

На правах рукописи

Барковская Маргарита Шамилевна

**Длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом  
и субпопуляционный состав Т-клеток памяти при бронхиальной  
астме**

14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология»

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Новосибирск 2019

**Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении  
«Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»**

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор,  
академик РАН

**Козлов Владимир Александрович**

**Официальные оппоненты:**

**Литвинова Лариса Сергеевна**, доктор медицинских наук, заведующая Базовой лабораторией иммунологии и клеточных биотехнологий, профессор кафедры Фундаментальной медицины Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»

**Минина Юлия Михайловна**, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории генетики развития отдела молекулярных механизмов онтогенеза, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России, г. Москва

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 в НИИФКИ по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФКИ и на сайте <http://www.niikim.ru/ru/диссовет/объявления-диссовета>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

**И. о. ученого секретаря диссертационного совета,  
доктор медицинских наук**



Колесникова О.П.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Бронхиальная астма (БА) – это хроническое иммуноопосредованное воспалительное заболевание дыхательных путей, проявляющееся их обструкцией. В научной литературе сформировано представление о различных фенотипах БА, которые классифицируют в зависимости от триггерного фактора, клинических проявлений, характера воспаления, возраста манифестации заболевания и других признаков [Wenzel S.E. и др., 2012; Фассахов Р.С., 2017]. Клиническую неоднородность БА связывают с реализацией в процессе её развития различных молекулярно-генетических и клеточных механизмов, которые объединяют в понятие эндотипа заболевания [Robinson D. И др., 2017].

В настоящее время важная роль в патогенезе бронхиальной астмы отводится Т-лимфоцитам памяти [Todo-Vom A. и др., 2012]. Литературные данные о содержании субпопуляций центральных и эффекторных Т-клеток памяти в периферической крови у пациентов с БА противоречивы и неоднозначны с клинической точки зрения. Тем не менее, они свидетельствуют об изменениях субпопуляционного состава Т-клеток памяти при БА, которые могут сопровождаться их различными функциональными изменениями [Chen и др., 2017; Wiest, M. и др., 2018]. Одним из функциональных показателей Т-клеток памяти является их пролиферативный потенциал, который снижен по сравнению с наивными Т-лимфоцитами. Снижение пролиферативного потенциала центральных Т-клеток памяти подтверждается данными о снижении средней длины теломер в  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-лимфоцитах памяти по сравнению с наивными Т-клетками [Rufer N. и др., 1999; Weng N.P. и др., 1995].

Теломеры – это нуклеопотеиновые структуры, которые находятся на концах хромосом и служат защитой от «репликативного старения» в результате деления клетки [Hayflick L., 1965; Moyzis R.K. и др., 1988]. Показано снижение средней длины теломер в лимфоцитах периферической крови при БА, atopическом дерматите (АД) и ревматоидном артрите (РА) [Schonland S.O. и др., 2003; Борисов В.И. и др., 2007]. К настоящему моменту известен факт, что количество теломерных повторов в клетке распределено неравномерно и отличается на плечах различных хромосом [Lansdorp P.M. и др., 1996]. Распределение длины теломер на плечах индивидуальных хромосом получило название теломерного профиля, который является индивидуальной наследуемой величиной [Graakjaer J. и др., 2006]. Ранее была продемонстрирована связь уменьшения длины теломерных последовательностей отдельных хромосом с некоторыми онкологическими заболеваниями и ревматоидным артритом [Blinova E.A. и др., 2016; Xing J. и др., 2009; Zheng Y.L. и др., 2011]. Таким образом, укорочение теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом, наряду с изменением субпопуляционного состава клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов периферической крови, может служить маркером БА. Однако при БА такие данные отсутствуют.

Недостаточное количество работ по исследованию теломерного профиля человека отчасти может объясняться тем, что среди множества существующих методик для определения длины теломер, провести количественную оценку теломерных последовательностей на всех плечах индивидуальных хромосом позволяет лишь методика Q-FISH [Aubert G., Lansdorp P.M., 2008]. Важным этапом Q-FISH является идентификация хромосом с помощью дифференциального окрашивания, качество которого зависит от выбранной температуры и времени денатурации ДНК. Также для методики Q-FISH необходимо корректное проведение регистрации микроизображений метафазных хромосом и их компьютерная обработка [Poong S.S., Lansdorp P.M., 2001]. В связи с чем было целесообразно оптимизировать методику Q-FISH и разработать программное обеспечение, позволяющее с высокой точностью и воспроизводимостью оценить длину теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом у пациентов с иммунопатологией.

Исходя из вышесказанного, была сформулирована **цель исследования:**

Изучить длину теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом и охарактеризовать изменения субпопуляционного состава и пролиферативной активности наивных Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти при бронхиальной астме.

#### **Задачи**

1. Разработать программное обеспечение и модифицировать методику Q-FISH для определения длины теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом у пациентов с иммунопатологией;

2. Определить длину теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом Т-лимфоцитов у пациентов с бронхиальной астмой в сравнении со здоровыми донорами;

3. Исследовать содержание Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов и изменение их субпопуляционного состава в периферической крови и при поликлональной активации *in vitro* у пациентов с бронхиальной астмой и здоровых доноров;

4. Изучить пролиферативную активность Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в ответ на поликлональную активацию *in vitro* при бронхиальной астме;

5. Сопоставить выявленные изменения длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом Т-лимфоцитов и субпопуляционного состава Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов с клиническими характеристиками бронхиальной астмы (форма и длительность заболевания).

#### **Научная новизна работы**

Впервые были определены особенности укорочения теломер на отдельных хромосомах у пациентов с БА в сравнении со здоровыми донорами. Было обнаружено, что у пациентов с БА происходит достоверное укорочение теломерных повторов 6p, 9p, 9q, 11q и 13q плеч индивидуальных хромосом.

Впервые был сделан вывод о связи длины теломер индивидуальных хромосом с клинической неоднородностью и длительностью течения данного заболевания. При

экзогенной форме БА показано достоверное укорочение длины теломер на различных плечах индивидуальных хромосом (1p, 4q, 5q, 6p, 9p, 9q, 11q, 12q, 13q, 14q, 15q, 20q), тогда как при эндогенной форме БА длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом не отличалась от доноров. А также показано, что в дебюте экзогенной БА укорочены теломерные повторы на обоих плечах 9 хромосомы, тогда как при длительно текущей экзогенной БА укорочение теломер происходит уже на многих плечах индивидуальных хромосом (4q, 5p, 5q, 6p, 7q, 9p, 9q, 10q, 11q, 12q, 13p, 13q, 14q, 15p, 15q, 17p, 18p, 20q, 22q).

Наиболее полно, по сравнению с предыдущими исследованиями, были охарактеризованы изменения содержания Т-клеток памяти при БА. Было установлено, что содержание  $CD4^+$  Т-клеток памяти повышено при экзогенной форме БА, а  $CD8^+$  Т-клеток памяти – в дебюте заболевания. При этом у пациентов с экзогенной формой БА происходит перераспределение субпопуляционного состава Т-клеток памяти в пользу субпопуляций  $CD4^+Tem62L^+$  и  $CD8^+Tem62L^+$ , а при дебюте БА – только в пользу  $CD4^+Tem62L^+$ .

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные результаты дополняют представления о характере укорочения теломер при БА. Выявлены особенности укорочения теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом при экзогенной форме БА, которые связаны с длительностью течения заболевания. Установленные данные об изменении содержания  $CD4^+$  Т-клеток памяти и субпопуляционного состава Т-клеток памяти при БА расширяют современное понимание о различном характере функционирования иммунной системы при экзогенной и эндогенной формах БА.

С практической точки зрения, данные об укорочении теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом в комплексе с данными об изменении содержания Т-клеток памяти и их отдельных субпопуляций при экзогенной форме БА могут послужить признаком индивидуальной предрасположенности к аллергическим заболеваниям. Что актуально с точки зрения персонифицированной медицины, так как эти данные можно использовать для дальнейшего поиска маркеров или предикторов неблагоприятного исхода бронхиальной астмы, связанных с длиной теломер и клетками памяти.

Практическая значимость исследования связана также с разработкой программного обеспечения и модификацией протокола Q-FISH, который обладает высокой воспроизводимостью и может с достаточной точностью определить длину теломерных повторов на плечах индивидуальных хромосом при сохранении морфологии последних. Созданное программное обеспечение «MeTeLen» вычисляет длину теломер с учетом времени экспозиции снимка, а также учитывает дополнительную информацию, получаемую с помощью флуоресцентных бус, для выравнивания сигнала флуоресценции с целью коррекции неравномерного освещения при микроскопии и регистрации изображений метафазных хромосом. Это позволяет проводить более точную оценку длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом. Методика опубликована в журналах, на программное

обеспечение получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2016614696 «Оценка длины теломерных районов хромосом (MeTeLen) / Measurement of telomere length on chromosome (MeTeLen)».

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Экзогенная форма бронхиальной астмы характеризуется укорочением теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом: в дебюте укорочены теломеры только на плечах девятой хромосомы, а при увеличении стажа заболевания укорачиваются теломерные повторы 4q, 5p, 5q, 6p, 7q, 9p, 9q, 10q, 11q, 12q, 13p, 13q, 14q, 15p, 15q, 17p, 18p, 20q, 22q плеч индивидуальных хромосом.

2. Отличием экзогенной формы бронхиальной астмы от эндогенной является накопление  $CD4^+$  клеток памяти и изменение субпопуляционного состава  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-лимфоцитов памяти в периферической крови, которое проявляется увеличением содержания  $CD4^+62L^+$  и  $CD8^+62L^+$  эффекторных клеток памяти.

#### **Апробация материалов диссертации**

Материалы диссертации были доложены и обсуждены на Международной научной конференции Научного Парка СПбГУ «Трансляционная биомедицина: современные методы междисциплинарных исследований в аспекте внедрения в практическую медицину» (г. Санкт-Петербург, 2015), на IX Отчетной научной сессии НИИФКИ "Фундаментальные и клинические аспекты иммунологии" (г.Новосибирск, 2016), на IX Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2017), на Европейском конгрессе ревматологов (EULAR-2017, Мадрид, Испания, 2017), на 5 Европейском иммунологическом конгрессе (ECI-2018, Амстердам, Нидерланды, 2018). Апробация диссертации состоялась 4 сентября 2019 года на семинаре клинического отдела НИИФКИ (протокол № 15).

#### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, включая 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ. Получено 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2016614696.

#### **Степень достоверности и личное участие автора**

Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором на базе лаборатории клинической иммунопатологии НИИФКИ.

#### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 179 страницах машинописного, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения и выводов. Прилагаемая библиография включает 285 литературных источников, из них 271 зарубежный. Работа иллюстрирована 25 рисунками, 6 таблицами.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

#### **Объект исследования**

Объектом исследования являлись мононуклеарные клетки периферической крови (МНК ПК) пациентов с БА (31 человек; 25 женщин и 6 мужчин; средний

возраст  $44,13 \pm 1,7$  года) и условно-здоровых доноров (30 человек; 24 женщин и 6 мужчин; средний возраст  $44,6 \pm 1,7$  года). Диагноз БА выставлялся в соответствии с клиническими критериями GINA-2016, наличие экзогенной формы БА во всех случаях подтверждалось сенсibilизацией к аэроаллергенам, установленной по результатам скарификационных тестов. Для валидации методических условий Q-FISH и программного обеспечения были использованы МНК ПК, полученные от 3 пациентов с РА. Все пациенты на момент забора материала находились на лечении в клинике иммунопатологии НИИФКИ г Новосибирска. Исследование проводилось с добровольного информированного письменного согласия всех пациентов и условно-здоровых доноров, одобрено локальным этическим комитетом НИИФКИ (протокол №111 от 06.11.2018).

### **Протокол активации Т-лимфоцитов периферической крови**

Мононуклеарные клетки выделялись из периферической крови на градиенте плотности фиккол-урографина стандартной методикой [Boyum A., 1968]. Клетки, предназначенные для определения длины теломерных последовательностей, ресуспендировали в полной среде 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, UK) и добавлением фитогемагглютинаина (ФГА) в качестве стимулятора митоза Т-лимфоцитов (30 мкг/мл). Клетки культивировали в течение 72 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе, при 37°C в 24-луночном плоскодонном планшете, концентрация клеток составляла 1,5 млн на 1 мл полной среды.

С целью определения субпопуляционного состава и пролиферативной активности Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в ответ на стимуляцию культивирование МНК проводилось таким же способом, как указано выше, но в меньшем объеме: культивировали в 96-луночных плоскодонных планшетах, в дублях, по 150 тыс. клеток на 100 мкл среды. В качестве контроля были проанализированы клетки, культивированные в полной среде RPMI 1640 без добавления ФГА. Для оценки пролиферации перед культивированием клетки окрашивали витальным красителем сукцинимидным эфиром карбоксифлюоресцеина (CFSE) с конечной концентрацией 1 мкМ в RPMI 1640 в течение 15 мин при 37°C. Избыток красителя удаляли путем добавления эквивалентного объема FCS.

### **Количественная флуоресцентная гибридизация *in situ* (Q-FISH)**

Гипотоническую обработку, фиксацию и распластывание метафаз на стекле проводили по стандартным протоколам [Roop, 2001; Рубцов Н.Б., 2006]. В качестве предгибризационной подготовки стекла обрабатывали пепсином, как было описано ранее [Barkovskaya M. Sh., 2017]. Качество готовых препаратов контролировали под фазово-контрастным микроскопом и до момента проведения гибридизации хранили при -20°C. Перед проведением гибридизации *in situ* препараты дегидратировали в растворах этилового спирта возрастающей концентрации (70%, 90%, 96%) и высушивали при комнатной температуре. На поверхность препарата наносили 2 капли по 10 мкл гибридизационного раствора под покровное стекло. Денатурацию ДНК проводили на термостойке (БИС М-209, Россия) при 75°C в течение 2 мин.

Далее переносили препараты во влажную камеру и гибридизировали 4 часа при температуре 37°C в темноте. После гибридизации покровное стекло удаляли и препараты отмывали 1 раз в течение 8 мин в отмывочном растворе №1 и 3 раза по 5 мин в отмывочном растворе №2, все отмывки проводили на шейкере. Затем препараты дегидратировали в растворах этилового спирта возрастающей концентрации (70%, 90%, 96%). Для получения дифференциального окрашивания препараты заключали в раствор DAPI (1,5мкг/мл) в антифэйде (Pro Long Gold, Invitrogen MP) – 20 мкл под покровное стекло (22×50 мм). Окрашивание проводили в темноте в течение 20 мин. Препараты до микроскопии хранили в темноте при температуре + 4°C.

#### **Приготовление препаратов флуоресцентных бус**

С целью нормировки осветительной системы микроскопа использовали флуоресцентные бусы (Fluospheres, Life Technologies, США) с оранжевым спектром флуоресценции (540/560 нм), которые предварительно разводили в 100 раз в смеси PBS и FBS (1:1). Затем 3 мкл полученной суспензии микросфер равномерно распределяли по покровному стеклу и подсушивали 15 минут в темноте, после чего препарат заключали в антифэйд без DAPI и сверху помещалось стандартное предметное стекло.

#### **Микроскопия, регистрация и анализ изображений**

Микроскопию и регистрацию изображения проводили на микроскопе «Axioscop 40» (Zeiss, Германия), оснащенном ртутной лампой высокого давления HBO 50W, комплектом интерференционных фильтров фирмы Zeiss (№49 для DAPI и №20 для Cy3) и монохромной CCD-камерой «AxioCam 503 mono». Запись микроскопических изображений хромосом и Q-FISH сигналов теломер проводили в отдельных каналах используя программное обеспечение «ZEN-2012» (Zeiss, Германия). Время экспозиции для каждого снимка подбиралось таким образом, чтобы профиль интенсивности наиболее яркого сигнала в пределах метафазы не выходил за границу 90% динамического диапазона камеры. В течение каждой сессии производилась периодическая съемка препарата с флуоресцентными бусами таким образом, чтобы для нормировки изображений метафазных пластинок, полученных от одного образца, было не менее 15 изображений бус.

Цифровая обработка изображений проводилась в специально созданной программе «MeTeLen» для определения количества теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом с учетом времени экспозиции, процедур нормировки и выравнивания. Идентификацию хромосом проводили согласно международной номенклатуре метафазных хромосом человека (ISCN 2013) Номера хромосомам присваивали в программе «MeTeLen» интерактивно.

Всего для каждого индивидуума, вовлеченного в исследование, проводился анализ 5 метафазных пластинок. Так как плечо метафазных хромосом состоит из двух сестринских хроматид, то для теломеры соответствующего хромосомного плеча в каждой клетке проводилось четыре измерения. Поэтому показатель интенсивности ее сигнала вычислялся как среднее арифметическое этих измерений в пяти метафазах. В



зависимости от эксперимента, длина теломер конкретного плеча хромосомы выражалась в единицах интенсивности флуоресценции (фл. ед.), которые представляют собой суммарную интенсивность регистрируемого сигнала с теломерной последовательности (IFI), выраженную в уровнях серого по 256-битной шкале или в относительных единицах (отн. ед.), которые представляют собой IFI, нормированную на время экспозиции и интенсивность флуоресцентного сигнала с бус.

### **Анализ фенотипа и пролиферативной активности Т-клеток памяти**

Анализ фенотипа Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов проводился на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD, США) с использованием соответствующих моноклональных антител (CD4-PE, CD3-PerCP/Cy5.5, CD62L-APC, CD45RO-PE-Cy7, CD197(CCR7)-APC/Cy7), специфичных к человеческим маркерам согласно инструкции производителя. Субпопуляции с фенотипом  $CD3^+CD4^{+/-}CD45RO^-CD62L^{+/-}CD197(CCR7)^+$  оценивались как «наивные» Т-клетки хелперы или цитотоксические лимфоциты соответственно. Центральным клеткам памяти соответствовал фенотип  $CD3^+CD4^{+/-}CD45RO^+CD62L^{+/-}CD197(CCR7)^+$ . Эффекторные Т-лимфоциты памяти распознавались как  $CD3^+CD4^{+/-}CD45RO^+CD62L^{+/-}CD197(CCR7)^-$ ;  $CD45RO^-$  эффекторные Т-клетки с фенотипом  $CD3^+CD4^{+/-}CD197(CCR7)^-$  определялись как субпопуляции терминально-дифференцированных 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.

### **Статистическая обработка**

Статистический анализ данных проводился с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft). Для оценки значимости различий между группами больных и здоровых доноров применялись методы непараметрической статистики. Сравнение независимых выборок проводилось с использованием критерия Манна-Уитни, для сравнения двух связанных групп применялся критерий Уилкоксона. Множественное сравнение связанных групп проводилось однофакторным дисперсионным анализом (метод Краскера-Уоллиса). Корреляционный анализ проводился методом ранговой корреляции Спирмена. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Разработка программного обеспечения**

Поскольку на интенсивность регистрируемого сигнала Q-FISH влияют многочисленные факторы, это делает необходимым проведение его корректной цифровой обработки. Поэтому в тесном сотрудничестве с д.б.н., профессором Рубцовым Н. Б. и Богомолковым А. Г., лаборатория морфологии и функции клеточных структур ФИЦ ИЦиГ СО РАН, было разработано специальное программное обеспечение «MeTeLen» (Measurement of Telomere Length of chromosomes),

предназначенное для оценки количества теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом. Созданная программа состоит из нескольких блоков и обрабатывает 2 типа изображений: фотографии флуоресцентных бус и изображения метафазных хромосом в 24-битном формате.

Чтобы провести корректировку таких недостатков оптической системы флуоресцентного микроскопа, как геометрические аберрации и нестабильное освещение, в программе использовалась процедура выравнивания. Изображения бус разбивались на  $n \times n$  фрагментов. Для каждого фрагмента ( $f_{ij}$ ) вычислялась средняя интенсивность сигнала бус ( $AvgBead(i,j)$ ). Далее, разделив значения  $AvgBead(i,j)$  на значения  $AvgBead$  в центральном фрагменте, получали коэффициент выравнивания  $w_{ij}$  для каждого фрагмента изображения, который использовали для коррекции неравномерности интенсивности сигнала в изображениях последующих метафазных пластинок.

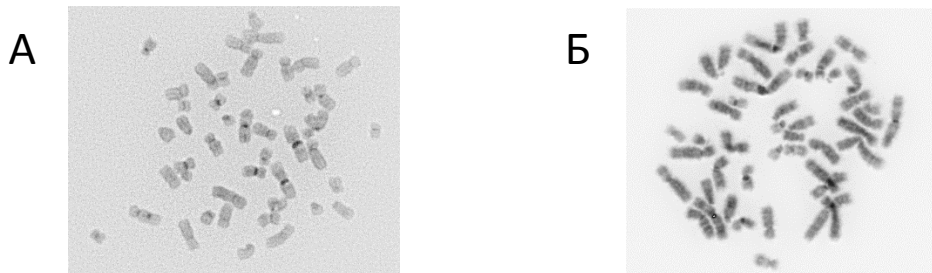
Кроме того, вычисление интенсивности флуоресцентного сигнала (IFI) в теломерных районах проводилось по формуле, которая нормирует результаты, полученные во время разных съемочных сессий и имеет вид:

$$IFI = \frac{1000 * (\sum I(x,y) - S * Background)}{Exp * BeadRatio},$$

где  $I(x,y)$  – интенсивность регистрируемого сигнала в точке  $(x,y)$ , принадлежащих теломере;  $S$  – площадь (количество пикселей в теломерном районе);  $Background$  – интенсивность фонового сигнала;  $Exp$  – время экспозиции в текущем эксперименте в миллисекундах;  $BeadRatio$  – коэффициент, который вычислялся как отношение средних значений интенсивности сигналов на бусах для этой съемочной сессии ( $AvgBead_x$ ) к самому первому эксперименту, относительно которого проводилась нормировка ( $AvgBead_1$ ).

### Модификация условий Q-FISH

Для успешной оценки длины индивидуальных теломер необходимо получение как стабильного и воспроизводимого сигнала Q-FISH, так и надежной идентификации хромосом и хромосомных районов, которая проводилась с помощью DAPI-бэндинга. Так как качество DAPI-бэндинга зависит температуры и продолжительность денатурации ДНК при проведении FISH, то была проведена модификация метода, предложенного Poon S.S. и Lansdorp P.M.: температура денатурации ДНК хромосом была снижена до 75°C, время денатурации уменьшено до 2-х минут. Это не повлияло на качество Q-FISH, но существенно улучшило морфологию хромосом.



**Рисунок 1 - Качество инвертированного DAPI-бэндинга метафазных хромосом после проведения Q-FISH стандартным (А) и модифицированным (Б) способом**

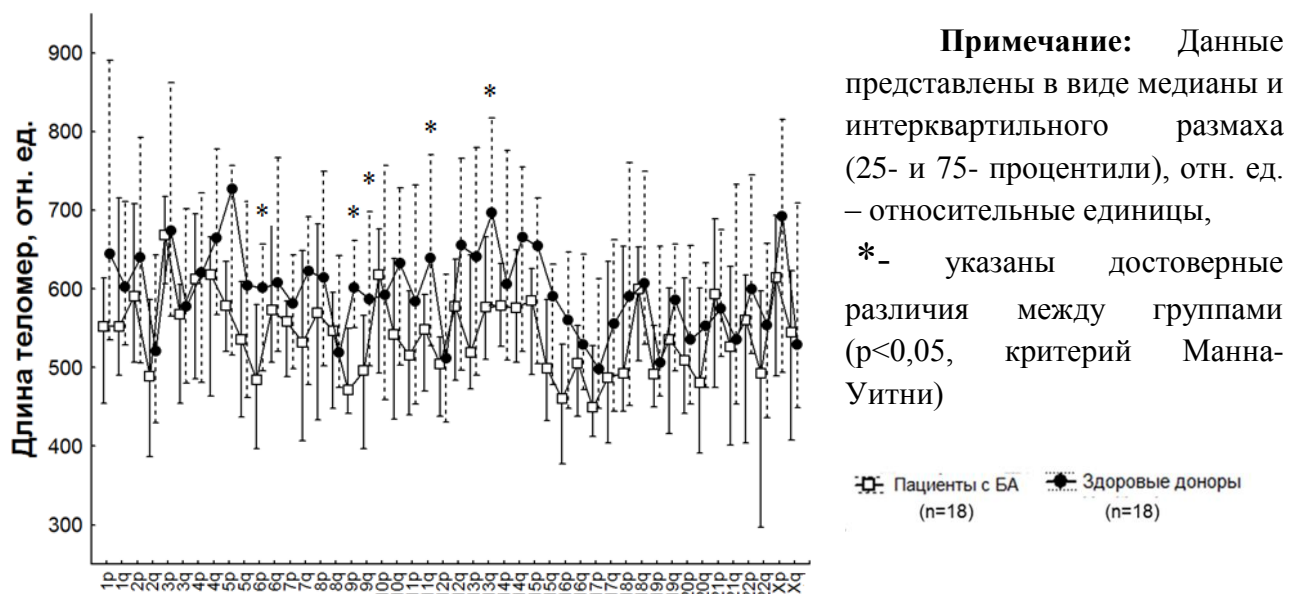
### **Валидизация методических условий**

Для подтверждения корректности проведения модифицированной методики было получено 2 стекла от одного и того же пациента с РА, для одного из которых гибридизация проводилась по традиционному протоколу (денатурация ДНК при 80°C в течение 3 мин), а для другого – по модифицированному. Для обоих вариантов гибридизации был осуществлен анализ 28 метафазных пластинок, в которых была измерена интенсивность флуоресцентных сигналов теломер, находящихся на сестринских хроматидах. В результате эксперимента была обнаружена сильная корреляция для значений IFI теломер, которые принадлежали сестринским хроматидам. Значение коэффициента ранговой корреляции Спирмена для модифицированной методики составляло 0,75 ( $p < 0,0001$ ), что сопоставимо со значением коэффициента корреляции для традиционного протокола Q-FISH 0,74 ( $p < 0,0001$ ). Эти результаты свидетельствуют о пропорциональном связывании PNA-зонда с теломерными повторами и дают возможность сравнивать длину теломер отдельных хромосом между группами пациентов с иммунопатологией и здоровых доноров после модификации методики Q-FISH.

#### **Особенности распределения теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом при бронхиальной астме и в норме**

Чтобы оценить распределение количества теломерных повторов, в группе пациентов и доноров были определены достоверно более короткие и более длинные теломерные районы индивидуальных хромосом относительно средней длины теломер во всех метафазах (тест Вилкоксона,  $p < 0,05$ ). Анализ показал, что в обеих группах теломеры на q-плече 4 хромосомы и на p-плечах 3 и X-хромосомы достоверно более длинные по сравнению со средней длиной теломер. А теломеры, локализованные на q-плечах 2, 17, 20, 22 хромосом и p-плечах 12, 16, 17 и 19 хромосом – достоверно более короткие. Несмотря на выявленные сходства, между пациентами и донорами были обнаружены отличия в распределении количества теломерных повторов. Среди здоровых доноров теломеры p-плеча 20 и q-плеча 22 хромосомы были более короткими и q-плеча 13 и 14 хромосом – более длинными, тогда как в группе пациентов длина данных теломерных районов не была изменена. В свою очередь, теломерные районы 4p, 5p, 6q, 18q были более длинными, а 6p, 9p, 9q и 15 q – более короткими у пациентов с БА, но не изменялись в группе здоровых доноров.

В последующем анализе представлялось интересным выявить изменение длины теломерных районов отдельных плеч индивидуальных хромосом у пациентов с БА по сравнению со здоровыми донорами. Результаты показали, что у пациентов с БА по сравнению со здоровыми донорами достоверно укорочены теломерные районы на следующих хромосомных плечах: 6p, 9p, 9 q, 11q, 13q (рисунок 2). Ни на одном из плеч исследуемых хромосом теломерные повторы у пациентов с БА не были удлинены по сравнению со здоровыми донорами.

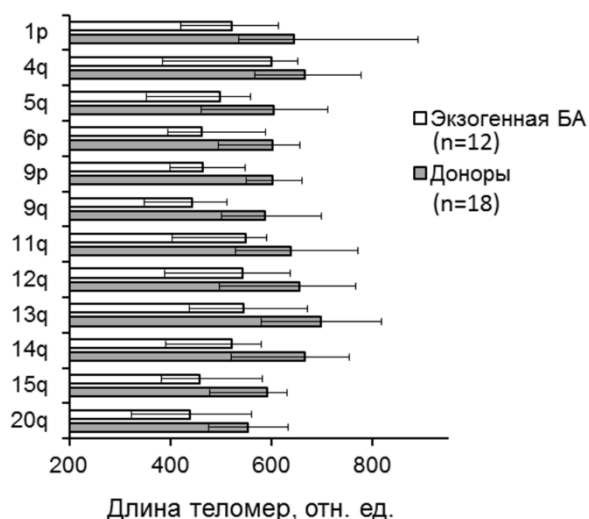


**Рисунок 2 - Теломерные профили пациентов с БА и здоровых доноров**

Полученные данные по относительно длинным и относительно коротким теломерным последовательностям для обеих групп во многом совпадали с данными исследования Martens U.M., исходя из чего можно предположить, что обнаруженные в данном исследовании у здоровых доноров укороченные (2q, 12p, 16p, 17p, 17q, 18q, 19p, 20p, 20q, 22q) и удлинённые (3p, 4q, 13q, 14q, Xp) теломерные последовательности являются конституциональными особенностями теломерного профиля. Таким образом, с одной стороны, было показано сходство в распределении теломерных повторов между пациентами и здоровыми донорами, которое говорит о детерминированности теломерного профиля и его частичной сохранности у больных БА. А с другой стороны, у пациентов с БА обнаружено большое количество хромосом с изменённой длиной теломерных повторов относительно средней длины теломер в метафазе. И выявлено достоверное укорочение теломер на плечах отдельных хромосом у пациентов с БА в сравнении со здоровыми донорами.

#### **Длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом в зависимости от формы и длительности течения бронхиальной астмы**

Известно, что средняя длина теломер укорачивается при различных клинических вариантах БА по-разному [Борисов В.И. и др., 2009]. В связи с этим представлялось интересным изучить и длину теломерных повторов индивидуальных хромосом в зависимости от формы БА. Были выделены 2 группы пациентов – с экзогенной (n=12) и эндогенной (n=6) формой БА. Результаты анализа показали, что при эндогенной форме БА не было изменения длины теломерных повторов ни на одном из плеч индивидуальных хромосом. При экзогенной же форме БА длина теломерных повторов укорочена на следующих плечах индивидуальных хромосом: 1p, 4q, 5q, 6p, 9p, 9q, 11q, 12q, 13q, 14q, 15q, 20q (рисунок 3). Интересно, что удлинения теломерных повторов в группе больных экзогенной БА не было отмечено. Также не было обнаружено укорочения средней длины теломер ни в одной из групп пациентов по сравнению со здоровыми донорами.

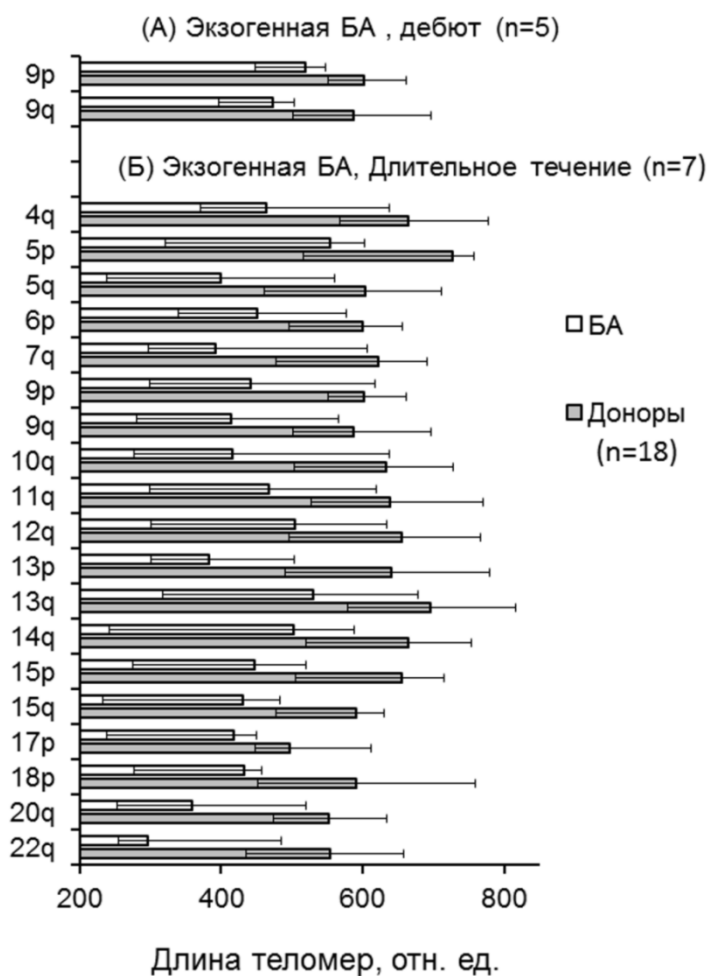


**Примечание:** Данные приведены в виде медианы и интерквартильных размахов (25- и 75- процентиля);  
отн. ед. – относительные единицы;  
Уровень статистической значимости  $p < 0,05$  (критерий Манна-Уитни).

**Рисунок 3 - Длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом при экзогенной форме БА**

Известно, что даже при адекватной терапии длительно текущая БА сопровождается прогрессирующим снижением функции внешнего дыхания и необратимым ремоделированием дыхательных путей [Sposato В. и др., 2016; Tiwari А. и др., 2017]. В связи с этим было актуально сопоставить длину теломерных повторов не только с формой, но и с длительностью течения БА. Были выделены 2 группы пациентов: группа пациентов с длительным течением экзогенной БА ( $n=7$ ) и группа с дебютом экзогенной БА ( $n=5$ ). Было обнаружено, что в группе дебюта экзогенной БА средняя длина теломер не изменена, а в группе пациентов с длительным течением экзогенной БА средняя длина теломер укорочена по сравнению с этим показателем у здоровых доноров. При анализе длины теломер индивидуальных хромосом выяснилось, что в группе с дебютом экзогенной БА достоверно укорочены теломеры на обоих плечах 9 хромосомы (рисунок 4А). Между тем, при экзогенной БА с длительным течением происходит достоверное укорочение на следующих плечах хромосом: 4q, 5p, 5q, 6p, 7q, 9p, 9q, 10q, 11q, 12q, 13p, 13q, 14q, 15p, 15q, 17p, 18p, 20q и 22q (рисунок 4Б).

В результате данного эксперимента показано, что длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом зависит от формы и длительности течения БА. Исходя из полученных данных, можно предположить, что при длительном течении экзогенной формы БА происходит снижение средней длины теломер, которое протекает неравномерно, затрагивает теломерные последовательности на определенных плечах индивидуальных хромосом и, возможно, оказывает влияние на развитие заболевания.



**Примечание:** Данные приведены в виде медианы и интерквартильных размахов (25- и 75- процентиля); отн. ед. – относительные единицы; Уровень статистической значимости  $p < 0,05$  (критерий Манна-Уитни).

**Рисунок 4 - Длина теломер в дебюте экзогенной БА (А) и при длительном течении экзогенной БА (Б)**

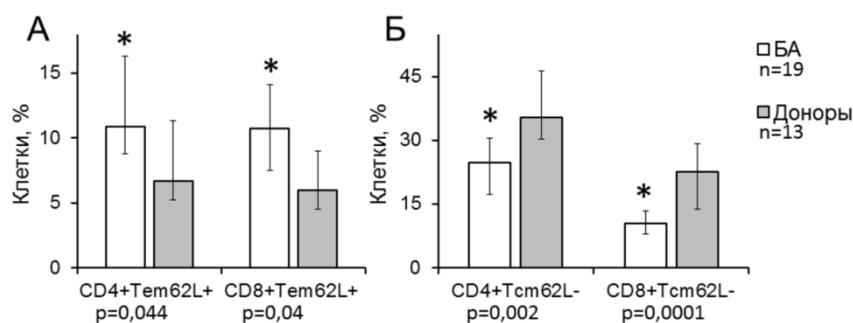
Известен такой способ влияния теломер на функцию клетки, как позиционный эффект теломер (TPE - telomeric position effect). Данный эффект, предполагает, что в норме теломеры подавляют экспрессию генов, блокируя их промоторы. Однако укорочение теломерных последовательностей, отменяя действие TPE, приводит к усилению их экспрессии. Уже доказано воздействие TPE на удаленно расположенные гены (TPE-OLD – Telomere Position Effect Over Long Distances) [Robin, J. D. И др., 2014], в том числе в клетках человека [Baur, J. A. и др., 2001; Lou, Z. и др., 2009]. Интересно, что в данном исследовании для многих хромосом (5q, 6p, 9p, 9q, 11q, 12q, 13q, 14q и другие), которые содержат генетические локусы, ассоциированные с БА, было обнаружено укорочение длины теломерных последовательностей (Таблица 1). Эти факты дают возможность сделать предположение, что при атопической форме БА существует взаимосвязь между этими генетическими локусами и длиной теломерных последовательностей тех хромосомных плеч, на которых они находятся.

**Таблица 1- Плечи индивидуальных хромосом, в которых локализованы гены, ассоциированные с развитием БА, и длина теломер на них при БА**

Хромосомный регион	Некоторые гены, локализованные в данном регионе, с которыми ассоциирована БА	Ассоциация с определенным фенотипом	Длина теломер на данных плечах индивидуальных хромосом при БА
1p22	PIGX	БА, поллиноз, экзема	↓
4q27	ADAD1, IL2	Атопия	↓
5q23	IL-4	Атопическая БА, ↑общ. IgE	↓
5q31	IL-13	БА	↓
5q31	β2AR	БА, снижение ФВД рефрактерность к бронхолитикам	↓
6p.21	HLA-DQA1	БА	↓
9p24	IL-33	БА	↓
9q34	LOC339807	БА, поллиноз, АД	↓
10q21	JMJD1C	БА	↓
11p15.5	MUC5AC, MUC2, MUC5B	БА	↓
11q13	FcεR1-β	БА, атопия, БА детского возраста	↓
12q22	NOS1, NNOS	БА, концентрация NO в выдыхаемом воздухе	↓
13q22	LAYN-SIK2	БА, поллиноз, АД	↓
14q24	STAT5B	БА, поллиноз, АД	↓
15q22	SMAD3	БА	↓

### Содержание эффекторных и центральных Т-клеток памяти в периферической крови у пациентов с БА и здоровых доноров

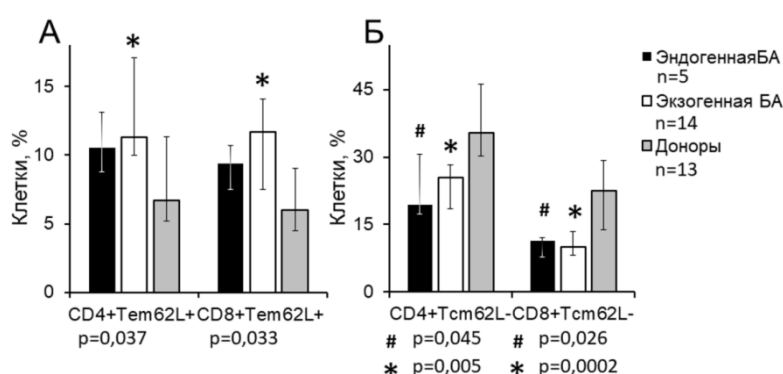
Изучение субпопуляционного состава  $CD45R0^{+}$ - и  $CD45R0^{-}$ -клеток проводилось с одновременным использованием маркеров CCR7 и CD62L [ Sallusto, F. и др., 1999]. Было показано, что у пациентов с БА повышено содержание  $CD4^{+}Tem62L^{+}$  и  $CD8^{+}Tem62L^{+}$  клеток памяти (рисунок 5А) и снижено содержание  $CD4^{+}Tcm62L^{-}$  и  $CD8^{+}Tcm62L^{-}$  клеток памяти (рисунок 5Б) в ПК по сравнению со здоровыми донорами. Процентное содержание клеток в субпопуляциях Tnaive и Temra у пациентов с БА и здоровых доноров не отличалось.



**Примечание:** Данные указаны в процентах, за 100 % принято число клеток в популяциях  $CD4^{+}CD45R0^{+}$  и  $CD8^{+}CD45R0^{+}$  Т-лимфоцитов (медианы и межквартильный интервал); \* - указаны достоверные отличия от группы доноров (Манна-Уитни U-тест)

**Рисунок 5 - Субпопуляционный состав эффекторных (А) и центральных (Б) Т-лимфоцитов памяти у пациентов с БА и здоровых доноров**

Учитывая данные о длине теломер индивидуальных хромосом, было также актуальным сопоставить содержание наивных Т-лимфоцитов и клеток памяти с формой БА. При экзогенной форме БА было повышено содержание  $CD4^{+}Tem62L^{+}$  и  $CD8^{+}Tem62L^{+}$  клеток в ПК по сравнению со здоровыми донорами. Пациенты с эндогенной формой БА не отличались достоверно от группы доноров по данным показателям (рисунок 6А). При этом относительное количество  $CD4^{+}Tcm62L^{-}$  и  $CD8^{+}Tcm62L^{-}$  клеток в ПК было снижено как при экзогенной, так и при эндогенной БА в сравнении со здоровыми донорами (рисунок 6Б). По субпопуляционному составу Tnaive и Temra среди  $CD4^{+}$  и  $CD8^{+}$  лимфоцитов изучаемые группы пациентов были сопоставимы с группой здоровых доноров.

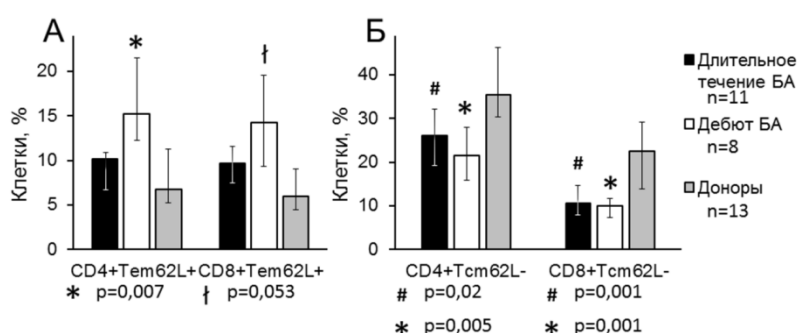


**Примечание:** Данные указаны в процентах, за 100 % принято число клеток в популяциях  $CD4^{+}CD45R0^{+}$  и  $CD8^{+}CD45R0^{+}$  Т-лимфоцитов (медианы и межквартильный интервал); # - достоверные отличия пациентов с эндогенной БА от группы доноров; \* - достоверные отличия

пациентов с экзогенной БА от группы доноров (Манна-Уитни U-тест).

**Рисунок 6 - Субпопуляционный состав эффекторных (А) и центральных (Б) Т-клеток памяти в зависимости от формы БА**

Представлялось интересным изучить также фенотипический состав Т-клеток памяти у пациентов с дебютом и с длительным течением БА в сравнении со здоровыми донорами. Было обнаружено, что у пациентов в дебюте БА повышено содержание  $CD4^{+}Tem62L^{+}$  клеток в ПК. У пациентов с длительным течением БА содержание  $CD4^{+}Tem62L^{+}$  и  $CD8^{+}Tem62L^{+}$  клеток в ПК не отличалось от группы здоровых доноров и пациентов с дебютом БА (рисунок 7А)



**Примечание:** Данные указаны в процентах, за 100 % принято число клеток в популяциях  $CD4^{+}CD45R0^{+}$  и  $CD8^{+}CD45R0^{+}$  Т-лимфоцитов (медианы и межквартильный интервал);. # - достоверные отличия пациентов с длительным течением БА от группы

доноров; \* - достоверные отличия пациентов с дебютом БА от группы доноров; † – указана тенденция в отличии пациентов с дебютом БА от группы доноров (Манна-Уитни U-тест).

**Рисунок 7 - Субпопуляционный состав эффекторных (А) и центральных (Б) Т-клеток памяти в зависимости от длительности течения БА**



При этом содержание  $CD4^+T_{cm62L}^-$  и  $CD8^+T_{cm62L}^-$  клеток в ПК было снижено по сравнению с группой здоровых доноров как в группе дебюта БА, так и у пациентов с длительным течением БА (рисунок 7Б). Таким образом, в данном эксперименте было показано, что содержание и субпопуляционный состав Т-клеток памяти зависят от формы и длительности БА. Кроме того, результаты исследования могут свидетельствовать, что эффекторные Т-лимфоциты памяти играют роль в патогенезе БА. Последнее подтверждается сообщениями о преобладании  $CD4^+$  Т-лимфоцитов с фенотипом клеток памяти в нижних дыхательных путях у пациентов с БА [Hondowicz B. D. и др., 2016].

#### **Пролиферативная активность и изменение субпопуляционного состава Т-клеток памяти и наивных Т-клеток в ответ на поликлональную стимуляцию *in vitro***

Еще одной задачей был анализ пролиферативной активности и субпопуляционного состава Т-лимфоцитов в ФГА-стимулированной культуре при БА. Результаты данного эксперимента показали, что у пациентов с БА содержание субпопуляций Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов при поликлональной активации *in vitro* находится на уровне нормы. Также была проведена оценка отвечаемости различных субпопуляций клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов на ФГА в группе пациентов с БА и группе доноров методом Уилкоксона. Показано, что в обеих группах наиболее отвечающими на поликлональную активацию *in vitro* являются субпопуляции центральных клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов, что может быть связано с их пролиферативной активностью.

Было показано, что при БА пролиферативная активность различных субпопуляций Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в ответ на ФГА находится на уровне донорских показателей. Также было проведено сравнение числа пролиферирующих клеток между разными субпопуляциями в пределах групп доноров и пациентов. В обеих группах  $CD8^+T_{cm62L}^+$  и  $CD8^+T_{naive62L}^+$  клетки делились более активно, чем  $CD8^+T_{em62L}^+$  и  $CD8^+T_{emra62L}^+$  клетки. Аналогичным образом пролиферировали субпопуляции  $CD4^+$  клеток памяти.

Суммируя вышеизложенное, можно заключить, что повышенное содержание эффекторных  $CD4^+$  и  $CD8^+$  клеток памяти, так же, как и укорочение длины теломер на отдельных хромосомах, свойственно аллергическому фенотипу БА.

### **ВЫВОДЫ**

1. Разработка корректных подходов для оценки количества теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом на основе применения программного обеспечения «MeTeLen» и модифицированного протокола методики Q-FISH позволяет выявить различия теломерных профилей пациентов с бронхиальной астмой и здоровых доноров.
2. У пациентов с экзогенной формой бронхиальной астмы происходит укорочение теломер ряда хромосом (1p, 4q, 5q, 6p, 9p, 9q, 11q, 12q, 13q, 14q, 15q, 20q), тогда как у пациентов с эндогенной формой заболевания длина теломер не изменена, что

свидетельствует о нарушении поддержания длины теломер при аллергической бронхиальной астме.

3. У пациентов с дебютом экзогенной бронхиальной астмы укорачиваются теломеры на обоих плечах девятой хромосомы, а у пациентов с длительным течением укорочение затрагивает теломерные районы на 19-ти плечах индивидуальных хромосом, включая девятую хромосому, что свидетельствует о накоплении укороченных теломерных районов при бронхиальной астме по мере увеличения длительности заболевания.

4. Содержание  $CD4^+$  клеток памяти и субпопуляций  $CD4^+62L^+$  и  $CD8^+62L^+$  эффекторных Т-клеток памяти периферической крови повышено у пациентов с экзогенной формой бронхиальной астмы, тогда как у пациентов с эндогенной формой заболевания данные показатели не изменены, что свидетельствует о различном характере функционирования иммунной системы при экзогенной и эндогенной формах бронхиальной астмы.

5. Пролиферативная активность и содержание субпопуляций  $CD4^+$  и  $CD8^+$  клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в культурах ФГА-стимулированных моноклеаров периферической крови не отличаются между группами здоровых доноров и пациентов с бронхиальной астмой, что свидетельствует о сохранности пролиферативного потенциала субпопуляций Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов при бронхиальной астме.

6. Выявленные при бронхиальной астме особенности в изменении длины теломер индивидуальных хромосом и субпопуляционном составе Т-клеток памяти периферической крови отражают иммунопатогенетические различия между экзогенной и эндогенной формами бронхиальной астмы.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Барковская М.Ш.**, Богомолов А.Г., Рубцов Н.Б., Козлов В.А. Разработка программного обеспечения для оценки длины теломер индивидуальных хромосом человека методом Q-FISH // «Трансляционная биомедицина: современные методы междисциплинарных исследований в аспекте внедрения в практическую медицину». Сборник тезисов международной научной конференции Научного Парка СПбГУ, Санкт-Петербург, 10-12 ноября – 2015. – С. 21.

2. . A.G. Bogomolov, **M.S. Barkovskaya**, N.B. Rubtsov, V.A. Kozlov The software for estimation of telomere length on individual chromosome arms in immunopathology // The Tenth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology. Abstracts, Novosibirsk, Russia, 29 August-02 September – 2016. – P. 45.

3. **Барковская М.Ш.**, Богомолов А.Г., Сизиков А.Э., Рубцов Н.Б., Козлов В.А. Определение длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом при ревматоидном артрите // Научно-практическая ревматология. Тезисы конференции «Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания», Москва, 8-10 декабря – 2016. – Т.54 (приложение 3) – С. 8-9.

4. Богомолов А.Г., **Барковская М.Ш.**, Рубцов Н.Б. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ «Оценка длины теломерных районов хромосом (MeTeLen)/ Measurement of telomere length on chromosomes (MeTeLen)» № 2016614696. Оpubл. 20.05.2016.
5. **Барковская М.Ш.**, Богомолов А.Г., Сизиков А.Э., Рубцов Н.Б., Козлов В.А. Оптимизация и валидация методики Q-FISH для оценки длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом при иммунопатологии // «Фундаментальные и клинические аспекты иммунологии». Материалы IX отчетной научной сессии НИИФКИ, Новосибирск, 16-17 июня – 2016. – С. 140-141.
6. **Barkovskaya M.Sh.**, Bogomolov A.G., Knauer N.Yu., Rubtsov N.B., Kozlov V.A. Development of software and modification of Q-FISH protocol for estimation of individual telomere length in immunopathology // Journal of Bioinformatics and Computational Biology. – 2017. – V. 15. -№ 2. - P. 1650041.
7. **Барковская М.Ш.**, Богомолов А.Г., Блинова Е.А., Рубцов Н.Б., Козлов В.А. Определение длины теломер индивидуальных хромосом при ревматоидном артрите с помощью разработанного программного обеспечения и оптимизированной методики Q-FISH // Материалы IX международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 20-22 февраля – 2017. – Т. 2. – С. 380-383.
8. **Барковская М.Ш.**, Богомолов А.Г., Кнауэр Н.Ю., Блинова Е.А., Сизиков А.Э., Рубцов Н.Б., Козлов В.А. Особенности распределения длины теломерных последовательностей на индивидуальных хромосомах при ревматоидном артрите // Медицинская Иммунология. XVI Всероссийский научный форум с Международным участием имени академика В.И.Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге», Санкт-Петербург, 5-8 июня – 2017. – Т. 19. – С. 103-104.
9. **M. Barkovskaya**, A. Bogomolov, N. Knauer, E. Blinova, A. Sizikov, N. Rubtsov, V. Kozlov Features of telomere length distribution on individual chromosomes in rheumatoid arthritis // Annals of the Rheumatic Diseases. EULAR Congress of Rheumatology, Madrid, 14-17 June – 2017. – V. 76 (supplement 2). – P. 206.
10. **M.S. Barkovskaya**, E.A. Blinova, J.V. Konyahina, A.E. Sizikov, D.V. Demina, V.A. Kozlov Telomere length on individual chromosome arms in patients with immunopathology and healthy donors // Abstracts of the 5th European Congress of Immunology, Amsterdam, The Netherlands, 2-5 September – 2018. – P. 124.
11. **Барковская М.Ш.**, Блинова Е.А., Коняхина Ю.В., Леонова М.И., Непомнящих В.М., Демина Д.В., **Кожевников В.С.**, Козлов В.А. Распределение длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом при бронхиальной астме // Бюллетень Сибирской Медицины. – 2019. – Т. 18. – № 1. – С. 164-174.
12. **Барковская М.Ш.**, Блинова Е.А., Гришина Л.В., Леонова М.И., Непомнящих В.М., Демина Д.В., Козлов В.А. Содержание CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> эффекторных клеток памяти и пролиферативная активность Т-лимфоцитов при бронхиальной астме // Медицинская Иммунология. – 2019. – Т. 31. – № 3. – С. 503-516.