

Распределение длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом при бронхиальной астме

Барковская М.Ш., Блинова Е.А., Коняхина Ю.В., Леонова М.И.,
Непомнящих В.М., Демина Д.В., Кожевников В.С., Козлов В.А.

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ)
Россия, 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

РЕЗЮМЕ

Цель. Охарактеризовать длину теломерных последовательностей на отдельных плечах индивидуальных хромосом у больных бронхиальной астмой (БА).

Материалы и методы. Были использованы метафазные пластинки, полученные из мононуклеарной фракции периферической крови пациентов с БА ($n = 10$, средний возраст $(44 \pm 8,2)$ года) и условно-здоровых доноров ($n = 10$, средний возраст $(44 \pm 8,4)$ года). Для измерения длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом использовали количественную флуоресцентную гибридизацию *in situ*. Новое программное обеспечение (MeTeLen, <http://www.bionet.nsc.ru/en/development/application-development/development-of-a-computer/metelen.html>) применялось для оценки количества теломерных повторов на изображениях метафазных хромосом.

Результаты. Показано, что теломерные последовательности на отдельных плечах ряда индивидуальных хромосом (4q, 5q, 9p, 10q, 11p, 13p, 15q, 18q, 19q) у пациентов с БА укорочены по сравнению с длиной теломер у доноров ($p < 0,05$; критерий Манна – Уитни). Также для исследуемых групп были определены теломерные последовательности, укороченные и удлиненные относительно средней длины теломер по группе ($p < 0,05$; критерий Вилкоксона). Были обнаружены следующие различия и сходства между теломерными профилями пациентов и доноров: у пациентов теломерные последовательности 4p, 6q, 8p были удлинены, а 2q, 9q, 11p, 15q – укорочены относительно средней длины теломер. При этом длина данных теломерных последовательностей не отличалась от средней длины теломер в группе доноров. Вместе с тем в обеих группах теломерные последовательности 12p, 16p, 17p, 19p были короче, а 3p – длиннее, чем средняя длина теломер.

Заключение. Таким образом, обнаружено уменьшение длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом у пациентов с БА в сравнении с донорами, а также выявлены особенности распределения длины теломерных последовательностей при данной патологии. Мы полагаем, что механизмы изменения теломерного профиля при БА требуют дальнейшего изучения.

Ключевые слова: длина теломер, количественная флуоресцентная гибридизация *in situ* (Q-FISH), теломерный профиль, хромосомы, бронхиальная астма.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Соответствия принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом при НИИФКИ (протокол № 111 от 06.11.2018).

Благодарности. Авторы статьи признательны центру коллективного пользования НИИФКИ за возможность использования оборудования (флуоресцентный микроскоп Axioscop 40, ZEISS,

✉ Барковская Маргарита Шамилевна, e-mail: margaritabarkovskaya@gmail.com.

Германия). А также выражают благодарность лично д-ру биол. наук, профессору Н.Б. Рубцову за консультативную поддержку при проведении цитогенетического анализа.

Для цитирования: 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; 18 (1): 164–174. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-164-174>.

УДК 616.248:576.316

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-164-174>

Telomere length distribution on individual chromosome arms in patients with bronchial asthma

Barkovskaya M.Sh., Blinova E.A., Konyahina J.V., Leonova M.I., Nepomniashchikch V.M., Demina D.V., Kozhevnikov V.S., Kozlov V.A.

*Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (RIFCI)
14, Yadrintsevskaya Str., Novosibirsk, 630099, Russian Federation*

ABSTRACT

Objective. The purpose of this study was to evaluate the length of telomeres in the arms of individual chromosomes in patients with bronchial asthma (BA).

Materials and methods. The study included patients with BA ($n = 10$, the mean age (44 ± 8.2) years) and healthy donors ($n = 10$, the mean age (44 ± 8.4) years). Metaphase spreads obtained from peripheral blood mononuclear cells were used. At the time of sampling BA patients received treatment at the Clinic of Immunopathology, Novosibirsk. BA was diagnosed by physicians according to GINA-2016.

For measurement of telomere length on individual chromosome arms we used quantitative fluorescent *in situ* hybridization with a PNA-probe specific for telomeres. We used inverted DAPI banding for chromosome identification (according to ISCN-2013). For each individual 5 metaphase cells were analyzed. We applied the newly developed MeTeLen software to estimate the telomere repeats quantity (<http://www.bionet.nsc.ru/en/development/application-development/development-of-a-computer/metelen.html>) in metaphase images. For enhanced image analysis compared with the previously developed programs, we included estimation of background signal and correction of defects of the optical system.

Results. Comparing of telomere length show, that telomeres in the certain chromosome arms (4q, 5q, 9p, 10q, 11p, 13p, 15q, 18q, 19q) in BA are significantly shorter than in corresponding group of donors ($p < 0.05$, Mann – Whitney U-test). For both studied groups we also evaluated telomere sequences shortened and elongated relative to the average telomere length in the group ($p < 0.05$, Wilcoxon-signed-runk test). The following differences and similarities between the telomere profiles of patients and donors were determined: the telomere sequences 4p, 6q, 8p were elongated and 2q, 9q, 11p, 15q were shortened relative to the average telomere length in BA patients. Moreover, this telomere sequences did not differ from the average telomere length in the group of donors. At the same time, the telomere sequences 12p, 16p, 17p, 19p were significantly shorter, and 3p was longer than the average telomere length in both groups.

Conclusions. We guess, that the observed significant shortening of telomere length on individual chromosome arms in BA, as compared to donors, is relevant in pathogenesis of this disorder. The revealed features of telomere profile of patients with BA may be a result of different telomere length maintenance mechanisms and may influence to the development of asthma that needs further study.

Key words: telomere length, quantitative fluorescent in situ hybridization(Q-FISH), telomere profile, chromosomes, bronchial asthma.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The authors state that there is no funding for the study.

Conformity with the principles of ethics. The study approved by the local ethics committee under Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Protocol No. 111 of 06.11.2018).

Acknowledgements. The authors would like to thank the Center for Collective Use at the Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology for the opportunity to use the equipment (fluorescent microscope Axioscop 40, ZEISS, Germany). The authors would like to thank Rubtsov N.B., Doctor of Biology, Professor, for his helpful advice on cytogenetic analysis.

For citation: Barkovskaya M.Sh., Blinova E.A., Konyahina J.V., Leonova M.I., Nepomniashchikh V.M., Demina D.V., Kozhevnikov V.S., Kozlov V.A. Telomere length distribution on individual chromosome arms in patients with bronchial asthma. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 164–174. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-164-174>.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время появляются данные, свидетельствующие об ускоренном старении иммунной системы и респираторного тракта при бронхиальной астме (БА) и других хронических бронхолегочных заболеваниях [1–3]. В числе прочих важным маркером старения иммунной системы является длина теломер в лимфоцитах. Теломеры – это нуклеопротеиновые структуры, которые находятся на концах хромосом [4] и служат защитой от «репликативного старения» в результате деления клетки [5].

Показано, что в клетках иммунной системы средняя длина теломер снижается с возрастом [6]. Укорочение средней длины теломер в CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитах памяти по сравнению с длиной теломер наивных Т-лимфоцитов сопровождается снижением пролиферативного потенциала Т-клеток памяти [7] и свидетельствует о пролиферативном стрессе. Наиболее выраженное снижение длины теломер вследствие клональной экспансии обнаружено в антиген-специфичных Т-клетках [8]. Для иммунопатологии также характерно снижение длины теломер в иммунокомпетентных клетках вследствие пролиферативного стресса [9]. Лимфоциты периферической крови, несмотря на способность к продукции теломеразы, демонстрируют укорочение средней длины теломер у пациентов с ревматоидным артритом [10], атопическим дерматитом и БА [11] в сравнении со средней длиной теломер доноров. Ряд авторов находит связь между укорочением средней длины теломер и формой БА [12], а также тяжестью [13] и продолжительностью данного заболевания [14].

Известный к настоящему моменту факт, что длина теломер в клетках распределена неравномерно [15] и является индивидуальной наследуемой величиной [16], позволяет задуматься о роли укороченных теломер отдельных хромосом в па-

тогенезе иммуноопосредованных заболеваний. Распределение длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом получило название теломерного профиля [16]. Ранее уже была продемонстрирована связь уменьшения длины теломерных последовательностей отдельных хромосом с некоторыми онкологическими заболеваниями [17, 18] и аутоиммунной патологией [19]. Поскольку распределение длины теломер на отдельных хромосомах при астме не охарактеризовано, основной целью данной работы было изучение длины теломерных последовательностей на отдельных плечах индивидуальных хромосом у пациентов с БА в сравнении со здоровыми донорами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 10 пациентов в стадии обострения БА (8 женщин и 2 мужчины). Средний возраст в группе пациентов составил ($44 \pm 8,2$) года. В связи с тем, что длина теломер является возраст-зависимым параметром, группа доноров подбиралась строго по возрасту и полу (8 женщин и 2 мужчины), средний возраст ($44 \pm 8,4$) года. На момент забора материала все пациенты находились на лечении в клинике иммунопатологии НИИФКИ г. Новосибирска. Диагноз БА выставлялся врачами клиники иммунопатологии НИИФКИ в соответствии с GINA-2016.

Метод получения и культивирования клеток периферической крови. Фракцию мононуклеарных клеток (МНК) выделяли из гепаринизированной периферической крови в градиенте плотности фиколл-урографина (стандартная методика). Клетки культивировали в течение 72 ч в CO₂-инкубаторе при 37 °С в среде RPMI-1640 с содержанием L-глутамин (0,3 мг/мл), гентамицина (50 мкг/мл), тиенама (25 мкг/мл) и 10%-й фетальной бычьей сыворотки (FCS HyClone, Великобритания). Клетки в концентрации 1,5 млн

на 1 мл полной среды культивировали в объеме 2 мл, в 24-луночном плоскодонном планшете. В качестве стимулятора митоза Т-лимфоцитов использовали фитогемагглютинин (РНА), конечная концентрация которого составила 30 мкг/мл (РНА-Р, Sigma, США).

Количественная флуоресцентная гибридизация in situ. Для оценки количества теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом использовали метод количественной флуоресцентной гибридизации *in situ* (Q-FISH). Постановку реакции Q-FISH проводили на препаратах метафазных хромосом, приготовленных в соответствии со стандартной методикой из трехсуточной РНА-стимулированной культуры МНК периферической крови [20]. Качество полученных препаратов контролировали на фазово-контрастном микроскопе. Препараты с наилучшим расплыванием метафазных пластинок выдерживали в течение 1 ч при температуре 60 °С и подвергали реакции Q-FISH с использованием зонда РНА (Peptide Nucleic Acid), меченного Су3 (СССТАА)3 (Eurogenetec Ltd., Бельгия) в подобранных нами ранее условиях [21].

Флуоресцентный микроскоп Axioscop 40 (ZEISS, Германия) применялся для микроскопии и регистрации изображения в соответствии с ранее описанной методикой [21]. С целью нормирования осветительной системы использовали флуоресцентные бусы (Fluospheres 0,2 мкм, Life Technologies, США) с оранжевым спектром флуоресценции (540/560 нм), которые предварительно наносились на предметное стекло и заключались в антифэйд. В течение каждой сессии производилась периодическая съемка стекла с бусами таким образом, чтобы для нормировки изображений метафазных пластинок, полученных от одного образца, было не менее 20 изображений бус.

Анализ изображений. Цифровая обработка изображений проводилась в специально созданной программе MeTeLen с учетом времени экспозиции, процедур нормировки и выравнивания, как было описано ранее [21]. Для каждого индивидуума, вовлеченного в исследование, проводился анализ пяти метафазных пластинок. Для идентификации хромосом и их районов согласно международной номенклатуре метафазных хромосом человека An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013) использовали инвертированный DAPI-бэндинг. Номера хромосомам присваивали в программе MeTeLen интерактивно.

Так как плечо метафазных хромосом состоит из двух сестринских хроматид, то для теломеры

соответствующего плеча хромосомы в каждой клетке проводилось четыре измерения, а показатель интенсивности ее сигнала вычислялся как среднее арифметическое этих измерений. Длина теломер конкретного плеча хромосомы выражалась в относительных единицах (отн. ед. представляют собой суммарную интенсивность флуоресценции объекта, выраженную в уровнях серого по 256-битной шкале и нормированную на время экспозиции и интенсивность флуоресцентного сигнала с бус). Поскольку в большинстве случаев идентификация гомологов, имеющих отцовское и материнское происхождение, невозможна, то она не проводилась. Также не проводился анализ длины теломер в плечах Y-хромосомы в связи с их небольшим количеством.

Статистический анализ данных проводился с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft). Применялись методы непараметрической статистики, так как распределение параметров в группах отличалось от нормального. Оценка значимости различий между группами больных и доноров проводилась с использованием критерия Манна – Уитни (U). Для сравнения двух связанных групп применяли непараметрический критерий Вилкоксона. Данные представлены в виде медианы, интерквартильного размаха $Me (Q_{25}-Q_{75})$ и минимального и максимального значений. Различия считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Считается, что клетки иммунной системы при иммуноопосредованных заболеваниях постоянно находятся в состоянии иммунного ответа, что приводит к снижению средней длины теломер [7]. Для подтверждения этого факта была определена средняя длина всех теломерных последовательностей метафазных хромосом РНА-стимулированных лимфоцитов периферической крови в группах доноров и пациентов. Полученные нами данные подтвердили, что средняя длина теломер при БА достоверно меньше, чем у условно-здоровых доноров (рис. 1).

Графики индивидуальных теломерных профилей, построенные для лиц, включенных в исследование, имели сходный вид распределения теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом. Поэтому общие теломерные профили для групп доноров и пациентов были построены для дальнейшего анализа (рис. 2). Разница в длине теломерных последовательностей отдельных плеч индивидуальных хромосом определялась между группой пациентов и доно-

ров с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни. Сравнение показало, что у пациентов с БА по сравнению с донорами достоверно укорочены теломерные последовательности на следующих хромосомных плечах: 4q, 5q, 9p, 10 q, 11p, 13p, 15q, 18q, 19q (см. рис. 2). Сле-

дует заметить, что укорочение теломер на q-плечах хромосом 9, 11, 13, 16 и 22 носило характер тенденции ($p = 0,052$). При этом ни на одном из плеч исследуемых хромосом теломерные последовательности у пациентов с БА не были удлинены по сравнению со здоровыми донорами.

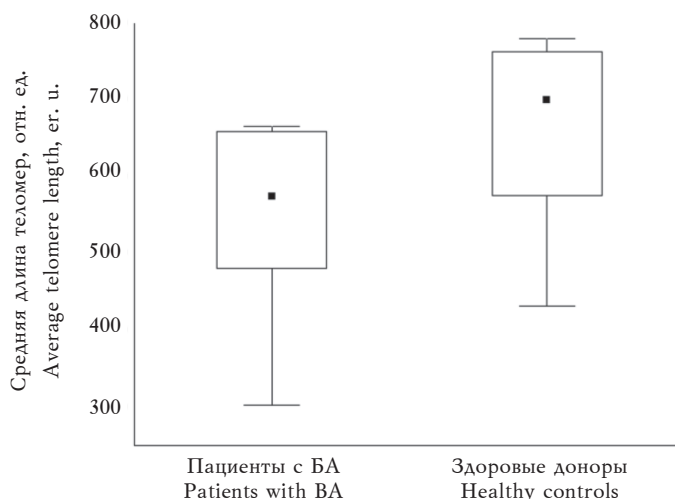


Рис. 1. Средняя длина теломер у пациентов с бронхиальной астмой и условно-здоровых доноров: данные представлены в виде $Me (Q_{25}-Q_{75})$ и минимального и максимального значений, $p < 0,05 (U)$

Fig. 1. Average telomere length of patients with BA and healthy controls: data in the diagram are given as $Me (Q_{25}-Q_{75})$ and minimum and maximum values, r.u. – relative units, $p < 0.05 (U)$

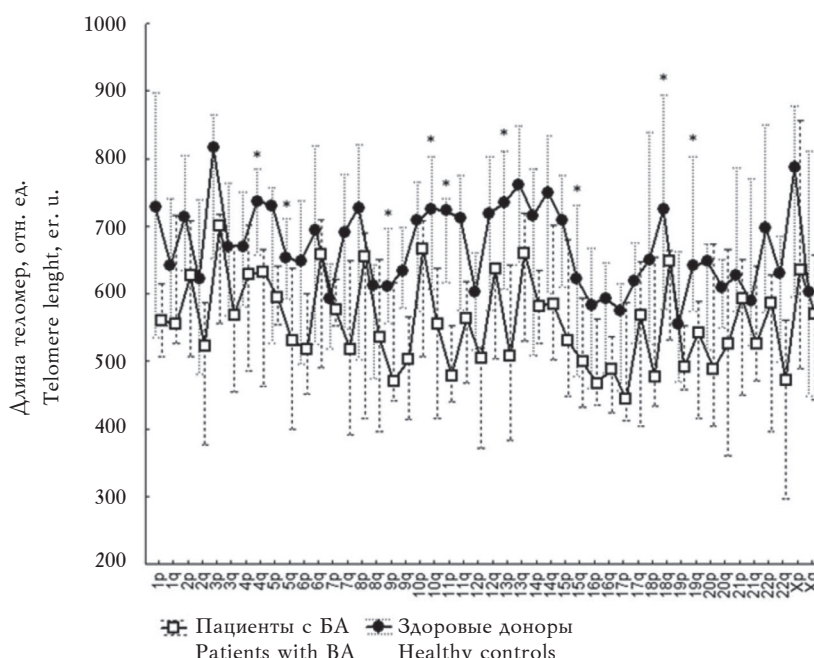


Рис. 2. Теломерные профили пациентов с БА и условно-здоровых доноров: данные представлены в виде $Me (Q_{25}-Q_{75})$. * указаны различия между соответствующими группами, $p < 0,05 (U)$

Fig. 2. Telomere profiles of patients with BA and healthy controls: data are given as $Me (Q_{25}-Q_{75})$, r.u. – relative units. * there are differences between the relevant groups, $p < 0.05 (U)$

Для оценки распределения длины теломерных последовательностей были определены достоверно более короткие и более длинные теломерные последовательности относительно средней длины теломер изучаемых профилей (применялся тест Вилкоксона, уровень статистической значимости $p < 0,05$). Анализ показал, что и в группе пациентов, и в группе доноров р-плечо 3-й хромосомы было достоверно удлинено, а р-плечи хромосом 12, 16, 17 и 19 – достоверно укорочены (таблица). В группе пациентов также была достоверно удлинена теломерная последовательность на р-плече X-хромосомы и достоверно укорочена – на q-плече 22-й хромосомы. При этом в группе здоровых доноров теломерные последовательно-

сти на р-плече X-хромосомы и q-плече 22-й хромосомы были изменены аналогично, но данные изменения носили характер тенденции. Несмотря на выявленные сходства теломерных профилей, при БА были обнаружены теломерные последовательности, которые отличаются по характеру изменения длины от группы здоровых доноров. Так, теломерные последовательности 4p, 6q, 8p были удлинены, а 2q, 9q, 11p, 15q – укорочены у пациентов с БА, но не изменялись в группе здоровых доноров (см. таблицу). Еще одной отличительной чертой БА является меньшее количество относительно укороченных или удлинённых теломерных последовательностей по сравнению с группой здоровых доноров (14 vs 17).

Т а б л и ц а
T a b l e

Характеристика отдельных плеч индивидуальных хромосом с укороченными и удлинёнными теломерными последовательностями у пациентов с БА и здоровых доноров				
Characterization of the arms of individual chromosomes with shortened and elongated telomere sequences in patients with BA and healthy donors				
Плечо индивидуальной хромосомы Arm of individual chromosome	Пациенты с БА Patients with BA		Здоровые доноры Healthy donors	
	длина теломер telomere length	тест Вилкоксона, p Wilcoxon test, p	длина теломер telomere length	тест Вилкоксона, p Wilcoxon test, p
2p	–	–	↑	0,059
2q	↓	0,017	–	–
3p	↑	0,005	↑	0,016
4p	↑	0,037	–	–
4q	–	–	↑	0,009
6q	↑	0,037	–	–
7p	–	–	↓	0,021
8p	↑	0,028	–	–
9q	↓	0,037	–	–
11p	↓	0,047	–	–
12p	↓	0,037	↓	0,005
12q	–	–	↑	0,059
13q	–	–	↑	0,007
14q	–	–	↑	0,037
15q	↓	0,007	–	–
16p	↓	0,028	↓	0,047
17p	↓	0,005	↓	0,012
17q	–	–	↓	0,007
18q	–	–	↓	0,037
19p	↓	0,009	↓	0,005
20p	–	–	↓	0,005
20q	–	–	↓	0,047
22q	↓	0,012	↓	0,059
Xp	↑	0,005	↑	0,059

Примечание. Теломерные последовательности плеча отдельных хромосом, которые удлинены (↑) или укорочены (↓) по сравнению со средней длиной теломер в метафазе. Отличия определялись по критерию Вилкоксона.

Note. The table shows the telomere sequences of the arms of individual chromosomes, which are elongated (↑) or shortened (↓) compared to the average telomere length in metaphase. The differences were determined in the Wilcoxon test.

ОБСУЖДЕНИЕ

Показанное методом Q-FISH укорочение средней длины теломер у пациентов с БА подтверждается данными литературы, в которых описано уменьшение средней длины теломер в Т-лимфоцитах, В-лимфоцитах, моноцитах и гранулоцитах при таких видах иммунопатологии, как БА, атопический дерматит и ревматоидный артрит [11, 22]. Однако считается, что именно чрезмерно укороченные теломеры могут приводить к нестабильности генома клетки, слиянию хромосом «конец-в-конец», запуску системы репарации ДНК и, в конечном итоге, вызывать апоптоз [7]. Мы установили, что у пациентов с БА была достоверно снижена длина теломер на плечах девяти различных хромосом (4q, 5q, 9p, 10q, 11p, 13p, 15q, 18q, 19q). Это укорочение теломерных последовательностей может быть вызвано усиленной пролиферацией лимфоцитов, которые находятся в состоянии иммунного ответа.

Поскольку в нашем исследовании длина теломер определялась не в абсолютных, а в относительных единицах, мы не можем утверждать, насколько критичным является укорочение теломер при БА. Вместе с тем есть доказательства того, что в клетке достаточно пяти теломер с нарушенной функцией для запуска пролиферативного старения [23]. Известны и другие способы влияния теломер на клетку, например позиционный эффект теломер (telomeric position effect (TPE)). TPE предполагает, что в норме теломеры вызывают «сайленсинг» генов субтеломерных регионов путем блокирования их промоторов [24]. При этом укорочение теломерных последовательностей отменяет репрессию данных генов, усиливая их экспрессию. В настоящее время доказано существование TPE для человеческих генов [25, 26]. Также считается, что укорочение теломер оказывает влияние не только на гены субтеломерных регионов, но и на удаленно расположенные гены (telomere position effect over long distances (TPE-OLD)) [27].

Развитие БА во многом связано с генетической предрасположенностью индивидуума к данному заболеванию. По данным геномных исследований, проводимых в разных популяциях, к одним из наиболее часто идентифицируемых кластеров генов, ассоциированных с БА, относятся локусы на 5-й и 11-й хромосомах [28]. Известно, что 31–33-й регионы q-плеча 5-й хромосомы содержат гены интерлейкина (IL) 3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, GM-CSF, а также иммуноглобулина (Ig) E, которые являются непосредственными участниками гиперчувствительности немедленно-

го типа при атопических заболеваниях. А локус 15.5, расположенный на p-плече 11-й хромосомы, кодирует гены семейства муциновых белков (MUC5AC, MUC5B), нарушенная секреция которых при БА способствует развитию гиперреактивности дыхательных путей [29]. По данным различных исследований, полиморфизм данных генов ассоциирован с развитием БА [28]. Связь данных генетических кластеров с длиной теломер не изучалась. Тем не менее в нашем исследовании наблюдалась уменьшенная длина теломерных последовательностей 5q и 11p. Исходя из чего, можно предположить, что укорочение индивидуальных теломерных последовательностей может вносить свой вклад в патогенетические процессы при астме посредством повышения экспрессии данных генов.

Существует мнение, что снижение длины теломер отражает не столько их укорочение в процессе иммунного ответа, сколько является наследственной чертой [30, 31], которая может влиять на ускоренное старение иммунной системы и нарушение Т-клеточного гомеостаза при иммунопатологии [22, 32]. Поэтому по распределению длины теломер индивидуальных хромосом относительно средней длины теломер были построены теломерные профили для доноров и пациентов, которые демонстрировали некоторое сходство. Полученные общие теломерные профили обеих групп по относительно длинным и относительно коротким теломерным последовательностям во многом совпадали с данными U.M. Martens и соавт. [33], в работе которых было показано, что 12p, 16p, 17p, 17q, 19p, 20q, 22q, также укорочены, а 3p, 4q, 12q, 13q, 14q и Xp удлинены относительно медианы.

Мы считаем, что обнаруженные в нашем исследовании укороченные (12p, 16p, 17p, 17q, 18q, 19p, 20p, 20q, 22q) и удлинённые (2p, 3p, 4q, 12q, 13q, 14q, Xp) последовательности являются конституциональными особенностями теломерного профиля, которые свойственны большинству людей, так как они были обнаружены у здоровых доноров. При этом значительная часть этих теломерных последовательностей (2p, 4q, 7p, 12q, 13q, 14q, 17q, 18q, 20p, 20q) у пациентов с БА не отличалась от средней длины теломер. Такое снижение варибельности длины теломерных последовательностей может свидетельствовать о своеобразном «стирании» теломерного профиля вследствие высокой пролиферативной нагрузки и ускоренного старения клеток иммунной системы при БА. Примечательно также, что у пациентов с БА были укорочены по сравнению с длиной те-

ломер доноров и относительно короткие последовательности теломерного профиля (11p, 15q) и те, которые не отклонялись от средней длины теломер (4q, 5q, 9p, 10q, 13p, 18q, 19q). При этом относительно длинные последовательности теломерного профиля не были укорочены при БА по сравнению с донорами. Это говорит о том, что в теломерном профиле пациентов с БА уменьшаются определенные теломерные последовательности. По нашему мнению, данные теломерные последовательности на отдельных плечах индивидуальных хромосом при БА могут принимать участие в развитии данного заболевания. В целом выявленные особенности распределения последовательностей теломерного профиля у пациентов с БА свидетельствуют о существовании более сложных механизмов укорочения теломер при данном заболевании, чем пролиферативное старение или наследуемый характер теломерного профиля. Данные механизмы могут опосредоваться различными факторами, такими как активность теломеразы, компоненты Sheltering-комплекса, быстрая делеция теломер или негомологичная рекомбинация теломерных последовательностей [34–36].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, была проведена комплексная оценка длины теломер и характеристик теломерного профиля при БА. Установлено, что у пациентов с БА укорочены средняя длина теломер и длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом (4q, 5q, 9p, 10 q, 11p, 13p, 15q, 18q, 19q) по сравнению с этими показателями здоровых доноров. Также были обнаружены различия между теломерными профилями пациентов и доноров: у пациентов теломерные последовательности 4p, 6q, 8p были удлинены, а 2q, 9q, 11p, 15 q – укорочены относительно средней длины теломер. Тогда как в группе доноров длина данных теломерных последовательностей не изменялась. По нашему мнению, укорочение средней длины теломер и длины теломер на отдельных хромосомах является свидетельством более раннего старения иммунной системы у пациентов с БА по сравнению со здоровыми донорами. Выявленные особенности теломерного профиля пациентов могут быть результатом воздействия различных механизмов поддержания длины теломер. А обнаруженные укороченные теломерные последовательности на отдельных плечах индивидуальных хромосом могут быть причастны к патогенезу БА, что требует дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Tsuji T., Aoshiba K., Nagai A. Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006; 174 (8): 886–893. DOI: 10.1164/rccm.200509-1374OC.
2. Albrecht E., Sillanpää E., Karrasch S., Couto Alves A., Codd V., Hovatta I., Buxton J.L., Nelson C.P., Broer L., Hägg S., Mangino M., Willemsen G., Surakka I., Ferreira M.A.R., Amin N., Oostra B.A., Bäckmand H.M., Peltonen M., Sarna S., Rantanen T., Sipilä S., Korhonen T., Madden P.A., Gieger C., Jörres R.A., Heinrich J., Behr J., Huber R.M., Peters A., Strauch K., Wichmann H.E., Waldenberger M., Blakemore A.I., de Geus E.J., Nyholt D.R., Henders A.K., Piirilä P.L., Rissanen A., Magnusson P.K., Vieucla A., Pietiläinen K.H., Martin N.G., Pedersen N.L., Boomsma D.I., Spector T.D., van Duijn C.M., Kaprio J., Samani N.J., Jarvelin M.R., Schulz H. Telomere length in circulating leukocytes is associated with lung function and disease. *Eur. Respir. J.* 2014; 43 (4): 983–992. DOI: 10.1183/09031936.00046213.
3. Birch J., Anderson R.K., Correia-Melo C., Jurk D., Hewitt G., Marques F.M., Green N.J., Moisey E., Birrell M.A., Belvisi M.G., Black F., Taylor J.J., Fisher A.J., De Soyza A., Passos J.F. DNA damage response at telomeres contributes to lung aging and chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 2015; 309 (10): L1124–L1137. DOI: 10.1152/ajplung.00293.2015.
4. Moyzis R.K., Buckingham J.M., Cram L.S., Dani M., Deaven L.L., Jones M.D., Meyne J., Ratliff R.L., Wu J.R. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988; 85 (18): 6622–6626. DOI: 10.1073/pnas.85.18.6622.
5. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid strains. *Exp. Cell Res.* 1965; 37 (3): 614–636. DOI: 10.1016/0014-4827(65)90211-9.
6. Rufer N., Brümmendorf T.H., Kolvraa S., Bischoff C., Christensen K., Wadsworth L., Schulzer M., Lansdorp P.M. Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. *J. Exp. Med.* 1999; 190 (2): 157–167. DOI: 10.1084/jem.190.2.157.
7. Weng N., Levine B.L., June C.H., Hodes R.J. Human naive and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92 (24): 11091–11094. DOI: 10.1073/pnas.92.24.11091.
8. Burns J.B., Lobo S.T., Bartholomew B.D. In vivo reduction of telomere length in human antigen-reactive memory T cells. *Eur. J. Immunol.* 2000; 30 (7): 1894–1901. DOI: 10.1002/1521-4141(200007)30:7<1894::AID-IMMU1894>3.0.CO;2-N.
9. Andrews N.P., Fujii H., Goronzy J.J., Weyand C.M. Telomeres and immunological diseases of aging. *Gerontology.* 2010; 56 (4): 390–403. DOI: 10.1159/000268620.

10. Schönland 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; 100 (23): 13471–13476. DOI: 10.1073/pnas.2233561100.
11. Борисов В.И., Демаков С.А., Непомнящих В.М., Леонова М.И., Баровская Н.А., Кожевников В.С. Сокращение теломерных районов ДНК в субпопуляциях CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов при заболеваниях атопической природы. *Омский научный вестник*. 2007; 3 (61): 172–174. [Borisov V.I., Demakov S.A., Nepomnyaschikh V.M., Leonova M.I., Barovskaya N.A., Kozhevnikov V.S. Decreasing of DNA telomere regions in subpopulations of CD4 + and CD8 + lymphocytes in atopic diseases. *Omsk Scientific Bulletin*. 2007; 3 (61): 172–174 (in Russ.)].
12. Борисов В.И., Демаков С.А., Непомнящих В.М., Леонова М.И., Демина Д.В., Баровская Н.А., Кожевников В.С. Особенности изменения средней длины теломер в лимфоцитах у больных бронхиальной астмой. *Медицинская иммунология*. 2009; 11 (6): 523–530. [Borisov V.I., Demakov S.A., Nepomnyaschikh V.M., Leonova M.I., Demina D.V., Barovskaya N.A., Kozhevnikov V.S. Some features of changing telomere length in lymphocytes from the patients with bronchial asthma. *Medical Immunology*. 2009; 11 (6): 523–530 (in Russ.)].
13. Kyoh S., Venkatesan N., Poon A.H., Nishioka M., Lin T., Bagloli C.J., Eidelman D.H., Hamid Q. Are leukocytes in asthmatic patients aging faster? A study of telomere length and disease severity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013; 132 (2): 480–482. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.02.010.
14. Belsky D.W., Shalev I., Sears M.R., Hancox R.J., Lee Harrington H., Houts R., Moffitt T.E., Sugden K., Williams B., Poulton R., Caspi A. Is chronic asthma associated with shorter leukocyte telomere length at midlife? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2014; 190 (4): 384–391. DOI: 10.1164/rccm.201402-0370OC.
15. Lansdorp P.M., Verwoerd N.P., van de Rijke F.M., Dragowska V., Little M.T., Dirks R.W., Raap A.K., Tanke H.J. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum. Mol. Genet.* 1996; 5 (5): 685–691. DOI: 10.1093/hmg/5.5.685.
16. Graakjaer J.J., Der-Sarkissian H., Schmitz A., Bayer J., Kolvraa G.T.S., Londono-Vallejo J.A. Allele-specific relative telomere lengths are inherited. *Hum. Genet.* 2006; 119 (3): 344–350. DOI: 10.1007/s00439-006-0137-x.
17. Xing J., Ajani J.A., Chen M., Izzo J., Lin J., Chen Z., Gu J., Wuet X. Constitutive short telomere length of chromosome 17p and 12q but not 11q and 2p are associated with an increased risk for esophageal cancer. *Cancer Prev. Res.* 2009; 2 (5): 459–465. DOI: 10.1158/1940-6207.
18. Zheng Y.L., Zhou X., Loffredo C.A., Shields P.G., Sun B. Telomere deficiencies on chromosomes 9p, 15p, 15q and Xp: potential biomarkers for breast cancer risk. *Hum. Mol. Genet.* 2010; 20 (2): 378–386. DOI: 10.1093/hmg/ddq461.
19. Блинова Е.А., Зиннатова Е.В., Барковская М.Ш., Борисов В.И., Сизиков А.Е., Козhevnikov V.S., Rubtsov N.B., Kozlov V.A. Telomere length of individual chromosomes in patients with rheumatoid arthritis. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016; 160 (6): 779–782. DOI: 10.1007/s10517-016-3308-3.
20. Bangs C.D., Donlon T.A. Metaphase chromosome preparation from cultured peripheral blood cells. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 2005; 45 (1): 4.1.1–4.1.19. DOI: 10.1002/0471142905.hg0401s45.
21. Барковская М.Ш., Богомолов А.Г., Кнауер Н.Ю., Rubtsov N.B., Kozlov V.A. Development of software and modification of Q-FISH protocol for estimation of individual telomere length in immunopathology. *JBCB*. 2017; 15 (2): 1650041. DOI: 10.1142/s0219720016500414.
22. Costenbader K.H., Prescott J., Zee R.Y., DeVivo I. Immunosenescence and rheumatoid arthritis: does telomere shortening predict impending disease? *Autoimmun. Rev.* 2011; 10 (9): 569–573. DOI: 10.1016/j.autrev.2011.04.034.
23. Kaul Z., Cesare A.J., Huschtscha L.I., Neumann A.A., Reddel R.R. Five dysfunctional telomeres predict onset of senescence in human cells. *EMBO Rep.* 2011; 13 (1): 52–59. DOI: 10.1038/embor.2011.227.
24. Baur J.A., Zou Y., Shay J.W., Wright W.E. Telomere position effect in human cells. *Science*. 2001; 292 (5524): 2075–2077. DOI: 10.1126/science.1062329.
25. Lou Z., Jun W., Riethman H., Baur J.A., Voglauer R., Shay J.W., Wright W.E. Telomere length regulates ISG15 expression in human cells. *Aging*. 2009; 1 (7): 608–621. DOI: 10.18632/aging.100066.
26. Stadler G., Rahimov F., King O.D., Chen J., Robin J.D., Wagner K.R., Shay J.W., Emerson C.P., Wright W.E. Telomere position effect regulates DUX4 in human facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013; 20 (6): 671–678. DOI: 10.1038/nsmb.2571.
27. Robin J.D., Ludlow A.T., Chen M., Magdinier F., Batten K., Holohan B., Stadler G., Wagner K.R., Shay J.W., Wright W.E. Telomere position effect: regulation of gene expression with progressive telomere shortening over long distances. *Genes Dev.* 2014; 28 (22): 2464–2476. DOI: 10.1101/gad.251041.114.
28. Hakonarson H., Halapi E. Genetic analyses in asthma: current concepts and future directions. *Am. J. Pharmacogenomics*. 2002; 2 (3): 155–166. DOI: 10.2165/00129785-200202030-00001.
29. Bonser L.R., Erle D.J. Airway mucus and asthma: the role of MUC5AC and MUC5B. *J. Clin. Med.* 2017; 6 (12): 112. DOI: 10.3390/jcm6120112.
30. Njajou O.T., Cawthon R.M., Damcott C.M., Wu S.H., Ott S., Garant M.J., Blackburn E.H., Mitchel B.D., Shuldiner A.R., Hsueh W.C. Telomere length is paternally inherited and is associated with parental lifespan.

- PNAS*. 2007; 104 (29): 12135–12139. DOI: 10.1073/pnas.0702703104.
31. Broer L., Codd V., Nyholt D.R., Deelen J., Mangino M., Willemsen G., Albrecht E., Amin N., Beekman M., de Geus E.J.C., Henders A., Nelson C.P., Steves C.J., Wright M.J., de Craen A.J.M., Isaacs A., Matthews M., Moayyeri A., Montgomery G.W., Oostra B.A., Vink J.M., Spector T.D., Slagboom P.E., Martin N.G., Samani N.J., van Duijn C.M., Boomsma D.I. Meta-analysis of telomere length in 19,713 subjects reveals high heritability, stronger maternal inheritance and a paternal age effect. *Eur. J. Hum. Genet.* 2013; 21 (10): 1163–1168. DOI: 10.1038/ejhg.2012.303.
 32. 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. *Arthritis Rheum.* 2008; 58 (4): 990–1000. DOI: 10.1002/art.23287.
 33. Martens U.M., Zijlmans J.M., Poon S.S., Dragowska W., Yui J., Chavez E.A., Ward R.K., Lansdorp P.M. Short telomeres on human chromosome 17p. *Nat. Genet.* 1998; 18 (1): 76–80. DOI: 10.1038/ng0198-018.
 34. Morrish T.A., Greider C.W. Short telomeres initiate telomere recombination in primary and tumor cells. *PLoS Genet.* 2009; 5 (1): 1–15. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000357.
 35. Pickett H.A., Henson J.D., Au A.Y., Neumann A.A., Reddel R.R. Normal mammalian cells negatively regulate telomere length by telomere trimming. *Hum. Mol. Genet.* 2011; 20 (23): 46844692. DOI: 10.1093/hmg/ddr402.
 36. Zhdanova N.S., Rubtsov N.B. Telomere recombination in normal mammalian cells. *Russian Journal of Genetics.* 2016; 52 (1): 8–16. DOI: 10.1134/S1022795416010142.

Вклад авторов

Барковская М.Ш. – проведение исследования, обработка результатов и анализ данных, подготовка статьи. Блинова Е.А. – участие в интерпретации данных, подготовка статьи. Коняхина Ю.А. – помощь в наборе клинического материала. Леонова М.И. – ведение и отбор пациентов для исследования согласно критериям. Непомнящих В.М. – ведение и отбор пациентов для исследования согласно критериям. Демина Д.В. – ведение и отбор пациентов для исследования согласно критериям. Кожевников В.С. – разработка концепции исследования. Козлов В.А. – обоснование рукописи, окончательное утверждение для публикации.

Authors contribution

Barkovskaya M.Sh. – carrying out of the research, analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript. Blinova E.A. – interpretation of data, drafting of the manuscript. Konyahina J.V. – assistance in obtaining clinical material. Leonova M.I. – selection and management of patients according to the criteria. Nepomniashchikh V.M. – selection and management of patients according to the criteria. Demina D.V. – selection and management of patients according to the criteria. Kozhevnikov V.S. – conception. Kozlov V.A. – justification of the manuscript and final approval of the manuscript for publication.

Сведения об авторах

Барковская Маргарита Шамилевна, мл. науч. сотрудник, лаборатория клинической иммунопатологии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0001-5748-9116.

Блинова Елена Андреевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория клинической иммунопатологии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0003-3327-3630.

Коняхина Юлия Владимировна, клинический ординатор, НИИФКИ, г. Новосибирск.

Леонова Марина Ивановна, врач аллерголог-иммунолог, отделение аллергологии, НИИФКИ, г. Новосибирск.

Непомнящих Вера Макаровна, врач аллерголог-иммунолог, отделение аллергологии, НИИФКИ, г. Новосибирск.

Демина Дарья Владимировна, канд. мед. наук, врач аллерголог-иммунолог, зав. отделением аллергологии, НИИФКИ, г. Новосибирск.

Authors information

Barkovskaya Margarita Sh., Junior Researcher, Laboratory of Clinical Immunopathology, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-5748-9116.

Blinova Elena A., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Clinical Immunopathology, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-3327-3630.

Konyahina Julia V., Resident Physician, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Leonova Marina I., Allergist-immunologist, Department of Allergy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Nepomniashchikh Vera M., Allergist-immunologist, Department of Allergy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Demina Darja V., PhD, Allergist-immunologist, Head of the Department of Allergy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Kozhevnikov Vladimir S., DM, Professor, Chief Researcher of Laboratory of Clinical Immunopathology,

Кожевников Владимир Сергеевич, д-р. мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник, лаборатория клинической иммунопатологии, НИИФКИ, г. Новосибирск.

Козлов Владимир Александрович, д-р. мед. наук, профессор, академик РАН, науч. руководитель НИИФКИ, зав. лабораторией клинической иммунопатологии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-1756-1782.

(✉) **Барковская Маргарита Шамилевна**, e-mail: margaritabarkovskaya@gmail.com.

RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Kozlov Vladimir A., DM, Professor, Academician of RAS, Scientific Supervisor of RIFCI, Head of the Laboratory of Clinical Immunopathology, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-1756-1782.

(✉) **Barkovskaya Margarita Sh.**, e-mail: margaritabarkovskaya@gmail.com.

Received 22.11.2018

Accepted 17.12.2018

Поступила в редакцию 22.11.2018

Подписана в печать 17.12.2018