

# ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ СРЕДНЕЙ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР В ЛИМФОЦИТАХ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Борисов В.И., Демаков С.А.<sup>1</sup>, Непомнящих В.М.,  
Леонова М.И., Демина Д.В., Баровская Н.А.,  
Кожевников В.С.

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, лаборатория клинической иммунопатологии, г. Новосибирск  
<sup>1</sup>Институт цитологии и генетики СОРАН, лаборатория молекулярной цитогенетики, г. Новосибирск

**Резюме.** Показано, что у больных бронхиальной астмой теломеры лимфоцитов и CD4<sup>+</sup> клеток периферической крови короче, чем у доноров, и такое укорочение происходит в разных субпопуляциях в зависимости от клинико-патогенетической формы астмы. В подгруппе с инфекционно-зависимой астмой выявлено укорочение теломер в CD4<sup>+</sup> и в CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитах, у больных с астмой атопического генеза — только в CD4<sup>+</sup> клетках. У больных астмой смешанного генеза изменения длины теломер не обнаружено, однако выявлена достоверная прямая зависимость между длиной теломер CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов и концентрацией сывороточного IgE. Оказалось, что чем выше уровень IgE в сыворотке крови пациента, тем более длинные теломеры в обеих субпопуляциях лимфоцитов.

Полученные данные говорят о том, что сокращение теломер в лимфоцитах может происходить не только при истощении Т-клеточного пула и индуцируемой лимфопенией гомеостатической пролиферации, но и при экспансии антиген-реактивных клеток. Все эти данные говорят в пользу серьезных патогенетических различий разных форм бронхиальной астмы, важной основой которых может быть разный вклад атопического и инфекционного воспаления в развитие заболевания.

*Ключевые слова:* теломеры, бронхиальная астма, иммуностарение.

*Borisov V.I., Demakov S.A., Nepomnyashchikh V.M., Leonova M.I., Demina D.V., Barovskaya N.A., Kozhevnikov V.S.*

## SOME FEATURES OF CHANGING TELOMERE LENGTH IN LYMPHOCYTES FROM THE PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

**Abstract.** A significant telomere shortening was shown in both total peripheral lymphocyte populations and CD4<sup>+</sup> T-cells from patients with bronchial asthma, as compared to normal donors. Such shortening takes place in different cell subpopulations depends on different types of bronchial asthma. In patients with intrinsic asthma, a telomere contraction was found both in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>T-lymphocytes, but only in CD4<sup>+</sup> lymphocytes from patients with extrinsic-type asthma. We didn't find any changes of telomere length in patients with mixed-type asthma, however, a significant correlation was found between telomere length in both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>T-cells, and serum IgE concentrations.

The data obtained demonstrate that telomere shortening in lymphocytes may take place not only due to T-cell exhaustion, or homeostatic proliferation induced by lymphopenia, but also due to expansion of antigen-reacting cells. The entire data point to sufficient pathogenetic differences for various types of bronchial asthma.

A non-uniform contribution of atopic and infectious inflammation may present an important reason for different patterns of the disease development. (*Med. Immunol., vol. 11, N 6, pp 523-530*)

### Адрес для переписки:

Борисов Вячеслав Игоревич,  
ГУ НИИКИ СО РАМН  
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцовская, 14.  
Тел.: (383) 228-21-20.  
Факс: (383) 222-70-28.  
E-mail: borisovslava@yandex.ru

### Введение

Пролиферация соматических клеток в культуре ограничена количеством делений, называемым

пределом Хейфлика [11]. В основе ограничения количества делений лежит проблема концевой недорепликации ДНК, приводящей к ее укорочению [3], которое при каждом делении происходит за счет потери не смысловых последовательностей, а специальных теломерных гексаповторов TTAGGG, расположенных на концах хромосом и повторенных тысячи раз [5]. Теломеры не только решают проблему недорепликации ДНК, но и защищают от концевой деградации, образуя петлевую структуру, которая «закрывает» ДНК на саму себя. Такая петлевая структура предотвращает и от слипания хромосом друг с другом конец в конец. Таким образом, теломеры играют критическую роль в целостности ДНК, а следовательно, и в жизнеспособности клетки. Тем не менее при укорочении теломер до некоторого критического уровня запускается процесс клеточного «старения» и гибели. В одной из работ было показано, что такая критическая длина составляет около 2-4 тысяч пар оснований [4]. Теломеры, таким образом, могут считаться маркером общего биологического старения, которое может отличаться от хронологического.

Действительно, с возрастом у людей происходит укорочение теломер во всех клетках крови, причем с разной скоростью [2, 21]. В лимфоцитах, как наиболее активно отвечающих пролиферацией на инфекцию, теломеры укорачиваются значительно быстрее, несмотря на то что при активации кратковременно усиливается активность теломеразы [27]. Укорочение теломер с возрастом происходит неравномерно: наиболее резко происходит укорочение в лимфоцитах в течение первого года жизни, затем резко замедляется с постепенным выходом на постоянный уровень после 30 лет [9]. К 80 годам длина теломер приближается к критически короткой и составляет около 4,5 тыс. п.н. [14]. Опубликованы результаты нескольких длительных исследований, в которых показана прямая связь между уровнем укорочения теломер и смертностью. Если у близнецов существует разница в длине теломер в лейкоцитах, то тот, у кого короче теломеры, имеет значительно выше вероятность умереть раньше, причем чем больше разница, тем выше вероятность [14].

Раннее сокращение длины теломер может происходить при определенных генетических патологиях человека, таких как синдром Дауна (трисомия по 21 хромосоме) [26], синдром Ди Джорджи (синдром делеции 22q11.2) [19], а также при врожденном дискератозе, при котором выявлено несколько мутаций в гене основной субъединицы hTERT теломеразы, поддерживающей длину теломер [17].

Все больше работ посвящено тому, что в результате воздействия стрессорирующих факторов происходит быстрое укорочение теломер в клетках, которое более выражено при увеличении времени воздействия [8]. При оксидативном стрессе доказано повреждение хромосом, включая и теломерную ДНК и ее укорочение, причем вне зависимости от причин, вызвавших стресс [15]. Уровень укорочения теломер напрямую зависит и от стажа курения: чем он более длителен, тем сильнее происходит сокращение длины теломер в лимфоцитах [24].

К настоящему времени уже показано, что быстрое укорочение теломер ассоциировано с развитием сердечно-сосудистых и инфекционных заболеваний, таких как ишемическая болезнь сердца, хроническая сердечная недостаточность [10], атеросклероз [22] и инфаркт миокарда [6]. У людей с более короткими теломерами в лейкоцитах крови смертность от сердечно-сосудистых заболеваний увеличена в 3 раза, а от инфекций — в 8 раз [7]. При множестве, казалось бы, этиопатогенетически разнородных заболеваний выявлено раннее укорочение теломер в МНК крови: остеопороз [25], сахарный диабет 1 и 2 типа [12], болезнь Альцгеймера и других [18].

Показано, что при иммунопатологических заболеваниях, таких как ревматоидный артрит [2, 23], системная красная волчанка [16], атопический дерматит и псориаз, происходит быстрое укорочение теломер в МНК периферической крови [1, 27]. Такое укорочение связывают с повышенной пролиферативной активностью и клеточным обновлением иммунокомпетентных клеток в результате хронического воспаления. Это, в свою очередь, способствует раннему старению всей иммунной системы, поскольку именно лимфоциты являются основными регуляторами иммунных реакций.

Бронхиальная астма, как и атопический дерматит, относится к аллергическим заболеваниям, в основе проявлений которого, в отличие от атопического дерматита, лежит иммунопатологическая реакция гиперчувствительности немедленного типа. Центральным звеном в каскаде воспалительной реакции являются Т-лимфоциты, отвечающие на антигенную стимуляцию активацией, пролиферацией и синтезом цитокинов [13]. Проллиферация этих клеток, как было сказано выше, может приводить к укорочению их теломер. В доступной литературе, однако, мы не нашли данных о длине теломер иммунокомпетентных клеток у больных бронхиальной астмой.

**Целью работы** было исследование длины теломер и оценка пролиферативной активности иммунокомпетентных клеток у больных бронхиальной астмой. Полученные в работе данные

продемонстрировали не только укорочение теломер в иммунокомпетентных клетках при бронхиальной астме, но и различия, касающиеся разных субпопуляций клеток при разных патогенетических вариантах заболевания, а именно атопической, инфекционно-зависимой и смешанной формах.

## Материалы и методы

Группа больных бронхиальной астмой была сформирована из пациентов, поступивших в стационар аллергологического отделения клиники иммунопатологии ГУ Института клинической иммунологии СОРАМН, г. Новосибирск, с обострением основного заболевания,  $n = 27$ , средний возраст  $40,8 \pm 1,96$  года. Группа контроля была сформирована из здоровых доноров,  $n = 25$ . Для каждой подгруппы больных с бронхиальной астмой подбирались своя группа доноров, соответствующая по возрасту. Группа с инфекционно-зависимой астмой составила 11 человек, средний возраст  $43,6 \pm 2,3$  года, с атопической формой — 7 человек,  $31,8 \pm 4,36$  года, и со смешанной формой — 9 человек,  $44,3 \pm 2,77$  года.

**Выделение лейкоцитов периферической крови.** В 5 мл периферической крови, смешанной со 100 ед. гепарина, добавляли 10% раствор желатина для осаждения эритроциты. Лейковзвесь отмывали забуференным физиологическим раствором с 0,1% бычьего сывороточного альбумина (ЗФР-БСА) (Sigma, США).

**Метод Flow-FISH для оценки длины теломер в клетках**

**Получение мышечных спленоцитов.** После измельчения селезенки мышей линии C57Black (Питомник «Рассвет», г. Томск) клетки отмывали ЗФР, содержащим 0,01% ЭДТА («СибДиаМед», Россия), 0,1% азида натрия (ICN Biomedicals Inc, США) и 0,1% БСА, центрифугируя при 1000 об./мин 5 мин, суспендировали в сыворотке эмбрионов коров, содержащей 10% ДМСО (ICN Biomedicals Inc, США) и хранили при температуре  $-80^\circ\text{C}$  до использования.

**Мечение CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов.** Лейкоциты человека метили биотинилированными анти-CD4 или анти-CD8 антителами (Becton Dickinson, США), инкубировали 20 мин, отмывали ЗФР-БСА и добавляли стрептавидин, связанный с флуорохромом Cy5 (Amersham Bioscience, UK) и инкубировали 20 минут. После отмывки ресуспендировали в 4 мМ растворе BS<sup>3</sup> (Pierce, USA) и инкубировали 30 мин при  $37^\circ\text{C}$  с последующей отмывкой ЗФР-БСА.

**Оценка относительной длины теломер (ОДТ).** Подробное описание методики измерения относительной длины теломер с помощью мето-

да гибридизации *in situ* с анализом на проточном цитофлуориметре было представлено ранее [2, 21]. Лейкоциты в количестве  $1 \times 10^6$  смешивали с  $5 \times 10^5$  мышечных спленоцитов и осаждали. Осадок ресуспендировали в 300 мкл гибридационного раствора, содержащего 70% формамид (Sigma, США). Флуоресцин-(CCCTAA)<sub>3</sub> PNA-зонд (Peptide Nucleic Acid, EUROAGENTEC Ltd, Belgium) добавляли в концентрации 0,3 мкг/мл. Инкубировали при  $80^\circ\text{C}$  в течение 10 минут, с последующей гибридизацией в течение 3 часов при комнатной температуре (КТ). По окончании клетки дважды отмывали 70% формамидом и однократно ЗФР-БСА, содержащем 0,1% Tween 20 (Sigma, США). Осадок ресуспендировали в 0,5 мл ЗФР-БСА, содержащем 25 мкл/мл РНКазы и 7-AAD. Анализ проб проводили на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, США). Сигнал флуоресценции теломер определяли как средний уровень флуоресценции (mean fluorescence intensity, MFI) клеток, находящихся в G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> фазе клеточного цикла, вычитанием фоновой аутофлуоресценции (т.е. MFI контрольных образцов, прошедших FISH в отсутствие PNA зонда). Относительные значения длины теломер определяли как отношение MFI исследуемого образца к MFI спленоцитов мыши. Дополнительно вводили коэффициент для уравнивания сигнала на количество хромосом в клетках, поскольку у человека 46 хромосом, а у мыши 42 хромосомы.

**Оценка уровня апоптоза.** Клетки с гипердиплоидным (клетки в S-M фазах клеточного цикла) и с гиподиплоидным (апоптотические клетки) набором ДНК определяли с помощью проточной цитометрии по степени флуоресценции внутриядерного красителя 7-аминоактиномицина D (ICN Biomedicals Inc, США) по одномерной гистограмме третьего канала флуоресценции FL-3 клеток лимфоцитарного и моноцитарного гейтов.

**Метод для измерения длины теломер Southern Blotting**

**Заливка клеток в блочки и их обработка.** Клетки в количестве  $1 \times 10^6$  заливались легкоплавкой агарозой (Bio-Rad, Inc.) и переносились в форму для блочков. Блочки переносились в пробирки с протеиназой K на ночь. Затем отмывались TE буфером 4 раза.

**Гидролиз ДНК в блочках и пульс-форез.** Блочки инкубировали 30 мин в 1 х буфере для рестриктазы Kzo9I (СибЭнзим, Россия), содержащем 20 мкг/мл РНКазы А и 5 мкМ спермидина. Буфер заменяли на содержащий по 50 ед Kzo9I и инкубировали ночь при  $37^\circ\text{C}$ . Рестриктную смесь заменяли на 0,5 х TBE и инкубировали 30 мин.

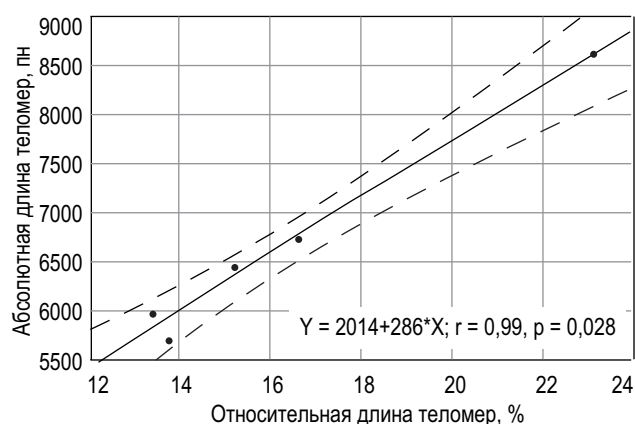
Затем блочки монтировали в 1% агарозный гель на 0,5 x TBE и проводили пульс-форез.

**Саузерн-блот гибридизация.** Гель обрабатывали 0,25 N HCl в воде 15 мин. После 2 раз промывания помещали в раствор состава 0,5 N NaOH, 1 M NaCl и переносили ДНК на мембрану Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham-Pharmacia, Biotech) в течение 20 ч. Фильтр подсушивали, кратковременно облучали УФ, споласкивали в 2xSSC 10 мин и полностью высушивали. ДНК для зонда содержала многократно повторенную теломерную последовательность (TTAGGG)<sub>n</sub>. ДНК метили альфа-<sup>32</sup>P датФ. Фильтр с образцами смачивали в 2xSSC и проводили предгибридизацию в растворе 5xSSC, 1,5% сухое обезжиренное молоко, 0,2% SDS при 55 °C в течение 30 мин, после чего раствор заменяли на свежий и добавляли денатурированный кипячением зонд. Гибридизацию проводили при 55 °C в течение 12 ч. Фильтр отмывали: 2xSSC, 0,1% SDS – 1 раз при КТ 10 мин, 1xSSC, 0,1% SDS – 2 раза по 20 мин при 55 °C, 0,1xSSC, 0,1% SDS – 2 раза по 20 мин при 55 °C. Отмытый фильтр экспонировали с рентгеновской пленкой CP-BU, AGFA.

**Оценка абсолютной длины теломер в субпопуляции лимфоцитов.** Оценка абсолютной длины теломер проводилась пересчетом через относительную длину по формуле:

$$Y = 2014 + 286 * X,$$

где Y – это получаемая абсолютная длина в парах нуклеотидов, а X – это длина теломер относительно клеток внутреннего контроля (рис. 1). Формула получена в результате пересчета по 5 донорам относительной длины через абсолютную, измеренную методом Southern Blotting. Все данные по длине теломер представлены в формате среднее значение ± стандартная ошибка.



**Рисунок 1.** Корреляционная прямая между относительной длиной теломер, измеренной Flow-FISH, и абсолютной длиной теломер, измеренной Southern Blotting

## Определение IgE

Уровень IgE определяли с помощью двухсайтового (сэндвич) иммуоферментного анализа стандартным набором для определения иммуноглобулина E фирмы «Хема-Медика» (Россия) на приборе Multiscan Ascent (ThermoLabsystems, USA) согласно прилагаемой инструкции.

## Статистическая обработка данных

Статистические расчеты проводились с использованием методов описательной, параметрической (критерий Стьюдента t) и непараметрической статистики (U-тест Манна–Уитни и метод парных признаков Вилкоксона) с использованием программы «Statistica 6.0» (StatSoft Inc., USA). Все данные представлены в формате среднее ± стандартная ошибка.

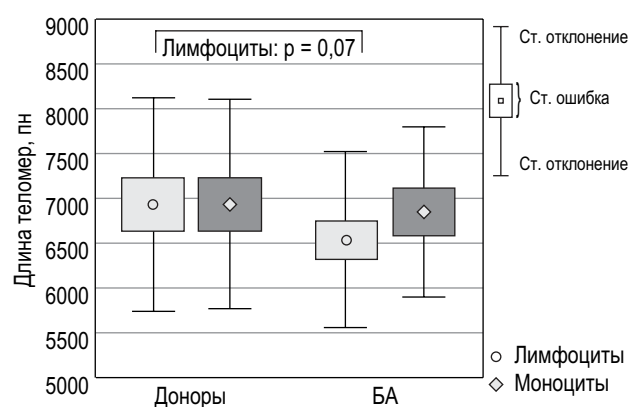
## Результаты

### Длина теломер в МНК

Измерение длины теломер не выявило достоверных различий между группами доноров и больных БА (рис. 2), отмечена лишь тенденция укорочения теломер лимфоцитов у пациентов с астмой (6,55 тыс. п.н. против 6,94 тыс. п.н.) при практически одинаковых значениях в моноцитах (6,86 тыс. п.н. против 6,94 тыс. п.н.).

### Длина теломер в субпопуляциях Т-лимфоцитов

После определения тенденции укорочения теломер в общей лимфоцитарной популяции у больных с астмой длина теломер измерялась в субпопуляциях CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов. Анализ результатов показал, что в группе с БА длина теломер в CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитах значительно короче, чем у доноров, тогда как в CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов длина теломер достоверно не отличалась от донорского уровня (рис. 3).



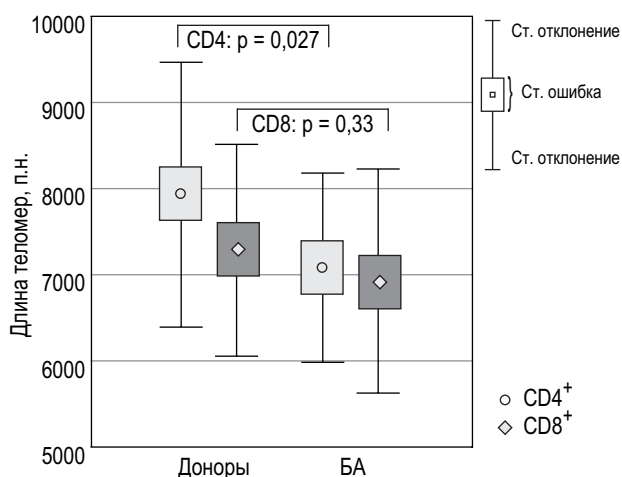
**Рисунок 2.** Длина теломер в МНК доноров и больных бронхиальной астмой

**Примечание.** БА – группа с бронхиальной астмой. Длина теломер представлена в парах нуклеотидов.

**ТАБЛИЦА 1. КОЛИЧЕСТВО АПОПТОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК В СУБПОПУЛЯЦИЯХ CD4<sup>+</sup> И CD8<sup>+</sup> ЛИМФОЦИТОВ В ГРУППЕ БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ И ГРУППЕ ДОНОРОВ**

	Астма	Доноры
CD4 <sup>+</sup> , %	0,96±0,166*	0,55±0,094
CD8 <sup>+</sup> , %	1,43±0,473	0,87±0,135

**Примечание.** \* – достоверное различие при  $p < 0,05$  между донорами и больными с БА. Уровень апоптоза представлен в процентах апоптотических клеток от всей популяции в формате среднее ± стандартная ошибка.



**Рисунок 3. Длина теломер в субпопуляциях CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов у доноров и больных бронхиальной астмой**

**Примечание.** БА – группа с бронхиальной астмой. Длина теломер представлена в парах нуклеотидов.

Исследование уровня апоптоза показало, что процент апоптотических клеток при бронхиальной астме достоверно выше среди CD4<sup>+</sup> клеток (табл. 1).

Анализ длины теломер у больных с разными вариантами БА показал, что у больных

**ТАБЛИЦА 3. УРОВЕНЬ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ В ПОДГРУППАХ БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ И ГРУППЕ ДОНОРОВ**

Тип астмы	Астма	Доноры
Инфекционно-зависимая, %	1,14±0,224*	0,99±0,196
Атопическая, %	0,79±0,175	0,77±0,391
Смешанная форма, %	0,92±0,434	0,48±0,148

**Примечание.** \* – достоверное различие при  $p < 0,05$  по сравнению с донорами). Уровень апоптоза представлен процентом апоптотических клеток от всей популяции, среднее ± стандартная ошибка.

с инфекционно-зависимой астмой теломеры достоверно короче как в CD4<sup>+</sup>, так и в CD8<sup>+</sup> клетках, при атопической – только в CD4<sup>+</sup> лимфоцитах, а при смешанной форме не было выявлено достоверных отличий от донорских величин (табл. 2). Уровень апоптоза был достоверно повышен только в общей популяции лимфоцитов при инфекционно-зависимой астме (табл. 3). Анализ данного показателя на субпопуляционном уровне не выявил достоверных различий от донорских значений (данные не представлены).

Определение уровня сывороточного IgE показало его повышение при всех формах астмы: 430±184 МЕ/мл – при атопической, 206±102 МЕ/мл – при инфекционно-зависимой и 570±125 МЕ/мл. МЕ/мл – при смешанной, при этом достоверно различались только показатели между инфекционно-зависимой и смешанной формой ( $p < 0,05$ ). Корреляционный анализ выявил прямую взаимосвязь уровня IgE и длины теломер CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов только при смешанной форме бронхиальной астмы (соответственно  $R = 0,66$  при  $p = 0,05$  и  $R = 0,66$  при  $p = 0,04$ ), т.е. более длинные теломеры ассоциированы с более высоким уровнем IgE в сыворотке.

**ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ СРЕДНЕЙ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР В ПОДГРУППАХ БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ И ГРУППЕ ДОНОРОВ**

Тип астмы	Пациенты			Доноры		
	CD4 <sup>+</sup> лимфоциты	CD8 <sup>+</sup> лимфоциты	Возраст, лет	CD4 <sup>+</sup> лимфоциты	CD8 <sup>+</sup> лимфоциты	Возраст, лет
Инфекционно-зависимая	6,7±0,24*	6,3±0,38*	43±7,6 (n = 11)	7,3±0,30	6,9±0,27	43±8,3 (n = 18)
Атопическая	7,3±0,20*	7,0±0,47	31±11,5 (n = 7)	7,8±0,23	7,3±0,22	31±14,1 (n = 21)
Смешанного типа	7,0±0,28	6,9±0,31	44±8,3 (n = 9)	7,2±0,25	6,9±0,22	44±8,2 (n = 25)

**Примечание.** \* – достоверное различие при  $p < 0,05$  между донорами и больными с БА. Для каждой подгруппы с БА подбирались соответствующая по возрасту группа доноров. Длина теломер представлена в тыс. п.н., среднее ± стандартная ошибка.

## Обсуждение

Усиленное деление лимфоцитов приводит к более быстрому укорочению теломер и к ускоренному старению. При аутоиммунной патологии, когда антиген постоянно присутствует в организме, иммунная система находится в хроническом активированном состоянии. При бронхиальной астме хронический воспалительный процесс течет на низком уровне и резко усиливается лишь триггерами, которыми могут быть аллергены, антигены, а также различные физические и стрессовые факторы [13]. Суммарное напряжение иммунной системы будет значительно ниже при астме в сравнении с любым аутоиммунным заболеванием, и поэтому лимфоциты с укороченными теломерами как результат активной пролиферации, возможно, будут появляться только в короткий период обострения. Во время ремиссии основная масса антиген-позитивных лимфоцитов гибнет за счет активационного апоптоза, а т.к. именно они содержат короткие теломеры, то в результате средняя длина теломер популяции лимфоцитов в ремиссии будет снова соответствовать норме при данном возрасте. Выдвинутые предположения требуют тщательного длительного исследования.

В данной работе было обнаружено, что в лимфоцитах периферической крови у больных с бронхиальной астмой происходит ускорение укорочения теломер, и оказывается, что такое укорочение происходит в разных субпопуляциях на разном уровне и в зависимости от клинико-патогенетической формы астмы.

Поскольку в патогенезе бронхиальной астмы лежит активация и, значит, пролиферация Т-хелперов, укорочение теломер популяции CD4<sup>+</sup> клеток (рис. 3) в группах с атопической и инфекционно-зависимой астмой (табл. 2) вполне ожидаемо. При инфекционно-зависимой астме также выявлено укорочение теломер в CD8<sup>+</sup> лимфоцитах, что может свидетельствовать об активном участии этих клеток в инфекционном процессе. Действительно, инфекционно-зависимая астма развивается на фоне наличия инфекционного процесса в бронхолегочных путях как бактериальной этиологии, так и вирусной.

Часто, особенно у детей, приступы астмы возникают на фоне острой респираторной вирусной инфекции, иммунный ответ на которую включает активное участие CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов. Одним из результатов активации и пролиферации этих клеток и может являться укорочение их теломер.

У больных астмой смешанного типа не выявлено достоверных различий с донорскими показателями по длине теломер, как в общей, так и в субпопуляции лимфоцитов. Пациенты этой груп-

пы, как правило, имеют длинный стаж заболевания и у них постоянно присутствует хронически текущий инфекционный процесс. Поэтому массивная пролиферация лимфоцитов на антиген во время короткого периода обострения может отсутствовать, но происходит при других формах астмы.

Было выявлено, что в группе со смешанной формой уровень IgE максимальный, а при инфекционно-зависимой астме ниже, чем при атопической и смешанной, т.е. наименьшее изменение в длине теломер среди всех трех групп, в той, где максимальный уровень IgE. Также в группе со смешанной формой астмы была выявлена достоверная корреляционная связь длины теломер CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток с уровнем общего IgE в сыворотке: более длинные теломеры ассоциированы с более высоким уровнем IgE. Поэтому менее выраженное патологическое укорочение теломер в обеих субпопуляциях лимфоцитов.

Действительно, активация Т-хелперов 2 типа будет приводить к увеличению количества IgE. А так как Т-хелперов 2 типа в десятки раз меньше, чем хелперов 1 типа, то укорочение теломер в этих клетках при активации не должно заметно отражаться на средней длине теломер всех CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов. Так будет, когда первичный иммунный ответ запускается через IgE Т-хелперами 2 типа, но в последующем при соединении инфекционного процесса будут уже «вторично» вовлекаться Т-хелперы 1 типа. Такое вовлечение уже должно сопровождаться значительным укорочением теломер в общей популяции лимфоцитов.

Другим объяснением отсутствия достоверного укорочения теломер при этой форме астмы может являться недостаточное количество исследованных больных для выявления небольших (по сравнению с другими формами астмы), но существующих различий. Не исключена также возможность относительно высокой активности теломеразы у этих пациентов, что было показано при другом аллергическом заболевании — атопическом дерматите [27] — и требует отдельного исследования.

Все эти данные говорят в пользу серьезных патогенетических различий разных форм бронхиальной астмы, важной основой которых может существенно быть разный вклад атопического и инфекционного воспаления в развитие заболевания.

Все исследуемые нами пациенты были с обострением основного заболевания, соответственно, сделанные нами выводы справедливы только во время рецидива. Поскольку при обострении бронхиальной астмы нет лимфопении и не развивается гомеостатическая пролиферация,

то возможно, что такое укорочение теломер функционально, т.е. вызвано усиленной антигенной активацией и пролиферацией в ответ на сенсибилизирующие антигены строго определенных антигенспецифичных лимфоцитов. Эти лимфоциты во время рецидива заболевания пролиферируют максимально быстро. Дальше эти клетки, после того как закончили фазу пролиферации, попадают в циркуляцию с резко укороченными теломерами, внося значительный вклад в среднюю длину теломер всей популяции лимфоцитов. Поэтому при определении средней длины теломер мы видим значительное укорочение в среднем на популяцию лимфоцитов в сравнении с донорами.

После элиминации антигена происходит массивная гибель антигенспецифичных лимфоцитов в результате активационного апоптоза, и в результате средняя длина теломер в популяции лимфоцитов будет вновь соответствовать возрасту, что и было показано для CD8<sup>+</sup> лимфоцитов при инфекции вирусом Эпштейна–Барр [20]. Предполагается, что при бронхиальной астме происходит аналогичный процесс возврата средней длины теломер к длине, соответствующей возрасту в норме, т.е. выявленное укорочение в лимфоцитах во время обострения заболевания может быть функциональным, что будет изучено при следующем этапе исследования.

## Список литературы

1. Борисов В.И., Демаков С.А., Сеньюков В.В., Кожевников В.С., Сизиков А.Э., Коненкова Л.П., Герцог О.А., Леонова М.И., Демина Д.В., Козлов В.С. Укорочение теломер в Т-лимфоцитах крови у больных атопическим дерматитом и ревматоидным артритом // Вестник уральской медицинской академии наук. — 2006. — Т. 3, № 1. — С. 22-24.
2. Борисов В.И., Кожевников В.С., Сеньюков В.В., Сизиков А.Э., Коненкова Л.П., Герцог О.А., Козлов В.А. Укорочение длины теломер моноцитов при ревматоидном артрите // Медицинская иммунология. — 2006. — Т. 8, № 1. — С. 87-90.
3. Оловников А.М. Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов // Докл. АН СССР. — 1971. — Т. 201, № 6. — С. 1496-1499.
4. Allsopp R.C., Vaziri H., Patterson C., Goldstein S., Younglai E.V., Futcher A.B., Greider C.W., Harley C.B. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. — 1992. — Vol. 89, N 21. — P. 10114-10118.
5. Blackburn E.H. Structure and function of telomeres // Nature. — 1991. — Vol. 350. — P. 569-572.
6. Brouillette S., Singh R.K., Thompson J.R., Goodall A.H., White N.J. Cell Telomere Length and Risk of Premature Myocardial Infarction // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2003. — Vol. 23. — P. 842-846.
7. Cawthon R., Smith K., Brien E. O., Sivatchenko A., Kerber R. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older // Lancet. — 2003. — Vol. 361, N 9355. — P. 393-395.
8. Epel E.S., Blackburn E.H., Lin J., Dhabha F.S., Adler N.E., Morrow J.D., Cawthon R.M. Accelerated telomere shortening in response to life stress // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. — 2004. — Vol. 101. — P. 4917312-4917315.
9. Frenck R.W., Blackburn E.H., Shannon K.M. The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. — 1998. — Vol. 95. — P. 5607-5610.
10. Harst P., Steeg G., Boer R.A., Voors A.A., Hall A.S., Mulder M.J., Gilst W.H., Veldhuisen D.J. Telomere Length of Circulating Leukocytes Is Decreased in Patients With Chronic Heart Failure // J. Am. Coll. Cardiol. — 2007. — Vol. 49. — P. 1459-1464.
11. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains // Exp. Cell Res. — 1965. — Vol. 37. — P. 614-636.
12. Jeanclous E., Krolewski A., Skurnick J., Kimura M., Aviv H., Warram J.H., Aviv A. Shortened Telomere Length in White Blood Cells of Patients with IDDM // Diabetes. — 1998. — Vol. 47. — P. 482-486.
13. Kay A.B. Allergy and allergic diseases — First of Two Parts // Engl. J. Med. — 2001. — Vol. 344. — P. 30-37.
14. Kimura M., Hjelmborg J. v. B., Gardner J.P., Bathum L., Brimacombe M., Lu X., Christiansen L., Vaupel J.W., Aviv A., Christensen K. Telomere Length and Mortality: A Study of Leukocytes in Elderly Danish Twins // Am. J. Epidemiol. — 2008. — Vol. 167. — P. 799-806.
15. Kurz D.J., Decary S., Hong Y., Trivier E., Akhmedov A., Erusalimsky J.D. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells // J. Cell. Sci. — 2004. — Vol. 117. — P. 2417-2426.
16. Lin J., Xie J., Qian W.B. Telomerase activity and telomere length in CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and CD19<sup>+</sup> lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus // Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. — 2005. — Vol. 34, N 6. — P. 534-537.
17. Marrone A., Walne A., Dokal I. Dyskeratosis congenita: telomerase, telomeres and anticipation // Curr. Opin. Genet. Dev. — 2005. — Vol. 15, N 3. — P. 249-257.
18. Panossian L.A., Porter V.R., Valenzuela H.F., Zhu X., Reback E., Masterman D., Cummings J.L.,

Effros R.B. Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimer's disease status // *Neurobiol. Aging.* – 2003. – Vol. 24. – P. 77-84.

19. Piliero L.M., Sanford A.N., McDonald-McGinn D.M., Zackai E.H., Sullivan K.E. T-cell homeostasis in humans with thymic hypoplasia due to chromosome 22q11.2 deletion syndrome // *Blood.* – 2004. – Vol. 103. – P. 1020-1025.

20. Plunkett F.J., Vieira M., Soares D., Annels N., Hislop A., Ivory K., Lowdell M., Salmon M., Rickinson A., Akbar A.N. The flow cytometric analysis of telomere length in antigen-specific CD8 T-cells during acute Epstein-Barr virus infection // *Blood.* – 2001. – Vol. 97. – P. 700-707.

21. Rufer N., Brummendorf T.H., Kolvraa S., Bischoff C., Christensen K., Wadsworth L., Schulzer M., Lansdorp P.M. 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 // *J. Exp. Med.* – 1999. – Vol. 190. – P. 157-167.

22. Samani N.J., Boulby R., Butler R., Thompson J.R., Goodall A.H. Telomere shortening in atherosclerosis // *Lancet.* – 2001. – Vol. 358. – P. 472-473.

23. Ulf G., Goronzy W., Koetz K., Weyand C.M., Jorg J. Perturbation of the T-cell repertoire in rheumatoid arthritis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1998. – Vol. 95. – P. 14447-14452.

24. Valdes A.M., Andrew T., Gardner J.P., Kimura M., Oelsner E., Cherkas L.F., Aviv A., Spector T.D. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women // *Lancet.* – 2005. – Vol. 366. – P. 662-664.

25. Valdes A.M., Richards J., Gardner J., Swaminathan R., Kimura M., Xiaobin L., Aviv A., Spector T. Telomere length in leukocytes correlates with bone mineral density and is shorter in women with osteoporosis // *Osteoporos Int.* – 2007. – Vol. 18, N 9. – P. 1203-1210.

26. Vaziri H., Schachter F., Uchida I., Weit L., Zhu X., Effros R., Cohen D., Harley C.B. Loss of Telomeric DNA during Aging of Normal and Trisomy 21 Human Lymphocytes // *Am. J. Hum. Genet.* – 1993. – Vol. 52. – P. 661-667.

27. Wu K., Higashi N., Hansen E. R., Lund M., Bang K., Thestrup-Pedersen K. Telomerase Activity Is Increased and Telomere Length Shortened in T-Cells from Blood of Patients with Atopic Dermatitis and Psoriasis // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 165. – P. 4742-4747.

*поступила в редакцию 07.04.2009*

*отправлена на доработку 23.04.2009*

*принята к печати 18.06.2009*