

## **СОДЕРЖАНИЕ CD4<sup>+</sup> И CD8<sup>+</sup> ЭФФЕКТОРНЫХ КЛЕТОК ПАМЯТИ И ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ**

**Барковская М.Ш., Блинова Е.А., Гришина Л.В., Леонова М.И.,  
Непомнящих В.М., Демина Д.В., Козлов В.А.**

*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,  
г. Новосибирск, Россия*

**Резюме.** Бронхиальная астма – хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, в патогенезе которого ключевая роль отводится Т-лимфоцитам. Считается, что сокращение числа наивных Т-клеток и накопление Т-лимфоцитов памяти при бронхиальной астме сопровождаются функциональными изменениями Т-лимфоцитов. В данном исследовании был изучен субпопуляционный состав Т-лимфоцитов в периферической крови, в нестимулированной и РНА-стимулированной культурах, а также пролиферативная активность Т-клеточных субпопуляций у пациентов с бронхиальной астмой и здоровых доноров. В исследование было включено 10 пациентов с бронхиальной астмой (возраст 45,4±11,8 лет). Одна половина пациентов находилась в стадии ремиссии, вторая половина – в стадии обострения основного заболевания. Доноры подбирались по полу и возрасту. Методом проточной цитофлуориметрии по экспрессии маркеров CD45R0, CD62L и CD197(CCR7) CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-лимфоциты были разделены на центральные (T<sub>cm</sub>) и эффекторные клетки памяти (T<sub>em</sub>), наивные Т-лимфоциты (T<sub>naïve</sub>) и терминально-дифференцированные эффекторы (T<sub>emra</sub>). В качестве функционального показателя была исследована пролиферативная активность T<sub>cm</sub>, T<sub>em</sub> и T<sub>naïve</sub> в ответ на РНА. В ходе исследования было установлено, что содержание CD4<sup>+</sup>T<sub>em</sub>CD62L<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>T<sub>em</sub>CD62L<sup>+</sup> в периферической крови у пациентов в стадии обострения астмы было значимо снижено по сравнению с донорами. При стимуляции РНА данные различия в субпопуляционном составе между группами пациентов и доноров нивелировались. Также было обнаружено наличие положительной корреляции относительного количества CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток памяти с возрастом у пациентов с бронхиальной астмой, которая отсутствовала у доноров. Анализ митоген-индуцированной пролиферации показал, что наиболее активно делились T<sub>cm</sub> и T<sub>naïve</sub> клетки как у пациентов, так и у доноров. При этом пролиферативная активность CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов и субпопуляций CD8<sup>+</sup>T<sub>cm</sub>, CD4<sup>+</sup>T<sub>em</sub> и CD4<sup>+</sup>T<sub>em</sub>62L<sup>-</sup> была выше в группе пациентов с ремиссией астмы, чем в группах пациентов, находящихся в обострении, и здоровых доноров. Выявленное увеличение относительного количества Т-клеток памяти с возрастом позволяет предполагать их участие в процессе развития бронхиальной астмы. Сопоставимая с донорскими значениями пролиферативная реакция изученных субпопуля-

**Адрес для переписки:**

Барковская Маргарита Шамилевна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
фундаментальной и клинической иммунологии»  
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.  
Тел.: 8 (383) 227-01-35.  
Тел./факс: 8 (383) 222-70-28.  
E-mail: margaritabarkovskaya@gmail.com

**Address for correspondence:**

Barkovskaya Margarita Sh.  
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology  
630099, Russian Federation, Novosibirsk,  
Yadrintsevskaya str., 14.  
Phone: 7 (383) 227-01-35.  
Phone/Fax: 7 (383) 222-70-28.  
E-mail: margaritabarkovskaya@gmail.com

**Образец цитирования:**

М.Ш. Барковская, Е.А. Блинова, Л.В. Гришина,  
М.И. Леонова, В.М. Непомнящих, Д.В. Демина,  
В.А. Козлов «Содержание CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> эффекторных  
клеток памяти и пролиферативная активность  
Т-лимфоцитов при бронхиальной астме»  
// Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 3.  
С. 503-516. doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-503-516  
© Барковская М.Ш. и соавт., 2019

**For citation:**

M.Sh. Barkovskaya, E.A. Blinova, L.V. Grishina,  
M.I. Leonova, V.M. Nepomniashchikch, D.V. Demina,  
V.A. Kozlov "Contents of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> effector memory  
cells and proliferative activity of T lymphocytes in bronchial  
asthma", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya  
Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 503-516.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-503-516  
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-503-516

ций говорит о сохранности функциональных свойств Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов при бронхиальной астме. Усиление пролиферации отдельных супопуляций у пациентов, находящихся в ремиссии бронхиальной астмы свидетельствует об активированном статусе Т-клеток памяти. Обнаруженное снижение количества CD4<sup>+</sup>TemCD62L<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>TemCD62L<sup>+</sup> у пациентов в обострении, на наш взгляд, может быть связано с активным воспалительным процессом в бронхиальном дереве.

*Ключевые слова: иммунопатология, бронхиальная астма, Т-клетки памяти, наивные Т-клетки, PHA-стимуляция, пролиферативная активность*

## **CONTENTS OF CD4<sup>+</sup> AND CD8<sup>+</sup> EFFECTOR MEMORY CELLS AND PROLIFERATIVE ACTIVITY OF T LYMPHOCYTES IN BRONCHIAL ASTHMA**

**Barkovskaya M.Sh., Blinova E.A., Grishina L.V., Leonova M.I., Nepomniashchikh V.M., Demina D.V., Kozlov V.A.**

*Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation*

**Abstract.** Bronchial asthma is a chronic inflammatory disease of the respiratory tract. T-lymphocytes play a key role in pathogenesis of this allergic disease. The reduction in number of naïve T cells and the accumulation of memory T cells in bronchial asthma are accompanied by dysregulation of T lymphocyte function. In present study, we have investigated the contents of different T lymphocyte subpopulations in peripheral blood as well as in resting and PHA-stimulated cultures, along with their proliferative capacity in patients with bronchial asthma and healthy donors. The study included 10 patients with bronchial asthma (age 45.4±11.8 years). One-half of patients was in remission state, the others having been at the stage of clinical exacerbation. The group of donors was formed by healthy individuals matched by gender and age to the patients. Based on expression of cell surface markers CD45R0, CD62L and CD197 (CCR7), the CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>T lymphocytes were divided into central (Tcm) and effector memory cells (Tem), naïve T lymphocytes (Tnaïve) and terminally differentiated effector cells (Temra) using flow cytometry technique. The proliferative activity of Tcm, Tem and Tnaïve was evaluated in response to PHA as a functional marker of T cells. We have found that the percentage of peripheral CD4<sup>+</sup>TemCD62L<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>TemCD62L<sup>+</sup> cells in the patients with asthma exacerbation was significantly reduced, if compared to the donors. Following PHA stimulation, these differences in T cell subsets between the groups of patients and donors were not detectable. We performed a correlation analysis between the memory T cell contents and age of the subjects studied. It was shown that the relative amounts of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> memory cells increased with age in asthmatics, but not in healthy donors. Analysis of mitogen-induced proliferation showed that Tcm and Tnaïve cells proliferated more actively than other subpopulations in both groups. Meanwhile, the proliferative activity of CD4<sup>+</sup>T lymphocytes and subsets of CD8<sup>+</sup>Tcm, CD4<sup>+</sup>Tcm and CD4<sup>+</sup>Tem62L<sup>-</sup> was higher in the group of asthma patients in remission state than in the patients with exacerbating disease, and healthy donors. The revealed increase in the relative number of memory T cells with age suggests that these cells participate in development of bronchial asthma. Proliferative response of the studied subpopulations, which was comparable to the donor values, suggests a functional maintenance of memory T cells and naïve T lymphocytes in bronchial asthma. The increased proliferation of some T-cell subpopulations in asthmatics in remission suggests an activated state of memory T cells. The observed decrease in the number of CD4<sup>+</sup>TemCD62L<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>TemCD62L<sup>+</sup> in patients with asthma exacerbation may be, by our opinion, associated with an active inflammatory process in the airways.

*Keywords: immunopathology, bronchial asthma, memory T cells, naïve T cells, PHA-stimulation, proliferation*

## Введение

Бронхиальная астма (БА) – хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, в котором принимают участие различные иммунокомпетентные клетки и клеточные элементы. Астма представляет собой глобальную проблему здравоохранения, в мире насчитывается около 300 млн больных с верифицированным диагнозом БА [10]. В настоящее время сформировано мнение о существовании разных фенотипов БА в зависимости от возраста манифестации заболевания и выраженности эозинофильного воспаления [3, 18]. Считается, что клиническая неоднородность данного заболевания обусловлена участием различных видов Т-лимфоцитов в его развитии [14, 29].

Главной функцией Т-лимфоцитов является развитие иммунного ответа на антигенные стимулы с последующим формированием иммунологической памяти. Иммунологическая память реализуется Т-лимфоцитами памяти ( $CD45R0^+$ ), среди которых выделяют центральные ( $T_{cm}$ ,  $CD45R0^+CD62L^+CCR7^+$ ) и эффекторные ( $T_{em}$ ,  $CD45R0^+CD62L^-CCR7^-$ ) Т-клетки памяти. За счет экспрессии определенных молекул хоуминга на своей поверхности  $T_{cm}$  занимают Т-зоны периферических лимфоидных органов и способны к пролиферации и дифференцировке в эффекторные клетки в ответ на повторное воздействие антигена.  $T_{em}$ , напротив, мигрируют в органы и ткани для выполнения эффекторных функций на периферии [21]. Также выделяют субпопуляцию терминально-дифференцированных  $CD45RA$ -позитивных Т-клеток памяти ( $T_{emg}$ ), которые преобладают среди  $CD8^+$  лимфоцитов [15, 21]. Показано, что с возрастом количество клеток памяти увеличивается, тогда как численность наивных Т-лимфоцитов ( $T_{naïve}$ ,  $CD45R0^-$ ) уменьшается [22]. Поддержание соотношения  $T_{cm}$ ,  $T_{em}$  и  $T_{naïve}$  лимфоцитов нарушается при иммунопатологии, в том числе при БА [16, 24]. Экспериментальные данные свидетельствуют, что резидентные аллерген-специфичные Т-клетки памяти накапливаются в легочной ткани в результате сенсибилизации и могут приводить к развитию БА [11]. Также у пациентов с БА обнаружено повышенное содержание  $CD4^+$  Т-клеток памяти, которое сопровождается такими функциональными изменениями, как повышенная продукция  $IL-5$ ,  $IL-17$  и снижение синтеза  $IFN\gamma$  [4].

Одним из функциональных показателей Т-клеток памяти является их пролиферативный потенциал, который снижен по сравнению

с наивными Т-лимфоцитами [27]. Однако при БА данные о пролиферации клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов отсутствуют. Основной целью данной работы было изучение субпопуляционного состава и пролиферативной активности Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в периферической крови и в клеточных культурах *in vitro* у пациентов с БА в сравнении со здоровыми донорами.

## Материалы и методы

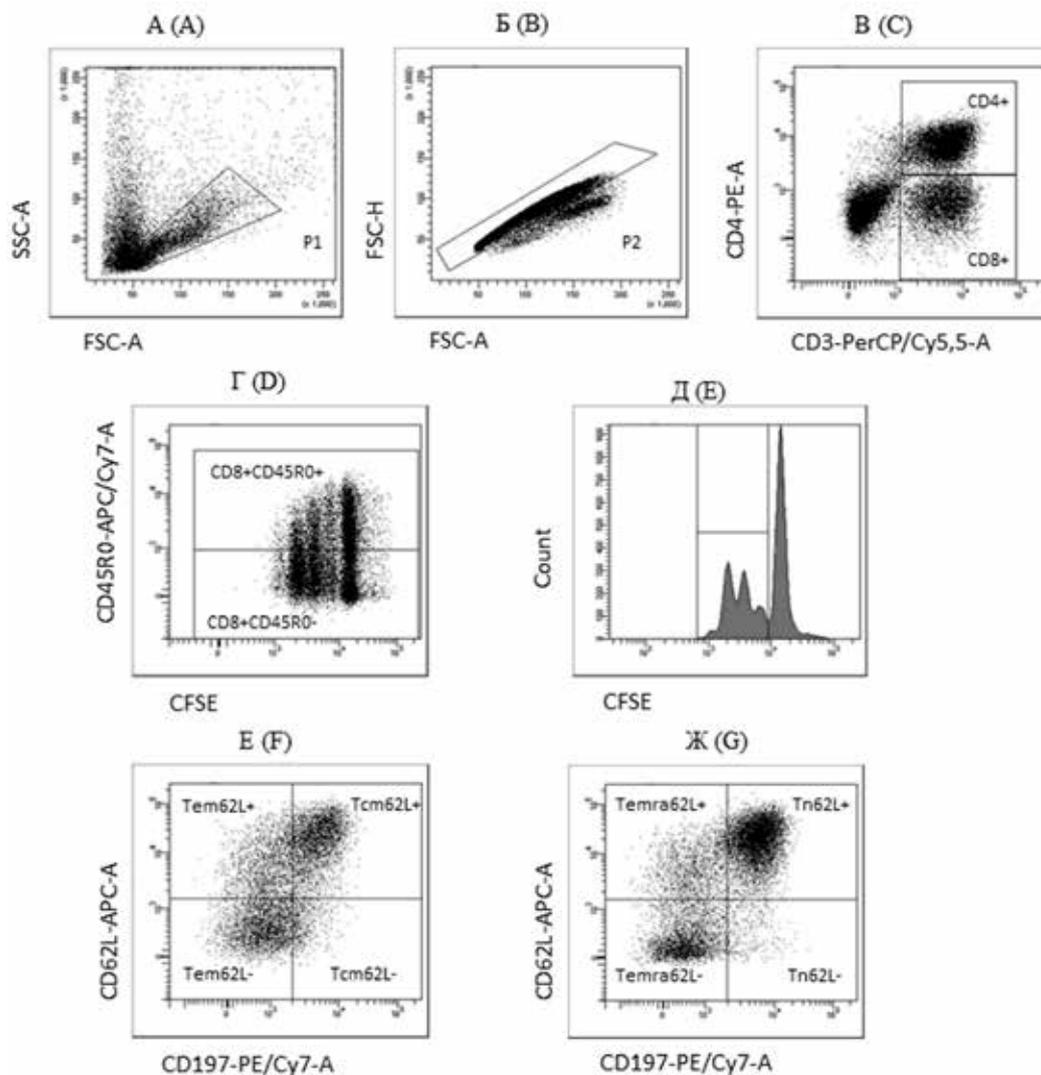
В исследование вошли 10 пациентов с БА (7 женщин и 3 мужчин), в возрасте от 23 до 60 лет (средний возраст  $45,4 \pm 11,8$  лет). На момент забора материала 5 пациентов находились в состоянии ремиссии, 5 пациентов – в состоянии обострения основного заболевания. Группа условно здоровых доноров составила 10 человек (7 женщин и 3 мужчин), в возрасте от 24 до 60 лет (средний возраст  $46,2 \pm 11,4$  года). Отбор пациентов и доноров в группы производился с их предварительного информированного письменного согласия. Диагноз БА выставлялся врачами клиники иммунопатологии НИИФКИ в соответствии с GINA-2016.

### Метод получения и культивирования клеток периферической крови

Мононуклеарную фракцию выделяли из гепаринизированной периферической крови (ПК) в градиенте плотности фиколл-урографина стандартной методикой. Клетки культивировали в 96-луночных плоскодонных планшетах в объеме 200 мкл в концентрации 150 тыс. на 100 мкл среды 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, США) в течение 72 часов в  $CO_2$ -инкубаторе при  $37^\circ C$ . В качестве стимулятора митоза Т-лимфоцитов добавляли фитогемагглютинин (PHA) в конечной концентрации 30 мкг/мл (PHA-P, Sigma). В качестве контроля использовались клетки, культивированные без добавления PHA. Перед культивированием клетки окрашивали витальным красителем CFSE (Molecular probe, США) с конечной концентрацией 1 мкМ в RPMI 1640 в течение 15 мин при  $37^\circ C$ . Избыток красителя удаляли путем добавления эквивалентного объема FCS.

### Проточная цитофлуориметрия

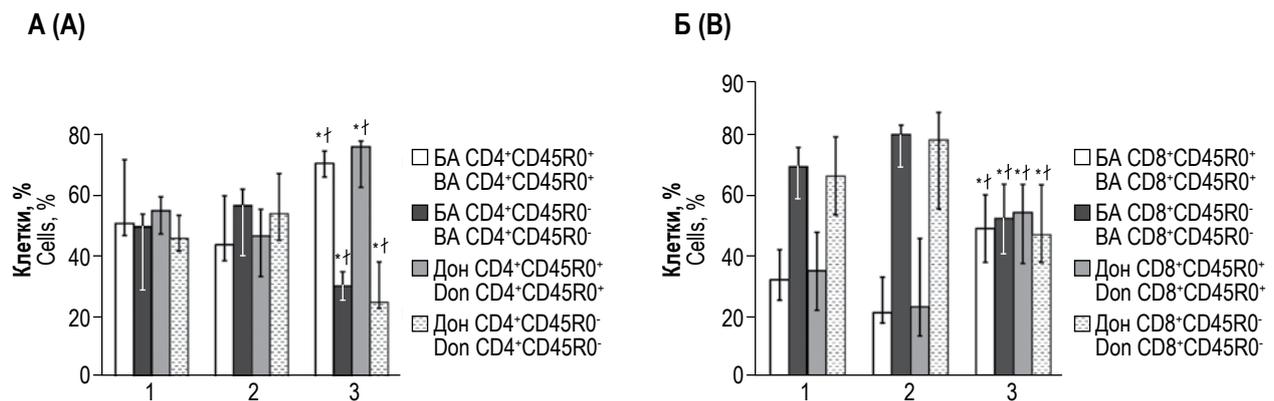
Клетки после 72 часов культивирования снимали, отмывали забуференным физиологическим раствором и окрашивали моноклональными антителами к поверхностным маркерам центральных и эффекторных Т-клеток памяти. Для анализа Т-клеток памяти до культивирова-



**Рисунок 1. Тактика 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, на рисунках 4-6: Tnaive – «наивные» Т-лимфоциты с фенотипом CD45R0<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD197(CCR7)<sup>+</sup>; Tcm – клетки центральной памяти с фенотипом CD45R0<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD197(CCR7)<sup>+</sup>; Tem – клетки эффекторной памяти с фенотипом CD45R0<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD197(CCR7)<sup>+</sup>; Temra – терминально-дифференцированные Т-клетки памяти с фенотипом CD45R0<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD197(CCR7)<sup>+</sup>. (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 высоты 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 CD45R0. (Д) Гистограмма флуоресценции цитотоксических Т-лимфоцитов, окрашенных CFSE, прошедших 4 деления *in vitro*. (Е) Разделение цитотоксических Т-клеток памяти на Tcm и Tem по экспрессии маркеров CD62L и CD197(CCR7). (Ж) Выделение субпопуляций Tnaive и Temra по экспрессии маркеров CD62L и CD197(CCR7).

Figure 1. The gating strategy for identification of naive T lymphocytes, central and effector memory T cells and terminal-differentiated T lymphocytes on the example of cytotoxic T lymphocytes cultivated for 72 hours in the presence of PHA *in vitro*  
Note. Here and below on figures 4-6: Tnaive, naive CD45R0<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD197(CCR7)<sup>+</sup> T cells; Tcm, central memory CD45R0<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD197(CCR7)<sup>+</sup> T cells; Tem, effector memory CD45R0<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD197(CCR7)<sup>+</sup> T cells; Temra, terminally differentiated CD45R0<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD197(CCR7)<sup>+</sup> T cells. (A) Identification of peripheral blood lymphocytes based on forward (FSC) and side light scattering (SSC). (B) Singlet gating based on area FSC versus high FSC. (C) Th and Tcyt lymphocytes were identified based on expression of CD3 and CD4. (D) Separation of cytotoxic T-lymphocytes into a subpopulation of naive T-lymphocytes and memory cells by the expression of the CD45R0 marker. (E) A fluorescence histogram of cytotoxic T-lymphocytes passed 4 divisions *in vitro* (CFSE-staining). (F) Total cytotoxic memory T cells subset was separated into Tcm and Tem by the expression of CD62L and CD197 markers (CCR7). (G) Identification of subpopulations of Tnaive and Temra by the expression of CD62L and CD197 (CCR7) markers.



**Рисунок 2.** Экспрессия маркера CD45R0 на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитах периферической крови и в 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 (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>). (А) CD4<sup>+</sup>Т-лимфоциты; (Б) CD8<sup>+</sup>Т-лимфоциты; 1 – клетки периферической крови до культивирования; 2 – нестимулированная культура; 3 – РНА-стимулированная культура; \* – указаны достоверные различия с клетками до культивирования (p < 0,05, тест Вилкоксона); † – указаны достоверные различия с клетками нестимулированной культуры (p < 0,05, тест Вилкоксона).

Figure 2. CD45R0 expression at CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>T lymphocytes of peripheral blood and in cultures in patients with BA and healthy donors

Note. The number of cells in the populations of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>T lymphocytes is taken for 100%. The histogram shows the medians and interquartile ranges (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>). (A) CD4<sup>+</sup>T lymphocytes; (B) CD8<sup>+</sup>T lymphocytes. 1, peripheral blood cells before cultivation; 2, unstimulated culture; 3, PHA-stimulated culture; \*, significant differences with cells before cultivation are indicated (p < 0.05, Wilcoxon test); †, significant differences with unstimulated cells are indicated (p < 0.05, Wilcoxon test).

ния брали свежесыведенные клетки. Применялась следующая панель: CD4-PE (Сорбент, Россия), CD3-PerCP/Cy5.5 (BioLegend, San Diego, CA, США), CD62L-APC (BioLegend, San Diego, CA, США), CD45R0-APC/Cy7 (BioLegend, San Diego, CA, США), CD197 (CCR7)-PE-Cy7 (Beckman Coulter, США) и CD197 (CCR7)-FITC (BioLegend, San Diego, CA, США). 6 × 10<sup>5</sup> клеток окрашивали данной комбинацией антител по протоколу, рекомендованному производителем. Для анализа CD62L- и CD197-маркеров применялся FMO-контроль (fluorescence minus one), который включал всю панель, за исключением антител к указанным антигенам. Анализ фенотипа Т-клеток проводился на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD, США) с использованием программного обеспечения FACS Diva (BD, США). Субпопуляции с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD4<sup>±</sup>CD45R0<sup>±</sup>CD62L<sup>±</sup>CD197(CCR7)<sup>±</sup> оценивались как наивные Т-клетки хелперы или цитотоксические лимфоциты соответственно. Центральным клеткам памяти соответствовал фенотип CD3<sup>+</sup>CD4<sup>±</sup>CD45R0<sup>±</sup>CD62L<sup>±</sup>CD197(CCR7)<sup>±</sup>. Эффекторные Т-лимфоциты памяти распознавались как CD3<sup>+</sup>CD4<sup>±</sup>CD45R0<sup>±</sup>CD62L<sup>±</sup>CD197(CCR7)<sup>-</sup>; CD45R0<sup>-</sup> эффекторные Т-клетки с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD4<sup>±</sup>CD197(CCR7)<sup>-</sup> определялись как субпопуляции терминально-диф-

ференцированных 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 (рис. 1Д).

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 доноров использовали критерий Манна–Уитни, для сравнения двух связанных групп применяли критерий Вилкоксона. Различия считали достоверными при уровне значимости p < 0,05. Ранговый корреляционный анализ Спирмена использовался для изучения связи параметров Т-клеток с возрастом в группах пациентов и доноров.

## Результаты

В процессе дифференцировки Т-лимфоцитов переход от наивных форм к эффекторным и клеткам памяти сопровождается сменой CD45-маркера с изотипа CD45RA на CD45R0. В груп-

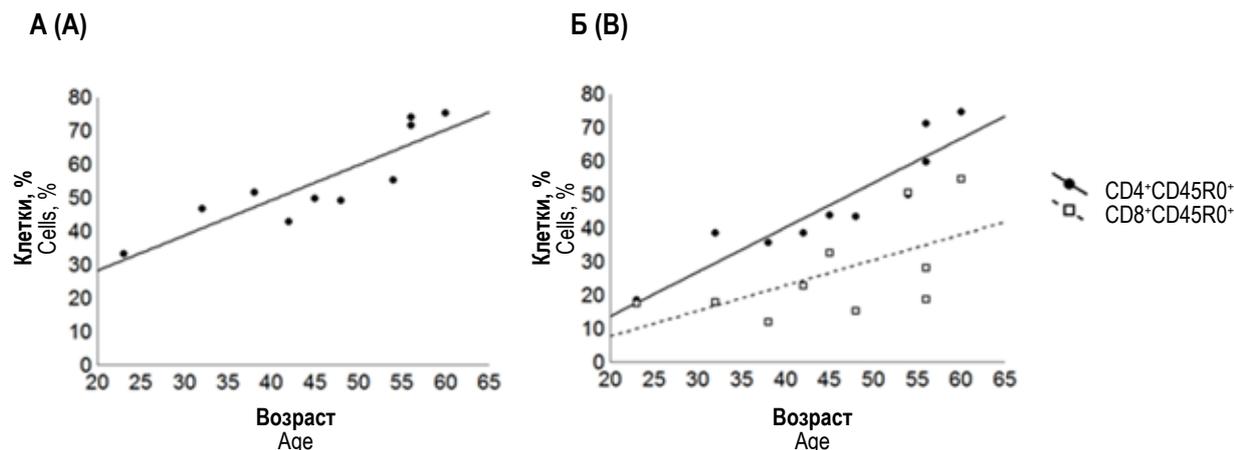


Рисунок 3. Корреляционная взаимосвязь количества CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> Т-лимфоцитов с возрастом у пациентов с БА

Примечание. За 100% принято число клеток в популяциях CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов соответственно. (А) CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> клетки периферической крови до культивирования, ( $R = 0,88, p < 0,001$ ); (Б) CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> клетки ( $R = 0,96, p < 0,001$ ) и CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> клетки ( $R = 0,63, p < 0,05$ ) в культурах без стимуляции.

Figure 3. Correlation of the percentage of CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> T lymphocytes with age in patients with BA

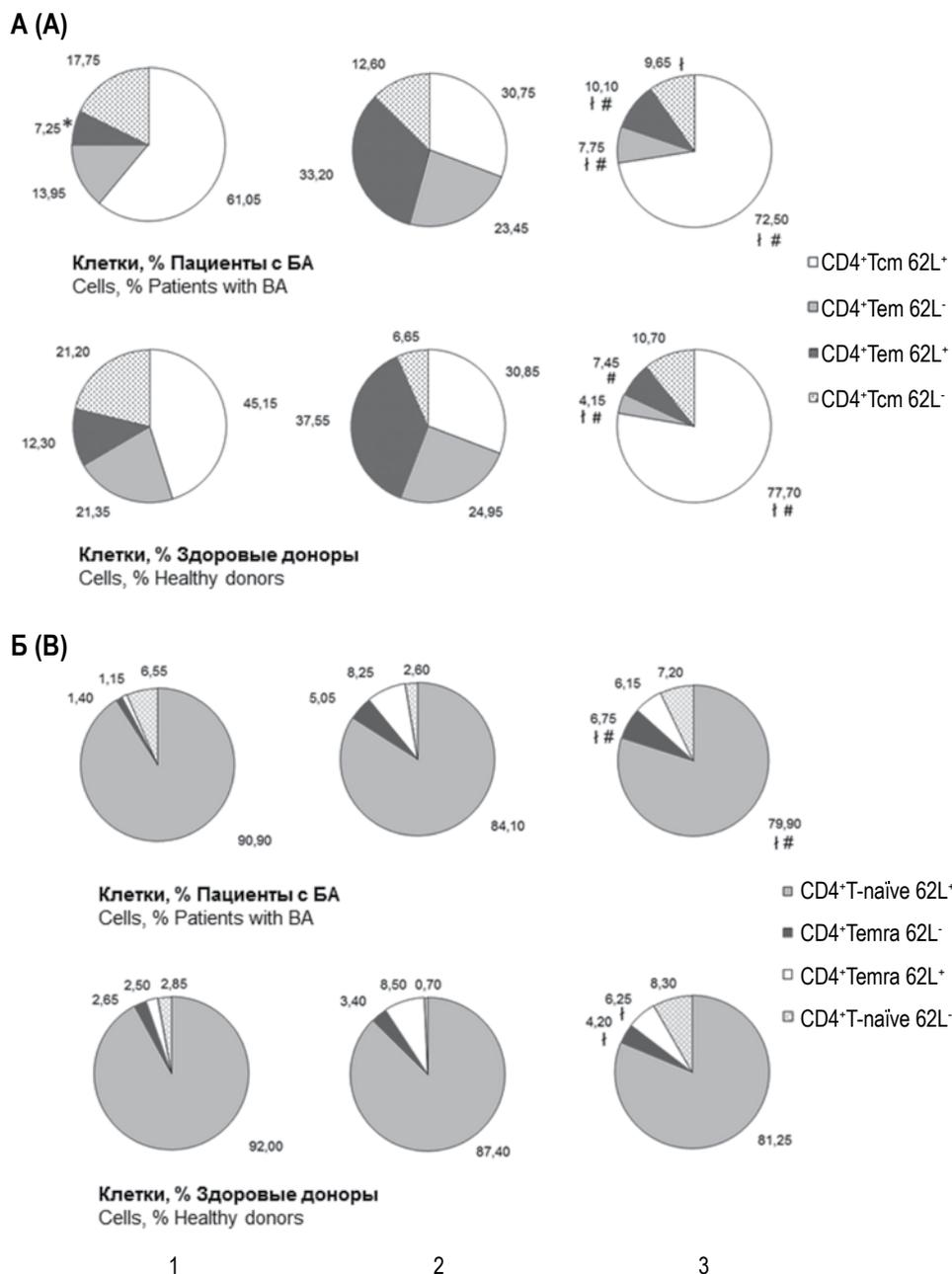
Note. The number of cells in the populations of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes is taken for 100%. The correlation analysis was carried out using the Spearman method. (A) CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> lymphocytes ( $R = 0.88, p < 0.001$ ) from peripheral blood before culturing; (B) CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> lymphocytes ( $R = 0.96, p < 0.001$ ) and CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> lymphocytes ( $R = 0.63, p < 0.05$ ) from unstimulated culture.

пах пациентов и доноров среди CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов экспрессия маркера CD45R0 достоверно возрастала после стимуляции РНА по сравнению с клетками периферической крови (рис. 2А, Б). Экспрессия CD45R0 в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клетках культуры без стимуляции не отличалась от клеток периферической крови и была достоверно ниже, чем показатели РНА-стимулированных лимфоцитов. Относительное количество CD45R0-негативных клеток, напротив, снижалось после стимулирования РНА (рис. 2А, Б). Интересно, что экспрессия маркера CD45R0 на CD8<sup>+</sup> лимфоцитах периферической крови и в культуре без стимуляции была ниже, чем на CD4<sup>+</sup> лимфоцитах.

Представлялось интересным выяснить взаимосвязь возраста с содержанием CD45R0<sup>+</sup> клеток. Было обнаружено, что относительное количество CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> клеток периферической крови положительно коррелирует с возрастом у пациентов с БА (рис. 3А). Также 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 (рис. 3Б). В РНА-стимулированной культуре у пациентов с БА корреляции не было выявлено. В то же время содержание Tnaïve, которые определялись как CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup> и CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup> клетки, было обратно пропорционально возрасту в периферической крови и в нестимулированной культуре у пациентов с БА. У здоровых доноров

достоверные корреляции между изучаемыми параметрами отсутствовали.

Дальнейшее изучение субпопуляционного состава CD45R0<sup>+</sup> и CD45R0<sup>-</sup> клеток проводилось с одновременным использованием маркеров CCR7 и CD62L, которые являются молекулами хоуминга для Т-лимфоцитов и позволяют надежно разделить Т-клетки памяти на центральные и эффекторные [21]. Анализ субпопуляционного состава CD4<sup>+</sup> лимфоцитов показал, что у пациентов с БА в периферической крови достоверно снижено содержание Tcm62L<sup>+</sup> клеток по сравнению со здоровыми донорами (рис. 4А). После стимуляции РНА это отличие отсутствовало. При этом после стимуляции митогеном у пациентов повышалось содержание Tcm62L<sup>+</sup>, тогда как у доноров содержание Tcm62L<sup>+</sup> достоверно не изменялось относительно показателей периферической крови. Другие клеточные субпопуляции в ответ на стимуляцию РНА также изменялись по сравнению с показателями периферической крови. Относительное количество Tcm62L<sup>+</sup> клеток достоверно повышалось в группах пациентов и доноров. Тогда как содержание Tcm62L<sup>-</sup> снижалось, но достоверно только в группе пациентов с БА. Содержание CD4<sup>+</sup>Tcm62L<sup>-</sup> после стимуляции РНА повышалось по сравнению с периферической кровью и у доноров, и у пациентов. В субпопуляции CD4<sup>+</sup>Tnaïve происходило снижение числа 62L-позитивных клеток, но оно было достоверным только в группе пациентов (рис. 4Б).



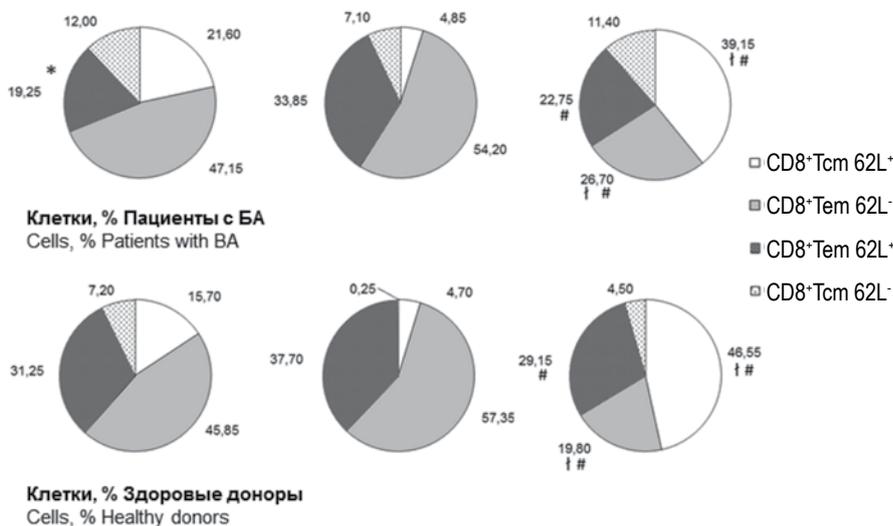
**Рисунок 4. Соотношение субпопуляций наивных Т-лимфоцитов, центральных, эффекторных Т-клеток памяти и терминально-дифференцированных CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов в периферической крови и в культурах у пациентов с БА и здоровых доноров**

**Примечание.** За 100 % принято число клеток в популяциях CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup>Т-лимфоцитов. На диаграмме представлены медианы. (А) CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup>Т-лимфоциты; (Б) CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup>Т-лимфоциты; 1 – клетки периферической крови до культивирования; 2 – нестимулированная культура; 3 – PHA-стимулированная культура; † – указаны достоверные различия с клетками периферической крови до культивирования (p < 0,05, тест Вилкоксона); # – указаны достоверные различия с клетками нестимулированной культуры (p < 0,05, тест Вилкоксона); \* – указаны достоверные различия между группами пациентов с БА и здоровых доноров (p < 0,05, Манна–Уитни U-тест).

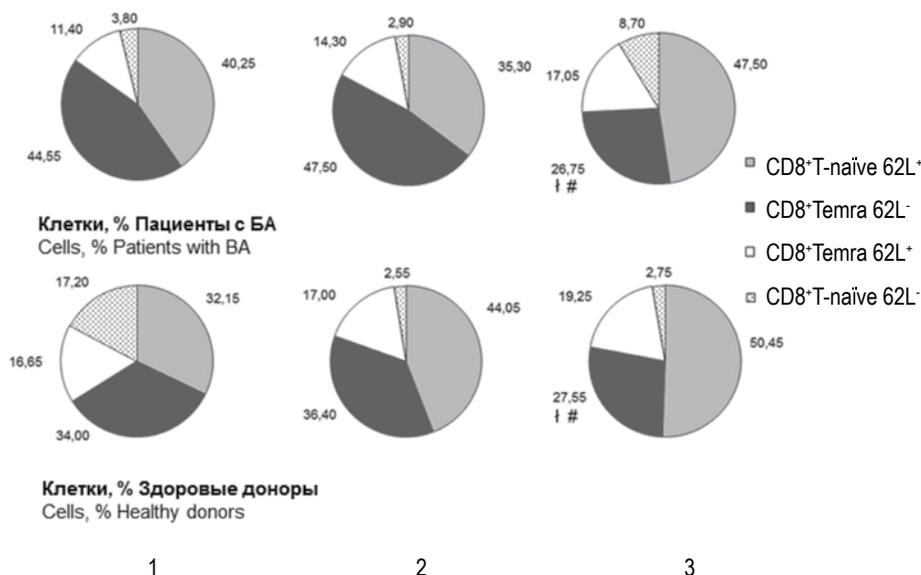
Figure 4. The subpopulations of naïve, central and effector memory CD4<sup>+</sup>T cells and terminal-differentiated CD4<sup>+</sup>T lymphocytes in peripheral blood and in cultures in patients with BA and healthy donors

Note. The number of cells in the populations of CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup>T lymphocytes is taken for 100%. The diagram shows the medians. (A) CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup>T lymphocytes; (B) CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup>T lymphocytes; 1, peripheral blood cells before cultivation; 2, unstimulated culture; 3, PHA-stimulated culture; †, significant differences with cells before cultivation are indicated (p < 0.05, Wilcoxon test); #, significant differences with unstimulated cells are indicated (p < 0.05, Wilcoxon test); \*, significant differences between the relevant groups (p < 0.05, Mann–Whitney U-test).

**А (А)**



**Б (Б)**

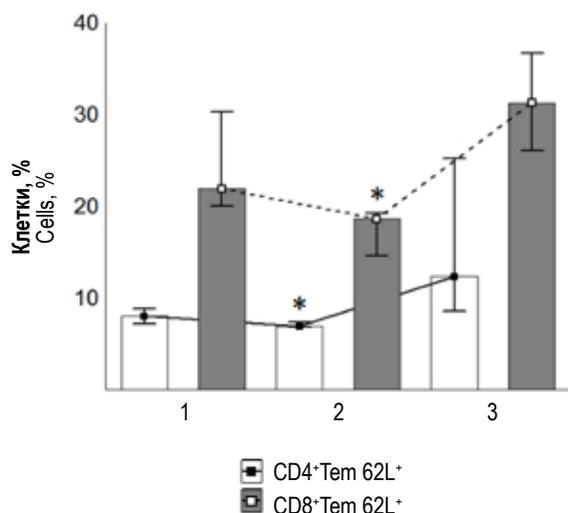


**Рисунок 5. Соотношение субпопуляций наивных Т-лимфоцитов, центральных, эффекторных Т-клеток памяти и терминально-дифференцированных CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов в периферической крови и в культурах у пациентов с БА и здоровых доноров**

Примечание. За 100 % принято число клеток в популяциях CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup>Т-лимфоцитов. На диаграмме представлены медианы. (А) CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup>Т-лимфоциты; (Б) CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup>Т-лимфоциты; 1 – клетки периферической крови до культивирования; 2 – нестимулированная культура; 3 – РНА-стимулированная культура; † – указаны достоверные различия с клетками до культивирования (p < 0,05, тест Вилкоксона); # – указаны достоверные различия с нестимулированными клетками (p < 0,05, тест Вилкоксона); \* – указаны достоверные различия между группами пациентов с БА и здоровых доноров (p < 0,05, Манна–Уитни U-тест).

Figure 5. The subpopulations of naïve, central and effector memory CD8<sup>+</sup>T cells and terminal-differentiated CD8<sup>+</sup>T lymphocytes in peripheral blood and in cultures in patients with BA and healthy donors

Note. The number of cells in the populations of CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup>T lymphocytes is taken for 100%. The diagram shows the medians. (A) CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup>T lymphocytes; (B) CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup>T lymphocytes; 1, peripheral blood cells before cultivation; 2, unstimulated culture; 3, PHA-stimulated culture; †, significant differences with cells before cultivation are indicated (p < 0.05, Wilcoxon test); #, significant differences with unstimulated cells are indicated (p < 0.05, Wilcoxon test); \*, significant differences between the relevant groups (p < 0.05, Mann–Whitney U-test).



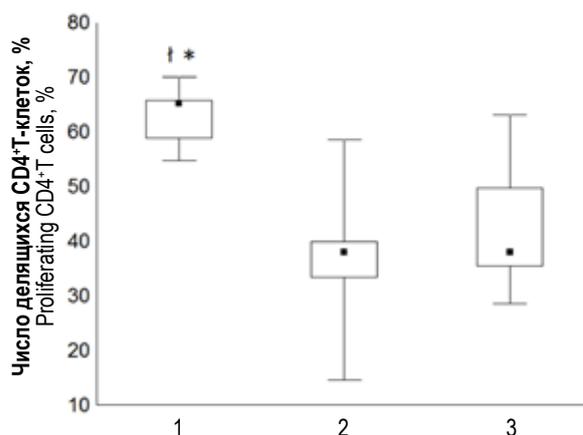
**Рисунок 6.** Содержание CD4<sup>+</sup>Tem62L<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Tem62L<sup>+</sup> клеток в периферической крови у пациентов с БА в стадии ремиссии, в обострении и у здоровых доноров  
Примечание. За 100% принято число клеток в популяциях CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup>Т-лимфоцитов соответственно. На гистограмме представлены медианы и интерквартильные размахи (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>). 1 – пациенты с БА в стадии ремиссии; 2 – пациенты с БА в стадии обострения; 3 – здоровые доноры; \* – указаны достоверные различия с группой доноров (p < 0,05, Манна–Уитни U-тест).

Figure 6. CD4<sup>+</sup>Tem62L<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>Tem62L<sup>+</sup> cells in peripheral blood in patients with BA in remission, in exacerbation and in healthy donors

Note. The number of cells in the populations of CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup>T lymphocytes is taken for 100%. 1, patients with BA in remission; 2, patients with BA in exacerbation; 3, healthy donors; \*, significant differences with group of healthy donors are indicated (p < 0.05, Mann–Whitney U-test).

Интересно, что в отличие от периферической крови в культуре без стимуляции не было субпопуляционных различий между Т-лимфоцитами пациентов и доноров. Но содержание Tem62L<sup>+</sup> клеток в культуре без стимуляции было достоверно больше, а Tcm62L<sup>+</sup> достоверно меньше, чем в РНА-стимулированной культуре, как в группе пациентов, так и доноров.

Субпопуляционный состав CD8<sup>+</sup> лимфоцитов во многом был сходен с CD4<sup>+</sup>. Во-первых, у пациентов с БА также было достоверно снижено количество CD8<sup>+</sup>Tem62L<sup>+</sup> в периферической крови по сравнению со здоровыми донорами. Во-вторых, в стимулированных клетках и в культуре без стимуляции отличий по этой субпопуляции между пациентами и донорами не было (рис. 5А). И у доноров, и у пациентов содержание CD8<sup>+</sup>Tcm62L<sup>+</sup> клеток было достоверно выше, а CD8<sup>+</sup>Tem62L<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Temra62L<sup>+</sup> – достоверно



**Рисунок 7.** Количество пролиферирующих CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов в ответ на стимуляцию РНА у пациентов с БА в стадии ремиссии, в обострении и у здоровых доноров

Примечание. За 100% принято общее количество CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов в культуре. Данные представлены в виде медианы, минимальных и максимальных значений и интерквартильных размахов (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>). 1 – пациенты с БА в стадии ремиссии; 2 – пациенты с БА в стадии обострения; 3 – здоровые доноры; † – указаны достоверные различия с группой пациентов с БА, находящихся в обострении (p < 0,05, Манна–Уитни U-тест); \* – указаны достоверные различия с группой доноров (p < 0,01, Манна–Уитни U-тест).

Figure 7. The number of proliferating CD4<sup>+</sup>T lymphocytes in response to PHA-stimulation in patients with BA in remission, in exacerbation and healthy donors

Note. The total number of CD4<sup>+</sup>T lymphocytes in culture is taken for 100%. Data in the diagram are given as median, interquartile range (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>) and minimum and maximum values for each variable. 1, patients with BA in remission; 2, patients with BA in exacerbation; 3, healthy donors; †, significant differences with group of BA patients in exacerbation (p < 0.05, Mann–Whitney U-test); \*, significant differences with group of healthy donors are indicated (p < 0.01, Mann–Whitney U-test).

ниже в РНА-стимулированной культуре по сравнению с клетками периферической крови и не-стимулированной культурой (рис. 5А, Б). Субпопуляция CD8<sup>+</sup>Tnaïve в процессе культивирования достоверно не изменялась ни в одной из групп.

Был изучен субпопуляционный состав CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов при разных стадиях БА. Обнаружено, что количество CD4<sup>+</sup>Tem62L<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Tem62L<sup>+</sup> клеток статистически достоверно снижено у пациентов, находящихся в стадии обострения по сравнению с донорами (рис. 6). По другим субпопуляциям различий между группой доноров и группами пациентов обнаружено не было.

Спонтанная пролиферация Т-лимфоцитов в культуре без стимуляции доходила до 1,25%

в группе пациентов с БА и 0,4% в группе доноров. При анализе митотической активности клеток, стимулированных РНА, было показано, что митоз CD4<sup>+</sup> лимфоцитов у пациентов в стадии ремиссии БА был достоверно выше, чем у пациентов в обострении и здоровых доноров (рис. 7). При этом анализ по субпопуляциям показал, что у пациентов в стадии ремиссии пролиферация была достоверно выше среди CD4<sup>+</sup>Tem62L<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>Tcm62L<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>Tcm62L<sup>-</sup>, а также CD8<sup>+</sup>Tcm62L<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Tcm62L<sup>-</sup> лимфоцитов по сравнению с пациентами в стадии обострения и донорами. Сравнение проводилось между группами с использованием критерия Манна–Уитни (данные не представлены).

Со стороны CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов как у доноров, так и у пациентов наиболее активно делились Tcm62L<sup>+</sup> и Tnaïve62L<sup>+</sup> по сравнению с Tem62L<sup>+</sup>. У доноров среди CD4<sup>+</sup> лимфоцитов активнее всего делились Tcm62L<sup>+</sup> клетки, отличий между Tem62L<sup>+</sup> и Tnaïve62L<sup>+</sup> не было. Тогда как у пациентов с БА CD4<sup>+</sup>Tcm62L<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>Tnaïve62L<sup>+</sup> демонстрировали сходный уровень пролиферации. В то же время CD4<sup>+</sup>Tcm62L<sup>+</sup> делились активнее, чем CD4<sup>+</sup>Tem62L<sup>+</sup>. Анализ делений CD4<sup>+</sup>Temra и CD8<sup>+</sup>Temra не проводился в связи с недостаточным количеством клеток в этих субпопуляциях. При этом во всех изучаемых субпопуляциях пролиферация 62L-позитивных клеток была достоверно выше, чем у негативных по 62L клеток. Сравнение разных субпопуляций проводилось в пределах группы методом Вилкоксона (данные не представлены).

## Обсуждение

Изучению Т-клеток памяти при БА посвящен ряд работ. 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 [2]. Также повышение количества Т-клеток памяти связывают с изменением их функциональной активности и существованием различных эндотипов БА [4]. Количество Tnaïve клеток (CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup> и CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup>), по данным других авторов, не изменяется при БА, что согласуется с нашим исследованием [2, 27]. Хотя нам не удалось выявить изменение содержания Т-клеток памяти (CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup>) при БА, выявленное у пациентов увеличение количества Т-клеток памяти и снижение количества Tnaïve с возрастом может быть признаком более раннего старения иммунной системы пациентов по сравнению с донорами. Так, показано, что происхо-

дит снижение количества Tnaïve (CD45RA<sup>+</sup> клеток) у лиц пожилого возраста, причем у больных БА оно выражено сильнее, чем у здоровых [24]. Кроме того, накопление CD4<sup>+</sup> клеток памяти в периферической крови с возрастом происходит быстрее, чем CD8<sup>+</sup> клеток памяти [1]. Последним может объясняться отсутствие корреляции между возрастом и количеством CD8<sup>+</sup> клеток памяти в периферической крови у пациентов с БА. Отсутствие корреляции количества Т-клеток памяти с возрастом в РНА-стимулированной культуре свидетельствует о хорошей отвечаемости клеток на неспецифическую стимуляцию у пациентов с БА, которая сопоставима с донорами.

По данным литературы, точная роль различных субпопуляций Т-клеток памяти в патогенезе БА не установлена. Так, в проведенном недавно исследовании, наряду с функциональными изменениями Т-клеток памяти, было выявлено повышенное содержание TcmCD62L<sup>+</sup> и TemCD62L<sup>+</sup> в CD4<sup>+</sup> клетках периферической крови у пациентов с БА [4]. В другой работе было показано, что у взрослых пациентов с БА, вне зависимости от формы и степени тяжести заболевания, повышается число CD4<sup>+</sup>Tcm, но не CD4<sup>+</sup>Tem по сравнению с донорами, что не подтверждается данными нашего исследования [28]. На наш взгляд, обнаруженное снижение количества CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>Tem в периферической крови у пациентов, находящихся в обострении БА может быть свидетельством того, что активированные Tem мигрируют на периферию в стадии обострения БА и находятся преимущественно в дыхательных путях в виде резидентных Tem. Последнее подтверждается сообщениями о преобладании CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов с фенотипом клеток памяти в нижних дыхательных путях у пациентов с БА [11, 20]. При этом считается, что CD4<sup>+</sup>Т-клетки памяти при обострении БА активированы больше, чем в ремиссии и характеризуются сниженной чувствительностью к апоптозу [2, 13, 20]. Кроме того, в последних опытах на мышиных моделях показано, что именно резидентные тканевые CD4<sup>+</sup>Т-клетки памяти поддерживают сенсбилизацию к причинно-значимому аллергену и содействуют быстрой прогрессии патологического процесса в легочной ткани [25]. Хотя значение CD8<sup>+</sup>Т-клеток памяти менее изучено, признано, что активированные цитотоксические Т-лимфоциты, аналогично Т-хелперам, инфильтрируют дыхательные пути при БА, что ассоциировано со снижением функции внешнего дыхания и может служить предиктором неблагоприятного исхода БА [5, 19, 26].

Результаты субпопуляционного анализа также показали, что  $T_{cm}62L^+$  лимфоциты более чувствительны к РНА, чем другие субпопуляции Т-клеток памяти. А увеличение количества  $CD4^+T_{cm}62L^+$  у пациентов с БА в ответ на стимуляцию РНА может говорить о переходе  $T_{cm}$  в  $CD4^+T_{cm}62L^+$ . Так как было показано, что  $T_{cm}$  способны дифференцироваться в  $T_{em}$ , например под воздействием факторов гомеостатической пролиферации (IL-7, IL-15) [8, 9]. Также это свидетельствует о том, что у пациентов с БА  $T_{em}$  находятся в активированном состоянии. Подтверждением последнего служат данные о повышенной экспрессии CD25- и HLA-DR-маркеров и сниженной индукции апоптоза в  $CD4^+$  лимфоцитах у пациентов с БА [12, 23]. Снижение количества  $CD4^+T_{naïve}$  у пациентов с БА при стимулировании РНА может быть связано с их способностью переходить в клетки памяти [9]. Интересно, что количество  $CD8^+62L^+T_{em}$  не изменялось, а  $CD8^+62L^-T_{em}$  уменьшалось как у пациентов, так и у доноров. Это может быть вызвано более низкой отзываемостью и выживаемостью  $CD8^+T_{em}$  на воздействие различных стимулов [8].

Рассматривая пролиферативную активность Т-лимфоцитов на воздействие митогеном, следует отметить, что РНА, с одной стороны, является неспецифическим стимулятором, а с другой – имитирует TCR-опосредованный ответ, так как вызывает поликлональный ответ Т-лимфоцитов *in vivo*. Считается, что в норме, в ответ на стимуляцию TCR,  $T_{naïve}$  и  $T_{cm}$  пролиферируют существенно сильнее, чем  $T_{em}$  [8, 9]. Данные нашего исследования в целом совпадают с литературными. Вместе с тем в группе доноров  $CD4^+T_{cm}$  делились даже активнее, чем  $CD4^+T_{naïve}$ . С одной стороны, эти данные могут говорить о том, что стимуляция РНА близка к модели TCR-активации. А с другой стороны, они свидетельствуют о лучшей отзываемости  $T_{cm}$  по сравнению с  $T_{naïve}$  при стимуляции РНА. Интересно, что пролиферация в ответ на РНА среди субпопуляций  $CD4^+$ Т-клеток памяти выше в группе пациентов с ремиссией БА, чем у пациентов в обострении и доноров. Возможно, такая реакция на митоген вызвана тем, что Т-клетки памяти в стадии ремиссии находятся в состоянии «повышенной готовности» к иммунному ответу, в отличие от Т-клеток памяти у доноров и пациентов в обострении.

Обращает на себя внимание, что среди всех субпопуляций Т-клеток памяти лучшим образом пролиферируют после воздействия РНА  $CD62L^-$ -позитивные клетки. Известно, что  $CD4^+CD45R0^+CD62L^-$  и  $CD4^+CD45R0^+CD62L^+$

клетки по экспрессии транскрипционных факторов и синтезу цитокинов функционально поляризованы в сторону Th1- и Th2-лимфоцитов соответственно [17]. Стимуляция лимфоцитов периферической крови РНА *ex vivo* приводит к повышению секреции IL-5 у здоровых лиц и больных БА, а также сопровождается повышением IL-4 и тенденцией к снижению секреции IFN $\gamma$  у пациентов с БА по сравнению с донорами [6, 23]. Учитывая это, обнаруженные нами особенности изменения субпопуляционного состава на РНА со стороны  $CD4^+$  клеток памяти могут также объясняться функциональной поляризацией  $CD62L^+$  клеток в сторону Th2-лимфоцитов. В свою очередь,  $CD8^+$ Т-лимфоциты под воздействием Th2-условий могут быть частично поляризованы в сторону цитотоксических Т-лимфоцитов 2 типа. При этом активация  $CD8^+$  лимфоцитов в Th2-условиях способствует поддержанию экспрессии CCR7, но снижает экспрессию маркера  $CD62L$  [7]. Поскольку в нашем исследовании проводилось совместное культивирование  $CD4^+$  и  $CD8^+$  лимфоцитов, то воздействием цитокинов Th2-типа может частично объясняться преимущественное поддержание  $CD8^+CCR7^+$  субпопуляций ( $T_{naïve}$  и  $T_{cm}$ ) при стимулировании РНА как у доноров, так и у пациентов. Вместе с тем в нашем исследовании отсутствовало повышение количества  $CD62L^-$  клеток в большинстве субпопуляций. Это может говорить о том, что клетки успешно вступают в деление, так как экспрессия L-селектина повышается при активной пролиферации [7].

Таким образом, показанное для пациентов с БА увеличение количества  $CD4^+$  и  $CD8^+$ Т-клеток памяти и уменьшение содержания наивных Т-лимфоцитов с возрастом позволяют предполагать их вовлеченность в процесс развития БА. Вместе с тем пролиферативная реакция Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов на митоген-индуцированную стимуляцию свидетельствуют о сохранности их функциональных свойств при БА. Оценка количества  $CD4^+T_{em}CD62L^+$  и  $CD8^+T_{em}CD62L^+$ Т-лимфоцитов в периферической крови у пациентов с БА нуждается в дальнейших исследованиях, поскольку, по нашему мнению, служит косвенным показателем активности воспалительного процесса в бронхиальном дереве. И в перспективе, будучи более доступным, безопасным и менее инвазивным методом, чем проведение бронхиальной биопсии и взятие бронхоальвеолярного лаважа, может явиться информативным маркером, который позволит идентифицировать тяжесть заболевания и группу риска для пациента с БА.

## Список литературы / References

1. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Копыльцова Е.А., Алешкин В.А. Возрастная динамика экспрессии изоформ CD45-T-хелперами и T-цитотоксическими лимфоцитами крови здоровых людей // Иммунология, 2014. Т. 35, № 4. С. 229-232. [Toptygina A.P., Semikina E.L., Kopyltsova E.A., Alyoshkin V.A. Age-dependent dynamics of the CD45 isoforms expression on the T helper and T cytotoxic lymphocytes in the blood of the healthy people. *Immunologiya = Immunology*, 2014, Vol. 35, no. 4, pp. 229-232. (In Russ.)]
2. Abdulmir A.S., Hafidh R.R., Abubakar F., Abbas K.A. Changing survival, memory cell compartment, and T-helper balance of lymphocytes between severe and mild asthma. *BMC Immunol.*, 2008, Vol. 9, p. 73.
3. Amelink M., de Groot J.C., de Nijs S.B., Lutter R., Zwinderman A.H., Sterk P.J., ten Brinke A., Bel E.H. Severe adult-onset asthma: A distinct phenotype. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 132, no. 2, pp. 336-341.
4. Chen Z., Pan J., Jia Y., Li D., Min Z., Su X., Yuan H., Shen G., Cao S., Zhu L., Wang X. Effect of memory CD4<sup>+</sup> T-cells' signal transducer and activator of transcription (STATs) functional shift on cytokine-releasing properties in asthma. *Cell Biol. Toxicol.*, 2017, Vol. 33, no. 1, pp. 27-39.
5. den Otter I., Willems L.N.A., van Schadewijk A., van Wijngaarden S., Janssen K., de Jeu R.C., Sont J.K., Sterk P.J., Hiemstra P.S. Lung function decline in asthma patients with elevated bronchial CD8, CD4 and CD3 cells. *Eur. Respir. J.*, 2016, Vol. 48, no. 2, pp. 393-402.
6. Endo H., Iwamoto I., Nakajima H., Yoshida S. *In vitro* interleukin-5 production of peripheral blood mononuclear cells is increased in patients with asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1993, Vol. 101, no. 4, pp. 425-430.
7. Fox A., Harland K.L., Kedzierska K., Kelso A. Exposure of human CD8<sup>+</sup> T cells to type-2 cytokines impairs division and differentiation and induces limited polarization. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1141. doi: 10.3389/fimmu.2018.01141.
8. Geginat J., Lanzavecchia A., Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human CD8<sup>+</sup> memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood*, 2003, Vol. 101, no. 11, pp. 4260-4266.
9. Geginat J., Sallusto F., Lanzavecchia A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naïve, central memory, and effector memory CD4<sup>+</sup> T cells. *Pathol. Biol.*, 2003, Vol. 51, no. 2, pp. 64-66.
10. Global Initiative for asthma. Global Strategy for asthma management and prevention (2018 updated). Electronic resource. Access mode: <https://ginasthma.org/2018-pocket-guide-for-asthma-management-and-prevention/>.
11. Hondowicz B.D., An D., Schenkel J.M., Kim K.S., Steach H.R., Krishnamurty A.T., Keitany G.J., Garza E.N., Fraser K.A., Moon J.J., Altemeier W.A., Masopust D., Pepper M. Interleukin-2-dependent allergen-specific tissue resident memory cells drive asthma. *Immunity*, 2016, Vol. 44, no. 1, pp. 155-166.
12. Jiang T., Sheng J., Qin Y., Xiong H., Gong Y., Tang H., Zhou J., Deng Z., Zhang H., Cui Y., Qian J., Shen Y., Jin Y. Enhanced proliferation and defective activation-induced cell death of CD4<sup>+</sup> T cells in childhood asthma. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.*, 2014, Vol. 32, no. 1, pp. 75-83.
13. Lamb J.P., James A., Carroll N., Siena L., Elliot J., Vignola A.M. Reduced apoptosis of memory T-cells in the inner airway wall of mild and severe asthma. *Eur. Respir. J.*, 2005, Vol. 26, no. 2, pp. 265-270.
14. Lloyd C.M., Hessel E.M. Functions of T cells in asthma: more than just Th2 cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 10, no. 12, pp. 838-848.
15. Mahnke Y.D., Brodie T.M., Sallusto F., Roederer M., Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur. J. Immunol.*, 2013, Vol. 43, no. 11, pp. 2797-2809.
16. Maldonado A., Mueller Y.M., Thomas P., Bojczuk P., O'Connors C., Katsikis P.D. Decreased effector memory CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T cells and increased central memory CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells in peripheral blood of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res. Therapy*, 2003, Vol. 5, no. 2, pp. R91-R96.
17. Matsuzaki S., Shinozaki K., Kobayashi N., Agematsu K. Polarization of Th1/Th2 in human CD4<sup>+</sup>T cells separated by CD62L: analysis by transcription factors. *Allergy*, 2005, Vol. 60, no. 6, pp. 780-787.
18. Miranda C., Busacker A., Balzar S., Trudeau J., Wenzel S.E. Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2004, Vol. 113, no. 1, pp. 101-108.
19. O'Sullivan S., Cormican L., Faul J.L., Ichinohe S., Johnston S.L., Burke C.M., Poulter L.W. Activated, cytotoxic CD8<sup>+</sup> T lymphocytes contribute to the pathology of asthma death. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001, Vol. 164, no. 4, pp. 560-564.
20. Robinson D.S., Bentley A.M., Hartnell A., Kay A.B., Durham S.R. Activated memory T helper cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with atopic asthma: relation to asthma symptoms, lung function, and bronchial responsiveness. *Thorax*, 1993, Vol. 48, no. 1, pp. 26-32.
21. Sallusto F., Lenig D., Förster R., Lipp M., Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 1999, Vol. 401, no. 6754, pp. 708-712.
22. Sprent J., Surh C.D. Normal T cell homeostasis: the conversion of naïve cells into memory-phenotype cells. *Nat. Immunol.*, 2011, Vol. 12, no. 6, pp. 478-484.
23. Tang C., Rolland J.M., Ward C., Bish R., Thien F., Walters E.H. Seasonal comparison of cytokine profiles in atopic asthmatics and atopic non-asthmatics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996, Vol. 154, no. 6, pp. 1615-1622.

24. Todo-Bom A., Mota-Pinto A., Alves V., Santos-Rosa M. Aging and asthma – changes in CD45RA, CD29 and CD95 T cells subsets. *Allergol. Immunopatol.*, 2012, Vol. 40, no. 1, pp. 14-19.
25. Turner D.L., Goldklang M., Cvetkovski F., Paik D., Trischler J., Barahona J., Cao M., Dave R., Tanna N., D'Armiento J.M., Farber D.L. Biased generation and in situ activation of lung tissue-resident memory CD4 T cells in the pathogenesis of allergic asthma. *J. Immunol.*, 2018, Vol. 200, no. 5, pp. 1561-1569.
26. van Rensen E.L.J., Sont J.K., Evertse C.E., Willems L.N.A., Mauad T., Hiemstra P.S., Sterk P.J. Bronchial CD8 cell infiltrate and lung function decline in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2005, Vol. 172, no. 7, pp. 837-841.
27. Weng N., Levine B.L., June C.H., Hodes R.J., Human naïve and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, Vol. 92, no. 24, pp. 11091-11094.
28. Wiest M., Upchurch K., Yin W., Ellis J., Xue Y., Lanier B., Millard M., Joo H.M., Oh S.K. Clinical implications of CD4<sup>+</sup>T cell subsets in adult atopic asthma patients. *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, 2018, Vol. 14, Article no. 7. doi: 10.1186/s13223-018-0231-3.
29. Wisniewski J.A., Muehling L.M., Eccles J.D., Capaldo B.J., Agrawal R., Shirley D.A., Patrie J.T., Workman L.J., Schuyler A.J., Lawrence M.G., Teague W.G., Woodfolk J.A. TH1 signatures are present in the lower airways of children with severe asthma, regardless of allergic status. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2018, Vol. 141, no. 6, pp. 2048-2060.

---

**Авторы:**

**Барковская М.Ш.** — младший научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Блинова Е.А.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Гришина Л.В.** — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Леонова М.И.** — врач аллерголог-иммунолог отделения аллергологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Authors:**

**Barkovskaya M.Sh.**, MD, Junior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Blinova E.A.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Grishina L.V.**, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Leonova M.I.**, MD, Allergologist-Immunologist, Department of Allergy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Непомнящих В.М.**, врач аллерголог-иммунолог  
отделения аллергологии ФГБНУ «Научно-  
исследовательский институт фундаментальной  
и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Демина Д.В.** — к.м.н., врач аллерголог-иммунолог,  
заведующий отделением аллергологии ФГБНУ «Научно-  
исследовательский институт фундаментальной  
и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Козлов В.А.** — д.м.н., профессор, академик  
РАН, заведующий лабораторией клинической  
иммунопатологии, научный руководитель  
НИИФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
фундаментальной и клинической иммунологии»,  
г. Новосибирск, Россия

**Nepomniashchikh V.M.**, MD, Allergologist-Immunologist,  
Department of Allergology, Research Institute of Fundamental  
and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Demina D.V.**, MD, PhD (Medicine), Allergologist-  
Immunologist, Head, Department of Allergology, Research  
Institute of Fundamental and Clinical Immunology,  
Novosibirsk, Russian Federation

**Kozlov V.A.**, MD, DC (Medicine), Professor, Full Member,  
Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Clinical  
Immunopathology, Scientific Director, Research Institute of  
Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian  
Federation

---

Поступила 09.11.2018  
Отправлена на доработку 19.11.2018  
Принята к печати 27.12.2018

---

Received 09.11.2018  
Revision received 19.11.2018  
Accepted 27.12.2018