

Министерство образования и науки Российской Федерации
Российская академия медицинских наук
Сибирское отделение
НИИ медицинских проблем севера СО РАМН
НИИ клинической иммунологии СО РАМН
ГОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. П. Ф. Катанова»
Министерство здравоохранения Республики Хакасия

ДНИ ИММУНОЛОГИИ В СИБИРИ

МАТЕРИАЛЫ ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ, ПОСВЯЩЕННОЙ 35-ЛЕТНЕМУ ЮБИЛЕЮ
НИИ МЕДИЦИНСКИХ ПРОБЛЕМ СЕВЕРА СО РАМН
И 30-ЛЕТНЕМУ ЮБИЛЕЮ НИИ КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ СО РАМН

г. Абакан, 27–28 апреля 2011 г.

Абакан
2011

**АНАЛИЗ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕРНЫХ РАЙОНОВ ДНК
У МЫШЕЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ РТПХ**

**Е.В. Гойман, В.И. Борисов, О.Т. Кудаева, В.А. Козлов
НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск**

Введение. Длина теломерных районов ДНК является значимым показателем пролиферативного потенциала клетки. Известно, что при

некоторых аутоиммунных заболеваниях (ревматоидный артрит, атопический дерматит и др.) отмечается укорочение теломерных районов ДНК [Weng N., 2008; Oeseburg H. et al., 2009]. Считается, что при иммунопатологических процессах укорочение теломерных районов ДНК происходит в результате гомеостатической пролиферации [Goronzy J. et al., 2006]. Ранее нами было показано участие процесса гомеостатической пролиферации лимфоцитов в патогенезе аутоиммунного заболевания, индуцированного хронической реакцией трансплантат против хозяина (РТПХ) [Гойман Е.В. с соавт., 2010].

Целью данного исследования было оценить длину теломерных районов ДНК в субпопуляциях лимфоцитов у мышей с аутоиммунной патологией при хронической РТПХ.

Материалы и методы. В опытах использовали мышей-самок линии DBA/2 и гибридов первого поколения (C57Bl6xDBA/2)F1, возрастом 2 месяца, полученных из лаборатории экспериментальных животных (моделей) НИИ КИ СО РАМН (г.Новосибирск). Хроническую РТПХ индуцировали внутривенным переносом 65×10^6 клеток селезенки мышей DBA/2 реципиентам – гибридам (C57Bl6xDBA/2)F1 двукратно с интервалом в 6 дней [Kimura M. et al., 1987; Козлов В.А. с соавт., 2002]. 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) [Колесникова О.П. с соавт., 1991]. На клеточном сортере FACSAria (Becton Dickinson, США) при помощи бус (Accudrop, Becton Dickinson, США) выделяли CD4⁺- и CD8⁺- субпопуляции; CD4⁺- и CD8⁺- субпопуляции после отмывки 3ФР-БСА метили биотинилированными антителами против CD45RB, а также измеряли длину в CD19⁺-лимфоцитах (eBioscience, Inc.). Определение длины теломерных районов ДНК проводили методом гибридизации *in situ* Flow-FISH, с последующим анализом на проточном цитофлуориметре. В качестве контроля использовали интактных мышей того же пола и возраста, а также мышей с хронической РТПХ без признаков гломерулонефрита - *nonlupus*-реципиентов).

Результаты и их обсуждение. Первоначально длину теломерных районов ДНК определяли в общей популяции лимфоцитов селезенки. Результаты проведенных исследований показывают, что на начальных этапах развития хронической РТПХ отмечается тенденция к увеличению длины теломерных районов ДНК в общей популяции спленоцитов у реципиентов относительно контрольной группы животных, хотя изменения недостоверны: 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 при окончательном формировании аутоиммунного процесса длина теломерных районов ДНК у *lupus*-реципиентов также значимо не отличается от контрольной группы животных и *nonlupus*-реципиентов (в контрольной группе – 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 по сравнению с контрольной группой животных: длина теломерных районов ДНК увеличена в CD8⁺-клетках памяти CD8⁺CD45RB^{low} у *nonlupus*-реципиентов по сравнению с контрольной группой животных (в контрольной группе – 26 165 п.н. и у *nonlupus*-реципиентов – 28 695 п.н.). В CD19⁺-лимфоцитах селезенки изменений в длине теломерных повторов ДНК отмечено не было (в контрольной группе – 30 807 п.н., у *nonlupus*-реципиентов – 31 886 п.н., у *lupus*-реципиентов – 31 688 п.н.).

Таким образом, анализ длины теломерных районов ДНК в разных субпопуляциях лимфоцитов (CD19⁺, в наивных и в клетках памяти CD4⁺ и CD8⁺) не выявил их укорочения при развитии аутоиммунной патологии, индуцированной хронической РТПХ. В нашем исследовании длина теломерных районов ДНК не только не сокращалась, а даже отмечалась некоторая тенденция к увеличению, в субпопуляции CD8⁺-клеток памяти CD8⁺CD45RB^{low} достигающая уровня достоверности.

Возможной причиной отсутствия сокращения длины теломерных районов ДНК в субпопуляциях лимфоцитов реципиентов с аутоиммунной патологией является активация теломеразы в лимфоидных клетках реципиентов. Так, показано, что IL-7 вызывает активацию теломеразы [Soares W.V. et al., 1998; Wallace D. et al., 2006]; в то же время было обнаружено, что уровень IL-7 возрастает в периферической крови на ранних стадиях хронической РТПХ у всех реципиентов и остается повышенным у *lupus*-реципиентов и через 3 месяца после индукции РТПХ [Гойман Е.В. с соавт., 2010]. Нужно отметить, что при системной красной волчанке, аутоиммунном заболевании, в качестве аналога которого рассматривают аутоиммунный гломерулонефрит, возникающий в использованной нами модели хронической РТПХ, некоторые авторы также находят увеличение длины теломер [Beier F. et al., 2007; Colmegna I. et al., 2008].