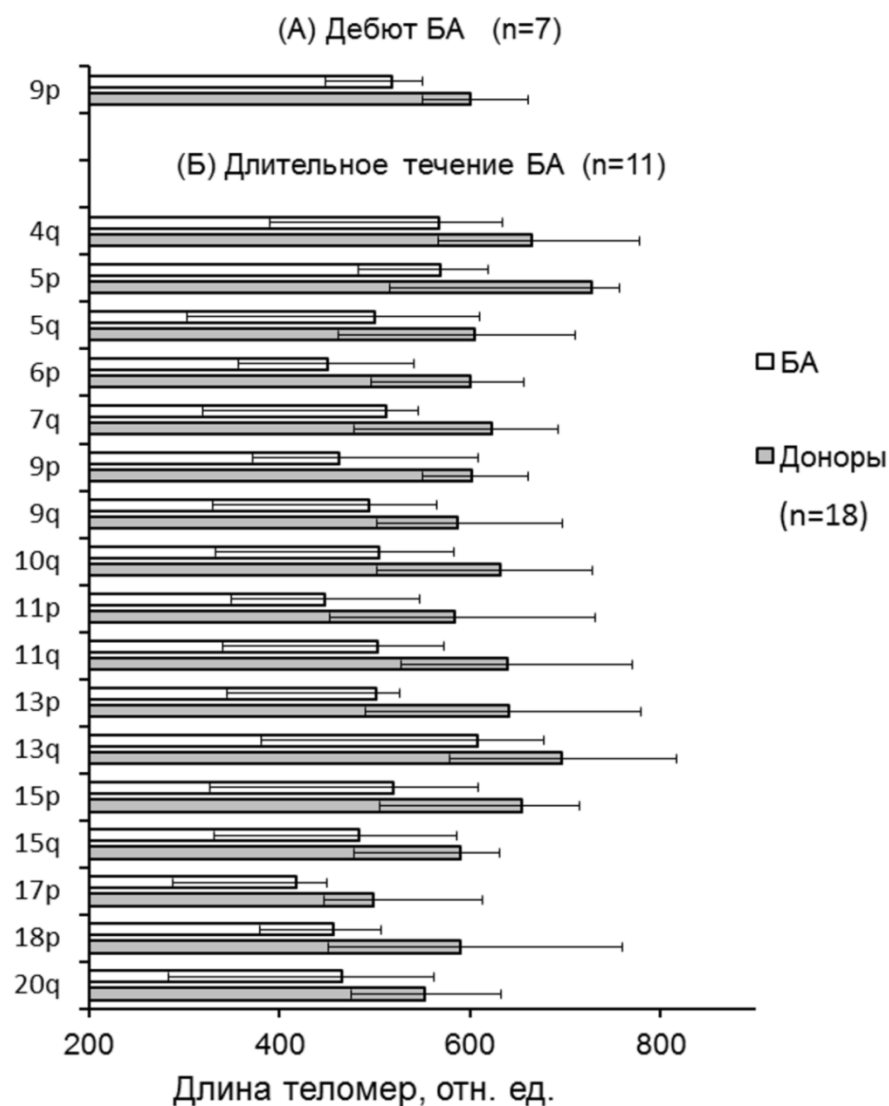


Рисунок 9 - Длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом в дебюте БА (А) и при длительном течении БА (Б)

Примечание: Данные приведены в виде медианы и интерквартильных размахов (25- и 75- перцентили; отн. ед. – относительные единицы; уровень статистической значимости  $p < 0,05$  (критерий Манна-Уитни)).

Поскольку было выявлено укорочение целого ряда теломерных районов в зависимости от таких параметров, как длительное течение и экзогенная форма БА, то дополнительно были выделены и изучены 2 группы пациентов: группа пациентов с длительным течением экзогенной БА (n=7) и группа с дебютом

экзогенной БА (n=5). Возраст в группе пациентов с длительным течением экзогенной БА был  $43,75 \pm 3,2$  года, длительность течения заболевания  $23,6 \pm 5,8$  лет. В группе с дебютом экзогенной БА эти показатели составили  $46,6 \pm 2,9$  лет и  $1 \pm 0,3$  года соответственно. Различий по возрасту в группе экзогенной БА с длительным течением и в группе дебюта экзогенной БА с группой здоровых доноров не было (критерий Манна-Уитни,  $p=0,79$  и  $0,58$  для каждой из групп соответственно). Было обнаружено, что в группе дебюта экзогенной БА средняя длина теломер не изменена, а в группе пациентов с длительным течением экзогенной БА средняя длина теломер укорочена по сравнению с этим показателем у здоровых донорами (рисунок 10).

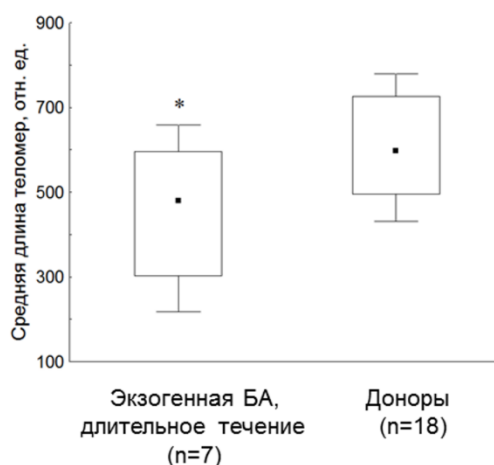


Рисунок 10 - Средняя длина теломер при длительном течении экзогенной БА

Примечание: Данные представлены в виде медианы, интерквартильного размаха (25- и 75- процентиля) и минимальных и максимальных значений, отн. ед. – относительные единицы.

\* - достоверные различия, уровень статистической значимости различий  $p < 0,05$  (критерий Манна-Уитни).

При анализе длины теломер индивидуальных хромосом выяснилось, что в группе с дебютом экзогенной БА достоверно укорочены теломеры на обоих плечах 9 хромосомы (рисунок 11А). Между тем, при экзогенной БА с длительным

течением сохраняется, как и в общей группе длительного течения БА (рисунок 9), достоверное укорочение на следующих плечах хромосом: 4q, 5p, 5q, 6p, 7q, 9p, 9q, 10q, 11q, 13p, 13q, 15p, 15q, 17p, 18p, 20q. И кроме того, укорачиваются теломеры на q-плечах 12, 14 и 22 хромосом (рисунок 11Б).

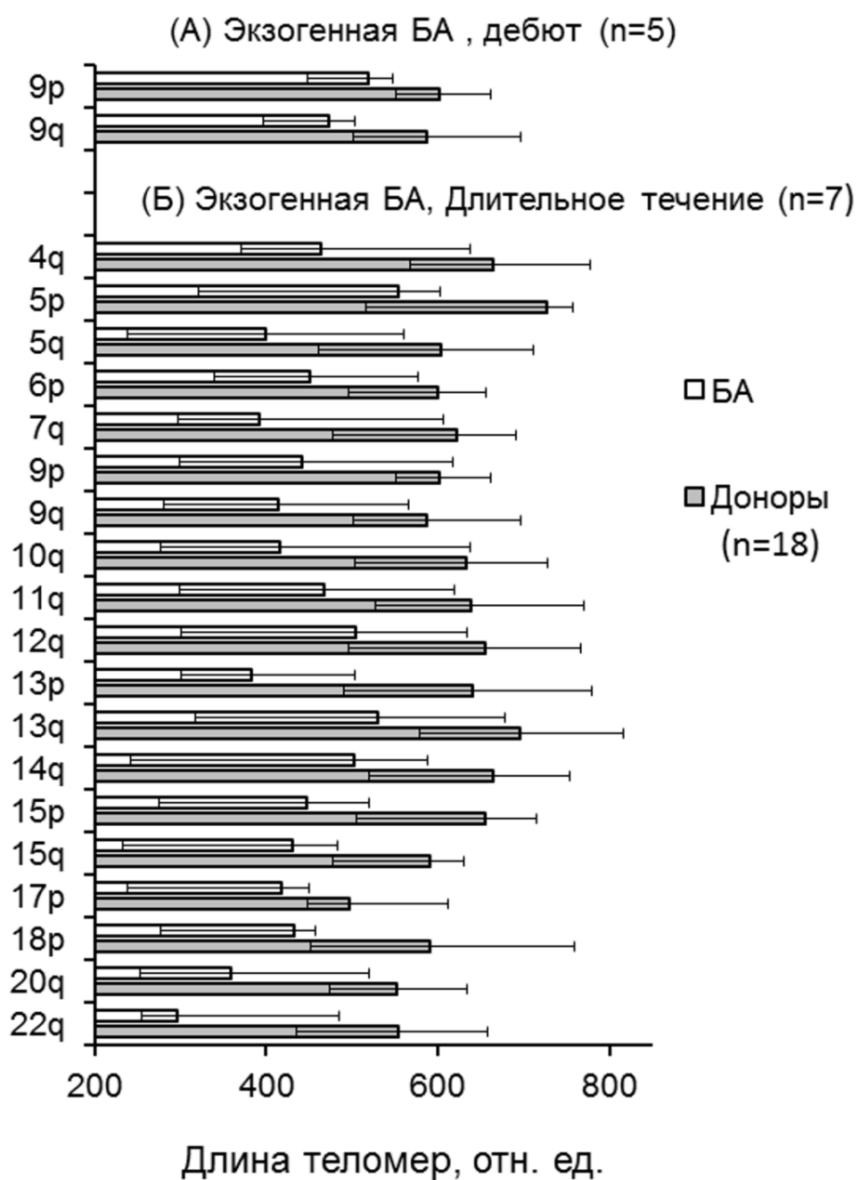


Рисунок 11 - Длина теломер в дебюте экзогенной БА (А) и при длительном течении экзогенной БА (Б)

Примечание: Данные приведены в виде медианы и интерквартильных размахов (25- и 75- процентиля; отн. ед. – относительные единицы; Уровень статистической значимости  $p < 0,05$  (критерий Манна-Уитни)).

В результате данного эксперимента показано, что длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом зависит от формы и длительности течения БА. При эндогенной БА не происходит укорочения теломер, тогда как экзогенная БА сопровождается укорочением целого ряда теломерных районов. Также, исходя из полученных данных, можно предположить, что при длительном течении экзогенной формы БА происходит снижение средней длины теломер, которое протекает неравномерно и затрагивает теломерные последовательности на определенных плечах индивидуальных хромосом.

### **3.4.3. Укорочение теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом с возрастом**

Ранее было показано, что снижение средней длины теломер, наблюдаемое с возрастом в лейкоцитах периферической крови, происходит неравномерно в разных возрастных группах [179]. Однако данные литературы по укорочению отдельных теломерных последовательностей с возрастом отсутствуют как среди здоровых лиц, так и среди пациентов с иммунопатологией. Для того, чтобы установить как изменяется с возрастом длина теломерных последовательностей на отдельных хромосомах при БА и у здоровых доноров, все исследуемые лица были разделены на 3 возрастные декады: 31-40 лет, 41-50 лет и 51-60 лет. Размеры групп доноров и пациентов, принадлежащих к соответствующей возрастной декаде, совпадали. Более подробная характеристика групп представлена в таблице 4.

Таблица 4 - Характеристика групп пациентов с БА и здоровых доноров, принадлежащих разным возрастным декадам

Возрастная декада	Группа	Возраст	Длительность БА	Возраст манифестации БА
4 декада жизни (31-40 лет) n=6	БА	37±1,36	13,7±6,3	23,2±6,6
	Доноры	36,8±1,37	-	-
5 декада жизни (41-50 лет) n=7	БА	43,5±0,86	6,8±2,7	36,7±2,73
	Доноры	43,7±0,86	-	-
6 декада жизни (51-60 лет) n=5	БА	54,4±0,81	13,6±9,05	40,6±9,0
	Доноры	54±1,14	-	-

Примечание: данные по возрасту и длительности течения БА представлены как Mean±SE

Между группами условно-здоровых доноров, принадлежащих к различным возрастным декадам, не было отличий по длине теломер на отдельных хромосомах. Тогда как в группах пациентов с БА были обнаружены отличия длины отдельных теломерных районов, в зависимости от принадлежности к той или иной возрастной группе. Так, у пациентов с БА, принадлежащих к 6 возрастной декаде (51-60 лет) была достоверно снижена длина теломер на 9p-, 9q-, 20p- плечах хромосом по сравнению с пациентами из 4 декады и на 1q-, 9q-, 17p- плечах по сравнению с пациентами из 5 возрастной декады (критерий достоверности  $p \leq 0,05$ , Манна-Уитни U-тест). При этом группы пациентов, принадлежащих к 4 и 5 декадам, не отличались друг от друга по длине теломер (рисунок 12).

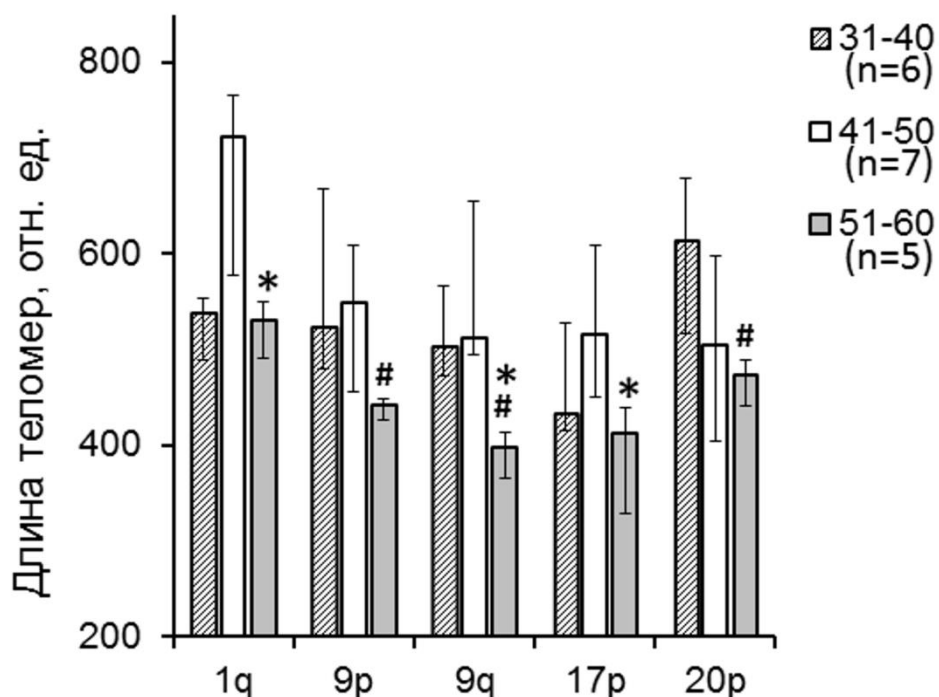


Рисунок 12 - Снижение длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом в зависимости от возраста

Примечание: На рисунке представлена длина теломер индивидуальных хромосом пациентов с БА, относящихся к разным возрастным декадам. Данные приведены в виде медианы и интерквартильных размахов (25- и 75- процентиля); отн. ед. – относительные единицы; #- достоверные отличия от 4 декады; \*- достоверные отличия от 5 декады; уровень статистической значимости  $p \leq 0,05$  (критерий Манна-Уитни).

Поскольку в разных возрастных группах пациентов с БА были выявлены отличия в длине теломер отдельных хромосом, представлялось актуальным исследовать зависимость длины теломер отдельных плеч индивидуальных хромосом от возраста в общей группе пациентов с БА. Корреляционный анализ показал, что у пациентов с БА существует обратно пропорциональная взаимосвязь возраста и длины теломер, находящихся на p- и q- плечах 9 хромосомы и на p- плече 20 хромосомы (рисунок 13). Анализ проводился методом ранговой корреляции Спирмена. Выявленные корреляции были

умеренные по силе ( $R = -0,54$  ( $p = 0,02$ ),  $R = -0,5$  ( $p = 0,03$ ) и  $R = -0,53$  ( $p = 0,02$ ) для 9p, 9q и 20 p- плеч соответственно). Аналогичный анализ в общей группе доноров не выявил значимых корреляций возраста и длины теломер отдельных хромосом.

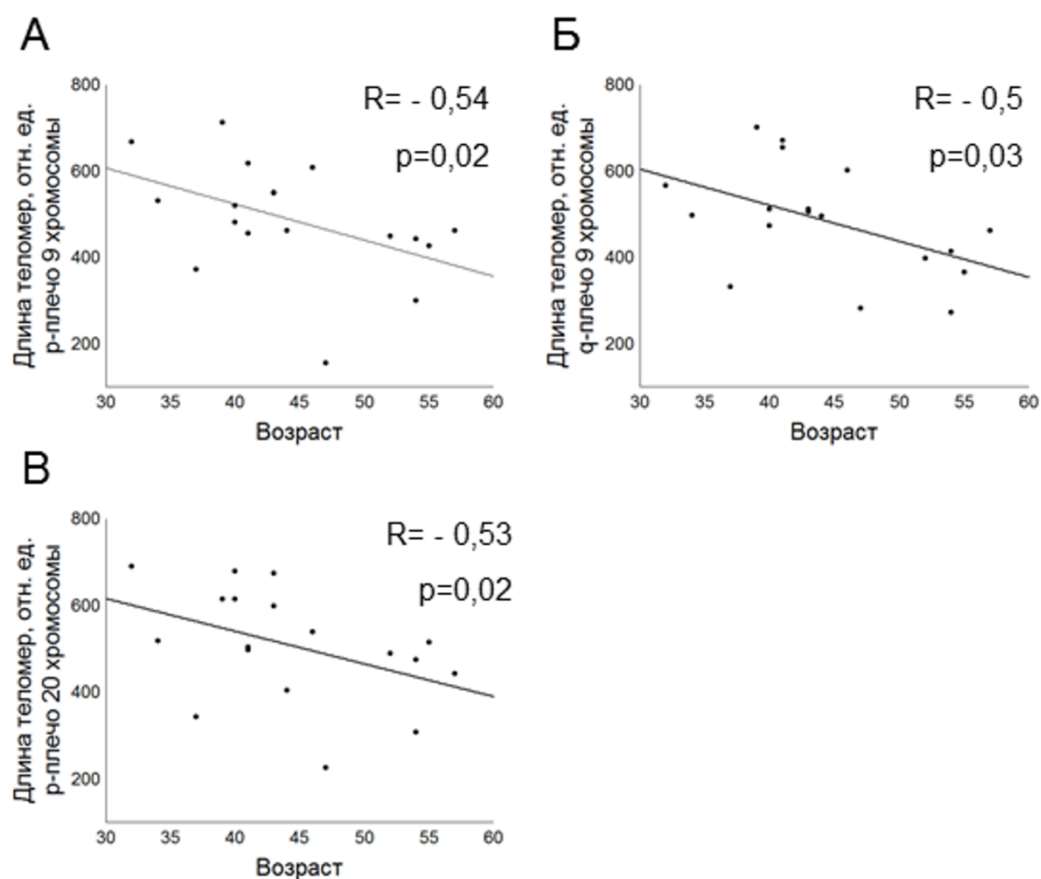


Рисунок 13 - Корреляционный анализ возраста и длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом у пациентов с БА

Примечание: Представлены данные корреляции возраста и длины теломер на р-плече 9 хромосомы (А); q-плече 9 хромосомы (Б) и р-плече 20 хромосомы (В); R – коэффициент корреляции Спирмена.

Таким образом, результаты данного эксперимента свидетельствуют о том, что у пациентов с БА, в отличие от здоровых доноров, с возрастом происходит укорочение теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом.



### **3.5. Характеристика Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов при бронхиальной астме**

Известно, что у здоровых лиц с возрастом происходит укорочение длины теломер в Т-лимфоцитах, которое сопровождается процессом накопления Т-клеток памяти и снижением репликативного потенциала последних по сравнению с наивными Т-лимфоцитами [16]. Однако при БА подобные исследования ограничиваются изучением лишь одного из данных показателей. В связи с этим в данном разделе была проведена оценка субпопуляционного состава Т-клеток памяти в сопоставлении с длиной теломер на отдельных хромосомах при БА. А также изучены пролиферативная активность и изменение субпопуляционного состава Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в ответ на поликлональную стимуляцию *in vitro*.

#### **3.5.1. Фенотипический состав Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов при бронхиальной астме**

В работу по определению фенотипического состава Т-клеток памяти вошло 19 пациентов с БА в возрасте от 25 до 54 лет ( $42,2 \pm 1,7$  лет) и 13 доноров в возрасте от 25 до 57 лет ( $45,61 \pm 2,6$  года). Достоверных отличий между исследуемыми группами по возрасту не было (сравнение по Манна-Уитни,  $r$ -критерий статистической достоверности 0,16). Для определения относительного количества различных субпопуляций Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов использовался метод проточной цитофлуориметрии (подробно описано в разделе «Материалы и методы»). Сравнение между группами пациентов и здоровых доноров проводилось с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).

Традиционно для разделения популяций наивных Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти человека используется экспрессия изоформ молекулы CD45 [208]. Есть ряд исследований по содержанию Т-клеток памяти при БА, одни из которых

говорят о снижении содержания Т-клеток памяти при БА [209, 210], а другие – о повышении [98, 211]. Учитывая противоречивость существующих данных, было актуальным изучить экспрессию маркера CD45R0 на Т-лимфоцитах с целью определения относительного количества CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в периферической крови при БА и в норме. Проведенный анализ показал, что количество CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> Т-клеток памяти было повышено у пациентов с БА по сравнению со здоровыми донорами. Тогда как количество CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> Т-клеток памяти в группе БА демонстрировало тенденцию к повышению по сравнению с группой здоровых доноров (рисунок 14). При этом количество CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup> и CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup> наивных Т-лимфоцитов было закономерно снижено у пациентов с БА по сравнению со здоровыми донорами.

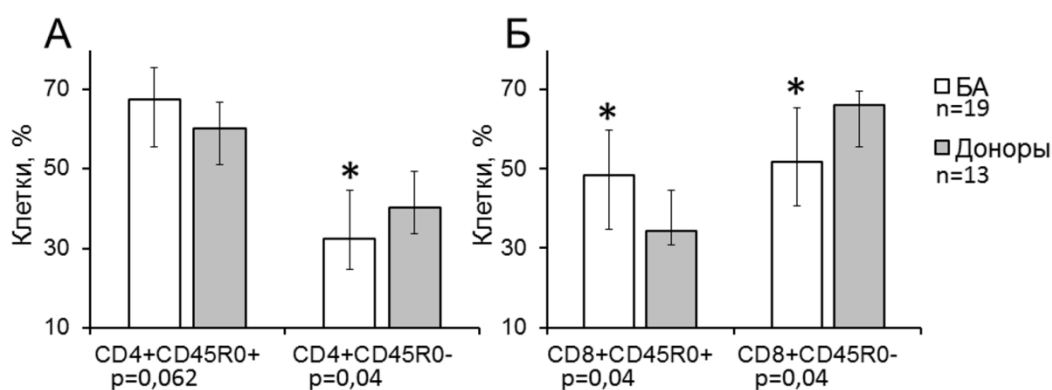


Рисунок 14 - Экспрессия маркера CD45R0 на CD4<sup>+</sup> (А) и CD8<sup>+</sup> (Б) Т-лимфоцитах периферической крови у пациентов с БА и здоровых доноров

Примечание: Данные указаны в процентах, за 100 % принято число клеток в популяциях CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов соответственно. На гистограмме представлены медианы и интерквартильные размахи (25- и 75- процентили); \* - указаны достоверные отличия от группы доноров (Манна-Уитни U-тест).

Дальнейшее изучение субпопуляционного состава CD45R0<sup>+</sup>- и CD45R0<sup>-</sup>-клеток проводилось с одновременным использованием маркеров CCR7 и CD62L, поскольку они являются молекулами хоуминга для Т-лимфоцитов и позволяют

надежно разделить Т-клетки памяти на центральные и эффекторные [11]. Было показано, что у пациентов с БА повышено содержание  $CD4^{+}Tem62L^{+}$  и  $CD8^{+}Tem62L^{+}$  клеток памяти (рисунок 15А) и снижено содержание  $CD4^{+}Tcm62L^{-}$  и  $CD8^{+}Tcm62L^{-}$  клеток памяти (рисунок 15Б) в периферической крови по сравнению со здоровыми донорами. Интересно, что процентное содержание клеток в субпопуляциях  $Tnaive$  и  $Temra$  у пациентов с БА и здоровых доноров не отличалось.

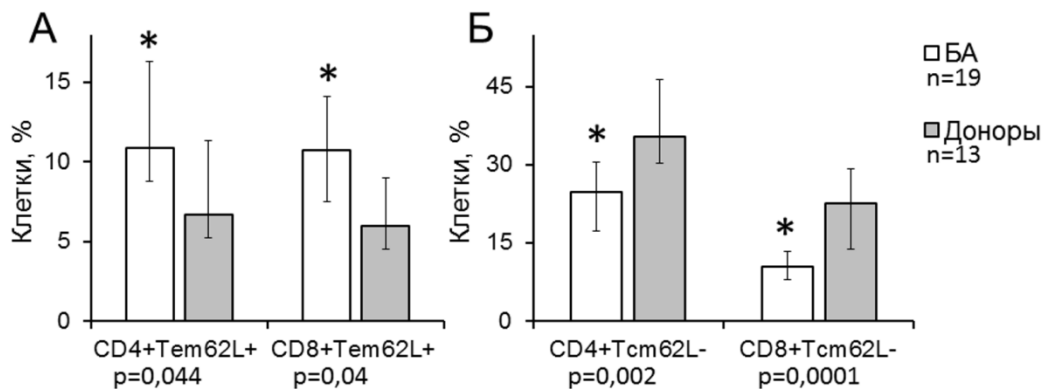


Рисунок 15 - Субпопуляционный состав эффекторных (А) и центральных (Б) Т-лимфоцитов памяти у пациентов с БА и здоровых доноров

Примечание: Данные указаны в процентах, за 100 % принято число клеток в популяциях  $CD4^{+}CD45RO^{+}$  и  $CD8^{+}CD45RO^{+}$  Т-лимфоцитов. На диаграмме представлены медианы и интерквартильные размахи (25- и 75- процентиля); \* - указаны достоверные отличия от группы доноров (Манна-Уитни U-тест).

Таким образом, в результате данного эксперимента показано, что при БА повышено относительное количество  $CD8^{+}$  Т-клеток памяти и имеется тенденция к повышению относительного количества  $CD4^{+}$  Т-клеток памяти. А также показано, что у пациентов с БА среди субпопуляций  $CD4^{+}$  и  $CD8^{+}$  Т-клеток памяти происходит перераспределение в пользу эффекторных Т-лимфоцитов памяти, что может иметь значение для патогенеза БА.

### **3.5.2. Фенотипический состав Т-клеток памяти при различных формах бронхиальной астмы**

Существующие научные данные связывают изменение содержания Т-клеток памяти в периферической крови преимущественно со степенью тяжести БА [15, 98, 99]. Однако, учитывая данные о длине теломер индивидуальных хромосом, представлялось интересным сопоставить содержание наивных Т-лимфоцитов и клеток памяти не с тяжестью, а с формой БА. Для этого были выделены группы пациентов с эндогенной и экзогенной БА. Средний возраст пациентов в группе с эндогенной БА составил  $40,8 \pm 2,0$  года. В группе пациентов с экзогенной БА средний возраст был  $42,7 \pm 4,2$  года. Возраст в группах пациентов не отличался достоверно от возраста в группе здоровых доноров (сравнение по Манна-Уитни, р-критерий достоверности 0,2 для обеих групп).

Было показано, что у пациентов с экзогенной формой БА повышено относительное количество  $CD4^+CD45RO^+$  Т-клеток памяти и снижено количество  $CD4^+CD45RO^-$  наивных Т-лимфоцитов (рисунок 16). Тогда как у пациентов с эндогенной БА данные показатели не отличались от донорских. Относительное количество  $CD8^+$  наивных Т-лимфоцитов и клеток памяти не отличалось в группах пациентов с разными формами БА и здоровых доноров.

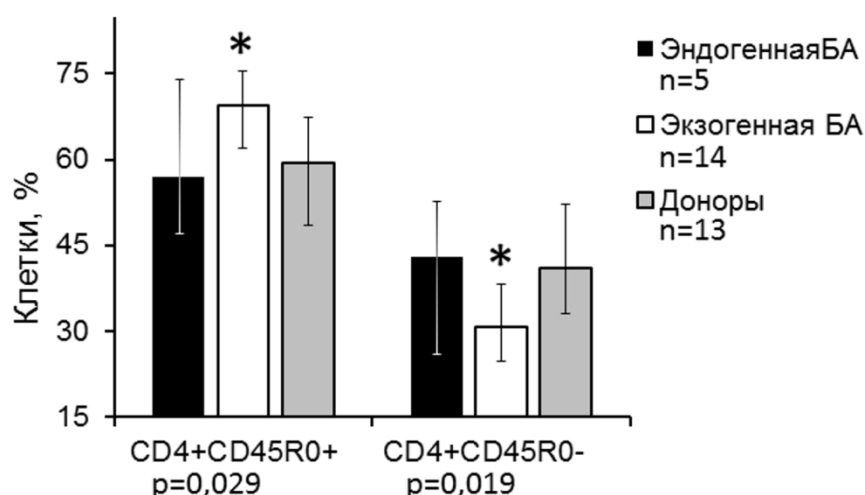


Рисунок 16 - Экспрессия маркера CD45R0 на CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах периферической крови в зависимости от формы БА

Примечание: Данные указаны в процентах, за 100 % принято число клеток в популяции CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. На гистограмме представлены медианы и интерквартильные размахи (25- и 75- процентиля); \* - указаны достоверные отличия от группы доноров (Манна-Уитни U-тест).

У пациентов с БА в субпопуляционном составе клеток памяти, как среди CD4<sup>+</sup>, так и среди CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов были обнаружены изменения в зависимости от формы астмы. Так, при экзогенной БА было повышено содержание CD4<sup>+</sup>Tem62L<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Tem62L<sup>+</sup> клеток в периферической крови по сравнению со здоровыми донорами. Пациенты с эндогенной формой БА не отличались достоверно от группы доноров по данным показателям (рисунок 17А). Иначе изменялось содержание центральных Т-клеток памяти: относительное количество CD4<sup>+</sup>Tcm62L<sup>-</sup> и CD8<sup>+</sup>Tcm62L<sup>-</sup> клеток в периферической крови было снижено как при экзогенной, так и при эндогенной БА в сравнении со здоровыми донорами (рисунок 17Б). По субпопуляционному составу Tnaïve и Temra среди CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов изучаемые группы пациентов были сопоставимы с группой здоровых доноров.

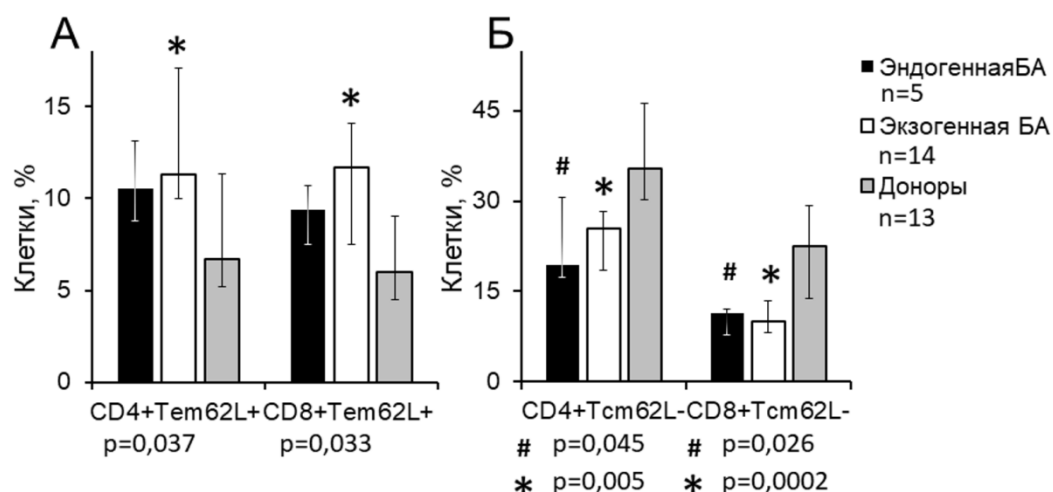


Рисунок 17 - Субпопуляционный состав эффекторных (А) и центральных (Б) Т-клеток памяти в зависимости от формы БА

Примечание: Данные указаны в процентах, за 100 % принято число клеток в популяциях  $CD4^+CD45RO^+$  и  $CD8^+CD45RO^+$  Т-лимфоцитов. На диаграмме представлены медианы и интерквартильные размахи (25- и 75- процентиля); # - указаны достоверные отличия пациентов с эндогенной БА от группы доноров; \* - указаны достоверные отличия пациентов с экзогенной БА от группы доноров (Манна-Уитни U-тест).

Таким образом, было показано, что содержание и субпопуляционный состав Т-клеток памяти связаны с формой БА. При экзогенной БА на фоне повышенного содержания  $CD4^+$  Т-клеток памяти происходит перераспределение субпопуляционного состава в пользу  $CD4^+$  и  $CD8^+Tem62L^+$  лимфоцитов. А при эндогенной БА на фоне не измененного содержания  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток памяти происходит только снижение относительного количества  $CD4^+$  и  $CD8^+Tcm62L^+$  лимфоцитов.

### 3.5.3. Фенотипический состав Т-клеток памяти в зависимости от длительности течения бронхиальной астмы

Известно, что большая продолжительность БА ассоциирована с усилением тяжести этого заболевания [212] и более трудным достижением ремиссии [213]. Это принято связывать с ремоделированием дыхательных путей, которое при длительно протекающей БА является следствием постоянно поддерживающегося воспалительного процесса [214, 215]. Показано, что отдельные субпопуляции Т-клеток памяти, например, Th2 (CD62L<sup>lo</sup>CXCR3<sup>lo</sup>) -клетки памяти поддерживают гиперпродукцию слизи, эозинофильную инфильтрацию и гиперреактивность дыхательных путей при аллергической БА [81]. В связи с чем было актуально изучить фенотипический состав Т-клеток памяти у пациентов с дебютом и с длительным течением БА в сравнении со здоровыми донорами. Средний возраст пациентов в группе БА с длительным течением составил 43,5±2,3 года, длительность течения заболевания – 19,4±4,5 года. В группе с дебютом БА средний возраст пациентов был 40,4±2,63 года. Достоверных отличий исследуемых групп от группы здоровых доноров по возрасту не было (сравнение по Манна-Уитни, р-критерий статистической достоверности 0,3 для группы с длительным течением и 0,1 для группы дебюта).

Было показано, что у пациентов с дебютом БА повышено относительное количество CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> Т-клеток памяти и снижено количество CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup> наивных Т-лимфоцитов в сравнении с группой здоровых доноров (рисунок 18). У пациентов с длительным течением данные показатели не изменялись по сравнению с группой дебюта и здоровыми донорами. Относительное количество CD4<sup>+</sup> наивных Т-лимфоцитов и клеток памяти не отличалось в группах пациентов с дебютом и с длительным течением БА от группы здоровых доноров.

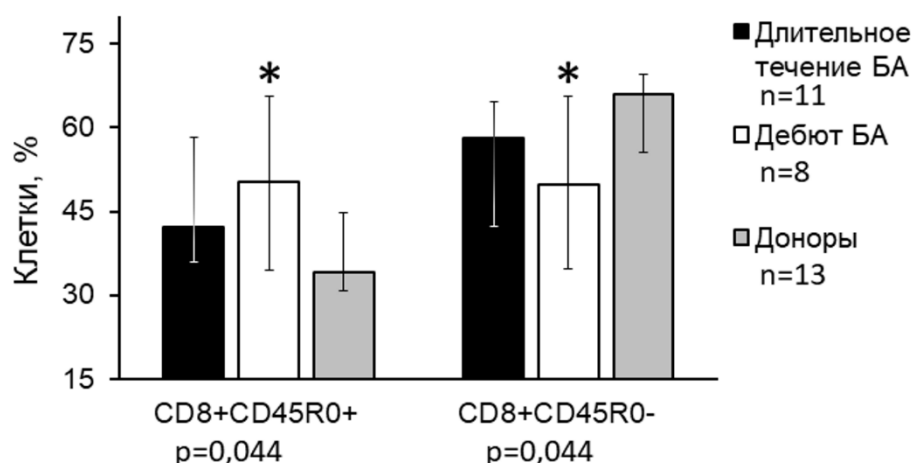


Рисунок 18. - Экспрессия маркера CD45RO на CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитах периферической крови в зависимости от длительности течения БА

Примечание: Данные указаны в процентах, за 100 % принято число клеток в популяции CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. На гистограмме представлены медианы и интерквартильные размахи (25- и 75- процентиля); \* - указаны достоверные отличия от группы доноров (Манна-Уитни U-тест).

Субпопуляционный состав Т-клеток памяти также изменялся в зависимости от длительности течения БА. Было обнаружено, что у пациентов в дебюте БА повышено содержание CD4<sup>+</sup>Tem62L<sup>+</sup> клеток в периферической крови и наблюдается тенденция к повышению содержания CD8<sup>+</sup>Tem62L<sup>+</sup> клеток по сравнению со здоровыми донорами. У пациентов с длительным течением БА содержание CD4<sup>+</sup>Tem62L<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Tem62L<sup>+</sup> клеток в периферической крови не отличалось от группы здоровых доноров и пациентов с дебютом БА (рисунок 19А). При этом содержание CD4<sup>+</sup>Tcm62L<sup>-</sup> и CD8<sup>+</sup>Tcm62L<sup>-</sup> клеток в периферической крови было снижено по сравнению с группой здоровых доноров как в группе дебюта БА, так и у пациентов с длительным течением БА (рисунок 19Б).



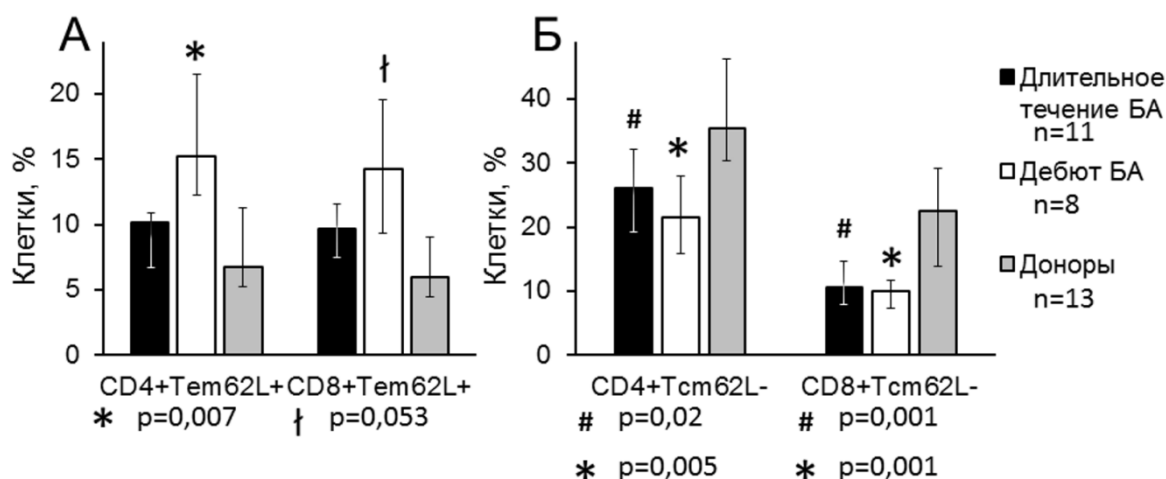


Рисунок 19. - Субпопуляционный состав эффекторных (А) и центральных (Б) Т-клеток памяти в зависимости от длительности течения БА

Примечание: Данные указаны в процентах, за 100 % принято число клеток в популяциях  $CD4^+CD45RO^+$  и  $CD8^+CD45RO^+$  Т-лимфоцитов. На диаграмме представлены медианы и интерквартильные размахи (25- и 75- процентили); # - указаны достоверные отличия пациентов с длительным течением БА от группы доноров; \* - указаны достоверные отличия пациентов с дебютом БА от группы доноров; † – указана тенденция в отличии пациентов с дебютом БА от группы доноров (Манна-Уитни U-тест).

Известно, что с возрастом происходит накопление  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток памяти [11]. Также предыдущими исследованиями показано, что у лиц пожилого возраста, страдающих БА, количество наивных Т-лимфоцитов ( $CD45RA^+$ ) в периферической крови снижается сильнее, чем у условно-здоровых лиц того же возраста [12]. Таким образом, изменение содержания наивных Т-лимфоцитов и клеток памяти может быть связано не только с длительностью заболевания, но и с возрастом. Поэтому дополнительно были изучены корреляционные взаимосвязи между содержанием различных субпопуляций Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов и возрастом, а также длительностью заболевания. Корреляционный анализ показал, что при БА содержание  $CD4^+Tem62L^+$  клеток снижалось по мере увеличения длительности заболевания (коэффициент корреляции Спирмена  $R=$

-0,49;  $p=0,03$ ) (рисунок 20А). Интересно, что обратно пропорциональной зависимости содержания  $CD4^{+}Tem62L^{+}$  клеток с возрастом в группе пациентов обнаружено не было. Тогда как у здоровых доноров наблюдалась отрицательная корреляция содержания  $CD4^{+}Tem62L^{+}$  клеток и возраста (коэффициент корреляции Спирмена  $R=-0,59$ ;  $p=0,03$ ) (рисунок 20Б). При анализе других субпопуляций Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в группе БА не было обнаружено корреляционной зависимости с возрастом и длительностью течения заболевания. Однако для группы здоровых доноров было также показано, что содержание  $CD4^{+}Tcm62L^{-}$  и  $CD8^{+}Tcm62L^{-}$  клеток периферической крови увеличивалось с возрастом (коэффициенты корреляции Спирмена составили:  $R=0,64$ ;  $p=0,01$  и  $R=0,7$ ;  $p=0,007$  соответственно).

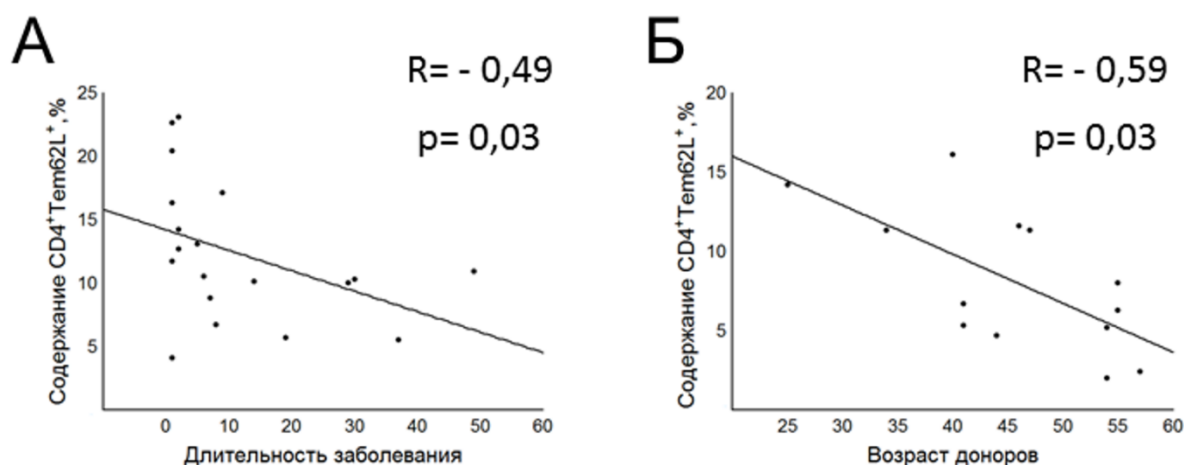


Рисунок 20 - Корреляционный анализ содержания  $CD4^{+}Tem62L^{+}$  клеток и длительности БА

Примечание: Представлены данные о корреляции содержания  $CD4^{+}Tem62L^{+}$  клеток и длительности заболевания в группе пациентов с БА (А) и корреляции содержания  $CD4^{+}Tem62L^{+}$  клеток и возраста в группе доноров (Б);  $R$  – коэффициент корреляции Спирмена.

Таким образом, было показано, что содержание и субпопуляционный состав Т-клеток памяти зависят от длительности БА. В дебюте заболевания происходит повышение количества  $CD8^{+}CD45RO^{+}$  Т-клеток памяти, которое сопровождается тенденцией к повышению содержания  $CD8^{+}Tem62L^{+}$  клеток и снижением

содержания  $CD8^+Tcm62L^-$  клеток в периферической крови. Также в дебюте БА на фоне неизмененного количества  $CD4^+CD45RO^+$  Т-клеток памяти происходит повышение содержания  $CD4^+Tem62L^+$  клеток. Это подтверждается данными об отрицательной корреляции между относительным количеством  $CD4^+Tem62L^+$  клеток и длительностью заболевания.

#### **3.5.4. Взаимосвязь между длиной теломер отдельных хромосом и содержанием Т-клеток памяти**

Известно, что средняя длина теломер снижается в Т-клетках памяти по сравнению с наивными Т-лимфоцитами [18]. А также показано, что средняя длина теломер отрицательно коррелирует с содержанием  $CD8^+$  Т-клеток памяти и положительно – с содержанием наивных  $CD8^+$  Т-лимфоцитов [51]. Поэтому представлялось актуальным изучить взаимосвязь длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом и содержания клеток памяти. Поскольку данным исследованием уже была показана взаимосвязь длительности БА с укорочением определенных теломерных районов и содержанием эффекторных Т-клеток памяти, то корреляционный анализ был проведен в группе пациентов с длительным течением БА ( $n=10$ ) и в группе здоровых доноров ( $n=12$ ). Длительность заболевания в группе пациентов составляла  $18,3 \pm 4,8$ , а возраст –  $42,9 \pm 2,4$  года. Средний возраст в группе доноров насчитывал  $47,3 \pm 2,2$  года, что достоверно не отличалось от группы пациентов ( $p=0,16$ , критерий Манна-Уитни).

У пациентов с БА содержание  $CD4^+CD45RO^+$  клеток памяти отрицательно коррелировало с длиной теломер, находящихся на р-плече 5 хромосомы и q-плечах 12 и 20 хромосом, для которых ранее было показано укорочение при длительном течении БА. У условно-здоровых доноров были выявлены множественные корреляции  $CD4^+CD45RO^+$  клеток памяти с длиной теломерных последовательностей на отдельных хромосомах, наиболее значимые из которых представлены в таблице 5. Взаимосвязи между содержанием отдельных

субпопуляций клеток памяти и длиной теломерных последовательностей, в группах доноров и пациентов выявлено не было.

Таблица 5 - Корреляционные связи между содержанием  $CD4^+ CD45R0^+$  - клеток памяти и длиной теломер индивидуальных хромосом в норме и при БА

Локализация теломер	Бронхиальная астма (n=10)	Здоровые доноры (n=12)
5p	R= - 0,71 p=0,02	R= - 0,58 p=0,04
6p	-	R= - 0,81 p=0,001
9q	-	R= - 0,75 p=0,004
12q	R= - 0,64 p=0,04	-
19q	-	R= - 0,67 p=0,02
20q	R= - 0,68 p=0,03	-

R – коэффициент корреляции Спирмена

Таким образом, для пациентов с длительным течением БА было показано наличие отрицательной корреляционной взаимосвязи между длиной теломер, локализованных на p-плече 5 и q-плечах 12 и 20 хромосом, и содержанием  $CD4^+CD45R0^+$  клеток памяти.

### 3.5.5. Изменение субпопуляционного состава Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в ответ на поликлональную стимуляцию *in vitro*

Для исследования длины теломер на отдельных хромосомах Т-лимфоцитов необходимо большое количество активно пролиферирующих клеток. Традиционно для этого используют поликлональную активацию МНК ПК *in vitro* с помощью ФГА [217]. Чтобы установить каким образом изменяется субпопуляционный состав Т-лимфоцитов памяти и наивных Т-лимфоцитов в ответ на поликлональную стимуляцию *in vitro* в группах пациентов с БА и здоровых доноров, был проведен следующий эксперимент. Были получены МНК ПК от 10 здоровых доноров и 10 пациентов с БА, которые культивировали в течение 72 часов *in vitro* в присутствии ФГА. В качестве контроля использовались клетки нестимулированной культуры (подробно описано в разделе «Материалы и методы»).

После культивирования клеток проводилось сравнение экспрессии маркера CD45R0 на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитах между группами пациентов и здоровых доноров. Анализ проводился непараметрическим критерием Манна-Уитни, и он показал, что по данному показателю между группой пациентов с БА и здоровыми донорами, как в ФГА-стимулированной, так и в контрольной культуре различий не было ( $p > 0,05$ ).

Известно, что в процессе дифференцировки Т-лимфоцитов переход от наивных форм к эффекторным и клеткам памяти сопровождается сменой CD45-маркера с изотипа CD45RA на CD45R0 [218]. Поэтому был проведен анализ экспрессии CD45R0 -маркера методом Вилкоксона в группах пациентов с БА и здоровых доноров между ФГА-стимулированной и контрольной культурами. Выяснилось, что в обеих группах экспрессия маркера CD45R0 среди CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов была достоверно выше после стимуляции ФГА по сравнению с клетками контрольной культуры (рисунок 21 А, Б). Относительное количество CD45R0-негативных клеток, напротив, снижалось после стимулирования ФГА

(рисунок 21 А, Б). Интересно, что экспрессия маркера CD45R0 на CD8<sup>+</sup>-лимфоцитах в культуре без стимуляции была ниже, чем на CD4<sup>+</sup>-лимфоцитах.

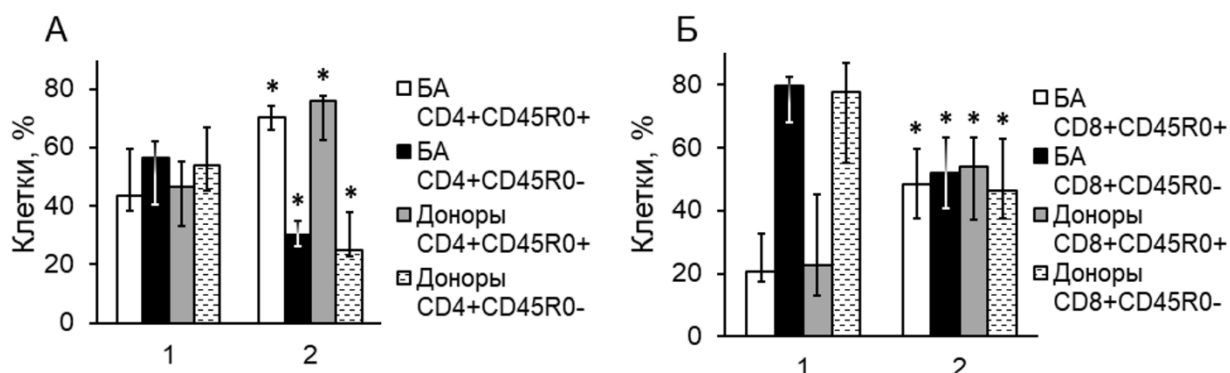


Рисунок 21 - Экспрессия маркера CD45R0 на CD4<sup>+</sup> (А) и CD8<sup>+</sup> (Б) Т-лимфоцитах в нестимулированной и ФГА-стимулированной культурах у пациентов с БА и здоровых доноров

Примечание: За 100 % принято число клеток в популяциях CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов соответственно. На гистограмме представлены медианы и интерквартильные размахи (25- и 75-процентили); 1 – нестимулированная культура; 2 – ФГА-стимулированная культура; \* - указаны достоверные различия с клетками нестимулированной культуры ( $p < 0,05$ , тест Уилкоксона).

Представлялось также интересным выяснить взаимосвязь возраста с содержанием CD45R0<sup>+</sup>-клеток. Было обнаружено, что в группе пациентов положительная корреляция содержания CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup>-клеток с возрастом наблюдалась в нестимулированной культуре:  $R=0,96$ , ( $p < 0,001$ ) и  $R=0,63$ , ( $p < 0,05$ ) соответственно. В ФГА-стимулированной культуре у пациентов с БА корреляции не было выявлено. У здоровых доноров достоверные корреляции между изучаемыми параметрами в культурах отсутствовали.

Еще одной задачей данного эксперимента был анализ субпопуляционного состава Т-лимфоцитов в ФГА-стимулированной и контрольной культурах у пациентов с БА по сравнению со здоровыми донорами. Как и ранее, субпопуляции T<sub>cm</sub>, T<sub>em</sub>, T<sub>naive</sub> и T<sub>emra</sub> в ФГА-стимулированной и контрольной культурах определялись по экспрессии CCR7- и CD62L- маркеров. Анализ между группами

здоровых доноров и пациентов проводился с использованием критерия Манна-Уитни и не обнаружил отличий в контрольной и стимулированной культурах по субпопуляционному составу  $CD4^{+}$ - и  $CD8^{+}$ - клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов ( $p > 0,05$ ).

Также была проведена оценка отвечаемости различных субпопуляций клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов на ФГА в группе пациентов с БА и группе здоровых доноров методом Вилкоксона. В результате стимуляции ФГА как в группе пациентов, так и здоровых доноров, достоверно повышалось содержание  $CD4^{+}T_{cm62L}^{+}$  Т-лимфоцитов и снижалось -  $CD4^{+}T_{em62L}^{+/-}$  клеток по сравнению с нестимулированной культурой (рисунок 22А). Среди  $CD8^{+}$  Т-клеток памяти в ФГА-стимулированной культуре по сравнению с контрольной культурой достоверно повышалось содержание  $T_{cm62L}^{+}$  и  $62L^{-}$  клеток в обеих исследуемых группах. Количество  $CD8^{+}T_{em62L}^{+}$  и  $62L^{-}$  клеток снижалось в ФГА-стимулированной культуре по сравнению с контрольной культурой у пациентов и у здоровых доноров (рисунок 22Б).

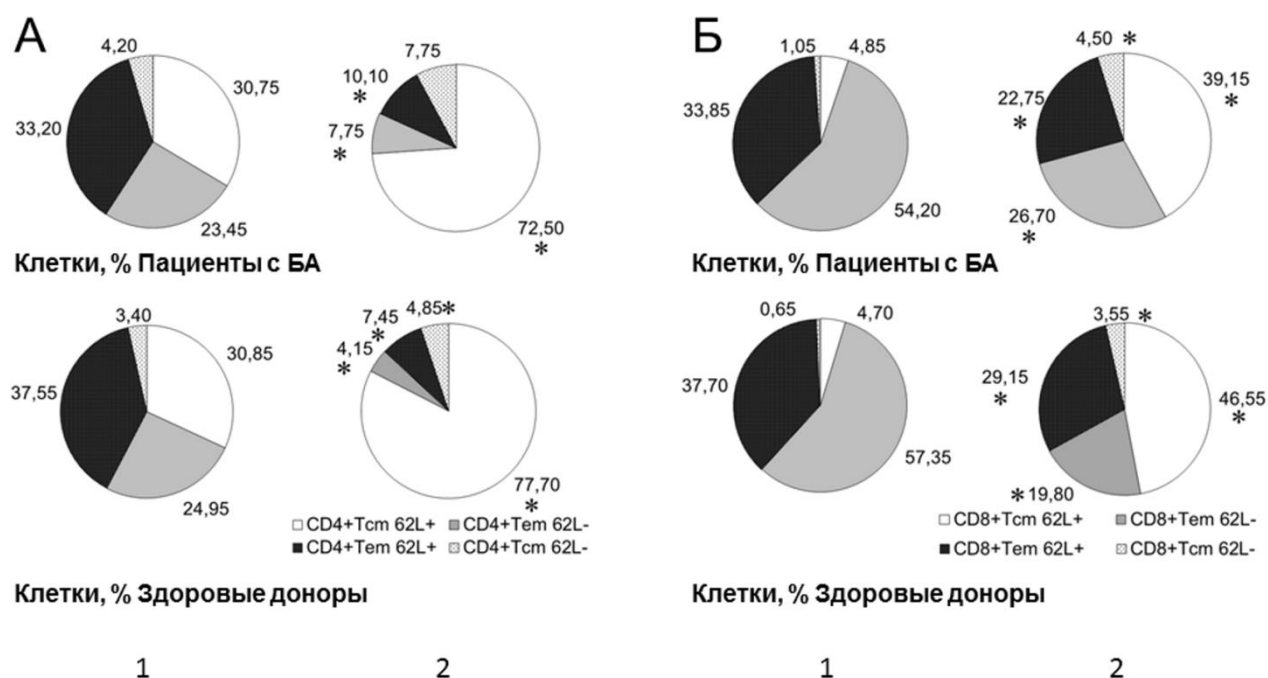


Рисунок 22 - Соотношение субпопуляций CD4<sup>+</sup> (А) и CD8<sup>+</sup> (Б) центральных и эффекторных Т-клеток памяти в нестимулированной и ФГА-стимулированной культурах у пациентов с БА и здоровых доноров

Примечание: Данные указаны в процентах, за 100 % принято число клеток в популяциях CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> CD45R0<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. На диаграмме представлены медианы.

(А) – CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> Т-лимфоциты; (Б) – CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> Т-лимфоциты; 1 – нестимулированная культура (контроль); 2 – ФГА-стимулированная культура; \* – указаны достоверные различия параметров контрольной и ФГА-стимулированной культуры ( $p < 0,05$ , тест Вилкоксона).

Относительное количество CD4<sup>+</sup> наивных и терминально-дифференцированных Т-лимфоцитов в ответ на воздействие ФГА изменялось у здоровых доноров и пациентов с БА по-разному. Так, в группе пациентов достоверно повышалось содержание CD4<sup>+</sup>Tnaive62L<sup>-</sup> и CD4<sup>+</sup>Temra62L<sup>-</sup> клеток в ФГА-стимулированной культуре по сравнению с контрольной и незначительно снижалось содержание CD4<sup>+</sup>Tnaive62L<sup>+</sup> клеток. Тогда как в группе здоровых доноров происходило только достоверное повышение CD4<sup>+</sup>Tnaive62L<sup>-</sup> клеток в ФГА-стимулированной культуре (рисунок 23А). Субпопуляционный состав CD8<sup>+</sup> наивных и терминально-дифференцированных Т-лимфоцитов при воздействии



ФГА изменялся в группе пациентов и здоровых доноров сходным образом: происходило достоверное увеличение количества  $CD8^+Tnaive62L^-$  и уменьшение количества  $CD8^+Temra62L^-$  клеток (рисунок 23Б).

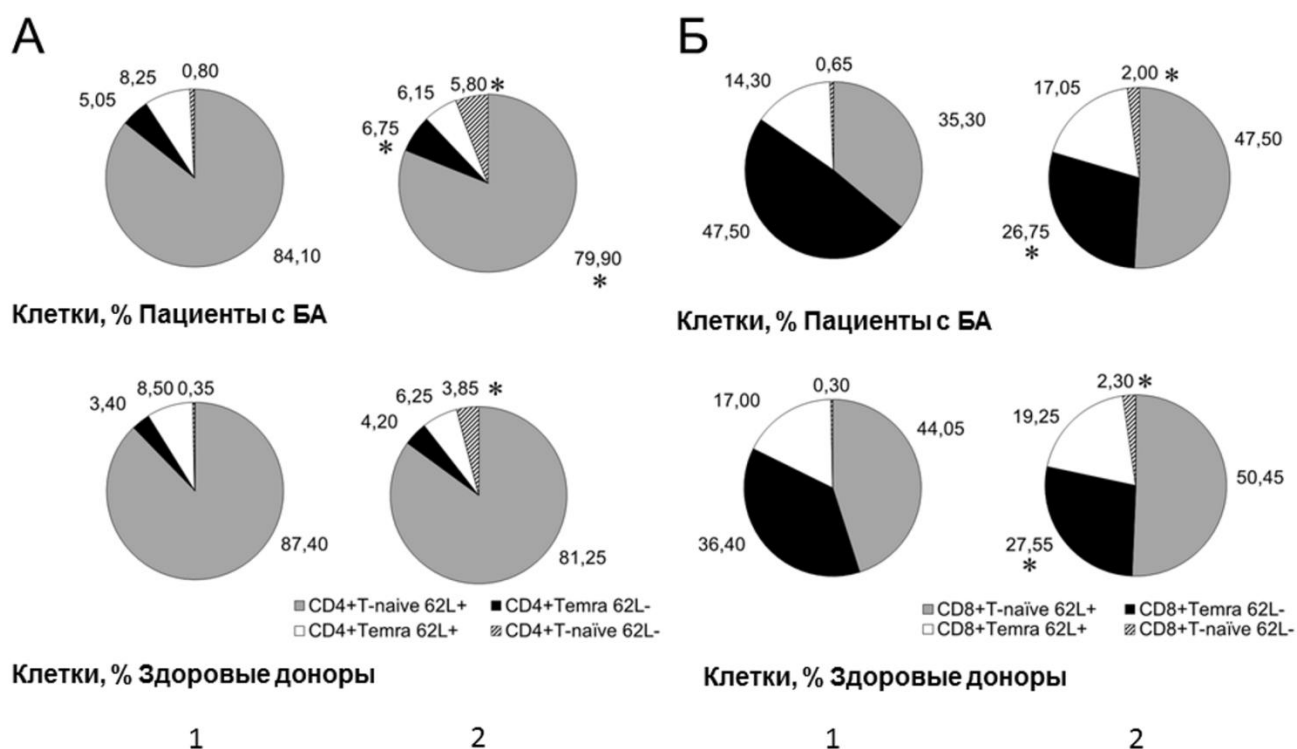


Рисунок 23 - Соотношение субпопуляций  $CD4^+$  (А) и  $CD8^+$  (Б) наивных и терминально-дифференцированных Т-лимфоцитов в нестимулированной и ФГА-стимулированной культурах у пациентов с БА и здоровых доноров

Примечание: Данные указаны в процентах, за 100 % принято число клеток в популяциях  $CD4^+$  и  $CD8^+CD45R0^-$  Т-лимфоцитов. На диаграмме представлены медианы.

(А) –  $CD4^+$   $CD45R0^-$  Т-лимфоциты; (Б) –  $CD8^+$   $CD45R0^-$  Т-лимфоциты; 1 – нестимулированная культура (контроль); 2 – ФГА-стимулированная культура. \* – указаны достоверные различия параметров контрольной и ФГА-стимулированной культуры ( $p < 0,05$ , тест Вилкоксона).

Результаты данного эксперимента свидетельствуют, о том, что у пациентов с БА реакция Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов на поликлональную активацию *in vitro* находится на уровне нормы. Это делает правомочным сравнение длины теломер на отдельных хромосомах Т-лимфоцитов, полученных в

результате стимуляции ФГА, между группами здоровых доноров и пациентов с БА. Также в результате эксперимента было показано, что наиболее отвечающими на поликлональную активацию *in vitro* являются субпопуляции  $CD4^+$  и  $CD8^+$   $T_{cm62L}^+$  и  $T_{naive62L}^-$  клеток, достоверное увеличение которых по сравнению с нестимулированной культурой может быть связано с их пролиферативной активностью. Тогда как численное уменьшение клеток других субпопуляций, возможно, вызвано перераспределением относительного количества клеток в результате поликлональной активации.

### **3.5.6. Проллиферативная активность Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов при поликлональной активации *in vitro***

С одной стороны, для здоровых лиц показано, что наряду с укорочением средней длины теломер, у Т-клеток памяти снижен пролиферативный потенциал по сравнению с наивными Т-лимфоцитами [16]. С другой стороны, есть данные о том, что у детей, страдающих БА, повышена пролиферативная активность  $CD4^+$  Т-лимфоцитов [219]. При этом в литературе нет данных о пролиферативной активности различных субпопуляций клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов при БА. Поэтому была также исследована пролиферативная активность различных субпопуляций клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в ответ на поликлональную активацию *in vitro*. Для анализа пролиферативной активности использовали витальный краситель CFSE, который позволяет разделить делящиеся и неделящиеся клетки по уровню их флуоресценции. Неделящиеся клетки обладают максимальной флуоресценцией. При делении клетки краситель равномерно распределяется между дочерними клетками, что приводит к уменьшению флуоресценции. Проллиферативную активность клеток вычисляли как процент пролиферирующих клеток. В качестве контроля использовались клетки из нестимулированной культуры (подробно описано в разделе «Материалы и методы»).

Сравнение пролиферативной активности различных клеточных субпопуляций между группой здоровых доноров и пациентов проводилось непараметрическим критерием Манна-Уитни. Было показано, что спонтанная пролиферация  $CD8^+$  Т-лимфоцитов в культуре без стимуляции достоверно отличалась в группе пациентов с БА от группы доноров и составила 1,3% и 0,4% соответственно ( $p < 0,05$ ). Отличий между группой пациентов и здоровых доноров по уровню спонтанной и ФГА-стимулированной пролиферации различных субпопуляций Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов обнаружено не было ( $p > 0,05$ ).

Также было проведено сравнение числа пролиферирующих клеток между разными субпопуляциями в пределах группы здоровых доноров и пациентов с БА. Анализ проводился методом Вилкоксона для культур клеток, стимулированных ФГА. Было показано, что во всех изучаемых субпопуляциях  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-лимфоцитов пролиферация  $62L^+$  форм клеток была достоверно выше, чем  $62L^-$  (рисунок 24 и 25).

Среди  $CD4^+$  Т-лимфоцитов в группе здоровых доноров наиболее активно делились  $T_{cm}62L^+$  клетки, отличий между субпопуляциями клеток  $T_{em}62L^+$  и  $T_{naive}62L^+$  не было (рисунок 24Б). Тогда как в группе пациентов с БА не было достоверных отличий между пролиферацией  $CD4^+T_{cm}62L^+$  и  $CD4^+T_{naive}62L^+$  клеток. В то же время, у пациентов  $CD4^+T_{cm}62L^+$  делились активнее, чем  $CD4^+T_{em}62L^+$  и  $CD4^+T_{emra}62L^+$ , а  $CD4^+T_{naive}62L^+$  - активнее, чем  $CD4^+T_{emra}62L^+$  (рисунок 24А).

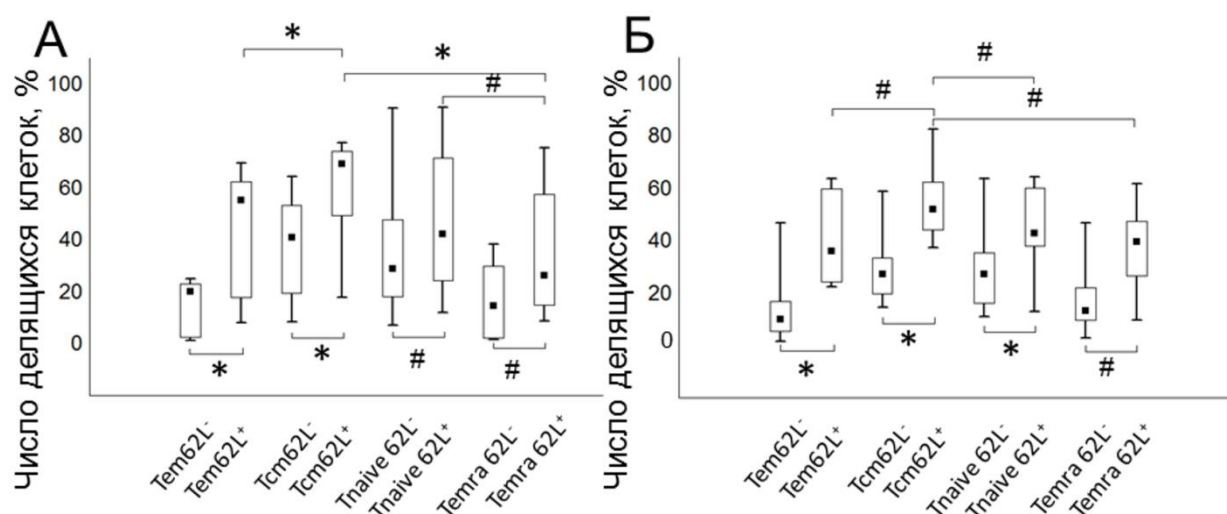


Рисунок 24 - Пролиферативная активность субпопуляций  $CD4^+$  Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в ФГА-стимулированной культуре у пациентов с БА (А) и здоровых доноров (Б)

Примечание: Данные указаны в процентах, за 100 % принято общее количество клеток определенной субпопуляции. Графики представлены в виде медианы, минимальных и максимальных значений и интерквартильных размахов (25- и 75- процентиля); \*— указаны достоверные различия между субпопуляциями при  $p < 0,01$ ; # - указаны достоверные различия между субпопуляциями при  $p < 0,05$  (тест Вилкоксона).

Субпопуляции  $CD8^+$  клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в группах здоровых доноров и пациентов с БА пролиферировали сходным образом. В обеих группах  $CD8^+Tcm62L^+$  и  $CD8^+Tnaive62L^+$  клетки делились более активно, чем  $CD8^+Tem62L^+$  и  $CD8^+Temra62L^+$  клетки (рисунок 25 А и Б).

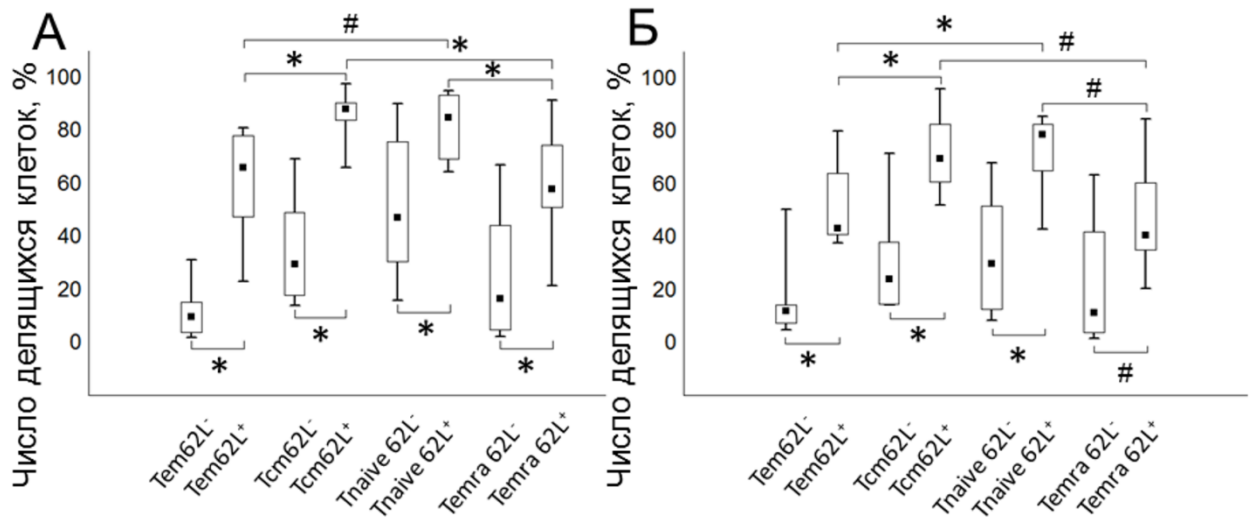


Рисунок 25 - Пролиферативная активность субпопуляций CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в ФГА-стимулированной культуре у пациентов с БА (А) и здоровых доноров (Б)

Примечание: Данные указаны в процентах, за 100 % принято общее количество клеток определенной субпопуляции. Графики представлены в виде медианы, минимальных и максимальных значений и интерквартильных размахов (25- и 75- процентиля); \* – указаны достоверные различия между субпопуляциями при  $p < 0,01$ ; # - указаны достоверные различия между субпопуляциями при  $p < 0,05$  (тест Вилкоксона).

В результате данного эксперимента было показано, что при БА пролиферативная активность различных субпопуляций Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в ответ на ФГА сохранена, так как находится на уровне донорских показателей. А также было выявлено, что наиболее активно делятся субпопуляции CD4<sup>+</sup>Tcm62L<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>Tcm62L<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Tnaive62L<sup>+</sup> клеток как у пациентов, так и у здоровых доноров.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Определение длины теломер призвано решить ряд задач персонифицированной медицины по поиску прогностических и диагностических маркеров таких заболеваний, как сердечно-сосудистая патология, онкопатология и иммуноопосредованные заболевания [220]. Существующие в настоящее время методы определения длины теломер используются как в прикладных, так и в фундаментальных исследованиях, в связи с чем они не теряют своей актуальности. В данной работе для вычисления длины теломер на отдельных хромосомах в норме и при патологии был модифицирован протокол Q-FISH. При этом лучше сохраняется морфология хромосом, что делает качество изображений и последующего цитогенетического анализа выше. При валидации модифицированной методики было получено высокое значение коэффициента корреляции флуоресцентного сигнала с теломер на сестринских хроматидах. Это дает возможность сравнивать длину теломер отдельных хромосом между группами пациентов с иммунопатологией и здоровых доноров после модификации методики.

Также была разработана программа «MeTeLen» для измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с теломер. В ходе создания программы были подобраны оптимальные параметры для процедуры выравнивания сигнала, способы вычитания фонового сигнала. Стоит отметить, что данные процедуры могут указывать на качество настройки оптической системы флуоресцентного микроскопа. Резкое уменьшения колебаний интенсивности после применения процедуры выравнивания и высокий уровень фонового сигнала могут указывать на проблемы с оптической системой микроскопа. Апробация программы выявила проблему соприкасающихся и наложенных объектов. Особенно эта проблема актуальна для теломер, так как при вычислении IFI очень важно определить точные границы этих районов. На данный момент разделение объектов выполняется пользователем интерактивно. Частично, проблема разделения теломер может быть решена использованием метода водораздела [221].

Для количественной оценки результатов Q-FISH необходимы идентичные условия получения метафазных хромосом, гибридизации *in situ* и микроскопического анализа. Использование плазмиды, которая содержит вставленный теломерный повтор стандартного размера или образца метафазных хромосом, ранее охарактеризованных по длине теломер, может частично решить проблему калибровки полученного результата [31]. Тем не менее, лучший способ обеспечить стандартизацию состоит в том, чтобы выполнить подготовку метафазных хромосом и Q-FISH со всеми образцами, участвующими в исследовании одновременно. К сожалению, процесс сбора образцов у пациентов с иммунопатологией обычно занимает много времени. Во многих исследованиях суспензии фиксированных клеток, полученные от пациентов, хранятся при  $-20^{\circ}\text{C}$  до подготовки метафазных хромосом. В данном исследовании сравнивались результаты приготовления метафазных хромосом, гибридизации *in situ* и микроскопического анализа с использованием фиксированных клеток, которые хранились при  $-20^{\circ}\text{C}$ , и результаты гибридизации *in situ* и микроскопического анализа, полученные из предметных стекол с метафазными хромосомами, которые также хранились при  $-20^{\circ}\text{C}$ . На основании полученных данных для исследований, включающих измерение длины теломер у пациентов с иммунопатологией, может быть рекомендовано, чтобы слайды с метафазными хромосомами были приготовлены из образцов от пациентов и здоровых доноров и хранились при  $-20^{\circ}\text{C}$ . А затем, когда все образцы собраны, реакция гибридизации выполнялась бы в парах донор-пациент одновременно.

Показанное методом Q-FISH в данном исследовании укорочение средней длины теломер у пациентов с длительно текущей БА подтверждается литературными данными, в которых описано укорочение средней длины теломер в клетках иммунной системы при БА и атопическом дерматите [22]. Характерно при этом, что у пациентов с дебютом БА не было обнаружено укорочение средней длины теломер. Эти данные согласуются с исследованием D.W. Belsky и соавт., в котором было показано, что средняя длина теломер у лиц длительно

страдающих персистирующей БА с детства по сравнению со здоровыми лицами и заболевшими в подростковом возрасте [25].

Однако считается, что именно чрезмерно укороченные теломеры могут приводить к нестабильности генома клетки, слиянию хромосом «конец-в-конец», запуску системы репарации ДНК и, в конечном итоге, вызывать апоптоз [165]. В результате экспериментов, выполненных в данной работе, было установлено, что у пациентов с БА достоверно снижена длина теломер в Т-лимфоцитах на плечах пяти различных хромосом (6p, 9p, 9q, 11q, 13q). При этом было показано, что при эндогенной форме БА длина теломерных последовательностей не изменена. Тогда как при экзогенной БА происходит укорочение длины многих теломер (1p, 4q, 5q, 6p, 9p, 9q, 11q, 12q, 13q, 14q, 15q, 20q). Эти данные не имеют аналогов в литературе, однако частично совпадают с более ранним исследованием, которое показало, что средняя длина теломер укорачивается в разных субпопуляциях Т-лимфоцитов по-разному в зависимости от клинико-патогенетической формы БА [23]. Таким образом, показанное укорочение длины теломер на отдельных хромосомах может быть патогенетическим маркером, который позволяет разделить основные нозологические формы БА – экзогенную и эндогенную.

Существует мнение, подтвержденное экспериментальными данными [21, 222], что при ревматоидном артрите укорочение средней длины теломер детерминировано генетически и происходит уже на уровне ранних предшественников миело- и лимфопоэза, что создает врожденную предрасположенность к развитию данного заболевания [223]. При БА исследование средней длины теломер в клетках-предшественниках иммунопоэза не проводилось. Однако есть предположение, что укорочение длины теломер при БА может происходить в процессе раннего развития или под влиянием генетических факторов [224]. Полученные в данном исследовании результаты не могут в полной мере решить этот вопрос, но позволяют сказать, что длина теломер на индивидуальных хромосомах зависит от длительности заболевания. Так, в дебюте БА укорочена теломерная последовательность на p-плече 9 хромосомы, а у пациентов с длительным течением БА укорочение длины



теломерных районов затрагивает уже семнадцать плеч индивидуальных хромосом (4q, 5p, 5q, 6p, 7q, 9p, 9q, 10q, 11p, 11q, 13p, 13q, 15p, 15q, 17p, 18p, 20q). Данные, аналогичные общей группе, получены и для экзогенной БА, которая манифестирует с укорочения двух теломерных районов на p и q плечах 9 хромосомы, а при длительном течении характеризуется укорочением девятнадцати теломерных районов (4q, 5p, 5q, 6p, 7q, 9p, 9q, 10q, 11q, 12q, 13p, 13q, 14q, 15p, 15q, 17p, 18p, 20q, 22q).

Также была выявлена зависимость укорочения теломерных последовательностей, находящихся на разных плечах индивидуальных хромосом, не только от длительности заболевания, но и от возраста пациентов. Известно, что с возрастом в клетках человека средняя длина теломер уменьшается [20]. Тем не менее, в данном исследовании у здоровых доноров, находящихся в 4-6 декадах жизни, не наблюдалось укорочения длины теломер с возрастом. Такой результат может объясняться тем, что темп укорочения длины теломер не одинаков на протяжении жизни: он максимален в 1 декаду жизни, выходит на плато во 2-3 декадах и затем поддерживает небольшую скорость укорочения теломер вплоть до 8 декады жизни [17, 179]. Поэтому обнаруженное укорочение длины теломер индивидуальных хромосом у пациентов с БА, находящихся в 6 декаде жизни, по сравнению с пациентами из 4 и 5 декады, может быть вызвано ускоренным старением иммунной системы при БА. Это подтверждается данными об ускоренном старении клеток иммунной системы и дыхательных путей при БА и других хронических бронхолегочных заболеваниях [196, 197, 199, 225].

Интересно, что у пациентов из 6 декады жизни укорачивались теломерные последовательности на плечах разных хромосом: на 9p, 9q, 20p плечах в сравнении с пациентами из 4 декады и на 1q, 9q, 17p плечах в сравнении с пациентами из 5 декады жизни. Пожилой возраст считается фактором риска возникновения БА [226], и в возрасте 50-65 лет заболеваемость БА возрастает [227]. Поэтому возможно, что такое неравномерное укорочение теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом зависит от возраста манифестации заболевания. Действительно, в исследуемой группе у пациентов из более старшей

возрастной декады заболевание, в среднем, начиналось позже, чем у пациентов из более младшей возрастной декады. Это позволяет предположить, что с возрастом у предрасположенных лиц могут накапливаться укороченные кластеры теломерных повторов, которые способствуют развитию заболевания. В этом аспекте снова обращает на себя внимание 9 хромосома, на р и q плечах которой длина теломер не только укорочена в дебюте заболевания, но и укорачивается с возрастом.

Таким образом, полученные данные об укорочении теломер индивидуальных хромосом при БА в зависимости от формы, длительности течения заболевания и возраста пациентов, создают различные предпосылки для выводов. С одной стороны, они свидетельствуют о том, что укорочение длины теломер при БА является не столько наследственным признаком, сколько по мере течения заболевания процесс укорочения захватывает все большее количество теломер. Это может происходить вследствие усиленной пролиферации лимфоцитов, которые находятся в состоянии иммунного ответа. Так как показано, что уменьшение длины теломер в Т-лимфоцитах является следствием клональной экспансии в ответ на антиген [100]. С другой стороны, очевидно, что укорочение отдельных теломерных последовательностей при экзогенной БА само по себе может быть патогенетическим фактором, который оказывает влияние на развитие заболевания. Эта точка зрения подтверждается тем фактом, что теломеры укорачиваются сильнее у лиц с тяжелой БА, чем у пациентов со средней степенью тяжести заболевания [24].

Поскольку в данном исследовании длина теломер определялась не в абсолютных, а в относительных единицах, то невозможно утверждать, насколько критичным является укорочение теломер при БА. Вместе с тем, есть доказательства того, что в клетке достаточно пяти теломер с нарушенной функцией для запуска пролиферативного старения [228]. Кроме того, известен такой способ влияния теломер на функцию клетки, как позиционный эффект теломер (TPE - telomeric position effect). Данный эффект, показанный впервые на дрожжах, предполагает, что в норме теломеры вызывают «сайленсинг» генов

субтеломерных регионов, то есть подавляют экспрессию генов, блокируя их промоторы [229]. Однако при укорочении теломерных последовательностей происходит отмена репрессии данных генов, что приводит к усилению их экспрессии. В настоящее время уже доказано существование TPE в клетках человека [79, 80]. Например, показано влияние TPE на повышенную экспрессию патогенетически значимого гена DUX4 при одной из разновидностей мышечных дистрофий человека [230]. Кроме того считается, что укороченные теломеры повышают экспрессию не только генов субтеломерных регионов, но и удаленно расположенных генов (TPE-OLD – Telomere Position Effect Over Long Distances) [231]. В том числе есть данные, показывающие, что экспрессия каталитической субъединицы теломеразы (hTERT) находится под влиянием TPE-OLD [232]. Это дает основания полагать, что обнаруженные при БА укороченные теломерные последовательности индивидуальных хромосом влияют на экспрессию генов, локализованных в данных хромосомах.

Развитие БА во многом связано с генетической предрасположенностью индивидуума к данному заболеванию. По данным многочисленных полногеномных исследований, проводимых в разных популяциях, склонность к БА ассоциирована с большим количеством генетических локусов, расположенных на различных хромосомах. Так, обнаружена связь БА с локусами, расположенными на следующих хромосомных плечах и/или хромосомах: 2p, 6p, 9, 12q [233]; 1p, 11p, 11q, 12q, 13q, 17q, 19q [234]; 5q [235] а также 5q23-31, 6p21.3-23; 12q14-24.2, 13q21.3-qter, 14q11.2-13 среди лиц европеоидной расы [236]. Примечательно, что во всех исследованиях изучалась связь данных локусов не только с БА, но и с атопическим фенотипом БА (повышенный уровень IgE, эозинофилия крови, положительные скарификационные тесты). Интересно, что в данном исследовании для многих хромосом (5q, 6p, 9p, 9q, 11q, 12q, 13q, 14q), которые содержат генетические локусы, ассоциированные с БА, было обнаружено укорочение длины теломерных последовательностей. Эти факты дают возможность сделать предположение, что при атопической форме БА существует

взаимосвязь между этими генетическими локусами и длиной теломерных последовательностей тех хромосомных плеч, на которых они находятся.

К одним из наиболее часто идентифицируемых кластеров генов, ассоциированных с БА, относятся локусы на 5, 11 и 12 хромосомах [237]. Известно, что 31-33 регионы q-плеча 5 хромосомы содержат гены IL-3, -4, -5, -9, -13, GM-CSF, а также IgE, которые являются непосредственными участниками гиперчувствительности немедленного типа при atopических заболеваниях. Лocus 15.5, расположенный на p плече 11 хромосомы кодирует гены семейства муциновых белков (MUC5AC, MUC5B), нарушенная секреция которых при БА способствует развитию гиперреактивности дыхательных путей [238]. В q-плече 12 хромосомы содержится ген, кодирующий фермент NO-синтазу, полиморфизм которого отвечает за повышенную концентрацию NO в выдыхаемом воздухе при БА [239, 240]. А также ген IFN- $\gamma$  и фактора, регулирующего IFN- $\gamma$ , для которых показан полиморфизм при БА [241]. Полногеномные исследования последних лет обнаружили новые генетические локусы, ассоциированные с развитием БА [242]. Показано, что при БА существует взаимосвязь между однонуклеотидными заменами генов (SNP – single nucleotide polymorphisms) и чувствительностью к терапии, проводимой  $\beta$ 2-агонистами [243]. Также при БА известна взаимосвязь SNP генетических последовательностей регионов 5p15, 9p23, 11q14, 12p12, 18q12 и 20q13 с повышенной чувствительностью к средовым факторам [244, 245]. В таблице 6 приведены основные хромосомные регионы, локусы которых ассоциированы с развитием БА, и результаты по длине теломер на плечах индивидуальных хромосом, полученные в данном исследовании. Связь данных генетических кластеров с длиной теломер не изучалась. Тем не менее, как видно из таблицы 6, длина теломерных последовательностей укорочена на многих хромосомных плечах, которые являются носителями локусов, ассоциированных с БА или atopией. Исходя из этого можно предположить, что укорочение индивидуальных теломерных последовательностей может вносить свой вклад в патогенетические процессы при экзогенной БА посредством повышения экспрессии данных генов. Тот факт, что не на всех плечах хромосом, которые

содержат значимые генетические локусы, теломеры укорочены, может быть связан с проведением полногеномных исследований в разных этнических группах. Так как последние существенно отличаются по локусам, ассоциированным с предрасположенностью к БА [236]. Например, среди афроамериканских детей известна сильная генетическая предрасположенность, связанная с SNP в локусе 19q21, к более слабому ответу дыхательных путей на воздействие бронхолитиков при БА [246].

Таблица 6 - Плечи индивидуальных хромосом, в которых локализованы гены, ассоциированные с развитием БА, и длина теломер на них при БА

Хромосом- ный регион	Некоторые гены, локализованные в данном регионе, с которыми ассоциирована БА	Ассоциация с определенным фенотипом	Литератур- ная ссылка	Длина теломер на данных плечах индивидуаль- ных хромосом при БА
1p22	PIGX	БА, поллиноз, экзема	[247]	↓
1q21	IVL-SPRR2E	БА, поллиноз, экзема	[247]	-
2q12	IL1RL1	БА	[74]	-
4q27	ADAD1, IL2	Атопия	[247]	↓
5q23	IL-4	Атопическая БА, ↑общ. IgE	[248], [249]	↓
5q31	IL13	БА	[74]	↓
5q31	β2AR	БА, сниже- ние ФВД рефрактер- ность к бронхо- литикам	[250], [251]	↓
5q31.1	CD14	Положитель- ные аллерги- пробы, поллиноз	[252]	↓
6p.21	HLA-DQA1	БА	[74]	↓
6p.21.3	HLA-DRB1	БА, ↑общий и специфи- ческий IgE	[253], [254]	↓
8p22	NAT2	БА	[255]	-
9p22	EQTN	БА	[256]	↓
9p24	IL-33	БА	[74]	↓
9q34	LOC339807	БА, поллиноз, атопический дерматит	[257]	↓
10p14	SLC7A10	БА, поллиноз, экзема	[247]	-
10q21	JMJD1C	БА	[256]	↓

Продолжение таблицы 6

Хромосом- ный регион	Некоторые гены, локализованные в данном регионе, с которыми ассоциирована БА	Ассоциация с определенным фенотипом	Литератур- ная ссылка	Длина теломер на данных плечах индивидуаль- ных хромосом при БА
11p15.5	MUC5AC, MUC2, MUC5B	БА	[258]	↓ (при длительном течении БА)
11q13	LRRC32	БА	[74]	↓
11q13	FcεR1-β	БА, атопия, БА детского возраста	[259]	↓
12q13	STAT6	БА	[74]	↓
12q22	NOS1, NNOS	БА, концентрация NO в выдыхаемом воздухе	[239]	↓
13q22	LAYN-SIK2	БА, поллиноз, АД	[257]	↓
14q24	STAT5B	БА, поллиноз, АД	[257]	↓
14q32	MAP3K14- ARHGAP27	БА, поллиноз, АД	[257]	↓
15q15	RUNX1	БА, поллиноз, АД	[257]	↓
15q22	SMAD3	БА	[74]	↓
16p12.1	IL-4R	Атопическая БА, БА детского возраста	[260]	-
17q21	IKZF3	БА	[261]	-
20q13	ATG5	БА, поллиноз, АД	[257]	↓
21q22	PIBF1-KLF5	БА, поллиноз, АД	[257]	-
22q13	RCOR1-TRAF3	БА, поллиноз, АД	[257]	↓

Рядом исследований доказано, что средовые факторы и образ жизни оказывают существенное влияние на длину теломер [262]. Тем не менее есть факты, указывающие на то, что длина теломер является наследственной чертой [176, 263]. Даже существует мнение, что не столько процесс иммунного ответа способствует снижению длины теломер, сколько наследуемое укорочение теломер вызывает ускоренное старение иммунной системы и нарушение Т-клеточного гомеостаза при иммунопатологии [21, 264]. В пользу этого мнения свидетельствуют работы J. Graakjaer и др., в которых было показано, что теломерный профиль человека имеет общие черты и индивидуальные особенности, которые наследуются и поддерживаются в различных клетках организма на протяжении всей жизни индивидуума. В данном исследовании были построены общие теломерные профили доноров и пациентов с БА. Чтобы оценить степень их сходства и существующие между ними отличия, были определены укороченные и удлинённые теломерные последовательности относительно средней длины теломер. Результаты, которые продемонстрировали высокое сходство теломерных профилей доноров и пациентов, свидетельствуют о том, что при БА общие черты теломерного профиля сохранены.

Кроме того, полученные данные по относительно длинным и относительно коротким теломерным последовательностям для обеих групп во многом совпадали с данными исследования U.M. Martens [168]. В последнем также было показано, что теломерные последовательности на хромосомных плечах 2q, 12p, 16p, 17p, 17q, 19p, 20q, 22q укорочены, а 3p, 4p, 4q, 5p, 6q, 13q, 14q, 18q и Xp удлинены относительно медианы. Вместе с полученными данными, это свидетельствует в пользу наследуемого характера распределения теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом. Более того, исходя из этого можно предположить, что обнаруженные в данном исследовании у здоровых доноров укороченные (2q, 12p, 16p, 17p, 17q, 18q, 19p, 20p, 20q, 22q) и удлинённые (3p, 4q, 13q, 14q, Xp) теломерные последовательности являются конституциональными особенностями теломерного профиля, которые свойственны большинству людей.



Примечательно, что по сравнению с донорами при БА большее количество теломер было укорочено или удлинено относительно средней (19 при БА vs 15 у здоровых доноров). Такое повышение вариабельности длины теломер может объясняться неравномерной работой теломеразы. Так как было показано в опытах, проводимых *in vitro* на фибробластах человека, что теломераза в процессе репликации увеличивает не все теломерные последовательности, а только самые короткие [265]. Важно отметить, что у пациентов с экзогенной БА были укорочены по сравнению с длиной теломер доноров и относительно длинные (4q) и относительно короткие (6p, 9p, 9q, 15q, 20q) последовательности теломерного профиля и те, которые не отклонялись от средней длины теломер (1p, 5q, 11q, 12q, 13q, 14q). Это говорит о том, что при БА укорачиваются не самые короткие теломеры из теломерного профиля, а именно определенные теломерные последовательности, которые вовлечены в развитие данного заболевания. Укорочение именно этих последовательностей может быть связано с генетическими факторами. Так, в результате мета-анализа, основанного на нескольких полногеномных исследованиях, было обнаружено пять генетических аллелей, которые вовлечены в развитие возраст-ассоциированных заболеваний посредством влияния на длину теломер [181]. Вместе с данными об укорочении теломер на отдельных хромосомах, выявленные особенности распределения последовательностей теломерного профиля при БА свидетельствуют об ассоциированном с теломерами старении Т-лимфоцитов у пациентов с этой патологией. А также о том, что процесс укорочения теломер при данном заболевании не сводится исключительно к пролиферативному старению или унаследованному от родителей теломерному профилю. Но может опосредоваться различными механизмами, такими, как активность теломеразы, компоненты Shelterin-комплекса, быстрая делеция теломер или нехомологичная рекомбинация теломерных последовательностей [136, 137, 205].

Другим свидетельством ускоренного старения иммунной системы при БА может быть изменение фенотипического состава клеток памяти. В предыдущих исследованиях изоформы молекулы CD45R0<sup>+</sup> использовались как единственный

маркер клеток памяти. Так, в более ранних работах обнаружено сниженное количество Т-клеток памяти ( $CD4^+CD45R0^+$ ) в периферической крови и культурах Т-лимфоцитов у пациентов с atopическими заболеваниями, в том числе БА, по сравнению со здоровыми донорами [209, 210, 266]. Вместе с тем, более поздние исследования отмечают повышенное содержание  $CD4^+CD45R0^+$  клеток у пациентов с тяжелой БА в сравнении с БА средней тяжести и здоровыми лицами [15, 98, 211]. С ними согласуются данные настоящего исследования, так как было показано повышенное содержание  $CD8^+CD45R0^+$  клеток-памяти и тенденция к повышению  $CD4^+CD45R0^+$  клеток памяти в периферической крови у пациентов с БА по сравнению с донорами. Более того, выяснилось, что повышение количества  $CD4^+$  и  $CD8^+$  клеток памяти зависит от формы и длительности заболевания. Поскольку количество  $CD4^+CD45R0^+$  клеток повышалось у пациентов с экзогенной БА, а количество  $CD8^+CD45R0^+$  клеток – у пациентов в дебюте, то можно предположить, что противоречивые данные по содержанию Т-клеток памяти при БА, полученные в различных исследованиях, обусловлены характеристиками выборки пациентов. Поскольку экзогенная БА является Th2-зависимым заболеванием, то повышенное содержание  $CD4^+$  Т-клеток памяти может быть связано с её патогенезом. Так, в недавнем исследовании было показано, что под влиянием TSLP при atopической БА выживаемость и дифференцировка наивных  $CD4^+$  Т-клеток в зрелые Th2- лимфоциты выше, чем у здоровых доноров [267].

Изучение фенотипа клеток памяти с использованием маркеров CCR7 и CD62L позволяет дать точное представление о центральных и эффекторных клетках памяти при БА. Количество исследований субпопуляционного состава при клетках памяти ограничено двумя работами, которые также противоречат друг другу. В первой работе было показано, что у пациентов с БА повышается содержание  $CD4^+CCR7^+$  (соответствуют  $CD4^+T_{cm}$ ), но не  $CD4^+CCR7^-$  (соответствуют  $CD4^+T_{em}$ ) клеток по сравнению с донорами [99]. В другой работе, напротив, отмечалось, что при БА количество  $CD4^+CCR7^-CD62L^+$  клеток (соответствуют  $CD4^+CD62L^+T_{em}$ ) повышено по сравнению с донорами. Авторы

статьи связывают такие изменения с активированным статусом Th2- клеток памяти периферической крови [15]. Данные этого исследования согласуются с настоящей работой, в которой было показано повышение количества  $CD4^+CD62L^+$  Tem и  $CD8^+CD62L^+$  Tem в ПК у пациентов с БА. Причем, увеличение этих же субпопуляций клеток памяти наблюдалось при экзогенной БА и у пациентов в дебюте. Тогда как количество клеток в субпопуляциях  $CD4^+Tcm62L^-$  и  $CD8^+Tcm62L^-$  было снижено при БА, независимо от длительности течения и формы БА.

Таким образом, повышенное содержание эффекторных  $CD4^+$  и  $CD8^+$  клеток памяти, так же, как и укорочение длины теломер на отдельных хромосомах, свойственно аллергическому фенотипу БА. Кроме того, результаты исследования свидетельствуют, что эффекторные Т-лимфоциты памяти имеют отношение к патогенезу БА. Возможно, они мигрируют в дыхательные пути, где в дальнейшем реализуют свои эффекторные функции в виде резидентных Tem. Последнее подтверждается сообщениями о преобладании  $CD4^+$  Т-лимфоцитов с фенотипом клеток памяти в нижних дыхательных путях у пациентов с БА [5, 14]. Кроме того, в последних опытах на мышинных моделях показано, что именно резидентные тканевые  $CD4^+$ Т-клетки памяти поддерживают сенсibilизацию к причинно-значимому аллергену и содействуют быстрой прогрессии патологического процесса в легочной ткани [268]. Хотя значение  $CD8^+$  клеток памяти менее изучено, признано, что активированные цитотоксические Т-лимфоциты аналогично Т-хелперам, инфильтрируют дыхательные пути при БА, что коррелирует со снижением функции внешнего дыхания и может служить предиктором неблагоприятного исхода БА [269–271]. Снижение количества  $CD4^+$  и  $CD8^+$  центральных клеток памяти также может быть связано с патогенезом БА, поскольку эти клетки могут мигрировать в лимфатические узлы в ответ на аллергены, которые периодически или круглогодично доступны при БА [86].

Получение клеток памяти из легких ограничено их небольшим количеством и техническими трудностями, так как проводится путем бронхо-альвеолярного лаважа (БАЛ) или биопсии, что сопряжено с возможными осложнениями для

пациентов. Однако, появляются новые данные, свидетельствующие о том, что  $CD4^+$  Т-клетки памяти обладают способностью быстро рекрутироваться в легкие и инициировать специфический иммунный ответ против ранее известных антигенов. Поэтому можно надеяться, что в будущем исследование клеток памяти ПК сможет послужить адекватной заменой исследованию клеток памяти, извлеченных из легочной ткани, и станет маркером экзогенной БА [272].

Рассматривая изменение относительного количества Т-лимфоцитов памяти и их субпопуляционного состава на воздействие митогеном следует отметить, что ФГА является неспецифическим стимулятором, а с другой, имитирует TCR-зависимый ответ, так как вызывает поликлональный ответ Т-лимфоцитов *in vivo*. Реакция Т-лимфоцитов на поликлональную стимуляцию ФГА в нашем исследовании была одинаковой. Она сопровождалась достоверным увеличением количества клеток памяти ( $CD4^+ CD45R0^+$  и  $CD8^+ CD45R0^+$ ), как у доноров, так и у пациентов. Тогда как количество  $CD45R0^-$  Т-лимфоцитов уменьшалось, что говорит о более высоком пролиферативном потенциале клеток памяти в обеих группах.

J. Geginat и соавт. показали, что в норме в ответ на стимуляцию Т-клеточного рецептора Tnaïve и Tsm отвечают существенно сильнее, чем Tem и Temra [93, 94]. Это может объяснять результаты данного исследования, которые показали достоверное увеличение среди  $CD4^+$  и  $CD8^+$  клеток памяти доли Tsm62L<sup>+</sup> лимфоцитов на стимуляцию ФГА. А также выявили повышение количества  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Tnaïve 62L<sup>-</sup> клеток в ФГА-стимулированной культуре по сравнению с нестимулированной культурой. Поскольку данные изменения выявлялись как у пациентов, так и у доноров, то это говорит о сохранности пролиферативного потенциала центральных Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов при БА. Интересно, что при стимулировании ФГА происходило снижение относительного количества  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Tem в обеих группах, что может быть связано с более низкой отвечаемостью Tem на воздействие антигена [93, 94]. С другой стороны, в нестимулированной культуре Tem клетки являются преобладающими, а количество Tsm существенно снижено, по-видимому, за счет

перераспределения. Тогда как в периферической крови наблюдается обратная картина – преобладают T<sub>cm</sub> клетки [15]. Это свидетельствует о том, что эффекторные клетки лучше способны к самоподдержанию в отсутствии каких-либо стимулов, независимо от наличия БА.

Известно, что снижение пролиферативной активности и количества наивных CD8<sup>+</sup> клеток у здоровых лиц сопутствует старению [273]. В другом исследовании депривация IL-2 приводила к повышенному апоптозу CD4<sup>+</sup> наивных Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти с возрастом посредством сниженной экспрессии Bcl-2 и повышенной внутриклеточной продукции свободных форм кислорода. Однако при добавлении ФГА в культуру, эти изменения не обнаруживались. Что свидетельствовало о наличии функциональных изменений наивных Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти, которые накапливаются с возрастом [274]. Имея в виду данные предыдущих и настоящего исследований, можно сказать, что при БА поликлональная стимуляция ФГА защищает клетки памяти от апоптоза и снижения пролиферации, связанных со старением. Потому что было показано, что пролиферативная активность наивных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и клеток памяти у пациентов с БА находится на уровне нормы. Как и ожидалось в связи с данными J. Geginat и соавт., наиболее эффективно делились CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> T<sub>cm</sub> и T<sub>naïve</sub> клетки.

Обращает на себя внимание, что среди всех субпопуляций CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток лучшим образом после воздействия ФГА пролиферируют CD62L<sup>+</sup> формы клеток. Известно, что CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> и CD62L<sup>+</sup> клетки по экспрессии транскрипционных факторов и синтезируемым цитокинам функционально поляризованы в сторону Th1- и Th2-лимфоцитов соответственно [275, 276]. Учитывая, что CD62L<sup>+</sup> клетки лучше отвечают на стимуляцию ФГА, то последняя должна была бы сопровождаться повышенным синтезом маркерных цитокинов Th2-лимфоцитов. Действительно, есть данные, которые показали, что у пациентов с БА стимуляция лимфоцитов периферической крови ФГА *in vitro* приводит к повышению секреции IL-4, IL-5, IL-13 и сопровождается слабой тенденцией к снижению секреции IFN-γ [277, 278]. Для лимфоцитов, полученных при

проведении бронхо-альвеолярного лаважа у пациентов с БА, также показана способность к повышенной секреции IL-5, которая коррелирует со снижением ОФВ1 и повышенным количеством эозинофилов в бронхиальном секрете [279]. Таким образом, обнаруженные особенности пролиферации на ФГА, со стороны Т-хелперов могут объясняться функциональной поляризацией CD62L<sup>+</sup> клеток в сторону Th2- лимфоцитов.

В свою очередь, CD8<sup>+</sup>Т-лимфоциты под воздействием Th2- условий могут быть поляризованы в сторону цитотоксических клеток 2 типа (Tc2), в том числе при atopическом дерматите и БА. При этом активация CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в Th2-условиях способствует поддержанию экспрессии CCR7, но снижает экспрессию маркера CD62L<sup>+</sup> [280, 281]. Поскольку в нашем исследовании проводилось совместное культивирование цитотоксических Т-лимфоцитов и хелперов, то воздействием цитокинов Th2-типа может частично объясняться преимущественное поддержание CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> субпопуляций (Tnaïve и Tcm) при стимулировании ФГА, как у доноров, так и у пациентов с БА. Вместе с тем, в данном исследовании отсутствовало повышение количества CD62L<sup>+</sup> клеток в большинстве субпопуляций CD8<sup>+</sup> клеток. Это может говорить о том, что клетки успешно подверглись бласттрансформации и охотно вступают в деление. Так как было показано, что экспрессия L-селектина способна повышаться при активном делении клеток [281].

Поскольку показано, что при старении происходит накопление CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти [282], то были изучены ассоциации возраста и содержания клеток памяти. Результаты показали, что количество CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> клеток памяти периферической крови и ФГА-стимулированной культуры у пациентов с БА и здоровых доноров не коррелирует с возрастом. Однако в нестимулированной культуре у пациентов с БА было обнаружено увеличение количества CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> клеток с возрастом. По-видимому, в отсутствии влияния стимулирующих агентов у пациентов с БА, происходит накопление CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти, которое увеличивается с возрастом и исчезает при стимулировании ФГА. Действительно, как указывалось

выше, в норме при депривации IL-2 апоптоз Т-клеток памяти значительно возрастает, но стимуляция ФГА отменяет этот эффект [274]. Собственно накопление клеток памяти в нестимулированной культуре может объясняться их повышенной резистентностью к апоптозу при БА [12, 98]. А ассоциация этого увеличения с возрастом связана с тем, что стареющие клетки демонстрируют резистентность к апоптозу [283]. В сумме, эти данные могут быть признаком более раннего старения Т-лимфоцитарного звена иммунитета у пациентов, чем у доноров.

При анализе связи субпопуляционного состава клеток памяти периферической крови и возраста, у здоровых доноров отмечалось наличие отрицательной корреляции  $CD4^{+}Tem62L^{+}$  клеток и возраста. Тогда как у пациентов с БА содержание  $CD4^{+}Tem62L^{+}$  клеток отрицательно коррелировало не с возрастом, а с длительностью заболевания. Что соотносится с полученными данными о повышении содержания  $CD4^{+}Tem62L^{+}$  клеток в дебюте заболевания. Отсутствие корреляции между количеством  $CD8^{+} Tem62L^{+}$  клеток периферической крови и возрастом может объясняться тем, что накопление  $CD4^{+}$  клеток памяти происходит быстрее, чем  $CD8^{+}$  [284].

Поскольку при экзогенной БА количество  $CD4^{+}$  клеток памяти повышается, а длина теломер на отдельных хромосомах укорачивается, то встает вопрос о взаимосвязи этих процессов. Проведенный корреляционный анализ показал, что по мере укорочения теломер содержание  $CD4^{+}CD45R0^{+}$  клеток памяти у пациентов с БА увеличивалось. Эта зависимость была обнаружена для теломерных последовательностей на р-плече 5 хромосомы и q-плечах 12 и 20 хромосом, которые укорачиваются при длительном течении БА. Учитывая также, что при БА происходило повышение количества  $CD4^{+}$  клеток памяти с возрастом в нестимулированных культурах, все вместе эти данные согласуются с гипотезой преждевременного старения клеток при иммунопатологических заболеваниях [24, 223]. Механизмы такой взаимосвязи при укорочении длины теломер данных хромосом могут также заключаться в повышении экспрессии генов, которые в них локализованы и отвечают за активированное состояние клеток памяти [231].

У здоровых доноров также было установлено наличие отрицательных корреляций между содержанием  $CD4^+CD45R0^+$  клеток памяти и длиной теломер на р-плечах 5 и 6 хромосом и q-плечах 9 и 19 хромосом. Хотя данные теломеры и не являются самыми короткими в теломерном профиле, эти отношения длины теломер и клеток памяти могут отражать естественные процессы старения иммунной системы. Что, возможно объясняется эпигенетическими механизмами. Так как в норме теломерный гетерохроматин находится в «cis-acting» состоянии, которое может изменяться ещё задолго до репликативного старения клетки и оказывать широкое влияние на экспрессию генов [230, 285].



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Протокол методики Q-FISH был модифицирован для определения длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом у пациентов с иммунопатологией. Модифицированный протокол Q-FISH дает возможность получать высококачественные изображения хромосом с DAPI-дифференциальным окрашиванием для более точной и надежной идентификации хромосом при условии проведения количественной оценки теломерных повторов в реакции гибридизации *in situ*.

Также была разработана и опробована программа «MeTeLen» для измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с теломер. Результаты валидизационных экспериментов показали, что в программе были подобраны оптимальные параметры для процедуры выравнивания флуоресцентного сигнала с теломер и способы вычитания фонового сигнала. Благодаря этому модифицированный метод Q-FISH и программное обеспечение и «MeTeLen» могут быть рекомендованы для изучения механизмов и процессов развития иммунопатологии, поскольку МНК ПК содержат фракцию иммунокомпетентных клеток, участвующих в развитии этих патологий. Кроме того, МНК ПК имеют общих предшественников с гемопоэтическими клетками и клетками иммунной системы, что может помочь в понимании вклада индивидуальной длины теломер и их укорочения в патогенез иммуноассоциированных заболеваний.

С использованием модифицированной методики Q-FISH и созданного программного обеспечения впервые была проведена оценка длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом при БА. Было показано, что длина теломер ряда индивидуальных хромосом Т-лимфоцитов укорочена в сравнении с донорами при экзогенной форме БА, как у пациентов в дебюте, так и у пациентов с длительным стажем заболевания. Эти результаты соотносятся с предыдущими исследованиями, показавшими укорочение длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом при АД и РА. Кроме того, при БА было выявлено укорочение длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом с

возрастом, тогда как у здоровых лиц такой зависимости не наблюдалось. Полученные данные отражают процесс ускоренного репликативного старения клеток иммунной системы при иммуноассоциированных заболеваниях в целом, и участие укороченных теломер отдельных хромосом в патогенезе экзогенной БА, в частности.

Также было установлено, что распределение количества TTAGGG – повторов на плечах отдельных хромосом теломерного профиля неравномерно, но имеет как сходство, так и отличия между группой доноров и группой пациентов с БА. Обнаруженные различия теломерных профилей здоровых доноров и пациентов, касающиеся повышенной вариабельности размера теломер у пациентов с БА и укорочения определенных последовательностей теломерного профиля, говорят о нарушении различных механизмов поддержания длины теломер при БА. С другой стороны, особенности распределения повторов теломерного профиля обеих групп соответствуют литературным данным, что свидетельствует о наличии общих черт теломерного профиля человека и его наследуемом характере.

При анализе клеток памяти было установлено, происходит изменение их содержания в периферической крови при БА: экзогенная форма БА сопровождается повышением количества  $CD4^+$  клеток памяти, а дебют БА сопровождается повышением количества  $CD8^+$  клеток памяти. Изменения также затрагивали субпопуляционный состав – повышение количества  $CD4^+Tem62L^+$  клеток памяти происходило как в дебюте, так и при экзогенной форме БА, а повышение количества  $CD8^+Tem62L^+$  клеток памяти сопровождало только экзогенную БА. Обнаруженные изменения содержания  $CD4^+$  клеток памяти коррелируют с длиной теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом, которые были укорочены у пациентов с БА. Это говорит о том, что при БА повышенное содержание клеток памяти может являться показателем ускоренного старения иммунной системы, ассоциированного с длиной теломер. А также свидетельствует о наличии единого патогенетического механизма БА, который

связывает укороченную длину теломер с повышенным содержанием CD4<sup>+</sup> клеток памяти.

Пролиферативный потенциал Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в ответ на поликлональную стимуляцию ФГА при БА был сохранен. При этом наиболее активно пролиферировали T<sub>cm</sub> и T<sub>naive</sub>, а также CD62L<sup>+</sup> клетки во всех субпопуляциях, что согласуется с литературными данными.

Проведенный корреляционный анализ всех изученных показателей с возрастом свидетельствовал о том, что при БА происходит более раннее старение клеток иммунной системы, которое имеет отношение к патогенезу заболевания. Так как было показано, что у пациентов с БА, в отличие от здоровых доноров, с возрастом снижается длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом и происходит увеличение количества CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток памяти в условиях нестимулированной культуры.

## ВЫВОДЫ

1. Разработка корректных подходов для оценки количества теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом на основе применения программного обеспечения «MeTeLen» и модифицированного протокола методики Q-FISH позволяет выявить различия теломерных профилей пациентов с бронхиальной астмой и здоровых доноров.
2. У пациентов с экзогенной формой бронхиальной астмы происходит укорочение теломер ряда хромосом (1p, 4q, 5q, 6p, 9p, 9q, 11q, 12q, 13q, 14q, 15q, 20q), тогда как у пациентов с эндогенной формой заболевания длина теломер не изменена, что свидетельствует о нарушении поддержания длины теломер при аллергической бронхиальной астме.
3. У пациентов с дебютом экзогенной бронхиальной астмы укорачиваются теломеры на обоих плечах девятой хромосомы, а у пациентов с длительным течением укорочение затрагивает теломерные районы на 19-ти плечах индивидуальных хромосом, включая девятую хромосому, что свидетельствует о накоплении укороченных теломерных районов при бронхиальной астме по мере увеличения длительности заболевания.
4. Содержание  $CD4^+$  клеток памяти и субпопуляций  $CD4^{+62}L^{+}$  и  $CD8^{+62}L^{+}$  эффекторных Т-клеток памяти периферической крови повышено у пациентов с экзогенной формой бронхиальной астмы, тогда как у пациентов с эндогенной формой заболевания данные показатели не изменены, что свидетельствует о различном характере функционирования иммунной системы при экзогенной и эндогенной формах бронхиальной астмы.
5. Пролиферативная активность и содержание субпопуляций  $CD4^+$  и  $CD8^+$  клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в культурах ФГА-стимулированных мононуклеаров периферической крови не отличаются между группами здоровых доноров и пациентов с бронхиальной астмой, что свидетельствует о сохранности пролиферативного потенциала субпопуляций Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов при бронхиальной астме.

6. Выявленные при бронхиальной астме особенности в изменении длины теломер индивидуальных хромосом и субпопуляционном составе Т-клеток памяти периферической крови отражают иммунопатогенетические различия между экзогенной и эндогенной формами бронхиальной астмы.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АД – атопический дерматит

АПК – антиген-представляющая клетка

БА – бронхиальная астма

ГКС – глюкокортикостероиды

ГП – гомеостатическая пролиферация

ЗФР – забуференный физиологический раствор

МНК – моноклеарные клетки

ПК – периферическая кровь

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РА – ревматоидный артрит

тыс.п.н. – тысяча пар нуклеотидов

ФВД – функция внешнего дыхания

ФГА – фитогемагглютинин

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ALT – альтернативное удлинение теломер (alternative telomere lenthening)

BSA – бычий сывороточный альбумин (bovine serum albumin)

CD – кластер дифференцировки (cluster of differentiation)

DAPI - 4',6-диамидино-2-фенилиндол (4',6-diamidino-2-phenylindole)

DMSO – диметилсульфоксид (dimethyl sulfoxide)

FBS – фетальная бычья сыворотка (fetal bovine serum)

FITC – флуоресцеин изотиоцианат (fluorescein isothiocyanate)

FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ* (fluorescent *in situ* hybridization)

FL – канал флуоресценции (flow line)

FSC – параметр прямого светорассеяния (forward angle light scatter)

hTERT – каталитическая субъединица теломеразы человека (human telomerase reverse transcriptase)

IFN – интерферон (interferon)

IgE – иммуноглобулин E (immunoglobulin E)

IL – интерлейкин (interleukin)

ILC – клетки врожденной иммунной системы (innate lymphoid cells)

MPC – лимфоциты, подобные Т-клеткам памяти (memory-like phenotype cells).

NK – натуральные киллеры (natural killers)

PNA – пептидо-нуклеиновая кислота (peptide nucleic acid)

RT-PCR – полимеразная цепная реакция в реальном времени (real time polymerase chain reaction)

SNP – однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism)

SSC – параметр бокового светорассеяния (side angle light scatter)

Tem – эффекторные Т-клетки памяти (effector memory T-cells)

Temra – CD45RA-позитивные эффекторные клетки памяти (CD45RA-positive effector memory cells)

TERRA – теломерные РНК-повторы (telomeric repeat-containing RNA)

Tcm – центральные Т-клетки памяти (central memory T-cells)

TCR – Т-клеточный рецептор (T-cell receptor)

TNF – фактор некроза опухолей (tumor necrosis factor)

Tnaive – наивные Т-лимфоциты (naive T-cells)

TPE – позиционный эффект теломер (telomere position effect)

TPE-OLD – позиционный эффект теломер на расстоянии (telomere position effect over long distances)

Treg – регуляторные Т-клетки (regulatory T-cells)

TSLP - тимический стромальный лимфопоэтин

Th – Т-хелперы (T-helpers)

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. GINA Pocket Guide for health professionals// Gina [Электронный ресурс]. URL: <https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2016/05/WMS-GINA-2016-main-Pocket-Guide.pdf>.
2. Baena-Cagnani, C. E. Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: Document presented for the World Health Organization Consultation on severe asthma / C. E. Baena-Cagnani, M. Chan-Yeung, B. Chowdhury, S. T. Holgate, C. E. Brightling, T. Haahtela, N. Khaltaev, S. Wenzel, P. Burney, K. F. Rabe, R. Dahl, J. M. Drazen, J. P. Kiley, W. W. Busse, A. Togias, M. R. Masjedi, N. Aït-Khaled, C. Weel van, M. R. Partridge, A. Bush, R. Chen, J. Bousquet, A. A. Cruz, E. R. Bleeker, T. B. Casale, E. Mantzouranis, K. F. Chung, T. Zuberbier, L. M. Fabbri, N. Zhong, P. O'Byrne, F. Kauffmann, Y Mohammad // Journal of Allergy and Clinical Immunology – 2010. – Vol. 126 – № 5 – P. 926–938.
3. Sears, M. R. Trends in the prevalence of asthma / M. R. Sears // Chest – 2014. – Vol. 145 – № 2 – P. 219–225.
4. Lundbäck, B. Is asthma prevalence still increasing? / B. Lundbäck, H. Backman, J. Lötval, E. Rönmark // Expert Review of Respiratory Medicine – 2016. – Vol. 10 – № 1 – P. 39–51.
5. Robinson, D. S. Activated memory T helper cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with atopic asthma: relation to asthma symptoms, lung function, and bronchial responsiveness. / D. S. Robinson, A. M. Bentley, A. Hartnell, A. B. Kay, S. R. Durham // Thorax – 1993. – Vol. 48 – № 1 – P. 26–32.
6. Hamid, Q. Th17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma / Q. Hamid, W. Al-Ramli, F. Chouiali, R. Olivenstein, C. Lemièr, J. G. Martin, D. Préfontaine // Journal of Allergy and Clinical Immunology – 2009. – Vol. 123 – № 5 – P. 1185–1187.
7. Wisniewski, J. A. Th1 signatures are present in the lower airways of children with severe asthma, regardless of allergic status / J. A. Wisniewski, L. M. Muehling, J. D.



Eccles, B. J. Capaldo, R. Agrawal, D. A. Shirley, J. T. Patrie, L. J. Workman, A. J. Schuyler, M. G. Lawrence, W. G. Teague, J. A. Woodfolk // *Journal of Allergy and Clinical Immunology* – 2018. – Vol. 141 – № 6 – P. 2048–2060.e13.

8. Miranda, C. Distinguishing severe asthma phenotypes: Role of age at onset and eosinophilic inflammation / C. Miranda, A. Busacker, S. Balzar, J. Trudeau, S. E. Wenzel // *Journal of Allergy and Clinical Immunology* – 2004. – Vol. 113 – № 1 – P. 101–108.

9. Amelink, M. Three phenotypes of adult-onset asthma / M. Amelink, S. B. Nijs de, J. C. Groot de, P. M. B. van Tilburg, P. I. van Spiegel, F. H. Krouwels, R. Lutter, A. H. Zwinderman, E. J. M. Weersink, A. ten Brinke, P. J. Sterk, E .H. Bel // *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* – 2013. – Vol. 68 – № 5 – P. 674–680.

10. Sallusto, F. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions / F. Sallusto, D. Lenig, R. Förster, M. Lipp, A. Lanzavecchia // *Nature* – 1999. – Vol. 401 – № 6754 – P. 708–712.

11. Sprent, J. Normal T cell homeostasis: the conversion of naïve cells into memory-phenotype cells / J. Sprent, C. D Surh. // *Nature immunology* – 2011. – Vol. 12 – № 6 – P. 478–484.

12. Todo-Bom, A. Aging and asthma - changes in CD45RA, CD29 and CD95 T cells subsets / A. Todo-Bom, A. Mota-Pinto, V. Alves, M. Santos-Rosa // *Allergologia et Immunopathologia* – 2012. – Vol. 40 – № 1 – P. 14–19.

13. Maldonado, A. Decreased effector memory CD45RA + CD62L – CD8 + T cells and increased central memory CD45RA – CD62L + CD8 + T cells in peripheral blood of rheumatoid arthritis patients / A. Maldonado, Y. M. Mueller, P. Thomas, P. Bojczuk, C. O. Connors, P. D. Katsikis // *Arthritis Research and Therapy* – 2003. – Vol. 5 – № 2 – P. 91–96.

14. Hondowicz, B. D. Interleukin-2-dependent allergen-specific tissue-resident memory cells drive asthma / B. D. Hondowicz, D. An, J. M. Schenkel, K. S. Kim, H. R. Steach, A. T. Krishnamurty, G. J. Keitany, E. N. Garza, K. A. Fraser, J. J. Moon,

W. A. Altemeier, D. Masopust, M. Pepper // *Immunity* – 2016. – Vol. 44 – № 1 – P.155–166.

15. Chen, Z. Effect of memory CD4<sup>+</sup> T cells' signal transducer and activator of transcription (STATs) functional shift on cytokine-releasing properties in asthma / Z. Chen, J. Pan, Y. Jia, D. Li, Z. Min, X. Su, H. Yuan, G. Shen, S. Cao, L. Zhu, X. Wang // *Cell Biology and Toxicology* – 2017. – Vol. 33 – № 1 – P. 27–39.

16. Weng, N. P. Human naive and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential. / N. P. Weng, B. L. Levine, C. H. June, R. J. Hodes // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 1995. – Vol. 92 – № 24 – P. 11091–11094.

17. Rufer, N. Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood / N. Rufer, T. H. Brümmendorf, S. Kolvraa, C. Bischoff, K. Christensen, L. Wadsworth, M. Schulzer, P. M. Lansdorp // *The Journal of experimental medicine* – 1999. – Vol. 190 – № 2 – P. 157-167.

18. Hayflick, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains / L. Hayflick // *Experimental Cell Research* – 1965. – Vol. 37 – № 3 – P. 614–636.

19. Moyzis, R. K. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. / R. K. Moyzis, J. M. Buckingham, L. S. Cram, M. Dani, L. L. Deaven, M. D. Jones, J. Meyne, R. L. Ratliff, J. R. Wu // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 1988. – Vol. 85 – № 18 – P. 6622–6626.

20. Aubert, G. Telomeres and aging / G. Aubert, P. M. Lansdorp // *Physiological Reviews* – 2008. – Vol. 88 – № 2 – P. 557–579.

21. Schonland, S. O. Premature telomeric loss in rheumatoid arthritis is genetically determined and involves both myeloid and lymphoid cell lineages / S. O. Schonland, C. Lopez, T. Widmann, J. Zimmer, E. Bryl, J. J. Goronzy, C. M. Weyand // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2003. – Vol. 100 – № 23 – P. 13471–13476.

22. Борисов, В. И. Сокращение теломерных районов ДНК в субпопуляциях CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов при заболеваниях атопической природы / В. И. Борисов, С. А. Демаков, В. М. Непомнящих, М. И. Леонова, Н. А. Баровская, В. С. Кожевников // Омский научный вестник – 2007. – Т. 3 – № 61 – С. 172–174.
23. Борисов, В. И. Особенности изменения средней длины теломер в лимфоцитах у больных бронхиальной астмой / В. И. Борисов, С. А. Демаков, В. М. Непомнящих, М. И. Леонова, Д. В. Демина, Н. А. Баровская, В. С. Кожевников // Медицинская Иммунология – 2009. – Т. 11 – № 6 – С. 523–530.
24. Kyoh, S. Are leukocytes in asthmatic patients aging faster? A study of telomere length and disease severity / S. Kyoh, N. Venkatesan, A. H. Poon, M. Nishioka, T. Y. Lin, C. J. Baglole, D. H. Eidelman, Q. Hamid // Journal of Allergy and Clinical Immunology – 2013. – Vol. 132 – № 2 – P. 64–68.
25. Belsky, D. W. Is chronic asthma associated with shorter leukocyte telomere length at midlife? / D. W. Belsky, I. Shalev, M. R. Sears, R. J. Hancox, H. L. Harrington, R. Houts, T. E. Moffitt, K. Sugden, B. Williams, R. Poulton, A. Caspi // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine – 2014. – Vol. 190 – № 4 – P. 384–391.
26. Lansdorp P. M. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes / P. M. Lansdorp, N. P. Verwoerd, F. M. van de Rijke, V. Dragowska, M. T. Little, R. W. Dirks, A. K. Raap, H. J. Tanke // Human Molecular Genetics – 1996. – Vol. 5 – № 5 – P. 685–691.
27. Graakjaer, J. Allele-specific relative telomere lengths are inherited / J. Graakjaer, H. Der-Sarkissian, A. Schmitz, J. Bayer, G. Thomas, S. Kolvraa, J.-A. Londoño-Vallejo // Human Genetics – 2006. – Vol. 119 – № 3 – P.344–350.
28. Zheng, Y. L. Telomere deficiencies on chromosomes 9p, 15p, 15q and Xp: Potential biomarkers for breast cancer risk / Y. L. Zheng, X. Zhou, C. A. Loffredo, P. G. Shields, B. Sun // Human Molecular Genetics – 2011. – Vol. 20 – № 2 – P. 378–386.
29. Xing, J. Constitutive short telomere length of chromosome 17p and 12q but not 11q and 2p are associated with an increased risk for esophageal cancer. / J. Xing, J. A.

- Ajani, M. Chen, J. Izzo, J. Lin, Z. Chen, J. Gu, X. Wuet // *Cancer Prevention Research* – 2009. – Vol. 2 – № 5 – P. 459–465.
30. Blinova, E. A. Telomere length of individual chromosomes in patients with rheumatoid arthritis / E. A. Blinova, E. V. Zinnatova, M. S. Barkovskaya, V. I. Borisov, A. E. Sizikov, V. S. Kozhevnikov, N. B. Rubtsov, V. A. Kozlov // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* – 2016. – Vol. 160 – № 6 – P.779–782.
31. Poon, S. S. S. Quantitative Fluorescence In Situ Hybridization (Q-FISH) / S. S. S. Poon, P. M. Lansdorp // *Current Protocols in Cell Biology* – 2001. – Vol. 12 – № 1 – P. 18.4.1-18.4.21.
32. Price, D. Asthma control and management in 8,000 European patients: the REcognise Asthma and Link to Symptoms and Experience (REALISE) survey / D. Price, M. Fletcher, T. van der Molen // *Primary Care Respiratory Medicine* – 2014. – Vol. 24 – № 1 – P. 4009.
33. Архипов, В. В. Контроль над бронхиальной астмой в России: результаты многоцентрового наблюдательного исследования НИКА / В. В. Архипов, Е. В. Григорьева, Е. В. Гавришина // *Пульмонология* – 2011. – № 6 – С. 87–93.
34. Asher, M. I. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys / M. I. Asher, S. Montefort, B Björkstén., C. K. Lai, D. P. Strachan, S. K. Weiland, H. Williams // *The Lancet* – 2006. – Vol. 368 – № 9537 – P. 733–743.
35. Backman, H. Increased prevalence of allergic asthma from 1996 to 2006 and further to 2016—results from three population surveys / H. Backman, P. Räsänen, L. Hedman, C. Stridsman, M. Andersson, A. Lindberg, B. Lundbäck, E. Rönmark // *Clinical and Experimental Allergy* – 2017. – Vol. 47 – № 11 – P. 1426–1435.
36. Anandan, C. Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies / C. Anandan, U. Nurmatov, O. C. P. van Schayck, A. Sheikh // *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* – 2010. – Vol. 65 – № 2 – P. 152–167.

37. Овсянников, Н. В. Анализ показателей заболеваемости и распространенности бронхиальной астмы среди населения Омской области / Н. В. Овсянников, В. А. Ляпин, Н. С. Антонов, С. Н. Авдеев, Н. В. Багишева // Пульмонология – 2012. – № 1 – С. 78–81.
38. Манжилеева, Т. В. Популяционное изучение распространенности бронхиальной астмы в г.Новосибирске / Т. В. Манжилеева, Л. Н. Можина, Л. М. Куделя, Л. Д. Сидорова, Е. Г. Тихомирова // Сибирский научный медицинский журнал – 2016. – Т. 36 – № 5 – С. 83–87.
39. Wenzel, S. E. Asthma phenotypes: The evolution from clinical to molecular approaches / S. E. Wenzel // Nature Medicine – 2012. – Vol. 18 – № 5 – P. 716–725.
40. Фассахов, Р. С. Современная фармакотерапия бронхиальной астмы: приоритеты в достижении контроля вне зависимости от степени тяжести / Р. С. Фассахов // Русский медицинский журнал – 2017. – № 3 – С. 221–226.
41. Robinson, D. Revisiting Type 2-high and Type 2-low airway inflammation in asthma: current knowledge and therapeutic implications / D. Robinson, M. Humbert, R. Buhl, A. A. Cruz, H. Inoue, S. Korom, N. A. Hanania, P. Nair // Clinical and Experimental Allergy – 2017. – Vol. 47 – № 2 – P. 161–175.
42. Fajt, M. L. Asthma phenotypes and the use of biologic medications in asthma and allergic disease: The next steps toward personalized care / M. L. Fajt, S. E. Wenzel // Journal of Allergy and Clinical Immunology – 2015. – Vol. 135 – № 2 – P. 299–310.
43. Hekking, P. P. W. Developing and emerging clinical asthma phenotypes / P. P. W. Hekking, E. H. Bel // Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice – 2014. – Vol. 2 – № 6 – P. 671–680.
44. Parsons, J. P. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline: Exercise-induced bronchoconstriction / J. P. Parsons, T. S. Hallstrand, J. G. Mastronarde, D. A. Kaminsky, K. W. Rundell, J. H. Hull., W. W. Storms, J. M. Weiler, F. M. Cheek, K. C. Wilson, S. D. Anderson // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine – 2013. – Vol. 187 – № 9 – P. 1016–1027.
45. Palakshappa, D. Food insecurity is associated with an increased prevalence of comorbid medical conditions in obese adults: NHANES 2007–2014 / D. Palakshappa,

J. L. Speiser, G. E. Rosenthal, M. Z. Vitolins // *Journal of General Internal Medicine* – 2019. – Vol. 34 – № 8 – P. 1486–1493.

46. Katz, L. E. Blood eosinophil count is a useful biomarker to identify patients with severe eosinophilic asthma / L. E. Katz, G. J. Gleich, B. F. Hartley, S. W. Yancey, H. G. Ortega // *Annals of the American Thoracic Society* – 2014. – Vol. 11 – № 4 – P. 531–536.

47. Fuhlbrigge, A. Asthma outcomes : Exacerbations / A. Fuhlbrigge, D. Peden, A. J. Apter, H. A. Boushey, C. A. Camargo, J. Gern, P. W. Heymann, F. D. Martinez, D. Mauger, W. G. Teague, C. Blaisdell, M. Boston, C. Hill, S. Francisco // *Journal of Allergy and Clinical Immunology* – 2011. – Vol. 129 – № 3 – P. S34–S48.

48. Куделя, Л. М. Влияние дебюта бронхиальной астмы на клинико-функциональные особенности её течения / Л. М. Куделя, Л. Д. Сидорова, Л. Н. Можина, Е. Г. Тихомирова, Т. В. Манжилеева // *Бюллетень СО РАМН* – 2014. – Т. 34 – № 6 – С.82–87.

49. Ferreira, M. A. R. Genetic architectures of childhood- and adult-onset asthma are partly distinct / M. A. R. Ferreira, R. Mathur, J. M. Vonk, A. Szvajda, B. Brumpton, R. Granell, B. K. Brew, V. Ullema, Y. Lu, Y. Jiang, P. K. E. Magnusson, R. Karlsson, D. A. Hinds, L. Paternoster, G. H. Koppelman, C. Almqvist // *The American Journal of Human Genetics* – 2019. – Vol. 104 – № 4 – P. 665–684.

50. Amelink, M. Severe adult-onset asthma: A distinct phenotype / M Amelink., J. C. Groot de, S. B. Nijs de, R. Lutter, A. H. Zwinderman, P. J. Sterk, A. Brinke ten, E. H. Bel // *Journal of Allergy and Clinical Immunology* – 2013. – Vol. 132 – № 2 – P. 336–341.

51. Alonso, A. M. Severe therapy resistant asthma in children: translational approaches to uncover sub-phenotypes / A. M. Alonso, V. Fainardi, S. Saglani // *Expert Review of Respiratory Medicine* – 2017. – Vol. 11 – № 11 – P. 867–874.

52. Chiappori, A. Biomarkers and severe asthma : a critical appraisal / A. Chiappori, L. Ferrari de, C. Folli, P. Mauri, A. M. Riccio, G. W. Canonica // *Clinical and Molecular Allergy* – 2015. – Vol. 13 – № 1 – P. 20.

53. Lee, Y. Serum levels of eosinophil-derived neurotoxin: a biomarker for asthma severity in adult asthmatics / Y. Lee, J. H. Lee, E. M. Yang, E. Kwon, C. G. Jung, S. C. Kim, Y Choi., Y. S. Cho, C. K. Kim, H. S. Park // *Allergy, Asthma and Immunology Research* – 2019. – Vol. 11 – № 3 – P. 394–405.
54. Oliphant, C. J. Insights into the initiation of type 2 immune responses / C. J. Oliphant, J. L. Barlow, A. N. J. McKenzie // *Immunology* – 2011. – Vol. 134 – № 4 – P. 378–385.
55. Papi, A. Asthma / A. Papi, C. Brightling, S. E. Pedersen, H. K. Reddel // *Medical Radiology* – 2018. – Vol. 391 – № 24 – P. 783–800.
56. Takatsu, K. Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases / K. Takatsu // *Proceedings of the Japan Academy, Series B* – 2011. – Vol. 87 – № 8 – P. 463–485.
57. Rael, E. L. Interleukin-13 signaling and its role in asthma / Rael E. L., Lockett R. F. // *World Allergy Organization Journal* – 2011. – Vol. 4 – № 3 – P. 54–64.
58. Oh, C. K. Biology of the interleukin-9 pathway and its therapeutic potential for the treatment of asthma / C. K. Oh, D. Raible, G. P. Geba, N. A. Molino // *Inflammation and Allergy - Drug Targets* – 2011. – Vol. 10 – № 3 – P. 180–186.
59. Benevides, L. B lymphocyte-induced maturation protein 1 controls Th 9 cell development, IL-9 production, and allergic inflammation / L. Benevides, R. S. Costa, L. A. Tavares, M. Russo, G. A. Martins, L. L. P. da Silva, L. K. Arruda, F. Q. Cunha, V. Carregaro, J. S. Silva // *Journal of Allergy and Clinical Immunology* – 2019. – Vol. 143 – № 3 – P. 1119–1130.e3.
60. Rijt, L. Type 2 innate lymphoid cells: at the cross-roads in allergic asthma / L. Rijt, H. Richthofen, R. Ree // *Seminars in Immunopathology* – 2016. – Vol. 38 – № 4 – P. 483–496.
61. Artis, D. The biology of innate lymphoid cells / D. Artis, H. Spits // *Nature* – 2015. – Vol. 517 – № 7534 – P. 293–301.
62. Matsumoto, K. Different profiles of IL-10+IFN- $\gamma$ -IL-4-CD4+ T cells in the peripheral blood in atopic and non-atopic asthmatics / K. Matsumoto, H. Inoue, M. Tsuda, T. Nakano, M. Komori, S. Fukuyama, Y. Nakanishi // *Respiration* – 2008. – Vol. 75 – № 3 – P. 281–287.

63. Palomares, O. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases / O. Palomares, G. Yaman, A. K. Azkur, T. Akkoc, M. Akdis, C. A. Akdis // *European Journal of Immunology* – 2010. – Vol. 40 – № 5 – P. 1232–1240.
64. Green, R. H. Analysis of induced sputum in adults with asthma: Identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids / R. H. Green // *Thorax* – 2002. – Vol. 57 – № 10 – P. 875–879.
65. Wang, M. Aberrant function of neutrophils in asthma / M. Wang, J. Zhao, J. Xie // *Inflammation and Cell Signaling* – 2018. – Vol. 4 – P. e1535.
66. Brusselle, G. G. Azithromycin for prevention of exacerbations in severe asthma (AZISAST): A multicentre randomised double-blind placebo-controlled trial / G. G. Brusselle, C. van der Stichele, P. Jordens, R. Deman, H. Slabbynck, V. Ringoet, G. Verleden, I. K. Demedts, K. Verhamme, A. Delporte, B. Demeyere, G. Claeys, J. Boelens, E. Padalko, J. Verschakelen, G. van Maele, E. Deschepper, G. F. P. Joos // *Thorax* – 2013. – Vol. 68 – № 4 – P. 322–329.
67. Johnston, S. L. Azithromycin for acute exacerbations of asthma: The AZALEA randomized clinical trial / S. L. Johnston, M. Szigeti, M. Cross, C. Brightling, R. Chaudhuri, T. Harrison, A. Mansur, L. Robison, Z. Sattar, D. Jackson, P. Mallia, E. Wong, C. Corrigan, B. Higgins, P. Ind, D. Singh, N. C. Thomson, D. Ashby, A. Chauhan // *JAMA Internal Medicine* – 2016. – Vol. 176 – № 11 – P. 1630–1637.
68. Tumes, D. J. Epigenetic regulation of T-helper cell differentiation, memory, and plasticity in allergic asthma / D. J. Tumes, M. Papadopoulos, Y. Endo, A. Onodera, K. Hirahara, T. Nakayama // *Immunological Reviews* – 2017. – Vol. 278 – № 1 – P. 8–19.
69. Cosmi, L. Identification of a novel subset of human circulating memory CD4<sup>+</sup> T cells that produce both IL-17A and IL-4 / L. Cosmi, L. Maggi, V. Santarlasci, M. Capone, E. Cardilicchia // *Journal of Allergy and Clinical Immunology* – 2010. – Vol. 125 – № 1 – P. 222–230.e4.
70. Irvin, C. Increased frequency of dual-positive Th2/Th17 cells in bronchoalveolar lavage fluid characterizes a population of patients with severe asthma / C. Irvin, I. Zafar, J. Good, D. Rollins, C. Christianson, M. M. Gorska, R. J. Martin, R. Alam //



Journal of Allergy and Clinical Immunology – 2014. – Vol. 134 – № 5 – P. 1175–1186.e7.

71. Boulet, L. Asthma-related comorbidities / L. Boulet, M.-È. Boulay // Expert Review of Respiratory Medicine – 2011. – Vol. 5 – № 3 – P. 377–393.

72. Fattahi, F. Smoking and nonsmoking asthma: differences in clinical outcome and pathogenesis / F. Fattahi, M. N. Hylkema, B. N. Melgert, W. Timens, D. S. Postma, N. H. ten Hacken // Expert Review of Respiratory Medicine – 2011. – Vol. 5 – № 1 – P. 93–105.

73. Frew, A. J. Atopic and non-atopic asthma / A. J. Frew // Current problems in dermatology – 1999. – Vol. 28 – P. 129–134.

74. Demenais, F. Multiancestry association study identifies new asthma risk loci that colocalize with immune-cell enhancer marks / F. Demenais, P. Margaritte-Jeannin, K. C. Barnes, D. L. Nicolae // Nature Genetics – 2018. – Vol. 50 – № 1 – P. 42–50.

75. Kohli, A. Secondhand smoke in combination with ambient air pollution exposure is associated with increased CpG methylation and decreased expression of IFN- $\gamma$  in T effector cells and Foxp3 in T regulatory cells in children / A. Kohli, M. A. Garcia, R. L. Miller, C. Maher, O. Humblet, S. Hammond, K. Nadeau // Clinical Epigenetics – 2012. – Vol. 4 – № 1 – P. 17.

76. Seumois, G. Epigenomic analysis of primary human T cells reveals enhancers associated with Th2 memory cell differentiation and asthma susceptibility / G. Seumois, L. Chavez, A. Gerasimova, M. Lienhard, N. Omran, L. Kalinke, M. Vedanayagam, A. P. V. Ganesan, A. Chawla, R. Djukanović, K. M. Ansel, B. Peters, A. Rao, P. Vijayanand // Nature Immunology – 2014. – Vol. 15 – № 8 – P. 777–788.

77. Kogan, V. Genetic-epigenetic interactions in asthma revealed by a genome-wide gene-centric search / V. Kogan, J. Millstein, S. J. London, C. Ober, S. R. White, E. T. Naureckas, W. J. Gauderman, D. J. Jackson, A. Barraza-Villarreal, I. Romieu, B. A. Raby, C. V. Breton // Human Heredity – 2019. – Vol. 83 – № 3 – P. 130–152.

78. Edris, A. Epigenome wide association studies in asthma: a systematic review / A. Edris, H. T. den Dekker, E. Melén, L. Lahousse // Clinical and Experimental Allergy – 2019. – Vol. 49 – № 9 – P. 953–968.

79. Baur, J. A. Telomere position effect in human cells / J. A. Baur, Y. Zou, J. W. Shay, W. E. Wright // *Science* – 2001. – Vol. 292 – № 5524 – P. 2075–2077.
80. Lou, Z. Telomere length regulates ISG15 expression in human cells / Z. Lou, J. Wei, H. Riethman, J. A. Baur, R. Voglauer, J. W. Shay, W. E. Wright // *Aging* – 2009. – Vol. 1 – № 7 – P. 608–621.
81. Endo, Y. Eomesodermin controls interleukin-5 production in memory T helper 2 cells through inhibition of activity of the transcription factor GATA3 / Y. Endo, C. Iwamura, M. Kuwahara, A. Suzuki, K. Sugaya, D. J. Tumes, K. Tokoyoda, H. Hosokawa, M. Yamashita, T. Nakayama // *Immunity* – 2011. – Vol. 35 – № 5 – P. 733–745.
82. Starr, T. K. Positive and negative selection of T cells / T. K. Starr, S. C. Jameson, K. A. Hogquist // *Annual Review of Immunology* – 2003. – Vol. 21 – № 1 – P. 139–176.
83. Krogsgaard M. A role for “self” in T-cell activation / M. Krogsgaard, J. Juang, M. M. /Davis / *Seminars in Immunology* – 2007. – Vol. 19 – № 4 – P. 236–244.
84. Boyman, O. Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells / O. Boyman, S. Létourneau, C. Krieg, J. Sprent // *European Journal of Immunology* – 2009. – Vol. 39 – № 8 – P. 2088–2094.
85. Cho, J. H. CD45-mediated control of TCR tuning in naïve and memory CD8<sup>+</sup> T cells / J. H. Cho, H. O. Kim, Y. J. Ju, Y. C. Kye, G. W. Lee, S. W. Lee, C. H. Yun, N. Bottini, K. Webster, C. C. Goodnow, C. D. Surh, C. King, J. Sprent // *Nature Communications* – 2016. – Vol. 7 – № 1 – P. 13373.
86. Sallusto, F. Central memory and effector memory T cell subsets : function, generation, and maintenance / F. Sallusto, J. Geginat, A. Lanzavecchia // *Annual Review of Immunology* – 2004. – Vol. 22 – № 1 – P. 745–763.
87. Masopust, D. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue / D. Masopust, V. Vezys, A. L. Marzo, L. Lefrançois // *Science* – 2001. – Vol. 291 – № 3 – P. 2413–2417.
88. Hamann, D. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8<sup>+</sup> T cells. / D. Hamann, P. a Baars, M. H. Rep, B. Hooibrink, S. R. Kerkhof-

Garde, M. R. Klein, R. a van Lier // The Journal of experimental medicine – 1997. – Vol. 186 – № 9 – P. 1407–1418.

89. Rufer, N. Ex vivo characterization of human CD8<sup>+</sup> T subsets with distinct replicative history and partial effector functions / N. Rufer, A. Zippelius, P. Batard, M. J. Pittet, I. Kurth, P. Corthesy, J. C. Cerottini, S. Leyvraz, E. Roosnek, M. Nabholz, P. Romero // Blood – 2003. – Vol. 102 – № 5 – P. 1779–1787.

90. Campbell, J. J. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells / J. J. Campbell, G. Haraldsen, J. Pan, J. Rottman, S. Qin, P. Ponath, D. P. Andrew, R. Warnke, N. Ruffing, N. Kassam, L. Wu, E. C. Butcher // Nature – 1999. – Vol. 400 – № 6746 – P. 776–780.

91. Read, K. A. IL-2, IL-7, and IL-15: Multistage regulators of CD4<sup>+</sup> T helper cell differentiation / K. A. Read, M. D. Powell, P. W. McDonald, K. J. Oestreich // Experimental Hematology – 2016. – Vol. 44 – № 9 – P. 799–808.

92. Link, A. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naïve T cells / A. Link, T. K. Vogt, S. Favre, M. R. Britschgi, H. Acha-orbea, B. Hinz, J. G. Cyster, S. A. Luther // Nature Immunology – 2007. – Vol. 8 – № 11 – P. 1255–1265.

93. Geginat, J. Proliferation and differentiation potential of human CD8<sup>+</sup> memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines / J. Geginat, A. Lanzavecchia, F. Sallusto // Blood – 2003. – Vol. 101 – № 11 – P. 4260–4266.

94. Geginat, J. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naïve, central memory and effector memory CD4<sup>+</sup>T cells / J. Geginat, F. Sallusto, A. Lanzavecchia // The Journal of experimental medicine – 2001. – Vol. 194 – № 12 – P. 1711–1719.

95. Messi, M. Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human Th1 and Th2 lymphocytes / M. Messi, I. Giacchetto, K. Nagata, A. Lanzavecchia, G. Natoli, F. Sallusto // Nature Immunology – 2003. – Vol. 4 – № 1 – P. 78–86.

96. King, C. Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity / C. King, A. Ilic, K. Koelsch, N. Sarvetnick // *Cell* – 2004. – Vol. 117 – № 2 – P. 265–277.
97. Kieper, W. C. A role for TCR affinity in regulating naive T cell homeostasis / W. C. Kieper, J. T. Burghardt, C. D. Surh // *The Journal of Immunology* – 2004. – Vol. 172 – № 1 – P. 40–44.
98. Abdulamir, A. S. Changing survival, memory cell compartment, and T-helper balance of lymphocytes between severe and mild asthma / A. S. Abdulamir, R. R. Hafidh, F. Abubakar, K. A. Abbas // *BMC Immunology* – 2008. – Vol. 9 – № 1 – P. 73.
99. Wiest, M. Clinical implications of CD4+ T cell subsets in adult atopic asthma patients / M. Wiest, K. Upchurch, W. Yin, J. Ellis, Y. Xue, B. Lanier, M. Millard, H. M. Joo, S. K. Oh // *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* – 2018. – Vol. 14 – № 1 – P. 7.
100. Burns, J.B. In vivo reduction of telomere length in human antigen-reactive memory T cells / J. B. Burns, S. T. Lobo, B. D. Bartholomew // *European Journal of Immunology* – 2000. – Vol. 30 – № 7 – P. 1894–1901.
101. Muller, H. J. The remaking of chromosomes / H. J. Muller // *The Collecting Net-Woods Hole* – 1938. – Vol. 13 – P. 181–198.
102. McClintock, B. The behavior in successive nuclear divisions of a chromosome broken at meiosis / B. McClintock // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 1939. – Vol. 25 – № 8 – P. 405–416.
103. Orr-Weaver, T. L. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. / T. L. Orr-Weaver, J. W. Szostak, R. J. Rothstein // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 1981. – Vol. 78 – № 10 – P. 6354–6358.
104. Arnoult, N. Complex interactions between the DNA-damage response and mammalian telomeres / N. J. Arnoult, Karlseder // *Nature Structural and Molecular Biology* – 2015. – Vol. 22 – № 11 – P. 859–866.

105. Fouladi, B. The relationship between spontaneous telomere loss and chromosome instability in a human tumor cell line / B. Fouladi, L. Sabatier, D. Miller, G. Pottier, J. P. Murnane // *Neoplasia* – 2000. – Vol. 2 – № 6 – P. 540–554.
106. Olovnikov, A. M. A theory of marginotomy: The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon / A. M. Olovnikov // *Journal of Theoretical Biology* – 1973. – Vol. 41 – № 1 – P. 181–190.
107. Lingner, J. Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? / J. Lingner, J. Cooper, T. Cech // *Science* – 1995. – Vol. 269 – № 5230 – P. 1533–1534.
108. Szostak, J. W. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors / J. W. Szostak, E. H. Blackburn // *Cell* – 1982. – Vol. 29 – № 1 – P. 245–255.
109. Greider, C. W. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts / C. W. Greider, E. H. Blackburn // *Cell* – 1985. – Vol. 43 – № 2 – P. 405–413.
110. Makarov, V. L. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening / V. L. Makarov, Y. Hirose, J. P. Langmore // *Cell* – 1997. – Vol. 88 – № 5 – P. 657–666.
111. Greider, C. W. Telomeres do D-loop-T-loop / C. W. Greider // *Cell* – 1999. – Vol. 97 – № 4 – P. 419–422.
112. Ly, D. van Telomere loop dynamics in chromosome end protection / D. van Ly, R. R. J. Low, S. Frölich, T. K. Bartolec, G. R. Kafer, H. A. Pickett, K. Gaus, A. J. Cesare // *Molecular Cell* – 2018. – Vol. 71 – № 4 – P. 510–525.e6.
113. Denchi, E. L. Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1 / E. L. Denchi, T. de Lange // *Nature* – 2007. – Vol. 448 – № 7157 – P. 1068–1071.
114. Lazzerini-Denchi, E. Stop pulling my strings-what telomeres taught us about the DNA damage response / E. Lazzerini-Denchi, A. Sfeir // *Nature Reviews Molecular Cell Biology* – 2016. – Vol. 17 – № 6 – P. 364–378.

115. Chu, H. P. TERRA RNA antagonizes ATRX and protects telomeres / H. P. Chu, C. Cifuentes-Rojas, B. Kesner, E. Aeby, H. Lee, C. Wei, H. J. Oh, M. Boukhali, W. Haas, J. T. Lee // *Cell* – 2017. – Vol. 170 – № 1 – P. 86–101.e16.
116. Montero, J. J. TERRA recruitment of polycomb to telomeres is essential for histone trimethylation marks at telomeric heterochromatin / J. J. Montero, I. López-Silanes, D. Megías, M. Fraga, Á. Castells-García, M. A. Blasco // *Nature Communications* – 2018. – Vol. 9 – № 1 – P. 4–6.
117. Tutton, S. Subtelomeric p53 binding prevents accumulation of DNA damage at human telomeres / S. Tutton, G. A. Azzam, N. Stong, O. Vladimirova, A. Wiedmer, J. A. Monteith, K. Beishline, Z. Wang, Z. Deng, H. Riethman, S. B. McMahon, M. Murphy, P. M. Lieberman // *The EMBO Journal* – 2016. – Vol. 35 – № 2 – P. 193–207.
118. Gonzalez-Vasconcellos, I. The Rb1 tumour suppressor gene modifies telomeric chromatin architecture by regulating TERRA expression / I. Gonzalez-Vasconcellos, R. Schneider, N. Anastasov, S. Alonso-Rodriguez, B. Sanli-Bonazzi, J. L. Fernández, M. J. Atkinson // *Scientific Reports* – 2017. – Vol. 7 – № 1 – P. 42056.
119. Feretzaki, M. A practical qPCR approach to detect TERRA, the elusive telomeric repeat-containing RNA / M. Feretzaki, J. Lingner // *Methods* – 2017. – Vol. 114 – P. 39–45.
120. Gilson, E. How telomeres are replicated / E. Gilson, V. Géli // *Nature Reviews Molecular Cell Biology* – 2007. – Vol. 8 – № 10 – P. 825–838.
121. Hackett, J. A. Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability / J. A. Hackett, D. M. Feldser, C. W. Greider // *Cell* – 2001. – Vol. 106 – № 3 – P. 275–286.
122. Nakamura, T. M. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human / T. M. Nakamura, G. B. Morin, K. B. Chapman, S. L. Weinrich, W. H. Andrews, J. Lingner, C. B. Harley, T. R. Cech // *Science* – 1997. – Vol. 277 – № 5328 – P. 955–959.

123. Cohen, S. B. Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells / S. B. Cohen, M. E. Graham, G. O. Lovrecz, N. Bache, P. J. Robinson, R. R. Reddel // *Science* – 2007. – Vol. 315 – № 5820 – P. 1850–1853.
124. Fu, D. Purification of human telomerase complexes identifies factors involved in telomerase biogenesis and telomere length regulation / D. Fu, K. Collins// *Molecular Cell* – 2007. – Vol. 28 – № 5 – P. 773–785.
125. Cheng, L. PES1 is a critical component of telomerase assembly and regulates cellular senescence / L. Cheng, B. Yuan, S. Ying, C. Niu, H. Mai, X. Guan, X. Yang, Y. Teng, J. Lin, J. Huang, R. Jin, J. Wu, B. Liu, S. Chang, E. Wang, C. Zhang, N. Hou, X. Cheng, D. Xu, X. Yang, S. Gao, Q. Ye // *Science Advances* – 2019. – Vol. 5 – № 5 – P. eaav1090.
126. Laudadio, I. How RNAi machinery enters the world of telomerase / I. Laudadio, C. Carissimi, V. Fulci // *Cell Cycle* – 2019. – Vol. 18 – № 10 – P.1056–1067.
127. Liu, J.-P. Telomerase in the ovary / J.-P. Liu, H. Li // *Reproduction* – 2010. – Vol. 140 – № 2 – P. 215–222.
128. Kim, N.W. Association of human telomerase activity with immortal cells and cancer / N. W. Kim, M. A. Piatyszek, K. R. Prowse, C. B. Harley, D. West, P. L. C. Ho, G. M. Coviello, W. E. Wright, S. L. Weinrich, W. Shay, M. D. West, J. W. Shay // *Science* – 1994. – Vol. 266 – № 5193 – P. 2011–2015.
129. Mizukoshi, E. Telomerase-targeted cancer immunotherapy / E. Mizukoshi, S. Kaneko // *International Journal of Molecular Sciences* – 2019. – Vol. 20 – № 8 – P. 1823.
130. Allen, N. D. Telomere length maintenance in stem cell populations / N. D. Allen, D. M. Baird // *Biochimica et Biophysica Acta* – 2009. – Vol. 1792 – № 4 – P. 324–328.
131. Akbar, A. N. Telomerase in T lymphocytes: use it and lose it? / A. N. Akbar, M. Vukmanovic-Stejic // *Journal of immunology* – 2007. – Vol. 178 – № 11 – P. 6689–6694.
132. Valenzuela, H. F. Divergent telomerase and CD28 expression patterns in human CD4 and CD8 T cells following repeated encounters with the same antigenic stimulus /

H. F. Valenzuela, R. B. Effros // *Clinical Immunology* – 2002. – Vol. 105 – № 2 – P. 117–125.

133. Norrback, K. F. Telomerase regulation and telomere dynamics in germinal centers / K. F. Norrback, M. Hultdin, K. Dahlenborg, P. Osterman, R. Carlsson, G. Roos // *European Journal of Haematology* – 2001. – Vol. 67 – № 5–6 – P. 309–317.

134. Henderson, S. In situ analysis of changes in telomere size during replicative aging and cell transformation / S. Henderson, R. Allsopp, D. Spector, S. S. Wang, C. Harley // *Journal of Cell Biology* – 1996. – Vol. 134 – № 1 – P. 1–12.

135. Lawlor, R. T. Alternative lengthening of telomeres (ALT) influences survival in soft tissue sarcomas: A systematic review with meta-analysis / R. T. Lawlor, N. Veronese, A. Pea, A. Nottegar, L. Smith, C. Pilati, J. Demurtas, M. Fassan, L. Cheng, C. Luchini // *BMC Cancer* – 2019. – Vol. 19 – № 1 – P. 232.

136. Morrish, T. A. Short telomeres initiate telomere recombination in primary and tumor cells / T. A. Morrish, C. W. Greider // *PLoS Genetics* – 2009. – Vol. 5 – № 1 – C.e1000357.

137. Pickett, H. A. Normal mammalian cells negatively regulate telomere length by telomere trimming / H. A. Pickett, J. D. Henson, A. Y. M Au., A. A. Neumann, R. R. Reddel // *Human Molecular Genetics* – 2011. – Vol. 20 – № 23 – P. 4684–4692.

138. Rivera, T. A balance between elongation and trimming regulates telomere stability in stem cells / T. Rivera, C. Haggblom, S. Cosconati, J. Karlseder // *Nature Structural and Molecular Biology* – 2017. – Vol. 24 – № 1 – P. 30–39.

139. Yu, E. Y. Telomere trimming and DNA damage as signatures of high risk neuroblastoma / E. Y. Yu, I. Y. Cheung, Y. Feng, M. O. Rabie, G. J. Roboz, M. L. Guzman, N. K. V. Cheung, N. F. Lue // *Neoplasia* – 2019. – Vol. 21 – № 7 – P. 689–701.

140. Kimura, M. Measurement of telomere length by the southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths / M. Kimura, R. C. Stone, S. C. Hunt, J. Skurnick, X. Lu, X. Cao, C. B. Harley, A. Aviv // *Nature Protocols* – 2010. – Vol. 5 – № 9 – P. 1596–1607.



141. Suda, T. Interchromosomal telomere length variation / T. Suda, M. Takimoto, M. Igarashi, T. Kuroiwa, N. Waguri, H. Kawai, Y. Mita, A. Fujiyama, A. Fujiyama, Y. Aoyagi // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 2002. – Vol. 291 – № 2 – P. 210–214.
142. Cawthon, R. M. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method / R. M. Cawthon // *Nucleic Acids Research* – 2009. – Vol. 37 – № 3 – P. 1–7.
143. Lai, T. P. Comparison of telomere length measurement methods / T. P. Lai, W. E. Wright, J. W. Shay // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* – 2018. – Vol. 373 – № 1741 – P. 20160451.
144. Lai, T. P. A method for measuring the distribution of the shortest telomeres in cells and tissues / T. P. Lai, N. Zhang, J. Noh, I. Mender, E. Tedone, E. Huang, W. E. Wright, G. Danuser, J. W. Shay // *Nature Communications* – 2017. – Vol. 8 – № 1 – P. 1356.
145. Pellestor, F. The use of peptide nucleic acids for in situ identification of human chromosomes / F. Pellestor, P. Paulasova, M. Macek, S. Hamamah // *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* – 2005. – Vol. 53 – № 3 – P. 395–400.
146. Hartley, T. Testing hygrometers used in cytogenetics laboratories for metaphase preparation / T Hartley, K. Dun // *Current Protocols in Human Genetics* – 2011. – Vol. 70 – № 1 – P. A.2F.1-A.2F.8.
147. Heng, H. H. Q. Modes of DAPI banding and simultaneous in situ hybridization / H. H. Q. Heng, L. C. Tsui // *Chromosoma* – 1993. – Vol. 102 – № 5 – P. 325–332.
148. Poon, S. S. S. Segmenting telomeres and chromosomes in cells / S. S. S. Poon, R. W. Ward, P. M. Lansdorp // *International Conference on Acoustics, Speech, and Signal Processing. Proceedings.* – 1999. – Vol. 6 – P. 3413–3416.
149. Poletti, E. A review of thresholding strategies applied to human chromosome segmentation / E. Poletti, F. Zappelli, A. Ruggeri, E. Grisan // *Computer Methods and Programs in Biomedicine* – 2012. – Vol. 108 – № 2 – P. 679–688.
150. Perner, S. Quantifying telomere lengths of human individual chromosome arms by centromere-calibrated fluorescence in situ hybridization and digital imaging / S.

Perner, S. Brüderlein, C. Hasel, I. Waibel, A. Holdenried, N. Ciloglu, H. Chopurian, K. Vang Nielsen, A. Plesch, J. Högel, P. Möller // *American Journal of Pathology* – 2003. – Vol. 163 – № 5 – P. 1751–1756.

151. *Telomeres and Telomerase: Methods in Molecular Biology*. – New York : Humana Press, 2017. – Vol. 1587. – 29–39 p.

152. Ishikawa, N. Changes of telomere status with aging: An update / N. Ishikawa, K. I. Nakamura, N. Izumiyama-Shimomura, J. Aida, Y. Matsuda, T. Arai, K. Takubo // *Geriatrics and Gerontology International* – 2016. – Vol. 16 – P. 30–42.

153. Butler, M.G. Comparison of chromosome telomere integrity in multiple tissues from subjects at different ages / M. G., Butler, J. Tilburt, A. Devries, B. Muralidhar, G. Aue, L. Hedges, J. Atkinson, H. Schwartz // *Cancer Genetics and Cytogenetics* – 1998. – Vol. 105 – № 2 – P. 138–144.

154. Andrews, N. P. Telomeres and immunological diseases of aging / N. P. Andrews, H. Fujii, J. J. Goronzy, C. M. Weyand // *Gerontology* – 2010. – Vol. 56 – № 4 – P. 390–403.

155. Cooke, H. J. Variability at the telomeres of the human X/Y pseudoautosomal region / H. J. Cooke, B. A. Smith // *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* – 1986. – Vol. 51 – P. 213–219.

156. Harley, C. B. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts / C. B. Harley, A. B. Futcher, C. W. Greider // *Nature* – 1990. – Vol. 345 – № 6274 – P.458–460.

157. Vaziri, H. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. / H. Vaziri, W. Dragowska, R. C. Allsopp, T. E. Thomas, C. B. Harley, P. M. Lansdorp // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 1994. – Vol. 91 – № 21 – P. 9857–9860.

158. Bodnar, A. G. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells / A. G. Bodnar, M. Ouellette, M. Frolkis, S. E. Holt, C. P. Chiu, G. B. Morin, C. B. Harley, J. W. Shay, S. Lichtsteiner, W. E. Wright // *Science* – 1998. – Vol. 279 – № 5349 – P. 349–352.

159. Vaziri, H. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span / H. Vaziri, S. Benchimol // *Current Biology* – 1998. – Vol. 8 – № 5 – P. 279–282.
160. Karlseder, J. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss / J. Karlseder, A. Smogorzewska, T. De Lange // *Science* – 2002. – Vol. 295 – № 5564 – P. 2446–2449.
161. Ning, Y. Telomere length and the expression of natural telomeric genes in human fibroblasts / Y. Ning, J. F. Xu, Y. Li, L. Chavez, H. C. Riethman, P. M. Lansdorp, N. P. Weng // *Human Molecular Genetics* – 2003. – Vol. 12 – № 11 – P. 1329–1336.
162. Maciejowski, J. Chromothripsis and kataegis induced by telomere crisis / J. Maciejowski, Y. Li, N. Bosco, P. J. Campbell, T. De Lange // *Cell* – 2015. – Vol. 163 – № 7 – P. 1641–1654.
163. Wright, W.E. The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. / W. E. Wright, J. Shay // *Experimental Gerontology* – 1992. – Vol. 27 – № 4 – P. 383–389.
164. Turner, K. Telomere biology and human phenotype / K. Turner, V. Vasu, D. Griffin // *Cells* – 2019. – Vol. 8 – № 1 – P. 73.
165. Hemann, M. T. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability / M. T. Hemann, M. A. Strong, L. Hao, C. W. Greider // *Cell* – 2001. – Vol. 107 – № 1 – P. 67–77.
166. Zijlmans, J .M. Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats / J. M. Zijlmans, U. M. Martens, S. S. Poon, A. K. Raap, H. J. Tanke, R. K. Ward, P. M. Lansdorp // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 1997. – Vol. 94 – № 14 – P. 7423–7428.
167. Slijepcevic, P. Telomere length and telomere-centromere relationships? / P. Slijepcevic // *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* – 1998. – Vol. 404 – № 1–2 – P. 215–220.
168. Martens, U. M. Short telomeres on human chromosome 17p / U. M. Martens, J. M. Zijlmans, S. S. S. Poon, W. Dragowska, J. Yui, E. A. Chavez, R. K. Ward, P. M. Lansdorp // *Nature Genetics* – 1998. – Vol. 18 – № 1 – P.76–80.

169. Graakjaer, J. The relative lengths of individual telomeres are defined in the zygote and strictly maintained during life / J. Graakjaer, L. Pascoe, H. Der-Sarkissian, G. Thomas, S. Kolvraa, K. Christensen, J. A. Londoño-Vallejo // *Aging Cell* – 2004. – Vol. 3 – № 3 – P. 97–102.
170. Graakjaer, J. The pattern of chromosome-specific variations in telomere length in humans shows signs of heritability and is maintained through life / J. Graakjaer, J. A. Londoño-Vallejo, K. Christensen, S. Kolvraa // *Annals of the New York Academy of Sciences* – 2006. – Vol. 1067 – № 1 – P. 311–316.
171. Londoño-Vallejo, J. A. Differences in telomere length between homologous chromosomes in humans / J. A. Londoño-Vallejo, H. Der Sarkissian, L. Cazes, G. Thomas // *Nucleic Acids Research* – 2002. – Vol. 29 – № 15 – P. 3164–3171.
172. Hernández-Caballero, E. Role of telomere length in subtelomeric gene expression and its possible relation to cellular senescence / E. Hernández-Caballero, N. E. Herrera-González, F. Salamanca-Gómez, D. J. Arenas-Aranda // *BMB Reports* – 2009. – Vol. 42 – № 11 – P. 747–751.
173. Blinova, E.A. The expression of genes located on 4th chromosome in association with short telomere length in patients with rheumatoid arthritis / E. A. Blinova, N. Y. Knauer, E. A. Kulagina, T. Y. Abramova, E. V. Zinnatova, M. S. Barkovskaya, N. A. Klyaus, L. V. Grishina, E. A. Pashkina, A. E. Sizikov, V. S. Kozhevnikov, V. A. Kozlov // *Immunologiya* – 2017. – Vol. 38 – № 1 – P. 27–34.
174. Samassekou, O. Chromosome arm-specific long telomeres: a new clonal event in primary chronic myelogenous leukemia cells / O. Samassekou, H. Li, C. G. Cliché, A. Ntwari, H. Wang, S. Huang, J. Yan, E. Bouchard, J. Hébert // *Neoplasia* – 2011. – Vol. 13 – № 6 – P. 550–560.
175. Sabatier, L. The loss of a single telomere can result in instability of multiple chromosomes in a human tumor cell line / L. Sabatier, M. Ricoul, G. Pottier, J. P. Murnane // *Molecular Cancer Research* – 2005. – Vol. 3 – № 3 – P. 139–150.
176. Broer, L. Meta-analysis of telomere length in 19 713 subjects reveals high heritability, stronger maternal inheritance and a paternal age effect / L. Broer, V. Codd, D. R. Nyholt, J. Deelen, M. Mangino, G. Willemsen, E. Albrecht, N. Amin, M.

Beekman, E. J. C. de Geus, A. Henders, C. P. Nelson, C. J. Steves, M. J. Wright, A. J. M. de Craen, A. Isaacs, M. Matthews, A. Moayyeri, G. W. Montgomery, B. A. Oostra, J. M. Vink, T. D. Spector, P. E. Slagboom, N. G. Martin, N. J. Samani, C. M. van Duijn, D. I. Boomsma // *European Journal of Human Genetics* – 2013. – Vol. 21 – № 10 – P. 1163–1168.

177. Factor-Litvak, P. Leukocyte telomere length in newborns: implications for the role of telomeres in human disease / P. Factor-Litvak, E. Susser, K. Kezios, I. McKeague, J. D. Kark, M. Hoffman, M. Kimura, R. Wapner, A. Aviv // *Pediatrics* – 2016. – Vol. 137 – № 4 – P. e20153927.

178. Holohan, B. Decreasing initial telomere length in humans intergenerationally understates age-associated telomere shortening / B. Holohan, T. de Meyer, K. Batten, M. Mangino, S. C. Hunt, S. Bekaert, M. L. de Buyzere, E. R. Rietzschel, T. D. Spector, W. E. Wright, J. W. Shay // *Aging cell* – 2015. – Vol. 14 – № 4 – P. 669–677.

179. Frenck, R. W. The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age / R. W. Frenck, E. H. Blackburn, K. M. Shannon // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 1998. – Vol. 95 – № 10 – P. 5607–5610.

180. Hjelmborg, J.B. The heritability of leucocyte telomere length dynamics / J. B. Hjelmborg, C. Dalgård, S. Möller, T. Steenstrup, M. Kimura, K. Christensen, K. O. Kyvik, A. Aviv // *Journal of Medical Genetics* – 2015. – Vol. 52 – № 5 – P. 297–302.

181. Codd, V. Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease / V. Codd, C. P. Nelson, E. Albrecht, N. J. Samani // *Nature Genetics* – 2013. – Vol. 45 – № 4 – P. 422–427.

182. Fasching, C. L. Telomere length measurement as a clinical biomarker of aging and disease / C. L. Fasching // *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* – 2018. – Vol. 55 – № 7 – P. 443–465.

183. Hunt, S. C. Leukocyte telomere length and coronary artery calcium / S. C. Hunt, M. Kimura, P. N. Hopkins, J. J. Carr, G. Heiss, M. A. Province, A. Aviv // *The American Journal of Cardiology* – 2015. – Vol. 116 – № 2 – P. 214–218.

184. Balint, B. Cardiac-referenced leukocyte telomere length and outcomes after cardiovascular surgery / B. Balint, J. Wong, J.M. Arpino, S. A. Fox, M. A. Quantz, A.

Watson, M. W. A. Chu, O. Akawi, B. Kiaii, J. G. Pickering, C. O'Neil, A. D. Nagpal, L. Guo, F. Li, H. Yin // *JACC: Basic to Translational Science* – 2018. – Vol. 3 – № 5 – P. 591–600.

185. Willeit, P. Leucocyte telomere length and risk of type 2 diabetes mellitus: new prospective cohort study and literature-based meta-analysis / P. Willeit, J. Raschenberger, E. E. Heydon, S. Tsimikas, M. Haun, A. Mayr, S. Weger, J. L. Witztum, A. S. Butterworth, J. Willeit, F. Kronenberg, S. Kiechl // *PLoS ONE* – 2014. – Vol. 9 – № 11 – P. e112483.

186. Bonfigli, A. R. Leukocyte telomere length and mortality risk in patients with type 2 diabetes / A. R. Bonfigli, L. Spazzafumo, F. Prattichizzo, M. Bonafè, E. Mensà, L. Micolucci, A. Giuliani, P. Fabbietti, R. Testa, M. Boemi, F. Lattanzio, F. Olivieri // *Oncotarget* – 2016. – Vol. 7 – № 32 – P. 50835–50844.

187. Willeit, P. Fifteen-year follow-up of association between telomere length and incident cancer and cancer mortality / P. Willeit, J. Willeit, A. Brandstätter, F. Kronenberg, S. Kiechl // *JAMA* – 2011. – Vol. 306 – № 1 – P. 42–44.

188. Ma H. Shortened telomere length is associated with increased risk of cancer: a meta-analysis / H. Ma, Z. Zhou, S. Wei, Z. Liu, K. A. Pooley, A. M. Dunning, U. Svenson, G. Roos, H. D. Hosgood, M. Shen, Q. Wei // *PLoS ONE* – 2011. – Vol. 6 – № 6 – P. e20466.

189. Weischer, M. Short telomere length, cancer survival, and cancer risk in 47102 individuals / M. Weischer, B. G. Nordestgaard, R. M. Cawthon, J. J. Freiberg, A. Tybjærg-Hansen, S. E. Bojesen // *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* – 2013. – Vol. 105 – № 7 – P. 459–468.

190. Rode, L. Long telomeres and cancer risk among 95 568 individuals from the general population / L. Rode, B. G. Nordestgaard, S. E. Bojesen // *International Journal of Epidemiology* – 2016. – Vol. 45 – № 5 – P. 1634–1643.

191. Goronzy, J. J. T-cell senescence and contraction of T-cell repertoire diversity – catalysts of autoimmunity and chronic inflammation / J. J. Goronzy, C. M. Weyand // *Arthritis Research and Therapy* – 2003. – Vol. 5 – № 5 – P. 225–234.

192. Nordensson, K. Increased activation-induced cell death in peripheral lymphocytes of rheumatoid arthritis patients: the mechanism of action / K. Nordensson, J. Richard, D. E. Yocum, X. Tang, D. F. Lake, D. Dejonghe // *Immunology* – 2004. – Vol. 112 – № 3 – P. 496–505.
193. Борисов, В. И. Укорочение длины теломер моноцитов при ревматоидном артрите / В. И. Борисов, В. С. Кожевников, В. В. Сеньюков, А. Э. Сизиков, Л. П. Коненкова, О. А. Герцог, В. А. Козлов // *Медицинская иммунология* – 2006. – № 1 – P. 87–90.
194. Fujii, H. Telomerase insufficiency in rheumatoid arthritis / H. Fujii, L. Shao, I. Colmegna, J. J. Goronzy, C. M. Weyand // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2009. – Vol. 106 – № 11 – P. 4360–4365.
195. Lee, Y. H. Association between shortened telomere length and rheumatoid arthritis / Y. H. Lee, S.-C. Bae // *Zeitschrift für Rheumatologie* – 2018. – Vol. 77 – № 2 – P. 160–167.
196. Albrecht, E. Telomere length in circulating leukocytes is associated with lung function and disease / E. Albrecht, E. Sillanpaa, S. Karrasch, A. C. Alves, V. Codd, I. Hovatta, J. L. Buxton, C. P. Nelson, L. Broer, S. Hagg, M. Mangino, G. Willemsen, I. Surakka, M. A. R. Ferreira, N. Amin, B. A. Oostra, H. M. Backmand, M. Peltonen, S. Sarna, T. Rantanen, S. Sipila, T. Korhonen, P. A. F. Madden, C. Gieger, R. A. Jorres, J. Heinrich, J. Behr, R. M. Huber, A. Peters, K. Strauch, H. E. Wichmann, M. Waldenberger, A. I. F. Blakemore, E. J. C. de Geus, D. R. Nyholt, A. K. Henders, P. L. Piirila, A. Rissanen, P. K. E. Magnusson, A. Vinuela, K. H. Pietilainen, N. G. Martin, N. L. Pedersen, D. I. Boomsma, T. D. Spector, C. M. van Duijn, J. Kaprio, N. J. Samani, M.-R. Jarvelin, H. Schulz // *European Respiratory Journal* – 2014. – Vol. 43 – № 4 – P. 983–992.
197. Birch, J. DNA damage response at telomeres contributes to lung aging and chronic obstructive pulmonary disease / J. Birch, R. K. Anderson, C. Correia-Melo, D. Jurk, G. Hewitt, F. M. Marques, N. J. Green, E. Moisey, M. A. Birrell, M. G. Belvisi, F. Black, J. J. Taylor, A. J. Fisher, A. de Soyza, J. F. Passos // *American Journal of*

Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology – 2015. – Vol. 309 – № 10 – P. L1124–L1137.

198. Desai, K. Rapid shortening of leukocyte telomeres is associated with poorer pulmonary function among healthy adults / K. Desai, N. Berkman, I. Cohen-Manheim, R. Sinnreich, A. Aviv, J. D. Kark // *Respiratory Medicine* – 2018. – Vol. 145 – P. 73–79.

199. Tsuji, T. Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema / T. Tsuji, K. Aoshiba, A. Nagai // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* – 2006. – Vol. 174 – № 8 – P. 886–893.

200. Córdoba-Lanús, E. Telomere shortening and accelerated aging in COPD: Findings from the BODE cohort / E. Córdoba-Lanús, S. Cazorla-Rivero, A. Espinoza-Jiménez, J. P. de-Torres, M. J. Pajares, A. Aguirre-Jaime, B. Celli, C. Casanova // *Respiratory Research* – 2017. – Vol. 18 – № 1 – P. 1–8.

201. Córdoba-Lanús, E. Shorter telomeres in non-smoking patients with airflow limitation / E. Córdoba-Lanús, C. Cabrera-López, S. Cazorla-Rivero, M. C. Rodríguez-Pérez, A. Aguirre-Jaime, B. Celli, C. Casanova // *Respiratory Medicine* – 2018. – Vol. 138 – P. 123–128.

202. Рубцов, Н. Б. Методы работы с хромосомами млекопитающих / Н. Б. Рубцов – Новосибирск: Новосибирский Государственный Университет, 2006. – 1-147 с.

203. Poon S. S. S. Telomere length measurement using digital fluorescent microscopy / S. S. S. Poon, U. M. Martens, R. K. Ward, P. M. Lansdorp // *Cytometry* – 1999. – Vol. 36 – № 4 – P. 267–278.

204. Otsu, N. A threshold selection method from gray-level histograms / N. Otsu // *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics* – 1979. – Vol. 9 – № 1 – P. 62–66.

205. Жданова, Н. С. Биология теломер млекопитающих / Н. С. Жданова, Ю. М. Минина, Н. Б. Рубцов // *Молекулярная биология* – 2012. – Vol. 46 – № 4 – P. 1–17.



206. Sposato, B. Predicted values for spirometry may underestimate long-standing asthma severity / B. Sposato // *The Open Respiratory Medicine Journal* – 2016. – Vol. 10 – № 1 – P. 70–78.
207. Tiwari, A. Longer duration of asthma is significantly associated with increased RV/TLC ratio / A. Tiwari, K. Rahman, B. Abejie, V. V. Jain, J. J. Vempilly // *Respiratory Medicine* – 2017. – Vol. 124 – P. 44–48.
208. Sanders, M.E. Human naive and memory T cells: reinterpretation of helper-inducer and suppressor-inducer subsets / M. E. Sanders, M. W. Makgoba, S. Shaw // *Immunology Today* – 1988. – Vol. 9 – № 7–8 – P. 195–199.
209. Pawlik, I. The differences in the expression of CD45 isoforms on peripheral blood lymphocytes derived from patients with seasonal or perennial atopic allergy / I. Pawlik, U. Mackiewicz, J. K. Lacki, K. Wiktorowicz, J. Konys // *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* – 1997. – Vol. 182. – № 1. – P. 1–8.
210. Ciepiela, O. Lymphocytes subpopulations in asthmatic children / O. Ciepiela, A. Zawadzka-Krajewska, I. Kotuła, K. Lewandowska, B. Pyrzak, U. Demkow // *Central-European Journal of Immunology* – 2011. – Vol. 36 – № 4 – P. 237–242.
211. Du, C. Cytokine profiles of CD4+T memory cells in asthma and their relationship with asthma severity / C. Du, K. Xu, Z. Min, D. Li, H. Yuan, C. Liu, C. Zhihong // *National Medical Journal of China* – 2017. – Vol. 97 – № 30 – P. 2333–2337.
212. Zein, J. G. Asthma is more severe in older adults / J. G. Zein, R. A. Dweik, S. A. Comhair, E. R. Bleeker, W. C. Moore, S. P. Peters, W. W. Busse, N. N. Jarjour, W. J. Calhoun, M. Castro, K. F. Chung, A. Fitzpatrick, E. Israel, W. G. Teague, S. E. Wenzel, T. E. Love, B. M. Gaston, S. C. Erzurum // *PLoS ONE* – 2015. – Vol. 10 – № 7 – P. e0133490.
213. Sözüner, Z. Ç. Prognosis of adult asthma: A 7-year follow-up study / Z. Ç. Sözüner, Ö. Aydın, D. Mungan, Z. Misirligil // *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* – 2015. – Vol. 114 – № 5 – P. 370–373.
214. Cassino, C. Duration of asthma and physiologic outcomes in elderly nonsmokers / C. Cassino, K. I. Berger, R. M. Goldring, R. G. Norman, S. Kammerman, C. Ciotoli, J.

Reibman // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine – 2000. – Vol. 162 – № 4 I – P. 1423–1428.

215. Vignola, A. M. Effect of age and asthma duration upon elastase and  $\alpha 1$ -antitrypsin levels in adult asthmatics / A. M. Vignola, A. Bonanno, M. Profita, L. Riccobono, N. Scichilone, M. Spatafora, J. Bousquet, G. Bonsignore, V. Bellia // European Respiratory Journal – 2003. – Vol. 22 – № 5 – P. 795–801.

216. Chen, B. H. Leukocyte telomere length, T cell composition and DNA methylation age / B. H. Chen, C. L. Carty, M. Kimura, J. D. Kark, W. Chen, S. Li, T. Zhang, C. Kooperberg, D. Levy, T. Assimes, D. Absher, S. Horvath, A. P. Reiner, A. Aviv // Aging – 2017. – Vol. 9 – № 9 – P. 1983–1995.

217. Current Protocols in Human Genetics – Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2005. – 4.1.1–4.1.19 p.

218. Hermiston, M. L. CD45: A critical regulator of signaling thresholds in immune cells / M. L. Hermiston, Z. Xu, A. Weiss // Annual Review of Immunology – 2003. – Vol. 21 – № 1 – P. 107–137.

219. Jiang, T. Enhanced proliferation and defective activation-induced cell death of CD4<sup>+</sup> T cells in childhood asthma / T. Jiang, J. Sheng, Y. Qin, H. Xiong, Y. Gong, H. Tang, J. Zhou, Z. Deng, H. Zhang, Y. Cui, J. Qian, Y. Shen, Y. Jin // Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology – 2014. – Vol. 32 – № 1 – P. 75–83.

220. Gorenjak, V. The future of telomere length in personalized medicine. / V. Gorenjak, S. Akbar, M. G. Stathopoulou, S. Visvikis-Siest // Frontiers in bioscience (Landmark edition) – 2018. – Vol. 23 – P. 1628–1654.

221. Kozubek, M. High-resolution cytometry of FISH dots in interphase cell nuclei. / M. Kozubek, S. Kozubek, E. Lukášová, A. Marecková, E. Bártová, M. Skalníková, A. Jergová // Cytometry – 1999. – Vol. 36 – № 4 – P. 279–293.

222. Colmegna, I. Defective proliferative capacity and accelerated telomeric loss of hematopoietic progenitor cells in rheumatoid arthritis / I. Colmegna, A. Diaz-Borjon, H. Fujii, L. Schaefer, J. J. Goronzy, C. M. Weyand // Arthritis and Rheumatism – 2008. – Vol. 58 – № 4 – P. 990–1000.

223. Hohensinner, P. J. Telomere dysfunction, autoimmunity and aging. / P. J. Hohensinner, J. J. Goronzy, C. M. Weyand // *Aging and disease* – 2011. – Vol. 2 – № 6 – P. 524–537.
224. Guerra, S. New asthma biomarkers: shorter telomeres, longer disease? / S. Guerra // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* – 2014. – Vol. 190 – № 4 – P. 356–358.
225. Ceylan, E. Increased DNA damage in patients with chronic obstructive pulmonary disease who had once smoked or been exposed to biomass / E. Ceylan, A. Kocyigit, M. Gencer, N. Aksoy, S. Selek // *Respiratory Medicine* – 2006. – Vol. 100 – № 7 – P. 1270–1276.
226. Eagan, T. M. L. Incidence of asthma and respiratory symptoms by sex, age and smoking in a community study / T. M. L. Eagan, P. S. Bakke, G. E. Eide, A. Gulsvik // *European Respiratory Journal* – 2002. – Vol. 19 – № 4 – P. 599–605.
227. Akgun, K. M. Epidemiology and management of common pulmonary diseases in older persons / K. M. Akgun, K. Crothers, M. Pisani // *The Journal of Gerontology* – 2012. – Vol. 67A – № 3 – P. 276–291.
228. Kaul, Z. Five dysfunctional telomeres predict onset of senescence in human cells / Z. Kaul, A. J. Cesare, L. I. Huschtscha, A. A. Neumann, R. R. Reddel // *EMBO Reports* – 2012. – Vol. 13 – № 1 – P. 52–59.
229. Nimmo, E.R. Telomere-associated chromosome breakage in fission yeast results in variegated expression of adjacent genes. / E. R. Nimmo, G. Cranston, R. C. Allshire // *The EMBO Journal* – 1994. – Vol. 13 – № 16 – P. 3801–3811.
230. Stadler, G. Telomere position effect regulates DUX4 in human facioscapulohumeral muscular dystrophy / G. Stadler, F. Rahimov, O. D. King, J. C. J. Chen, J. D. Robin, K. R. Wagner, J. W. Shay, C. P. Emerson, W. E. Wright // *Nature Structural and Molecular Biology* – 2013. – Vol. 20 – № 6 – P. 671–678.
231. Robin, J. D. Telomere position effect: Regulation of gene expression with progressive telomere shortening over long distances / J. D. Robin, A. T. Ludlow, K. Batten, F. Magdinier, G. Stadler, K. R. Wagner, J. W. Shay, W. E. Wright // *Genes and Development* – 2014. – Vol. 28 – № 22 – P. 2464–2476.

232. Kim, W. Regulation of the human telomerase gene TERT by telomere position effect—over long distances (TPE-OLD): implications for aging and cancer / W. Kim, A. T. Ludlow, J. Min, J. D. Robin, G. Stadler, I. Mender, T.-P. Lai, N. Zhang, W. E. Wright, J. W. Shay // *PLOS Biology* – 2016. – Vol. 14 – № 12 – P. e2000016.
233. Wjst, M. A genome-wide search for a link to asthma / M. Wjst, G. Fischer, T. Immervoll, M. Jung, K. Saar, F. Rueschendorf, M. Ulbrecht, M. Gomolka, E. H. Weiss, L. Jaeger, R. Nickel, K. Richter, N. M. Kjellman, M. Griesse, A. von Berg, M. Gappa, F. Riedel, M. Boehle, S. van Koningsbruggen, P. Schoberth, R. Szczepanski, W. Dorsch, M. Silbermann, S. Loesgen, M. Scholz, H. Bickebo, H. Wichmann// *Genomics* – 1999. – Vol. 58 – № 12 – P. 1–8.
234. Dizier, M. Genome screen for asthma and related phenotypes in the french EGEA study / M. Dizier, C. Besse-Schmittler, M. Guilloud-Bataille, I. Annesi-Maesano, M. Boussaha, J. Bousquet, D. Charpin, A. Degioanni, F. Gormand, A. Grimfeld, J. Hochez, G. Hyne, A. Lockhart, M. Luillier-Lacombe, R. Matran, F. Meunier, F. Neukirch, Y. Pacheco, V. Parent, E. Paty, I. Pin, C. Pison, P. Scheinmann, N. Thobie, D. Vervloet, F. Kauffmann, J. Feingold, M. Lathrop, F. Demenais // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* – 2000. – Vol. 162 – № 5 – P. 1812–1818.
235. Marsh, D. G. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations / D. G. Marsh, J. D. Neely, D. R. Breazeale, B. Ghosh, L. R. Freidhoff, E. Ehrlich-Kautzky, C. Schou, G. Krishnaswamy, T. H. Beaty // *Science* – 1994. – Vol. 264 – № 5162 – P. 1152–1156.
236. A genome-wide search for asthma susceptibility loci in ethnically diverse populations: The Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA) // *Nature Genetics* – 1997. – Vol. 15 – № 4 – P. 389–392.
237. Hakonarson, H. Genetic analyses in asthma: Current concepts and future directions / H. Hakonarson, E. Halapi // *American Journal of Pharmacogenomics* – 2002. – Vol. 2 – № 3 – P. 155–166.
238. Bonser, L. Airway mucus and asthma: the role of MUC5AC and MUC5B / L. Bonser, D. Erle // *Journal of Clinical Medicine* – 2017. – Vol. 6 – № 12 – P. 112.

239. Grasemann, H. A neuronal NO synthase (NOS1) gene polymorphism is associated with asthma / H. Grasemann, C. N. Yandava, K. Storm van's Gravesande, A. Deykin, A. Pillari, J. Ma, L. A. Sonna, C. Lilly, M. J. Stampfer, E. Israel, E. K. Silverman, J. M. Drazen // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 2000. – Vol. 272 – № 2 – P. 391–394.
240. Wechsler, M. E. Exhaled nitric oxide in patients with asthma: association with NOS1 genotype / M. E. Wechsler, H. Grasemann, A. Deykin, E. K. Silverman, C. N. Yandava, E. Israel, M. Wand, J. M. Drazen // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* – 2000. – Vol. 162 – № 6 – P. 2043–2047.
241. Nakao, F. Association of IFN- $\delta$  and IFN regulatory factor 1 polymorphisms with childhood atopic asthma / F. Nakao, K. Ihara, K. Kusuhara, Y. Sasaki, N. Kinukawa, A. Takabayashi, S. Nishima, T. Hara // *Journal of Allergy and Clinical Immunology* – 2001. – Vol. 107 – № 3 – P. 499–504.
242. Hernandez-Pacheco, N. Genomic predictors of asthma phenotypes and treatment response / N. Hernandez-Pacheco, M. Pino-Yanes, C. Flores // *Frontiers in Pediatrics* – 2019. – Vol. 7 – Article №6.
243. Duan, Q.L. A genome-wide association study of bronchodilator response in asthmatics / Q. L. Duan, J. Lasky-Su, B. E. Himes, W. Qiu, A. A. Litonjua, A. Damask, R. Lazarus, B. Klanderman, C. G. Irvin, S. P. Peters, J. P. Hanrahan, J. J. Lima, F. D. Martinez, D. Mauger, V. M. Chinchilli, M. Soto-Quiros, L. Avila, J. C. Celedón, C. Lange, S. T. Weiss, K. G. Tantisira // *Pharmacogenomics Journal* – 2014. – Vol. 14 – № 1 – P. 41–47.
244. Gref, A. Genome-wide interaction analysis of air pollution exposure and childhood asthma with functional follow-up / A. Gref, S. K. Merid, O. Gruzieva, S. Ballereau, A. Becker, T. Bellander, A. Bergström, Y. Bossé, M. Bottai, M. Chan-Yeung, E. Fuertes, D. Ierodiakonou, R. Jiang, S. Joly, M. Jones, M. S. Kobor, M. Korek, A. L. Kozyrskyj, A. Kumar, N. Lemonnier, E. MacIntyre, C. Ménard, D. Nickle, M. Obeidat, J. Pellet, M. Standl, A. Sääf, C. Söderhäll, C. M. T. Tiesler, M. van Den Berge, J. M. Vonk, H. Vora, C. J. Xu, J. M. Antó, C. Auffray, M. Brauer, J. Bousquet, B. Brunekreef, W. J. Gauderman, J. Heinrich, J. Kere, G. H. Koppelman, D.

Postma, C. Carlsten, G. Pershagen, E. Melén // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* – 2017. – Vol. 195 – № 10 – P. 1373–1383.

245. Vonk, J. M. Adult onset asthma and interaction between genes and active tobacco smoking: the GABRIEL consortium / J. M. Vonk, S. Scholtens, D. S. Postma, M. F. Moffatt, D. Jarvis, A. Ramasamy, M. Wjst, E. R. Omenaas, E. Bouzigon, F. Demenais, R. Nadif, V. Siroux, A. V. Polonikov, M. Solodilova, V. P. Ivanov, I. Curjuric, M. Imboden, A. Kumar, N. Probst-Hensch, L. M. Ogorodova, V. P. Puzyrev, E. Y. Bragina, M. B. Freidin, I. M. Nolte, A. M. Farrall, W. O. C. M. Cookson, D. P. Strachan, G. H. Koppelman, H. M. Boezen // *PLoS ONE* – 2017. – Vol. 12 – № 3 – P. e0172716.

246. Spear, M. L. A genome-wide association and admixture mapping study of bronchodilator drug response in African Americans with asthma / M. L. Spear, D. Hu, M. Pino-Yanes, S. Huntsman, C. Eng, A. M. Levin, V. E. Ortega, M. J. White, M. E. McGarry, N. Thakur, J. Galanter, A. C. Y. Mak, S. S. Oh, E. Ampleford, S. P. Peters, A. Davis, R. Kumar, H. J. Farber, K. Meade, P. C. Avila, D. Serebrisky, M. A. Lenoir, E. Brigino-Buenaventura, W. R. Cintron, S. M. Thyne, J. R. Rodriguez-Santana, J. G. Ford, R. Chapela, A. M. Estrada, K. Sandoval, M. A. Seibold, C. A. Winkler, E. R. Bleeker, D. A. Myers, L. K. Williams, R. D. Hernandez, D. G. Torgerson, E. G. Burchard // *The Pharmacogenomics Journal* – 2019. – Vol. 19 – № 3 – P. 249–259.

247. Zhu, Z. A genome-wide cross-trait analysis from UK Biobank highlights the shared genetic architecture of asthma and allergic diseases / Z. Zhu, P. H. Lee, M. D. Chaffin, W. Chung, P. R. Loh, Q. Lu, D. C. Christiani, L. Liang // *Nature Genetics* – 2018. – Vol. 50 – № 6 – P. 857–864.

248. Rosenwasser, L. J. Promoter polymorphism in the candidate genes, IL-4, IL-9, TGF- $\beta$ 1, for atopy and asthma / L. J. Rosenwasser // *International Archives of Allergy and Immunology* – 1999. – Vol. 118 – № 2–4 – P. 268–270.

249. Suzuki, I. Association between a C+33T polymorphism in the IL-4 promoter region and total serum IgE levels / I. Suzuki, N. Hizawa, E. Yamaguchi, Y. Kawakami // *Clinical and Experimental Allergy* – 2000. – Vol. 30 – № 12 – P. 1746–1749.

250. Israel, I. E. The effect of polymorphisms of the  $\beta$  2 -adrenergic receptor on the response to regular use of albuterol in asthma / E. Israel, J. Drazen, S. Liggett, H. Boushey, R. Cherniack, V. Chinchilli, D. Cooper, J. Fahy, J. Fish, J. Ford, M. Kraft, S. Kunselman, S. Lazarus, R. Lemanske, R. Martin, D. McLean, S. Peters, E. Silverman, C. Sorkness, S. Szefer, S. Weiss, C. Yandava // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine – 2000. – Vol. 162 – № 1 – P. 75–80.
251. Holloway, J. W. Association of  $\beta$ 2-adrenergic receptor polymorphisms with severe asthma / J. W. Holloway, P. R. Dunbar, G. A. Riley, G. M. Sawyer, P. F. Fitzharris, N. Pearce, G. S. le Gros, R. Beasley // Clinical and Experimental Allergy – 2000. – Vol. 30 – № 8 – P. 1097–1103.
252. Koppelman, G. Association of a promoter polymorphism of the CD14 gene and atopy / G. Koppelman, N. Reijmerink, O. C. Stine, T. Howard, P. Whittaker, D. Meyers, D. Postma, E. Bleecker // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine – 2001. – Vol. 163 – № 4 – P. 965–969.
253. Moffatt, M. F. Association between quantitative traits underlying asthma and the HLA-DRB1 locus in a family-based population sample / M. F. Moffatt, C. Schou, J. A. Faux, G. R. Abecasis, A. James, A. W. Musk, W. O. C. M. Cookson // European Journal of Human Genetics – 2001. – Vol. 9 – № 5 – P. 341–346.
254. Cho, S. H. Association of HLA-DRB1\*07 and DRB1\*04 to citrus red mite (*Panonychus citri*) and house dust mite sensitive asthma / S. H. Cho, Y. K. Kim, H. B. Oh, J. W. Jung, J. W. Son, M. H. Lee, H. S. Jee, Y. Y. Kim, K. U. Min // Clinical and Experimental Allergy – 2000. – Vol. 30 – № 11 – P. 1568–1575.
255. Makarova, S. I. Allele NAT2\*5 determines resistance to bronchial asthma in children / S. I. Makarova, V. A. Vavilin, V. V. Lyakhovich, S. M. Gavalov // Bulletin of Experimental Biology and Medicine – 2000. – Vol. 129 – № 6 – P. 575–577.
256. Almoguera, B. Identification of four novel loci in asthma in European American and African American populations / B. Almoguera, L. Vazquez, F. Mentch, J. Connolly, J. A. Pacheco, A. S. Sundaresan, P. L. Peissig, J. G. Linneman, C. A. McCarty, D. Crosslin, D. S. Carrell, T. Lingren, B. Namjou-Khales, J. B. Harley, E. Larson, G. P. Jarvik, M. Brilliant, M. S. Williams, I. J. Kullo, E. B. Hysinger, P. M. A.

Sleiman, H. Hakonarson // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine – 2017. – Vol. 195 – № 4 – P. 456–463.

257. Ferreira, M. A. Shared genetic origin of asthma, hay fever and eczema elucidates allergic disease biology / M. A. Ferreira, J. M. Vonk, H. Baurecht, L. Paternoster // Nature Genetics – 2017. – Vol. 49 – № 12 – P. 1752–1757.

258. Vinall, L. E. Polymorphism of human mucin genes in chest disease: possible significance of MUC2 / L. E. Vinall, J. C. Fowler, A. L. Jones, H. J. Kirkbride, C. de Bolós, A. Laine, N. Porchet, J. R. Gum., Y. S. Kim, F. M. Moss, D. M. Mitchell, D. M. Swallow // American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology – 2013. – Vol. 23 – № 5 – P. 678–686.

259. Laprise, C. Evidence for association and linkage between atopy, airway hyper-responsiveness, and the beta subunit Glu237Gly variant of the high-affinity receptor for immunoglobulin E in the French-Canadian population. / C. Laprise, L. P. Boulet, J. Morissette, E. Winstall, V. Raymond // Immunogenetics – 2000. – Vol. 51 – № 8–9 – P. 695–702.

260. Izuhara, K. Atopy and the human IL-4 receptor  $\alpha$  chain / K. Izuhara, Y. Yanagihara, N. Hamasaki, T. Shirakawa, J. M. Hopkin // Journal of Allergy and Clinical Immunology – 2000. – Vol. 106 – № 1 – P. S65–S71.

261. Nieuwenhuis, M. A. Combining genomewide association study and lung eQTL analysis provides evidence for novel genes associated with asthma / M. A. Nieuwenhuis, M. Siedlinski, M. van den Berge, R. Granell, X. Li, M. Niens, P. van der Vlies, J. Altmüller, P. Nürnberg, M. Kerkhof, O. C. van Schayck, R. A. Riemersma, T. van der Molen, J. G. de Monchy, Y. Bossé, A. Sandford, C. A. Bruijnzeel-Koomen, R. G. van Wijk, N. H. ten Hacken, W. Timens, H. M. Boezen, J. Henderson, M. Kabesch, J. M. Vonk, D. S. Postma, G. H. Koppelman // Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology – 2016. – Vol. 71 – № 12 – P. 1712–1720.

262. Lin, J. Telomeres and lifestyle factors: roles in cellular aging / J. Lin, E. Epel, E. Blackburn // Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis – 2012. – Vol. 730 – № 1–2 – P. 85–89.



263. Njajou, O. T. Telomere length is paternally inherited and is associated with parental lifespan / O. T. Njajou, R. M. Cawthon, C. M. Damcott, S.-H. Wu, S. Ott, M. J. Garant, E. H. Blackburn, B. D. Mitchell, A. R. Shuldiner, W.-C. Hsueh // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2007. – Vol. 104 – № 29 – P.1 2135–12139.
264. Costenbader, K. H. Immunosenescence and rheumatoid arthritis: does telomere shortening predict impending disease? / K. H. Costenbader, J. Prescott, R. Y. Zee, I. de Vivo // *Autoimmunity Reviews* – 2011. – Vol. 10 – № 9 – P. 569–573.
265. Ouellette, M.M. Subsenescent telomere lengths in fibroblasts immortalized by limiting amounts of telomerase / M. M. Ouellette, M. Liao, B.-S. Herbert, M. Johnson, S. E. Holt, H. S. Liss, J. W. Shay, W. E. Wright // *Journal of Biological Chemistry* – 2000. – Vol. 275 – № 14 – P. 10072–10076.
266. Frieri, M. Association between CD62 ligand on naïve and memory T cells and history of cow's milk hypersensitivity in atopic patients / M. Frieri, B. Bennuri, C. Dias, Y. C. Huang, P. Schaefer // *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* – 2004. – Vol. 92 – № 5 – P. 565–572.
267. Hirata, H. Th2 cell differentiation from naïve CD4+ T cells is enhanced by autocrine CC chemokines in atopic diseases / H. Hirata, T. Yukawa, A. Tanaka, T. Miyao, T. Fukuda, Y. Fukushima, K. Kurasawa, M. Arima // *Clinical and Experimental Allergy* – 2019. – Vol. 49 – № 4 – P. 474–483.
268. Turner, D. L. Biased generation and in situ activation of lung tissue-resident memory CD4 T Cells in the pathogenesis of allergic asthma / D. L. Turner, M. Goldklang, F. Cvetkovski, D. Paik, J. Trischler, J. Barahona, M. Cao, R. Dave, N. Tanna, J. M. D'Armiento, D. L. Farber // *The Journal of Immunology* – 2018. – Vol. 200 – № 5 – P. ji1700257.
269. O'Sullivan, S. Activated, cytotoxic CD8+ T Lymphocytes contribute to the pathology of asthma death / S. O'Sullivan, L. Cormican, J. L. Faul, S. Ichinohe, S. L. Johnston, C. M. Burke, L. W. Poulter // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* – 2001. – Vol. 164 – № 4 – P. 560–564.

270. Rensen, E. L. J. van Bronchial CD8 cell infiltrate and lung function decline in asthma / E. L. J. van Rensen, J. K. Sont, C. E. Evertse, L. N. A. Willems, T. Mauad, P. S. Hiemstra, P. J. Sterk // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* – 2005. – Vol. 172 – № 7 – P. 837–841.
271. Otter, I. den Lung function decline in asthma patients with elevated bronchial CD8, CD4 and CD3 cells / I. den Otter, L. N. A. Willems, A. van Schadewijk, S. van Wijngaarden, K. Janssen, R. C. de Jeu, J. K. Sont, P. J. Sterk, P. S. Hiemstra // *European Respiratory Journal* – 2016. – Vol. 48 – № 2 – P. 393–402.
272. Turner, D. L. Mucosal resident memory CD4 T cells in protection and immunopathology / D. L. Turner, D. L. Farber // *Frontiers in Immunology* – 2014. – Vol. 5 – P. 331.
273. Briceño, O. Reduced naïve CD8<sup>+</sup> T-cell priming efficacy in elderly adults / O. Briceño, A. Lissina, K. Wanke, G. Afonso, A. von Braun, K. Ragon, T. Miquel, E. Gostick, L. Papagno, K. Stiasny, D. A. Price, R. Mallone, D. Sauce, U. Karrer, V. Appay // *Aging Cell* – 2016. – Vol. 15 – № 1 – P. 14–21.
274. Donnini, A. Age-related susceptibility of naive and memory CD4 T cells to apoptosis induced by IL-2 deprivation or PHA addition / A. Donnini, F. Re, M. Bollettini, R. Moresi, S. Tesei, G. Bernardini, M. Provinciali // *Biogerontology* – 2005. – Vol. 6 – № 3 – P. 193–204.
275. Kanegane H. Expression of L-selectin (CD62L) discriminates Th1- and Th2-like cytokine-producing memory CD4<sup>+</sup> T cells / H. Kanegane, Y. Kasahara, Y. Niida, A. Yachie, S. Sugii, K. Takatsu, N. Taniguchi, T. Miyawaki // *Immunology* – 1996. – Vol. 87 – № 2 – P. 186–190.
276. Matsuzaki, S. Polarization of Th1/Th2 in human CD4<sup>+</sup> T cells separated by CD62L: Analysis by transcription factors / S. Matsuzaki, K. Shinozaki, N. Kobayashi, K. Agematsu // *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* – 2005. – Vol. 60 – № 6 – P. 780–787.
277. Tang, C. Seasonal comparison of cytokine profiles in atopic asthmatics and atopic non-asthmatics. / C. Tang, I. M. Rolland, C. Ward, R. Bish, F. Thien, E. H. Walters //

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine – 1996. – Vol. 154 – № 6 – P. 1615–1622.

278. Ly, N.P. Elevated allergen-induced IL-13 secretion predicts IgE elevation in children ages 2-5 years / N. P. Ly, Y .Li, D. L. Sredl, D. L. Perkins, P. W. Finn, S. T. Weiss, D. R. Gold // Journal of Clinical Immunology – 2005. – Vol. 25 – № 4 – P. 314–320.

279. Kelly, E .A. B. Inflammatory changes associated with circadian variation in pulmonary function in subjects with mild asthma / E. A. B. Kelly, J. J. Houtman, N. N. Jarjour // Clinical and Experimental Allergy – 2004. – Vol. 34 – № 2 – P. 227–233.

280. Seneviratne, S. L. Interleukin-4 promotes human CD8+ T cell expression of CCR7 / S. L. Seneviratne, A. P. Black, L. Jones, K. Di Gleria, A. S. Bailey, G. S. Ogg // Immunology – 2006. – Vol. 120 – № 1 – P. 66–72.

281. Fox, A. Exposure of Human CD8+ T Cells to Type-2 Cytokines Impairs Division and Differentiation and Induces Limited Polarization / A. Fox, K. L. Harland, K. Kedzierska, A. Kelso // Frontiers in Immunology – 2018. – Vol. 9 – P. 1141.

282. Lee, N. T-cell biology in aging, with a focus on lung disease / N. Lee, M. S. Shin, I. Kang // Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences – 2012. – Vol. 67 A – № 3 – P. 254–263.

283. Goronzy, J. J. T-cell senescence and contraction of T-cell repertoire diversity – catalysts of autoimmunity and chronic inflammation / J. J. Goronzy, C. M. Weyand // Arthritis Research and Therapy – 2003. – Vol. 5 – № 5 – P. 225–234.

284. Топтыгина, А. П. Возрастная динамика экспрессии изоформ CD45 Т-хелперами и Т-цитотоксическими лимфоцитами крови здоровых людей / А. П. Топтыгина, Е. Л. Семикина, Е. А. Копыльцова, В. А. Алешкин // Иммунология – 2014. – Vol. 4 – P. 229–232.

285. Britt-Compton, B. Structural stability and chromosome-specific telomere length is governed by cis-acting determinants in humans / B. Britt-Compton, J. Rowson, M. Locke, I. Mackenzie, D. Kipling, D. M. Baird // Human Molecular Genetics – 2006. – Vol. 15 – № 5 – P. 725–733.