

ОЦЕНКА ДЛИНЫ ТЕЛОМЕРНЫХ РАЙОНОВ ДНК У МЫШЕЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ РТПХ

Учреждение РАМН Институт клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Анализ длины теломерных районов ДНК в субпопуляциях лимфоцитов селезенки (CD19⁺, CD4⁺ и CD8⁺) не выявил их укорочения при развитии аутоиммунной патологии, индуцированной хронической РТПХ. Предполагается, что это может быть связано с активацией теломеразы в лимфоидных клетках реципиентов.

Ключевые слова. Теломерные районы ДНК, лимфоциты, селезенка, аутоиммунная патология.

Длина теломерных районов ДНК является значимым показателем пролиферативного потенциала клетки. Известно, что при некоторых аутоиммунных заболеваниях (ревматоидный артрит, atopический дерматит и другие) отмечается укорочение теломерных районов ДНК [7, 11]. Считается, что при иммунопатологических процессах укорочение теломерных районов ДНК происходит в результате геоэстатической пролиферации [5]. Ранее нами было показано участие процесса гомеостатической пролиферации лимфоцитов в патогенезе аутоиммунного заболевания, индуцированного хронической реакцией трансплантат против хозяина (РТПХ) [1]. Целью данного исследования было оценить длину теломерных районов ДНК в лимфоцитах у мышей с аутоиммунной патологией при хронической РТПХ.

Материалы и методы.

В опытах использовали мышей-самок линии DBA/2 и гибридов первого поколения (C57Bl/6xDBA/2)F1 в возрасте 2 месяцев, полученных из лаборатории экспериментальных животных (моделей) НИИ КИ СО РАМН (г. Новосибирск). Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). Хроническую РТПХ индуцировали внутривенным переносом 65×10^6 клеток селезенки мышей DBA/2 реципиентам – гибридам (C57Bl/6xDBA/2)F1 двукратно с интервалом в 6 дней [2, 6]. Через 3 месяца у части животных (*lupus*-реципиенты) развивался аутоиммунный *lupus*-подобный гломерулонефрит, который выявляли по появлению стойкой протеинурии (более 3.0 мг/мл белка в моче в трех последовательных измерениях) [3]. На клеточном сортере FACSAria (Veston Dickinson, США) сортировали CD4⁺ и CD8⁺ субпопуляции; затем после отмывки в PBS с 0.1% БСА метили биотинилированными антителами против CD45RB (CD45RB^{high} – наивные лимфоциты и CD45RB^{low} – лимфоциты памяти) и без предварительной сортировки общую популяцию спленоцитов антителами против CD19⁺ (В-клетки) (eBioscience, Inc.), в которых измеряли среднюю длину теломерных районов ДНК методом гибридизации *in situ* с последующим анализом на проточном цитофлуориметре (Flow-FISH). В качестве контроля использовали интактных мышей того же пола и возраста, а также мышей с хронической РТПХ без признаков гломерулонефрита – *nonlupus*-реципиентов). Для статистического анализа полученных результатов использовали методы непараметрической статистики. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение.

Первоначально длину теломерных районов ДНК определяли в общей популяции лимфоцитов селезенки. Результаты проведенных исследований показали, что на начальных этапах развития хронической РТПХ отмечается тенденция к увеличению длины теломерных районов ДНК в общей популяции спленоцитов реципиентов относительно контрольной группы животных: через 2 недели после индукции хронической РТПХ в контрольной группе длина теломерных районов ДНК составляла 44 970 п.н. и в опытной группе – 46 970 п.н.; через месяц после индукции хронической РТПХ, соответственно, 47 029 п.н. и 51 523 п.н.

Через 3 месяца после индукции хронической РТПХ после окончательного формирования у части реципиентов иммунокомплексного гломерулонефрита длина теломерных районов ДНК у *lupus*-реципиентов также значимо не отличалась от контрольной группы животных и *nonlupus*-реципиентов (в контрольной груп-

пе – 39 323 п.н., у *nonlupus*-реципиентов – 39 074 п.н., у *lupus*-реципиентов – 40 359 п.н.).

Так как роль различных субпопуляций клеток в развитии хронической РТПХ и формировании аутоиммунной патологии может отличаться, в дальнейшем мы оценивали длину теломерных районов ДНК в отдельных субпопуляциях лимфоцитов. Анализ длины теломерных повторов ДНК в наивных клетках и клетках памяти среди CD4⁺ и CD8⁺-лимфоцитов селезенки не выявил значимых изменений этого параметра у *lupus*-реципиентов; достоверные изменения наблюдаются только у *nonlupus*-реципиентов: длина теломерных районов ДНК увеличена в CD8⁺-клетках памяти CD8⁺CD45RB^{low} у *nonlupus*-реципиентов по сравнению с контрольной группой животных. В CD19⁺-лимфоцитах селезенки различий в длине теломерных повторов ДНК между группами отмечено не было (таблица).

Таблица

Средняя длина теломерных районов ДНК в субпопуляциях лимфоцитов селезенки у экспериментальных животных (М)

длина в п.н.	контроль (n=5)	nonlupus (n=5)	lupus (n=5)
CD4 ⁺ CD45RB ^{high}	26441	27013	26877
CD4 ⁺ CD45RB ^{low}	25523	27077	26776
CD8 ⁺ CD45RB ^{high}	27455	28553	27501
CD8 ⁺ CD45RB ^{low}	26165	28695*	27954
CD19 ⁺	30807	31886	31688

Примечание: * – достоверные различия по сравнению с контролем

Нужно отметить, что хотя в ряде работ обнаружено уменьшение теломерных повторов в ДНК при аутоиммунных заболеваниях, некоторые авторы находят увеличение длины теломерных районов ДНК при системной красной волчанке, аутоиммунном заболевании, в качестве аналога которого рассматривают аутоиммунную патологию, возникающую у реципиентов в использованной нами модели хронической РТПХ [4, 9].

Возможной причиной отсутствия сокращения длины теломерных районов ДНК в субпопуляциях спленоцитов реципиентов может являться активация теломеразы в лимфоидных клетках реципиентов. Так, показано, что IL-7 вызывает активацию теломеразы [8, 10]; в то же время нами ранее было обнаружено, что уровень IL-7 возрастает в периферической крови на ранних стадиях хронической РТПХ у всех реципиентов и остаётся повышенным у *lupus*-реципиентов и через 3 месяца после индукции хронической РТПХ [1].

ЛИТЕРАТУРА

1. Гойман Е.В., Кудяева О.Т., Ильина Н.А. и др. // БЭБиМ. 2010. № 1(149). С. 60-63.
2. Козлов В.А., Кудяева О.Т., Колесникова О.П. и др. // Иммунология. 2002. Вып. 23, № 3. С. 143-146.
3. Колесникова О.П., Кудяева О.Т., Логинов М.В. и др. // Вестник АМН. 1991. № 12. С. 13-16.
4. Beier F., Balabanov S., Amberger C.C. et al. // Lupus. – 2007. Vol. 16. P. 955-962.
5. Goronzy J., Fujii H., Weyand C. // Experimental Gerontology. 2006. Vol. 41. P. 246-251.
6. Kimura M., Ida S., Shimada K. et al. // Clin. and Exp. Immunol. 1987. Vol. 69, N 2. P. 385-393.
7. Oeseburg H., Boer R., Gilst W. et al. // Eur.J.Physiol. 2009. Vol. 17. P. 60-69.
8. Soares M.V., Borthwick N.J., Maini M.K. et al. // J Immunol. 1998. Vol. 161. P. 5909-5917.
9. Tarhan F., Vura I. F., Kosova B. et al. // Rheumatol Int. 2008. Vol. 28. P. 579-583.
10. Wallace D., Berard M., Soares M. et al. // Immunology. 2006. Vol. 119. P. 243-235.
11. Weng N., Paimer L., Levine B. et al. // Immunology Reviews. 1997. Vol. 160. P. 43-54.

Goiman E.V., Borisov V.I., Kudaeva O.T., Kozlov V.A.

**EVALUATION OF THE TELOMERE REGIONS
LENGTH OF DNA IN MICE WITH CHRONIC
GVHD**

Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

Summary. Analysis of telomere regions length of DNA in subpopulations of spleen lymphocytes (CD19⁺ CD4⁺ and CD8⁺) has not revealed their shortening during the development of autoimmune pathology induced by chronic GVHD. It is assumed that it may be due to increase of telomerase activity in lymphoid cells of recipients.

Key words: telomeric regions of DNA, lymphocytes, spleen, autoimmune pathology.
