

ТЕЛОМЕРНЫЙ ПРОФИЛЬ В-ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Зиннатова Е.В., Борисов В. И., Кожевников В.С.,
Сизиков А.Э., Козлов В.А.

Учреждение РАМН Научно-исследовательский институт клинической иммунологии Сибирского отделения
РАМН, г. Новосибирск

Резюме. Одним из механизмов, ограничивающих пролиферативный потенциал клеток, является укорочение теломер. Теломеры – это хроматиновые структуры, которые экранируют и защищают концы хромосом. У позвоночных они состоят из tandemных гексамерных повторов (TTAGGG), ассоциированных с разнообразными специфичными белками. Имунная система чрезвычайно чувствительна к потере теломер, так как для Т- и В-лимфоцитов пролиферация является не только частью процесса самообновления, но и необходима для выполнения их биологических функций. Укорочение теломер в лимфоцитах может способствовать развитию иммунной недостаточности и предрасполагать к аутоиммунным процессам в пожилом возрасте. В данной работе была исследована длина теломер, темпы укорочения и вариабельность теломер в В-лимфоцитах у пациентов с ревматоидным артритом и у здоровых доноров. Было выявлено, что длина теломер в В-клетках в среднем на 1,9 и 2,3 килобаз длиннее в сравнении с CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитами соответственно у здоровых доноров. Эта же тенденция наблюдается у пациентов с ревматоидным артритом. Темп укорочения теломер в В-лимфоцитах у здоровых доноров составил 20 пар оснований в год, тогда как при ревматоидном артрите он был незначительно больше. Таким образом, укорочение теломер в В-лимфоцитах, так же, как и другие механизмы старения, может способствовать развитию аутоиммунных заболеваний.

Ключевые слова: теломеры, В-лимфоциты, ревматоидный артрит.

Zinnatova E.V., Borisov V.I., Kozhevnikov V.S., Sizikov A.E., Kozlov V.A.

TELOMERIC PROFILE IN B LYMPHOCYTES FROM THE PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Abstract. Shortening of telomeres represents an important mechanism that limits the proliferative potential of cells. Telomeres are chromatin structures that perform capping and protection of the chromosome ends. In vertebrates, they consist of tandem hexameric repeated sequences (TTAGGG) that are associated with various specific proteins. Immune system is extremely susceptible to telomere loss, since cellular proliferation underlies self-renewal of T and B lymphocytes, being also quite necessary for their biological functions. Telomere loss in lymphocytes may contribute to development of immune deficiency, and predispose for autoimmune responses in the elderly. In this study, we analyzed telomere length, the rates of telomere loss, and the variability of telomeres in B cells from rheumatoid arthritis patients, and in healthy donors. Average values of telomere length in healthy donors were found to be, respectively, 1.9 and 2.3 kb longer for B cells, as compared with CD4⁺ and CD8⁺T-lymphocytes. The same tendency was observed in rheumatoid arthritis patients. Estimated rate of telomere loss in B-cells was 20 bp per year in healthy donors, while being slightly faster in rheumatoid arthritis patients. Thus, telomere shortening in B lymphocytes, as well as other senescence mechanisms, may contribute to development of autoimmune disease. (*Med. Immunol.*, 2011, vol. 13, N 2-3, pp 151-156)

Keywords: telomeres, B lymphocytes, rheumatoid arthritis.

Адрес для переписки:

Зиннатова Елена Владимировна
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: (383) 228-21-20.
Факс: (383) 225-05-22.
E-mail: ezinnat@mail.ru

Введение

В иммунопатогенез ревматоидного артрита (РА) вовлечены практически все клетки иммунной системы. При этом изучению гомеостаза Т- и В-клеточного звена посвящено наибольшее

шее количество работ. Известно, что дисфункция Т-лимфоцитов распространяется как на пул наивных CD4⁺Т-лимфоцитов, отражая вовлечение антигеннезависимых механизмов в нарушении Т-клеточного гомеостаза, так и на Т-клетки памяти [8]. По существу, весь пул Т-клеток при РА является устаревшим вследствие недостаточного выхода вновь образованных наивных Т-клеток и изменения порога восприимчивости к апоптозу среди той же популяции клеток [12]. Кроме того, при РА на CD4⁺Т-лимфоцитах в синовиальной ткани и крови экспрессируется NKG2D-рецептор НК-клеток стимулирующего характера, который отсутствует на нормальных CD4⁺Т-лимфоцитах [3]. Предполагается, что аномальная экспрессия NKG2D и его лиганда MICA приводит к постоянной ко-стимуляции CD4⁺Т-лимфоцитов, поддерживающих хроническое воспаление посредством продукции провоспалительных цитокинов (IFN γ). Последний в свою очередь является сильным индуктором активации макрофагов, которые продуцируют TNF α , поддерживающего хроническое воспаление в суставе. Данный пул Т-лимфоцитов, являющийся «продуктом» гомеостатической пролиферации, характеризуется и укороченными теломерами.

Длина теломер – это важный фактор, определяющий репликативный потенциал клеток. Теломеры состоят из повторяющихся нуклеотидных последовательностей (TTAGGG)_n, которые выполняют важные функции в сохранении стабильности хромосом, предохраняя их от слияний, транслокаций и других поломок в процессе митоза. Также теломеры обеспечивают сохранность смысловых последовательностей генома, беря на себя результаты «концевой недорепликации» ДНК при клеточном делении.

Органы и системы, функционально зависящие от процесса клеточного обновления и пролиферации высоко чувствительны к потере теломер. Деление клеток стоит на первом месте среди причин их укорочения. Иммунная система – это лучший пример высокодинамичной клеточной системы, для которой поддержание длины теломер занимает центральное место [10]. Исследование пациентов с РА выявило, что укорочение теломер происходит не только в Т-клетках памяти, но и в наивных. При этом, клетки памяти имеют более короткие теломеры в сравнении с наивными [12]. Аналогичные изменения наблюдаются в популяции моноцитов и гранулоцитов у пациентов с РА [1, 2]. Кроме этого, в исследовании Colmegna I. et al. [7] было доказано, что при РА не остается интактной и популяция СКК периферической крови, изменяются ее как качественные, так и количественные характеристики: наряду со снижением общего количества циркули-

рующих стволовых клеток, в них сокращена длина теломер в сравнении со здоровыми донорами.

Доказано, что В-лимфоциты принимают активное участие в иммунопатогенезе РА за счет различных механизмов: презентирование антигенов Т-лимфоцитам в эктопических лимфоидных структурах (особенно в позднюю стадию иммунного ответа), синтез аутоантител и цитокинов (В-клеточно-зависимый механизм внесуставных поражений) [11].

Вследствие того, что теломерный профиль в В-лимфоцитах при РА не исследовался, **целью настоящей работы** стало изучение средней длины теломер в популяции В-лимфоцитов периферической крови у больных РА.

Материалы и методы

В исследование были включены пациенты, у которых был верифицирован диагноз «ревматоидный артрит», группу сравнения составили 60 доноров, соответствующих по возрасту. Длину теломер определяли в субпопуляциях лимфоцитов (CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺). Клетки получали из лейкоцезы периферической крови. Длину теломер измеряли с помощью метода flow-FISH, как подробно описано нами ранее [1, 2]. За стандартную длину теломер принимали теломеры мышинных тимоцитов линии DBA. Мечение теломер проводили с использованием ДНК-зонда PNA, нагруженного флуорохромом FITC (EUROGENTEC Ltd, Belgium), с последующим анализом методом четырехцветной проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, Becton Dickinson). Дополнительно в данной работе вычисляли разницу между максимальными и минимальными значениями показателей, отражающих длину теломер, что на гистограмме соответствовало ширине пика флуорисценции ДНК-зонда PNA, меченного FITC.

Статистическая обработка. Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ “Statistica 6.0”. Сравнение вариационных рядов осуществлялась с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Корреляционный анализ проводился методом ранговой корреляции Спирмена.

Результаты

Длина теломер и динамика ее изменения с возрастом в В-лимфоцитах у здоровых доноров. В ходе исследования было достоверно подтверждено превалирование средней длины теломер в В-лимфоцитах над CD4⁺, CD8⁺ субпопуляциями клеток в группе здоровых доноров (рис. 1). Впервые данная закономерность была выявлена Martens U.M. et al. [13]. В своих работах данная

группа ученых не наблюдала более коротких теломер в В-лимфоцитах в сравнении с Т-клетками у здоровых доноров.

При исследовании динамики изменения длины теломер с возрастом была выявлена тенденция незначительного ежегодного укорочения теломер в В-лимфоцитах в сравнении с Т-клетками (20 п.н. и 60 п.н. в год соответственно), что не противоречит литературным данным о более медленном темпе ежегодного укорочения теломер в В-лимфоцитах в сравнении с Т-клетками (рис. 2).

Длина теломер и динамика ее изменения с возрастом в В-лимфоцитах у больных ревматоидным артритом. При сравнении значений средней длины теломер в клетках периферической крови доноров и пациентов с РА было выявлено достоверное укорочение теломер во всех исследуемых популяциях лимфоцитов в группе РА (табл. 1). При этом наибольшие теломерные потери наблюдались в В-клетках: в CD19⁺ лимфоцитах теломеры короче на 1967 пар оснований (п.о.), в CD4⁺ лимфоцитах – на 720 п.о., в CD8⁺ лимфо-

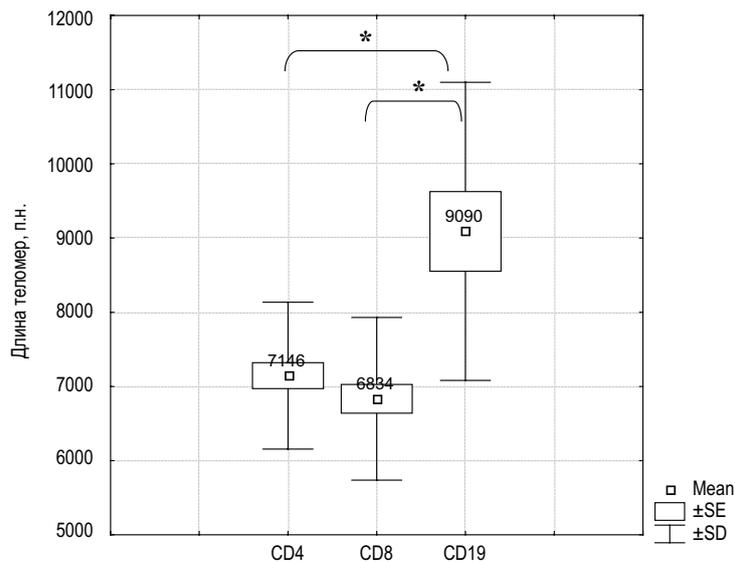


Рисунок 1. Средняя длина теломер в лимфоцитах периферической крови у доноров

Примечание. * – статистически значимая разница ($p < 0,05$).

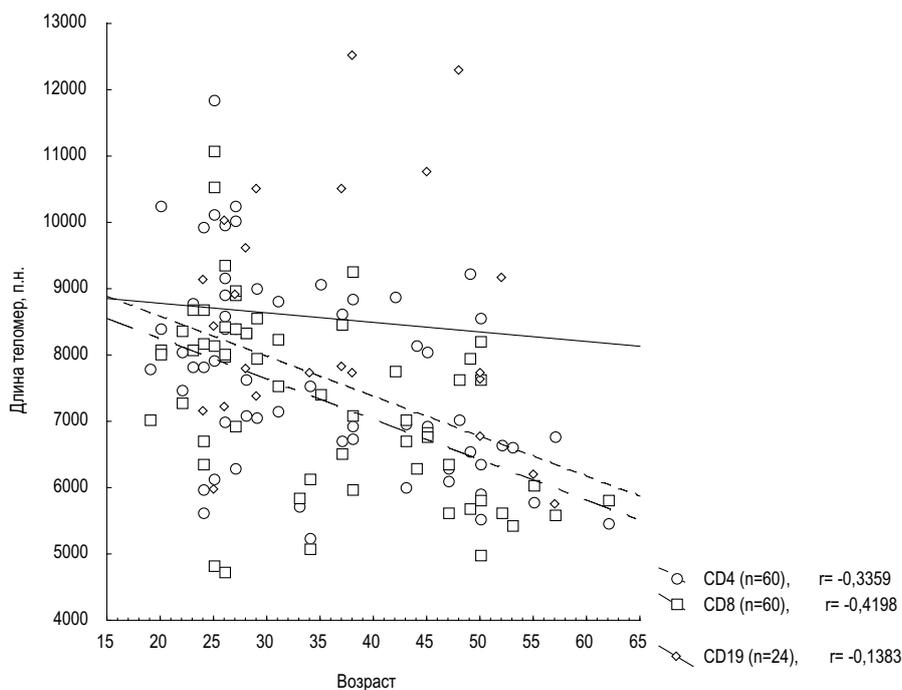


Рисунок 2. Динамика изменения длины теломер с возрастом в лимфоцитах у доноров

ТАБЛИЦА 1. СРЕДНЯЯ ДЛИНА ТЕЛОМЕР В ПОПУЛЯЦИЯХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ РА (Mean ± SD) п.н.

Исследуемые группы	CD4 ⁺ лимфоциты (Mean ± SD) п.н.	CD8 ⁺ лимфоциты (Mean ± SD) п.н.	CD19 ⁺ лимфоциты (Mean ± SD) п.н.
Доноры, средний возраст – 45 лет (min 28, max 56 лет)	7146±989	6943±1096	9090±2009
РА, средний возраст – 45 лет (min 21, max 58 лет)	6426±990*	6263±1024*	7123±1142*

Примечание. * – статистически значимая разница ($p < 0,05$).

цитах – на 680 п.о. в сравнении со здоровыми донорами.

Анализ темпов укорочения теломер в В-лимфоцитах доноров и больных РА выявил, что при РА скорость укорочения теломер отличается от таковой у доноров в сторону ее небольшого увеличения (39 п.н. в год в сравнении с 20 п.н. у доноров), не достигая при этом показателей ежегодной потери теломер в Т-лимфоцитах у здоровых доноров (60 п.н. в год) (рис. 3).

Вариабельность средней длины теломер лимфоцитов. Известно, что средняя длина теломер определяется как усредненное значение длины теломер на всю популяцию исследуемых клеток. С помощью гистограмм, полученных методом проточной цитометрии, можно рассчитать разброс по длине теломер от минимальных до максимальных значений в исследуемой популяции клеток. Это значение соответствует вариабельности длины теломер. В результате проведенного анализа было выявлено достоверное ($p < 0,01$) увеличение разницы между максимальными и минимальными значениями показателей, отра-

жающих длину теломер, во всех исследуемых популяциях лимфоцитов (табл. 2).

Как видно из таблицы, при РА в CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ лимфоцитах вариабельность длины теломер меняется в сторону ее увеличения до определенного уровня, практически одинакового для всех клеток.

Обсуждение

О проявлениях и механизмах гомеостатического контроля В-клеток известно мало. Несмотря на непрерывный и довольно значительный приток свежесформированных В-лимфоцитов из костного мозга (он примерно в 2 раза выше, чем приток Т-клеток), их численность остается постоянной. Срок жизни наивных В-клеток меньше, чем Т-клеток, но больше, чем предполагалось ранее. Он исчисляется неделями и месяцами. В-лимфоциты обладают очень выраженной способностью к пролиферативной экспансии: всего три В-клетки способны обеспечить заселение зародышевого центра [4]. Для выживания В-клеток необходимо их встраивание в адекват-

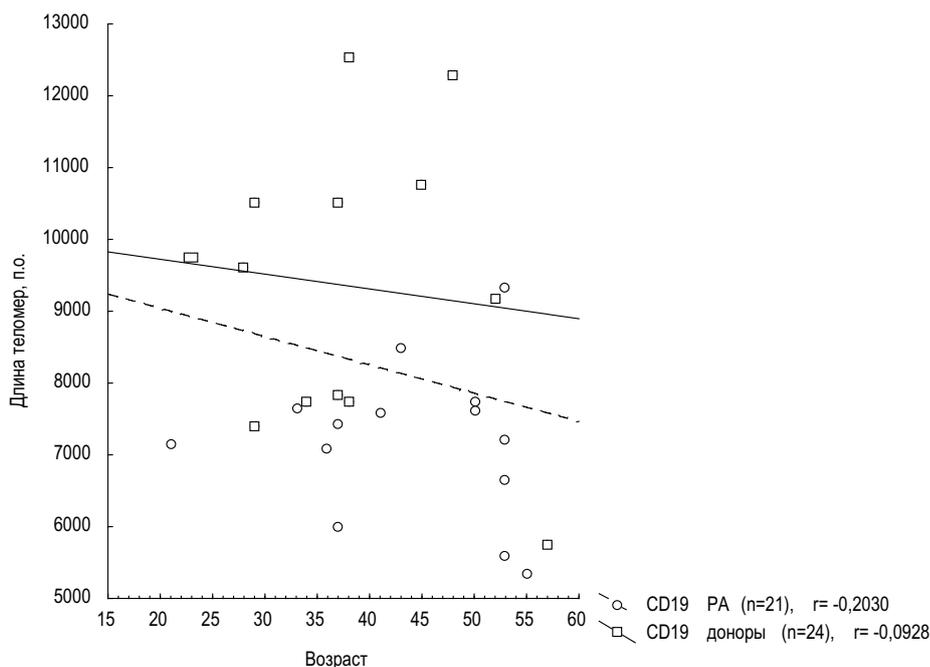


Рисунок 3. Динамика изменения длины теломер с возрастом в В-лимфоцитах у доноров и больных РА

ТАБЛИЦА 2. ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР В ЛИМФОЦИТАХ ПРИ РА (Mean \pm SD)

Группы сравнения	Лимфоциты	CD4 ⁺ (Mean \pm SD)	CD8 ⁺ (Mean \pm SD)	CD19 ⁺ (Mean \pm SD)
Доноры (n = 10), средний возраст – 46 (min 34, max 57)	72,1 \pm 12	62 \pm 11,4	59,2 \pm 11,3	67,1 \pm 12,2
РА (n = 14), средний возраст – 46 (min 20, max 62)	97,4 \pm 14,9*	88 \pm 18,4*	85,9 \pm 13,2*	89,2 \pm 13,6*

Примечание. * – статистически значимая разница ($p < 0,01$).

ную нишу, вне которой они неизбежно гибнут через несколько дней. В-клетки активно организуют свою нишу: общеизвестна их способность (зависимая от лимфотоксина) формировать первичные фолликулы и зародышевые центры. Данная способность хорошо демонстрируется на примере ревматоидного артрита, при котором имеет место типичная организация В-лимфоцитами эктопических лимфоидных структур в зоне воспаления суставов.

В результате проведенной работы было подтверждено, что динамика изменения теломер в В-лимфоцитах принципиально отличается от таковой в Т-клетках; выявленная особенность прослеживается и при ревматоидном артрите. Во-первых, было обнаружено, что у здоровых доноров теломеры в В-лимфоцитах на 1,9 kb и 2,3 kb длиннее в сравнении с CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитами соответственно. Во-вторых, динамика изменения длины теломер с возрастом в В-клетках также отличается от Т-лимфоцитов более медленным темпом ежегодной потери теломер (20 п.н./год и 60 п.н./год соответственно), что не противоречит ранее проведенным исследованиям. Однако данные других авторов относительно темпов укорочения теломер в субпопуляциях лимфоцитов немного отличаются. В работе Rufer et al. (1999) было показано, что теломеры в CD4⁺ и CD8⁺ клетках памяти укорачивались на 51 и 54 п.н./год соответственно, в наивных – на 39 и 34 п.н./год; исследования Son et al. (2000) выявили немного меньшую скорость укорочения: в CD4⁺, CD8⁺ и CD19⁺ лимфоцитах – 35, 26 и 19 п.н./год соответственно. Таким образом, в противоположность Т-лимфоцитам, у которых в процессе дифференцировки и пролиферации происходит значительное укорочение теломер (теломеры в Т-клетках памяти короче, чем в наивных), в В-лимфоцитах в процессе их развития укорочения теломер не наблюдается (длина теломер в наивных и клетках памяти практически одинакова [16]. В основе этого феномена лежит высокая теломеразная активность в В-клетках, которая способствует не только поддержанию длины теломер, но и их увеличению. Это имеет место при переходе наивных В-клеток в антигенактивированное состояние (центробласты и центроциты герминативных центров)

в ходе иммунного ответа. Возможно, данный механизм обеспечивает образование необходимого количества долгоживущих В-клеток памяти, которые персистируют в организме на протяжении всей жизни независимо от присутствия иммунных стимулов.

В-третьих, при РА, несмотря на то, что укорочение теломер наблюдается во всех субпопуляциях лимфоцитов, в В-клетках длина теломер остается большей в сравнении с Т-клетками. На сегодняшний момент до конца не ясно, какой из механизмов обеспечивает низкую степень суммарной потери теломер в В-лимфоцитах: высокая активность теломеразы, разная скорость деления Т-и В-лимфоцитов, либо это результат селекции и выживания клеток с изначально длинными теломерами.

Несмотря на то, что при РА темп укорочения теломер в В-лимфоцитах немного больше в сравнении со здоровыми донорами (39 п.н./год в сравнении с 20 п.н./год соответственно), наличие изначально коротких теломер в стволовых клетках периферической крови свидетельствует в пользу того, что происходящие на периферии активационные процессы (в т.ч. пролиферация) достаточно хорошо компенсируются теломеразой в популяции В-лимфоцитов [7, 17].

В-четвертых, увеличение вариативности средней длины теломер в лимфоцитах при РА свидетельствует о большей, чем в норме гетерогенности длин теломер на отдельных хромосомах. Кроме того, большая вариативность в В-лимфоцитах у здоровых доноров может косвенно свидетельствовать о выраженной асимметрии популяции периферических В-клеток [13, 18], в которой могут присутствовать как клетки с короткими, так и с длинными теломерами. Изучение данного феномена станет целью дальнейшей исследовательской работы в области биологии теломер.

Таким образом, укорочение теломер в В-лимфоцитах при РА подтверждает, что данная популяция клеток, находясь в активно пролиферирующем состоянии, принимает непосредственное участие в развитии аутоиммунного процесса. А меньший темп возрастного укорочения теломер в В-клетках в сравнении с Т-лимфоцитами, как в норме так и при патоло-

гии, свидетельствует о высокой теломеразной активности в В-лимфоцитах и о том, что укорочение теломер в этой популяции клеток скорее является следствием наличия изначально коротких теломер в стволовых кроветворных клетках костного мозга.

Список литературы

1. Борисов В.И., Кожевников В.С., Сениуков В.В., Сизиков А.Э., Коненкова Л.П., Герцог О.А., Козлов В.А. Укорочение длины теломер моноцитов при ревматоидном артрите // Медицинская иммунология. – 2006. – № 1. – С. 87-90.
2. Борисов В.И., Кожевников В.С., Сениуков В.В., Сизиков А.Э., Козлов В.А. Раннее старение иммунной системы при ревматоидном артрите // Российский иммунологический журнал. – 2007. – № 2. – С. 144-149.
3. Супоницкая Е.В. Естественные киллеры. Взгляд ревматолога // Научно-практическая ревматология. – 2008. – № 3. – С. 45-48.
4. Ярилин А.А. Гомеостатические процессы в иммунной системе. Контроль численности лимфоцитов // Иммунология. – 2004. – № 5. – С. 312-319.
5. Andrews N., Fujii H., Goronzy J.J., Weyand C.M. Telomeres and Immunological Diseases of Aging // J. Gerontology. – 2009. – Vol. 56.
6. Casellas R., Nussenzweig A., Wuerffel R., Pelanda R., Reichlin A., Suh H., Qin X.F., Besmer E., Kenter A., Rajewsky K., Nussenzweig M.C. Ku80 is required for immunoglobulin isotype switching // EMBO Journal. – 1998. – Vol. 17. – P. 2404-2411.
7. Colmegna I., Diaz-Borjon A., Fujii H., Schaefer L., Goronzy J.J., Weyand C.M. Defective Proliferative Capacity and Accelerated Telomeric Loss of Hematopoietic Progenitor Cells in Rheumatoid Arthritis // J. Arthritis & rheumatism. – 2008. – Vol. 58. – P. 990-1000.
8. Fujii H., Shao L., Colmegna I., Goronzy J.J., Weyand C.M. Telomerase insufficiency in rheumatoid arthritis // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – Vol. 106. – P. 4360-4365.
9. Gabalawy H.D., Lipsky P.E. Why do we not have a cure for rheumatoid arthritis? // J. Arthritis Rheum. – 2002. – Vol. 4. – P. 297-301.
10. Goronzy J.J., Fujii H., Weyand M. Telomeres, immune aging and autoimmunity // J. Experimental Gerontology. – 2006. – Vol. 41. – P. 246-251.
11. Kim H.J., Berek C. B cell in rheumatoid arthritis // J. Arthritis Res. – 2000. – Vol. 2. – P. 126-131.
12. Koetz K., Bryl E., Spickschen K., O'Fallon W.M., Goronzy J.J., Weyand C.M. T cell homeostasis in patient with rheumatoid arthritis // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2000. – Vol. 97. – P. 9203-9208.
13. Martens U.M., Brass V., Sedlacek L., Pantic M., Exner C., Guo Y., Engelhardt M., Lansdorp P.M., Waller C.F., Lange W. Telomere maintenance in human B lymphocytes // J. British Journal of Haematology. – 2002. – Vol. 119. – P. 810-818.
14. Nagumo H., Agematsu K., Kobayashi N., Shinozaki K., Hokibara S., Nagase H., Takamoto M., Yasui K., Sugane K., Komiyama A // The different process of class switching and somatic hypermutation; a novel analysis by CD27- na ve B cells. – 2002. – Vol. 99. – P. 567-575.
15. 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 // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2003. – Vol. 100. – P. 13471-13476.
16. Son N.H., Joyce B., Heiatt A., Chrest F.J., Yanovski J., Weng N. Stable telomere length and telomerase expression from naive to memory B-lymphocyte differentiation // J. Mechanisms of Ageing and Development. – 2003. – Vol. 124. – P. 427-432.
17. Son N.H., Murray S., Yanovski J., Hodes R.J., Weng N. Lineage-Specific Telomere Shortening and Unaltered Capacity for Telomerase Expression in Human T and B Lymphocytes with Age // The Journal of Immunology. – 2000. – Vol. 165. – P. 1191-1196.
18. Weng N., Granger L., Hodes R. Telomere lengthening and telomerase activation during human B cell differentiation // J. Immunology. – 1997. – Vol. 94. – P. 10827-10832.

поступила в редакцию 21.03.2011
отправлена на доработку 28.03.2011
принята к печати 30.03.2011