

УКОРОЧЕНИЕ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР МОНОЦИТОВ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

Борисов В.И., Кожевников В.С., Сениуков В.В.,
Сизиков А.Э., Коненкова Л.П., Герцог О.А., Козлов В.А.

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Россия

Резюме. В данной работе исследовалась длина теломерных районов ДНК в иммунокомпетентных клетках периферической крови человека. Для этого использовался метод определения относительной длины теломер (по сравнению с клетками внутреннего контроля) с помощью гибридизации *in situ* и проточной цитометрии. Предварительно были подобраны условия гибридизации, позволяющие достоверно определять длину теломер в моноцитах. Показано, что относительная длина теломер моноцитов больных ревматоидным артритом (РА) достоверно меньше по сравнению с донорами. Анализ групп больных РА и доноров в зависимости от возраста показал достоверное различие относительной длины теломер моноцитов между подгруппами до 30 лет. Полученные данные можно рассматривать в качестве дополнительного подтверждения гипотезы о генетических дефектах стволовой клетки, лежащих в основе патогенетических факторов, определяющих возникновение ревматоидного артрита.

Ключевые слова: теломеры, проточная цитометрия, PNA-зонд, ревматоидный артрит.

Borisov V.I., Kozhevnikov V.S., Seniukov V.V., Sizikov A.E., Konenkova L.P., Gerzog O.V., Kozlov V.A.

TELOMERE SHORTENING IN MONOCYTES OF THE PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Abstract. Present study deals with size measurements of telomeric DNA from the human peripheral mononuclear immune cells in rheumatoid arthritis (RA). A method for measuring the relative telomere length by *in situ* hybridization followed by flow cytometric analysis (flow-FISH) was used. Relative telomere length (RTL) in monocytes was estimated as mean fluorescence intensity (MFI) of test cells divided by MFI values of internal control cells. Hybridization conditions for analysis of telomere length in monocytes have been optimized in advance. It has been shown that RTL of monocytes was significantly lower in RA patients compared to donors. Significant differences in telomere length of monocytes between RA patients and donors were revealed for the young persons under 30 years old. The findings obtained may be considered as an additional argument confirming the hypothesis on genetic defects of hematopoietic stem cells determining RA development. (*Med. Immunol.*, 2006, vol.8, № 1, pp 87-90)

Введение

Этиология и патогенез ревматоидного артрита (РА) окончательно не выяснены, однако установлено несколько достоверных генетических и внешних факторов, связанных с развитием заболевания [2]. В частности, выявлена генетически обусловленная ранняя инволюция тимуса, приводящая к массивной пролиферации и созреванию Т-лимфоцитов на периферии, что сопровождается накоплением олигоклональной массы клеток с десятикратно редуци-

рованным разнообразием рецепторов, измененными фенотипическими и функциональными характеристиками и укороченными теломерами [3]. У позвоночных ДНК теломерного района состоит из нескольких тысяч GT-богатых гексаповторов (TTAGGG), и главная их функция заключается в том, что при каждом делении в результате «концевой недорепликации» происходит укорочение именно теломерного района ДНК, что сохраняет в целостности смысловые последовательности [1, 8, 9]. При критически укороченных теломерах наступает клеточное старение, которое проявляется, в частности, неспособностью к делению в ответ на стимуляцию, поскольку деление в данном случае приведет к «недорепликации» смысловых последовательностей

Адрес для переписки:

Борисов В.И.,
630099, Новосибирск, Ядринцевская ул., 14
ГУ НИИКИ СО РАМН, Борисову В.И.
8-(3832) 28-21-20, borisovslava@yandex.ru

[4, 7]. В связи с этим, в качестве одной из причин нарушения пролиферации Т-клеток при РА в ответ на поликлональную стимуляцию рассматривают укорочение их теломер. Раннее укорочение теломер не зависит от длительности, активности и других показателей характера течения заболевания и служит дополнительным доказательством того, что патология тимуса первична, а не индуцирована хроническим воспалительным процессом [6].

В нескольких исследованиях последнего времени было показано, что при РА преждевременное укорочение теломер затрагивает и гранулоциты [10, 12]. Авторы предполагают, что укорочение теломер в миелоидном и лимфоидном ростках кроветворения указывает на глубокий генетический дефект, обуславливающий репликативный стресс гематопоэтических стволовых клеток.

Исследование длины теломер в моноцитах могло бы дать дополнительную характеристику миелоидного ростка при РА, однако такие данные в литературе не представлены. Это может быть связано с техническими особенностями метода определения длины теломер с помощью проточной цитометрии, включающего процедуру гибридизации в формамиде, которая изменяет оптические свойства моноцитов так, что их «визуализация» при цитометрии становится затруднительной.

В связи с этим, целью настоящей работы стало исследование длины теломер моноцитов у больных РА с предварительным подбором таких условий обработки клеток, которые позволили бы достаточно четко выявлять моноциты при цитометрии.

Материалы и методы

Было обследовано 26 больных ревматоидным артритом (диагноз верифицирован в соответствии с критериями АСР, 1987г.), госпитализированных в ревматологическое отделение ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН. Среди них: мужчин - 2, женщин - 24. Средний возраст больных составил $37 \pm 15,9$ лет.

В соответствии с возрастом пациенты были разделены на две группы. В группу А вошли пациенты моложе 30 лет (мужчин - 0, женщин - 7, средний возраст - $22 \pm 6,3$ лет), в группу Б - старше 30 лет (мужчин - 2, женщин - 17, средний возраст - $53 \pm 12,1$ лет). Длительность заболевания в исследуемых группах составила $2 \pm 1,6$ лет для группы А и $9 \pm 8,3$ лет для группы Б. У всех пациентов регистрировалась активность ревматоидного воспаления II - III степени. Группы контроля были сформированы из здоровых доноров, соответствующих исследуемым группам по полу и возрасту.

Определение относительных длин теломер субпопуляций лейкоцитов проводили с помощью метода Flow-FISH (флуоресцентная *in situ* гибридиза-

ция с последующей цитометрией) [5, 11] с небольшой модификацией. В качестве клеток внутреннего контроля были использованы спленоциты мышей линии С57BL/6 (питомник «Рассвет», г. Томск). После измельчения селезенки клетки дважды отмывали забуференным физиологическим раствором (ЗФР), содержащим 0,01% ЭДТА («СибДиаМед», Россия), 0,1% азида натрия (ICN Biomedicals Inc, США) и 0,1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) (Sigma, США), центрифугируя при 1000 об/мин 5 мин, ресуспендировали в телячьей эмбриональной сыворотке, содержащей 10% ДМСО (ICN Biomedicals Inc, США), и хранили при температуре -80°C до использования.

Лейкоциты периферической крови, полученные после осаждения эритроцитов в термостате при 37°C однократно отмывали ЗФР-БСА. Осадок ресуспендировали в 1 мл ЗФР-БСА и подсчитывали количество клеток в камере Горяева. 1×10^6 клеток смешивали с $0,5 \times 10^6$ спленоцитов мыши и осаждали центрифугированием (1000 об./мин, 5 мин). Осадок ресуспендировали в 300 мкл гибридизационного раствора, состоящего из 70% формамида (Sigma, США), 20мМ Tris (pH=7,1) (Sigma, США) и 1% БСА. Зонд пептидной нуклеиновой кислоты (PNA-зонд), меченный флюоресцеином (EUROGENTEC Ltd, Belgium), комплементарный теломерной последовательности ДНК, добавляли в концентрации 0,3 мкг/мл. Пробы тщательно перемешивали и инкубировали при 80°C в течение 10 минут, после чего оставляли в темноте при комнатной температуре в течение 2 часов. После инкубации клетки переносили в пробирки для цитометрии (Falcon 2058), дважды отмывали 70% формамидом, содержащим 0,1% БСА, 0,1% Tween 20 (Sigma, США) и 10мМ Tris (pH=7,1), и однократно ЗФР-БСА, содержащим 0,1% Tween 20. Осадок ресуспендировали в 0,5 мл ЗФР-БСА, содержащем 25мкг/мл РНКазы и 2мкг/мл 7-аминоактомицина D (7-AAD) (ICN Biomedicals Inc, США).

Анализ проб проводили на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, США), используя FL1 канал для определения сигнала флюоресцеина и FL3 канал - для 7-AAD, с помощью программного обеспечения Cell Quest^{PRO} (Becton Dickinson, США). Сигнал флюоресценции теломер определяли как средний уровень флюоресценции (mean fluorescence intensity, MFI) клеток, находящихся в G_0/G_1 фазе клеточного цикла, с последующим вычитанием аутофлюоресценции клеток, прошедших гибридизацию в отсутствие PNA зонда. Относительные значения длины теломер определяли в процентах, как отношение MFI исследуемого образца к MFI спленоцитов мыши Ч100.

Статистическая обработка данных проводилась методами описательной, параметрической и непараметрической статистики с использованием пакета программ "STATISTICA 6.0".

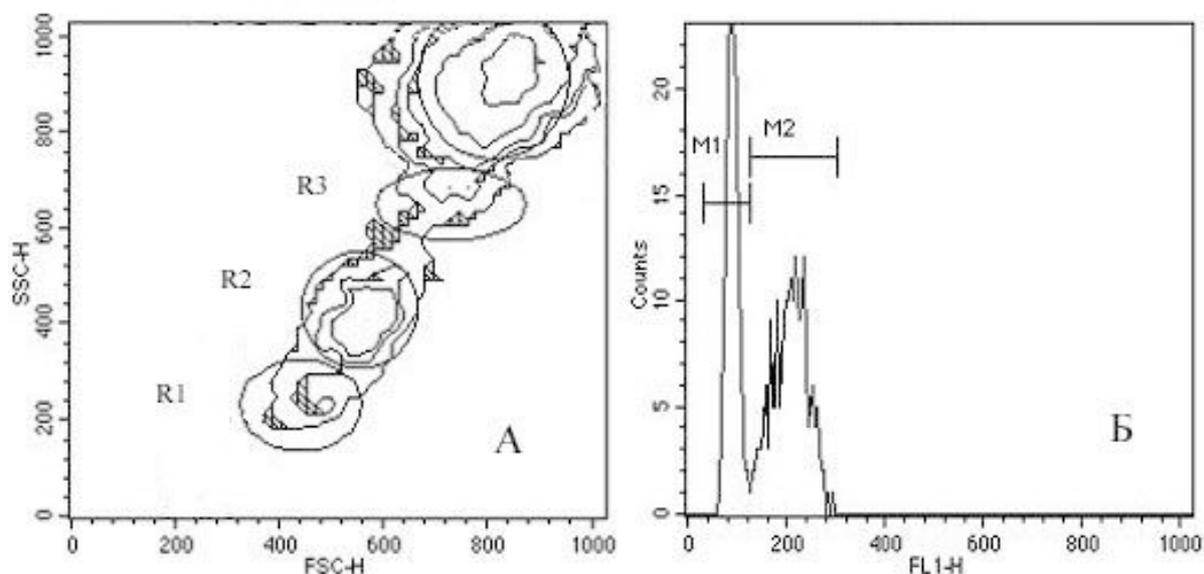


Рис. 1. Рабочие графики документа для определения средней интенсивности флуоресценции PNA-зонда.

A – график прямого и бокового светорассеяния: R1 – спленциты мыши, R2 – лимфоциты человека, R3 – моноциты человека.

Б – гистограмма флуоресценции PNA-зонда: M1 – лимфоциты человека, M2 – спленциты мыши.

Табл. 1. ОЦЕНКА СРЕДНЕЙ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР В ПОПУЛЯЦИЯХ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ОТНОСИТЕЛЬНО ТЕЛОМЕР МЫШИНЫХ СПЛЕНОЦИТОВ

	ОДТ (%)* лимфоцитов	ОДТ (%)* моноцитов
РА	11,6±2,32	11,9±2,26
Доноры	12,7±2,65	14,0±2,14**

Примечание: * – относительная длина теломер (отношение средней интенсивности флуоресценции исследуемых клеток к таковой клеток внутреннего контроля, выраженное в процентах); ** – P<0,05 (по сравнению с донорами)

Табл. 2. ОТНОСИТЕЛЬНАЯ ДЛИНА ТЕЛОМЕР* В ПОПУЛЯЦИЯХ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ РА В ПОДГРУППАХ А И Б.

Исследуемые клетки	Группа А (до 30 лет)		Группа Б (после 30 лет)	
	РА	Доноры	РА	Доноры
Лимфоциты	12,3±2,90	13,8±3,25	10,8±2,16	11,6±2,03
Моноциты	12,5±2,39**	15,4±2,15	11,3±2,26	12,6±1,56

Примечание: * – относительная длина теломер (отношение средней интенсивности флуоресценции исследуемых клеток к таковой клеток внутреннего контроля, выраженное в процентах); ** – P<0,05 (по сравнению с донорами)

Результаты и обсуждение

Сравнение результатов, полученных с использованием разных концентраций и степени очистки формамида, температуры и времени гибридизации, позволило найти комбинацию этих параметров, при которой на графике, отображающем параметры прямого и бокового светорассеяния, четко определялся регион моноцитов (рис. 1, А). Рабочая комбинация параметров представлена в предыдущем разделе. Рисунок 1 демонстрирует также возможность использования мышиных селезеночных клеток в качестве клеток внутреннего контроля: на гистограмме флуоресценции FL1 видны два пика, отражающие достаточную для достоверного разграничения разность длин теломер исследуемых клеток и клеток внутреннего контроля (рис. 1, Б).

В таблице 1 представлены данные, демонстрирующие относительную длину теломер (ОДТ) моноцитов и лимфоцитов больных РА. Достоверная разница по сравнению с донорами выявлена только для моноцитов, величина ОДТ которых снижена. Эти результаты вместе с литературными данными об укорочении теломер в гранулоцитах свидетельствуют о нарушениях миелоидного ростка кроветворения [10]. Тенденция к укорочению ОДТ отмечена и для лимфоцитов (табл. 1), а отсутствие достоверных различий может быть связано с тем, что мы не определяли ОДТ в популяции CD4-позитивных клеток, длина теломер которых при РА сокращается уже к 25 – 30 годам и соответствует таковой у 60 – 70-летних здоровых доноров [5]. В последнее время появились данные и об укорочении теломер CD8+

клеток, хотя менее значительном по сравнению с CD4⁺-клетками [5].

Анализ данных после разделения больных по возрасту также не выявил достоверных различий ОДТ лимфоцитов (табл. 2), однако достоверное уменьшение ОДТ моноцитов было характерно именно для больных в возрасте до 30 лет. Полученные данные свидетельствуют, скорее, о предшествующем развитию РА укорочении теломер моноцитов, чем об укорочении, зависящем от прогресса болезни. Такая интерпретация может быть поддержана и данными о длине теломер гранулоцитов при РА, укорочение которых (как и укорочение теломер CD4⁺-клеток) не зависит от стадии и активности процесса и определяется уже в молодом возрасте [5].

Полученные нами данные можно рассматривать в качестве дополнительного подтверждения гипотезы о генетических дефектах стволовой клетки (а не только ранней инволюции тимуса), лежащих в основе патогенетических факторов, определяющих возникновение ревматоидного артрита [3].

Список литературы

1. Blackburn E. H. Structure and function of telomeres // *Nature*. – 1991. – Vol.350.-P.569.
2. Deighton G.M., Wentzel J., Cavanagh G., Roberts D.E., Walker D.J. Contribution of genetic factors to rheumatoid arthritis // *Ann. Rheum. Dis.*-1992.-Vol.51.-P.182-185.
3. Goronzy J.J., Weyand C.M. Thymic function and peripheral T-cell homeostasis in rheumatoid arthritis // *Trends Immunol.* – 2001. – Vol.22. – P.251-255.
4. Harley C. B. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? // *Mutat. Res.*- 1991. – Vol.256.- P.271.
5. Hultdin M., Gronlund E., Norrback K., Eriksson-Lindstrom E., Just T., Roos G. Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry // *Nucleic Acids Res.* – 1998. – Vol.26(16)- P.3651-3656.
6. Koetz K., Bryl E., Spickschen K., O'Fallon W.M., Goronzy J. J., Weyand C.M. T cell homeostasis in patients with rheumatoid arthritis // *PNAS*. – 2000. - Vol.97. – P.9203–9208.
7. Lindsey J., McGill N., Lindsey L. A., Green D. K., Cooke H. J. In vitro loss of the telomeric repeats with age in humans // *Mutat. Res.* - 1991. – Vol.256. – P.245.
8. Meyne J., Ratliff R.L., Moyzis R.K. Conservation of the human telomere sequence [TTAGGG]_n among vertebrates // *PNAS*.-1989. - Vol.86. – P.6881-6888.
9. Olovnikov A. A theory of marginotomy // *J.Theor. Biol.*- 1973.-Vol.41. – P.181-190.
10. Robertson J.D., Gale R.E., Wynn R.F., Dougal M., Linch D.C., Testa N.G., Chopra R. Dynamics of telomere shortening in neutrophils and T lymphocytes during ageing and the relationship to skewed X chromosome inactivation patterns // *Br J Haematol.* – 2000.-Vol.109. – P.272-279.
11. Rufer N., Dragowska W., Thornbury G., Roosnek E., Lansdorp P.M. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry // *Nat. Biotech.* – 1998. – Vol.16. – P.743-747.
12. Schonland S.O., Lopez C., Widmann T., Zimmer J., Bryl E., Goronzy J.J., Weyand C.M. Premature telomeric loss in rheumatoid arthritis is genetically determined and involves both myeloid and lymphoid cell lineages // *PNAS*. – 2003.-Vol.100. – P.13471–13476.

поступила в редакцию 12.05.2005
принята к печати 10.09.2005