

## ДЛИНА ТЕЛОМЕР ХРОМОСОМ В КЛЕТКАХ ПУПОВИННОЙ КРОВИ КАК ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ КРИТЕРИЙ КАЧЕСТВА ОБРАЗЦА ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

© П. Ю. Новикова,<sup>1,2,\*</sup> О. В. Супильникова,<sup>1</sup> С. Ю. Новикова,<sup>1</sup> А. С. Хрупина,<sup>1</sup>  
Д. А. Иволгин,<sup>1</sup> Н. В. Смирнова,<sup>1,2</sup> В. М. Михельсон,<sup>2</sup> О. Г. Хурцилава,<sup>2</sup> А. Б. Смолянинов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ООО «Покровский банк стволовых клеток» и <sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

\* электронный адрес: polina\_novik@mail.ru

Теломеры являются некодирующими концевыми участками хромосом, которые состоят из повторяющейся последовательности ДНК и комплекса белков. Укорочение теломер с каждым делением клетки является ограничителем пролиферативного клеточного потенциала. В последнее время интенсивно развивается использование показателя длины теломер в клинической практике. Дополнительная характеристика пролиферативной активности стволовых клеток, оцениваемая по длине теломер, может стать информативным показателем качества трансплантата. В работе представлены результаты измерения средней длины теломер клеток лейкоцитарной фракции 14 образцов пуповинной крови методом flow-FISH параллельно с определением количества гемопоэтических стволовых клеток CD34+CD45dim, данными гематологического анализатора и иммуноферментного анализа на наличие антител к стандартным возбудителям. Средняя длина теломер в клетках лейкоконцентрата пуповинной крови составила  $20.4 \pm 4.9$  % относительно контрольной клеточной линии Т-лимфобластоидной лейкемии 1301.

Ключевые слова: теломеры, стволовые клетки, пуповинная кровь, flow-FISH, клеточная линия 1301, качество трансплантата.

Принятые сокращения: АДТ — абсолютная длина теломер, ГСК — гемопоэтические стволовые клетки, КОЕ — колониеобразующие единицы, ОДТ — относительная длина теломер, ПК — пуповинная кровь.

Теломеры — концевые участки хромосом, состоящие из повторяющейся последовательности ДНК и комплекса белков, которые формируют и стабилизируют защитную петлевою структуру, позволяющую системе репарации отличать концы хромосом от двойных разрывов ДНК (Shay, Wright, 2007; Mirsi et al., 2008). В связи с недорепликацией концов хромосом (Оловников, 1971) теломерные области ДНК укорачиваются при каждом делении клетки. Данный молекулярный механизм является ограничителем пролиферативного клеточного потенциала. В клетках, способных делиться практически неограниченно — эмбриональных стволовых клеток, клетки герментативной линии, а также большинства раковых клеток, — активно экспрессируется теломераза, которая способна достраивать теломеры, или (и) активируется альтернативный путь удлинения теломер. В процессе дифференцировки стволовых клеток активность теломеразы снижается, поэтому зрелые производные стволовых клеток делятся ограниченное число раз (Wai-Leong et al., 2007; Wagner, 2009).

Стандартные методы характеристики качества образца пуповинной крови (ПК) для трансплантации включают в себя количество гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) на 1 кг массы тела пациента, жизнеспособность, количество КОЕ и отсутствие контаминации (Hurley et al., 2010). Дополнительная характеристика пролиферативной активности стволовых клеток, оцениваемая по длине те-

ломер, может стать информативным показателем качества трансплантата. Из литературных данных известно, что эффективность приживления трансплантата напрямую коррелирует с длиной теломер в его клетках (Mangerini et al., 2009). Это является дополнительным доказательством того, что трансплантация ПК оказывается эффективнее, чем трансплантация мобилизованных стволовых клеток периферической крови, так как теломеры в клетках ПК длиннее. Клетки ПК проходят меньше циклов деления и имеют репликативное преимущество перед клетками периферической крови (Alenzi et al., 2009).

### Материал и методика

В работе исследовали 14 образцов лейкоконцентрата ПК. Лейкоконцентрат был получен аппаратным методом с использованием клеточного сепаратора Serax S100. Далее была получена фракция мононуклеарных клеток ПК с помощью градиентного центрифугирования на Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare, США). Измерение теломер мононуклеарных клеток ПК проводили с использованием набора DAKO Telomere PNA Kit/FITC for Flow Cytometry (DAKO, Дания). В качестве внешнего контроля использовали специальную клеточную линию Т-лимфобластоидной лейкемии 1301 (HPA Culture Collections, Великобритания), которая характеризуется тетраплоидным набором

**Средняя длина теломер относительно контрольной культуры 1301, содержание (в %) лимфоцитов, моноцитов, гемопоэтических стволовых клеток CD34+CD45dim и наличие антител к возбудителям в лейкоконцентрате 14 образцов пуповинной крови**

Номер анализа	Средняя длина теломер в образце, % относительно контрольной культуры 1301	Содержание лимфоцитов в лейкоконцентрате, %	Содержание моноцитов в лейкоконцентрате, %	Содержание гемопоэтических стволовых клеток CD34+CD45dim в лейкоконцентрате, %	Антитела к возбудителям
1	22.40	30.2	8.1	0.200	Цитомегаловирус (CMV), вирус простого герпеса ВПГ 1,2
2	14.50	42.6	4.4	0.500	Вирус простого герпеса ВПГ 1,2
3	14.50	45.6	3.5	0.090	Гепатит С (IgM+IgG), цитомегаловирус
4	23.60	40.4	6.6	0.140	Нет
5	19.20	38.2	7.3	0.300	<i>Toxoplasma gondii</i> , цитомегаловирус (CMV)
6	14.20	37.7	5.2	0.230	Цитомегаловирус (CMV)
7	21.30	56.4	5.1	0.250	<i>Toxoplasma gondii</i>
8	15.80	47.8	5.4	0.320	То же
9	22.80	37.7	6.9	0.140	Цитомегаловирус (CMV), вирус простого герпеса ВПГ 1,2
10	23.90	38.1	4.8	0.050	Нет
11	31.00	43.7	10.1	0.168	<i>Toxoplasma gondii</i> , цитомегаловирус (CMV)
12	24.90	37.9	4.6	0.071	Цитомегаловирус (CMV)
13	17.05	39.0	3.5	0.190	То же
14	21.00	35.3	8.1	0.109	<i>Toxoplasma gondii</i> , цитомегаловирус (CMV)
Среднее	20.40	41.8	5.8	0.200	
Стандартное отклонение	4.90	7.5	1.5	0.100	

хромосом и стабильной длиной теломер (Hultdin et al., 1998). Данная культура поддерживается в среде RPMI с добавлением 10 % бычьей сыворотки, глутамина и пенициллин/стрептомицина. Клетки образца ПК и контрольной линии 1301 выравняли по количеству после отмывки в PBS с добавлением 0.1 % BSA. Одну часть образца ПК и 1301 ресуспендировали в 300 мкл гибридизационно-

го раствора с пептидо-нуклеиновым зондом, меченным флуорохромом FITC и комплементарным теломерной последовательности ДНК, другую — без зонда. Далее проводили денатурацию ДНК при 82 °C в течение 10 мин с использованием твердотельного термостата Bio TDB-120 (Biosan, Латвия). Гибридизацию проводили в течение ночи при комнатной температуре в темноте. Далее дважды осуществляли отмывку клеток с инкубацией в отмывочном буфере ДАКО при 40 °C в течение 10 мин. На следующем этапе клетки ресуспендировали в растворе ДАКО для окраски ДНК (буфер, содержащий пропидиум йодид и РНКазу А) и выдерживали в течение 30 мин при 37 °C в темноте.

Пробы анализировали на проточном цитофлуориметре FC500 (Beckman Coulter, США) с программным обеспечением СХР с длиной волны лазерного излучения 488 нм. Перед выполнением анализа проводили ежедневный контроль настроек прибора с использованием частиц Flow-Check™ Fluorospheres (Beckman Coulter, США). Для выделения клеток на стадии клеточного цикла G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> использовали логарифмическую шкалу FL3. Относительную длину теломер (ОДТ) образца в % от длины теломер контрольной линии 1301 с учетом их тетраплоидности высчитывали следующим образом:

$$\text{ОДТ} = (\text{П} - \text{А})_{\text{образец}} \cdot 2 \cdot 100 / (\text{П} - \text{А})_{1301},$$

где (П – А) — разница между средней интенсивностью флуоресценции по FL1 пробы с зондом и без зонда (автофлуоресценция).

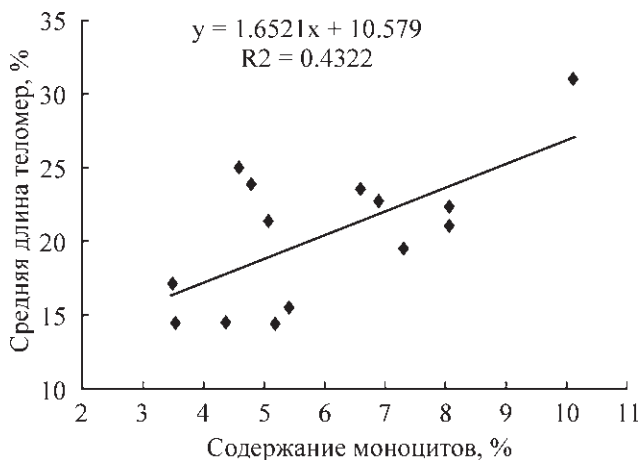


Рис. 1. Зависимость средней длины теломер клеток лейкоконцентрата ПК от содержания моноцитов в нем.

Длина теломер дана относительно контрольной линии клеток 1301. Величина достоверности аппроксимации равна 0.43.

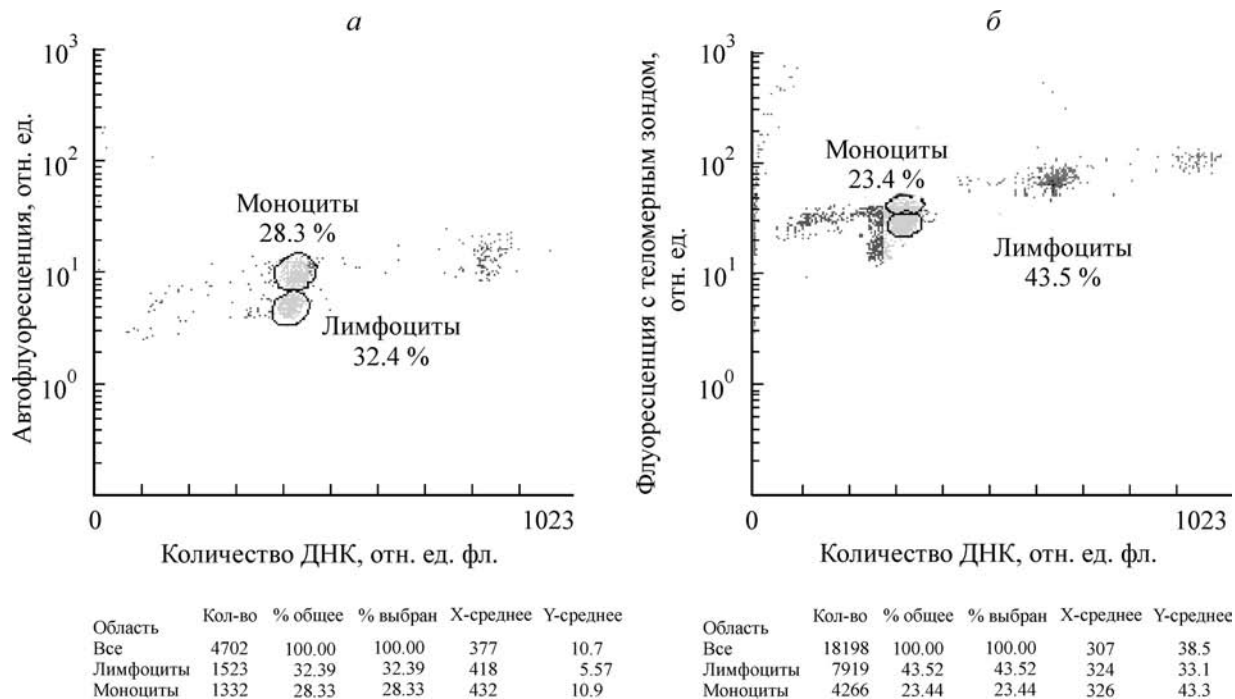


Рис. 2. Стандартная картина распределения клеточных событий по количеству ДНК (FL3, PI).

а — автофлуоресценции (FL1), б — флуоресценции с теломерным зондом (FL1, FITC) для лейкоконцентрата пуповинной крови. Средняя длина теломер моноцитов в относительных единицах флуоресценции для данного примера составила 32.4, лимфоцитов — 27.5.

Выявление наличия антител к инфекционным агентам в образцах проводилось с помощью иммуноферментного анализа, с использованием наборов фирмы ЗАО «Вектор-Бест» (Россия). Подсчет количества ГСК CD34+CD45dim в лейкоконцентрате ПК проводили с использованием набора Stem-Kit™ Reagents (Beckman Coulter, США) методом проточной цитометрии. Данные о процентном содержании лимфоцитов и моноцитов в лейкоконцентрате ПК были получены с использованием гематологического анализатора Coulter AcT diff 2 (Beckman Coulter, США).

### Результаты и обсуждение

Результаты измерений различных параметров лейкоконцентрата ПК представлены в таблице. Средняя длина теломер в клетках лейкоконцентрата ПК составила  $20.4 \pm 4.9$  % относительно контрольной клеточной линии Т-лимфобластоидной лейкемии 1301, что полностью соответствует литературным данным (Regéczy et al., 2002; Ferragio et al., 2009). Для пересчета относительных значений средней длины теломер (ОДТ, % от 1301) в абсолютные (АДТ, т. п. н.) можно воспользоваться следующими коэффициентами (Schmid et al., 2002) :

$$\text{АДТ} = \text{ОДТ} \cdot 0.77 + 2.02.$$

Таким образом, средняя длина теломер в клетках лейкоконцентрата ПК составляет  $17.7 \pm 5.7$  т. п. н., что несколько превышает значение средней длины теломер в лейкоцитах периферической крови новорожденных — 16.4 т. п. н. (Beckaert et al., 2005). Это связано с тем, что в ранний период жизни наблюдается повышенная скорость

укорочения теломер в связи с интенсивным соматическим ростом (Frenck et al., 1998). Проведенный корреляционный анализ не выявил зависимости между средней длиной теломер в клетках лейкоконцентрата и содержанием ГСК CD34+CD45dim в нем ( $r = -0.49$ ), что также соответствует литературным данным (Regéczy et al., 2002). Показано, однако, что средняя длина теломер клеток лейкоконцентрата ПК положительно коррелирует с процентным содержанием моноцитов ( $r = 0.65$ ) (рис. 1).

Кроме того, максимальное значение средней длины теломер клеток лейкоцитарной фракции ПК (31 %) наблюдалось в образце с наибольшим процентным содержанием моноцитов (10.1 %). Это связано с тем, что моноциты характеризуются большей по сравнению с лимфоцитами длиной теломер (рис. 2). Интересно, что значения средней длины теломер в двух образцах ПК (23.6 и 23.9 %), в которых не выявлено наличия антител к стандартным возбудителям, находятся на верхней границе распределения данного показателя. Эти данные косвенно указывают на то, что наличие хронических инфекций отрицательно влияет на среднюю длину теломер клеток крови (Berg et al., 2010). Для подробного анализа соответствия данных ИФА и средней длины теломер в образцах ПК требуются более обширные статистические данные.

Таким образом, проведенные исследования показывают возможность применения методики flow-FISH для измерения средней длины теломер клеток лейкоцитарной фракции ПК. Длина теломер клеток ПК косвенно отражает качество заготовленного образца для трансплантации, так как коррелирует с процентным содержанием моноцитов, а также наличием или отсутствием антител к различным возбудителям, определение которых прописано в стандартах заготовки ПК.

## Список литературы

- Alenzi F. Q., Alenazi B. Q., Ahmad S. Y., Salem M. L., Al-Jabri A. A., Wyse R. K. H. 2009. The haemopoietic stem cell: between apoptosis and self renewal. *Yale J. Biol., Med.* 82 (1) : 7—18.
- Bekaert S., De Meyer T., Van Oostveldt P. 2005. Telomere attrition as ageing biomarker. *Anticancer. Res.* 25 (4) : 3011—3021.
- Berg P. J. van de, Griffiths S. J., Yong S. L., Macaulay R., Bemelman F. J., Jackson S., Henson S. M., ten Berge I. J., Akbar A. N., van Lier R. A. 2010. Cytomegalovirus infection reduces telomere length of the circulating T cell pool. *J Immunol.* 184 (7) : 3417—3423.
- Ferrario D., Collotta A., Carfi M., Bowe G., Vahter M., Hartung T., Gribaldo L. 2009. Arsenic induces telomerase expression and maintains telomere length in human cord blood cells. *Toxicology*, 260 (1—3) : 132—141.
- Frenck R. W. Jr., Blackburn E. H., Shannon K. M. 1998. The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 95 (10) : 5607—5610.
- Hultdin M., Gronlund E., Norrback K., Eriksson-Lindstrom E., Just T., Roos G. 1998. Telomere analysis by fluorescence *in situ* hybridization and flow cytometry. *Nucl. Res.* 26 (16) : 3651—3656.
- Hurley C. K., Foeken L., Horowitz M., Lindberg B., McGregor M., Sacchi N. 2010. Standards, regulations and accreditation for registries involved in the worldwide exchange of hematopoietic stem cell donors and products. *Bone Marrow Transplant.* 45 (5) : 819—824.
- Mangerini R., Lanino E., Terranova P., Faraci M., Pistillo M. P., Gaetani G. F., Ferraris A. M. 2009. Telomere length of donors influences granulocyte recovery in children after hematopoietic stem cell transplantation. *Ann. Hematol.* 88 (10) : 1029—1031.
- Misri S., Pandita S., Kumar R., Pandita T. K. 2008. Telomeres, histone code, and DNA damage response. *Cytogenet. Genome Res.* 122 (3—4) : 297—307.
- Regéczy N., Valent S., Kormos L., Hajdu M., Gopcsa L., Paloczi K. 2002. Telomere length analysis on cord blood cells by the flow-FISH method. *Haematologia* 32 (3) : 265—269.
- Schmid I., Dagarag M. D., Hausner M. A., Matud J. L., Just T., Effros R. B., Jamieson B. D. 2002. Simultaneous flow cytometric analysis of two cell surface markers, telomere length, and DNA content. *Cytometry.* 49 (3) : 96—105.
- Shay J. W., Wright W. E. 2007. Hallmarks of telomeres in ageing research. *J. Pathol.* 211 (2) : 114—123.
- Wagner W., Bork S., Horn P., Krunic D., Walenda T., Diehlmann A., Benes V., Blake J., Huber F. X., Eckstein V., Boukamp P., Ho A. D. 2009. Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PLoS ONE.* 4 (6) : e5846.
- Wai-Leong T., Ang Y. S., Lim B. 2007. The molecular basis of ageing in stem cells. *Mechanisms of ageing and development*, 128 (1) : 137—148.

Поступила 28 VI 2010

## TELOMERE LENGTH OF CORD BLOOD CELLS CHROMOSOMES AS ADDITIONAL QUALITY CHARACTERISTIC OF SAMPLE FOR TRANSPLANTATION

P. Y. Novikova,<sup>1,2,\*</sup> O. V. Supilnikova,<sup>1</sup> S. Y. Novikova,<sup>1</sup> A. S. Chrupina,<sup>1</sup> D. A. Ivolgin,<sup>1</sup> N. V. Smirnova,<sup>1,2</sup> O. G. Khurtsilava,<sup>1</sup> A. B. Smolyaninov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Stem Cell Bank Pokrovski and <sup>2</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;  
\*e-mail: polina\_novik@mail.ru

Telomeres are the ends of the chromosomes and represent repeated DNA sequence and protein complex. Telomeres shorten with each cell division, which limits proliferative potential of cells. There is a great progress in clinical application of telomere length now. Additional characteristic of stem cell proliferation activity estimated by telomere length can be an informative indicator of transplant quality. In this work, we analyzed 14 cords blood samples by flow-FISH, ELISA and gematologicaly analisator, and also the number of CD34 + CD45dim cells. Average telomere length of leukocytes fraction CB cells was  $20.4 \pm 4.9$  % respectively the control cells 1301 (T-cell lymphoblastic leukemia).

Key words: telomeres, stem cell, cord blood, flow-FISH, cell line 1301, transplant quality.