

ГУЛЕЮК Н. Л.¹✉, ЗАСТАВНА Д. В.¹, ГАЙБОНЮК І. Є.¹, ТКАЧ І. Р.¹, ТИРКА М.²¹ ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»,

Україна, 79008, м. Львів, вул. М. Лисенка, 31 а, e-mail: root@ihp.lviv.ua

² Жешівська Політехніка ім. І. Лукасевича,

Польща, 35-959, м. Жешів, вул. Повстанців Варшави, 6, e-mail: mtyrka@prz.edu.pl

✉ huleyuk@yahoo.com, (095) 655-85-49

ДОВЖИНА ТЕЛОМЕР В ОСІБ ІЗ РАННІМИ РЕПРОДУКТИВНИМИ ВТРАТАМИ

Мета. За останнє десятиліття біологія теломер стала важливою темою у галузі репродукції людини. Ми зосредили увагу на взаємозв'язку між відносною довжиною теломер (RTL) та тенденцією до ранніх репродуктивних втрат (РРВ) у людини. **Методи.** Відносну довжину теломер (Relative Telomere Length, RTL) вивчали у лейкоцитах периферійної крові за допомогою полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (RT-PCR). Показники RTL визначили у 654 осіб, а саме: 209 осіб без обтяженого репродуктивного анамнезу (контрольна група, К), серед яких 107 жінок (КЖ) та 102 чоловіків (КЧ), та у 445 осіб із РРВ (обстежувана група), серед котрих 223 жінки (РРВЖ) та 212 чоловіків (РРВЧ). **Результати.** У жінок (КЖ+РРВЖ) показник RTL є вірогідно вищим аналогічного показника у чоловіків (1,74±0,06 у жінок та 1,40±0,05 у чоловіків, P=0,000053). Середнє значення RTL є вірогідно меншим у чоловіків КЧ порівняно із аналогічним показником у жінок КЖ (КЖ:2,27±0,12 проти КЧ: 1,15±0,08, P=0,0000001), та подібним у жінок РРВЖ і чоловіків РРВЧ (1,50±0,06 у РРВЖ та 1,53±0,06 у РРВЧ, P=0,47). Жінки із РРВ мають вірогідно нижчу величину RTL порівняно з жінками КЖ (РРВЖ:1,50±0,06 проти КЖ:2,27±0,12, P=0,0000001). Середнє значення RTL є вірогідно нижчим у чоловіків КЧ порівняно із значенням у чоловіків РРВЧ (1,15±0,08 у КЧ та 1,53±0,06 у РРВЧ, P=0,00006). **Висновки.** Жінки із збереженою репродуктивною функцією мають довші теломери порівняно з чоловіками. Для жінок із РРВ характерні коротші теломери порівняно із жінками зі збереженою репродуктивною функцією. У групі із РРВ чоловіки та жінки мають подібну довжину теломер.

Ключові слова: теломери, RT-PCR, стать, ранні репродуктивні втрати.

Теломери – еволюційно консервативні, поліфункціональні ДНК–білкові комплекси,

розташовані на кінцях хромосом еукаріот. У ссавців теломери складаються із гексамерної (TTAGGG) послідовності ДНК, яка повторюється [1]. Основною функцією теломер є збереження стабільності геному шляхом захисту кінців хромосом від вкорочення, зумовленого прогресуючою втратою теломерних повторів, що відбуваються під час поділу клітини або за пошкодження ДНК. Під час кожного поділу клітини втрачається 50-200 пар нуклеотидів [2]. Цей процес викликає обмеження реплікації та врешті зумовлює старіння клітин. Виснаження теломер запускає процеси, характерні у процесі старіння людини, зокрема такі захворювання, як рак, нейродегенеративні процеси, серцево-судинні та ін. [1–6]. Тому теломери розглядають у якості біологічного годинника [7, 8].

За останнє десятиліття біологія теломер стала важливою темою у галузі репродукції людини [9]. Рання втрата вагітності (РРВ) відбувається у ~ 15 % клінічно визнаних вагітностей і є найпоширенішим ускладненням вагітності. Мимовільно втрачена вагітність характеризується укороченими теломерами. Ми зосредили увагу на взаємозв'язку між відносною довжиною теломер (Relative Telomere Length, RTL) та тенденцією до РРВ у людини.

Матеріали і методи

Відносну довжину теломер вивчали в лімфоцитах периферійної крові. Забір венозної крові проводили у вакутейнери із ЕДТА. Виділення та очистку ДНК із цільної периферійної крові виконували методом висолювання [10] або ферментативного розщеплення та подальшої фенольної екстракції [11]. Густина ДНК вимірювали за допомогою Qubit® 2.0 Fluorometer (ThermoFisher Scientific, Inc).

RTL досліджували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з детекцією флюоресценції у реальному часі (RT-PCR). Реакції проводили на Eco Real-Time PCR System (Illumina,

Inc) згідно з протоколом Sawthon R.M., 2002 [13]. Праймери для ампліфікації синтезовані фірмою biomers.net GmbH: для ампліфікації теломерних (Т) послідовностей – tel1 GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT та tel2 TCCCGACTATCCCTSTCCSTATCCSTATCCSTATCCСТА; для ампліфікації однокопійного (S) гена 36B4 – 36B4u CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC та 36B4d CCCATTCTATCATCAACGGGTACAА.

Для стандартизації вимірювань використовували референтну ДНК, отриману з цільної крові двох здорових осіб (чоловіка та жінки). Криві для сигналу теломер або сигналу однокопійного гена створювали, використовуючи програму Illumina Eco Software v4.1.11.2. Для статистичної обробки значень RTL використовували ANOVA та t-тест із застосуванням програмного забезпечення Statistica 12 (StatSoft, Inc, США).

Результати та обговорення

Відносну довжину теломер вивчили у 654 осіб, з них 445 осіб (233 жінки та 212 чоловіків) із порушеннями репродуктивної функції, в анамнезі у яких спостерігали одну і більше втрачених у першому триместрі вагітностей (обстежувана група) та 209 осіб (107 жінок та 102 чоловіки), що мають здорових дітей та без репродуктивних втрат в анамнезі (контрольна група) (табл.1).

Середня RTL у загальній об'єднаній групі становила 1,58 та характеризувалася міжіндивідуальними коливаннями в межах 0,002–6,913. У групі із РРВ середня RTL склала 1,51 за міжіндивідуальних коливань від 0,034 до 6,788. У контрольній групі середня RTL складала 1,72 за міжіндивідуальних коливань від 0,002 до 6,913 (табл. 2).

Варіабельність довжини теломер між особами характерна для людської популяції [13], хоча короткі теломери є фактором ризику багатьох захворювань [1–8], асоційованих зі старін-

ням. Варіабельність теломер може бути зумовлена відмінностями в довжині теломер під час зачаття, активності теломерази під час раннього пренатального періоду розвитку, швидкості поділу клітин та кількості втрачених теломерних послідовностей на клітинний поділ, зумовлених стресом, рівнем гормонів, факторами зовнішнього середовища та ін.

Отримані результати свідчать про відсутність вірогідної відмінності між показниками RTL в осіб із збереженою репродуктивною функцією чи ранніми репродуктивними втратами ($1,51 \pm 0,04$ проти $1,72 \pm 0,08$ відповідно, $P=0,062$) (рис. 1).

Проаналізували отримані показники відносної довжини теломер із урахуванням статі обстежуваного та репродуктивного анамнезу (табл. 3). Середній показник RTL у загальній групі жінок (контрольна група + обстежувана група) становив 1,74 та характеризувався міжіндивідуальними коливаннями в межах 0,002–6,913. У жінок із РРВ середній показник RTL склав 1,50 за міжіндивідуальних коливань від 0,03 до 6,79, а у жінок контрольної групи – 2,27 за міжіндивідуальних коливань від 0,002 до 6,91. Середній показник RTL у загальній групі чоловіків (контрольна група + обстежувана група) становив 1,40 та характеризувався міжіндивідуальними коливаннями в межах 0,002–6,50. У чоловіків обстежуваної групи величина RTL становила 1,53 за міжіндивідуальних коливань від 0,07 до 6,50, а у чоловіків контрольної групи – 1,15 за міжіндивідуальних коливань від 0,002 до 5,50.

Встановлена вірогідна відмінність відносної довжини теломер в осіб різної статі у загальній групі (без поділу за репродуктивним анамнезом) – $1,74 \pm 0,06$ у жінок проти $1,40 \pm 0,05$ у чоловіків, $P=0,000053$ (рис. 2 а), а також у групі зі збереженою репродуктивною функцією – $2,27 \pm 0,12$ у жінок проти $1,15 \pm 0,08$ у чоловіків, $P=0,0000001$ (рис. 2 б).

Таблиця 1. Характеристика обстежуваних осіб з урахуванням статі та кількості репродуктивних втрат

Стать	Контрольна група, n	Особі із репродуктивними втратами, n					Загалом, n
		загалом, n	РВ1, n	РВ2, n	ННВ, n	інші, n	
жінки	107	233	55	70	68	40	340
чоловіки	102	212	49	67	68	28	314
загалом	209	445	104	137	136	68	654

Примітки: n – кількість осіб; РВ1 – перша і єдина втрачена вагітність; РВ2 – дві репродуктивні втрати; ННВ – три і більше репродуктивних втрат; інші – в анамнезі репродуктивні втрати та народжені діти або переривання вагітності за медичними показами.

Таблиця 2. Відносна довжина теломер загалом і всередині кожної групи

Загалом		Обстежувана група		Контрольна група	
середнє значення, мін-макс	n	середнє значення, мін-макс	n	середнє значення, мін-макс	n
1,58 (0,002– 6,913)	654	1,51 (0,034 – 6,788)	445	1,72 (0,002– 6,913)	209

Примітки: n- кількість обстежених осіб; мін – мінімальне значення; макс – максимальне значення.

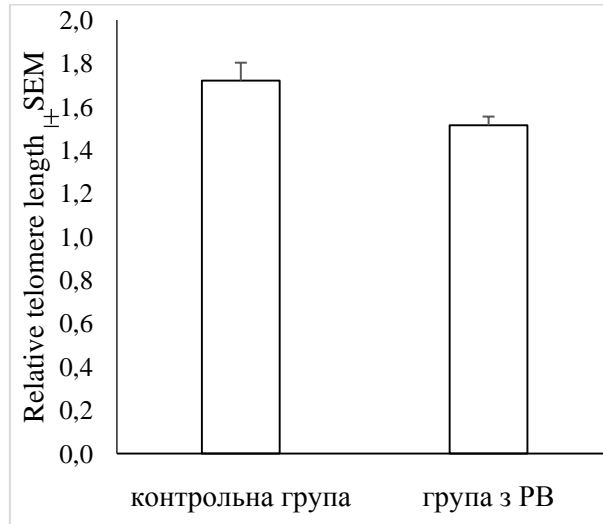


Рис. 1. RTL в осіб із різним репродуктивним анамнезом. РВ – репродуктивні втрати.

Таблиця 3. Відносна довжина теломер в осіб різної статі

Стать	Обстежувана група		Контрольна група		Загалом	
	середнє значення, мін-макс	n	середнє значення, мін-макс	n	середнє значення, мін-макс	n
жінки	1,50 (0,034 – 6,788)	233	2,27 (0,002 – 6,91)	107	1,74 (0,002 – 6,91)	340
чоловіки	1,53 (0,07 – 6,50)	212	1,15 (0,002 – 5,50)	102	1,40 (0,002 – 6,50)	314

Примітка: n – кількість обстежених осіб; мін – мінімальне значення; макс – максимальне значення.

Той факт, що дорослі жінки назагал мають довші теломери порівняно з чоловіками, підкреслюється й іншими дослідниками [13, 15], хоча у новонароджених різної статі такої відмінності немає [13].

Цікавий феномен спостерігається у групі із ранніми репродуктивними втратами – показники відносної довжини теломер є майже ідентичними ($1,50 \pm 0,06$ – у жінок проти $1,53 \pm 0,06$ – у чоловіків, $P=0,47$) (рис. 2 в).

Порівняли середні значення відносної довжини теломер у жінок із різним репродуктивним анамнезом (рис. 3 а). Встановлено, що у жінок із РРВ величина RTL є вірогідно меншою від аналогічного показника у жінок зі збереженою репродуктивною функцією ($1,50 \pm 0,06$ проти $2,27 \pm 0,12$ відповідно, $P=0,0000001$). Аналогі-

чні висновки викладені Hanna C. W. et al., 2009 [16], які обстежували жінок із репродуктивними втратами. Жінки, що перенесли втрати вагітності, зазнають стресу, через що порушуються функції цілого організму [7, 9, 15, 16]. Вони також мають підвищений ризик кардіоваскулярних захворювань [14], які, як відомо, асоціюються із короткими теломерами [4, 6]. Отже, довжина теломер є суттєво меншою у жінок із ранніми репродуктивними втратами.

У чоловіків спостерігається зворотна тенденція: величина RTL є вірогідно меншою в осіб контрольної групи – $1,15 \pm 0,08$ проти $1,53 \pm 0,06$ в обстежуваній групі ($P=0,00006$).

Отже, довжина теломер у людини асоціюється із здатністю до народження потомства.

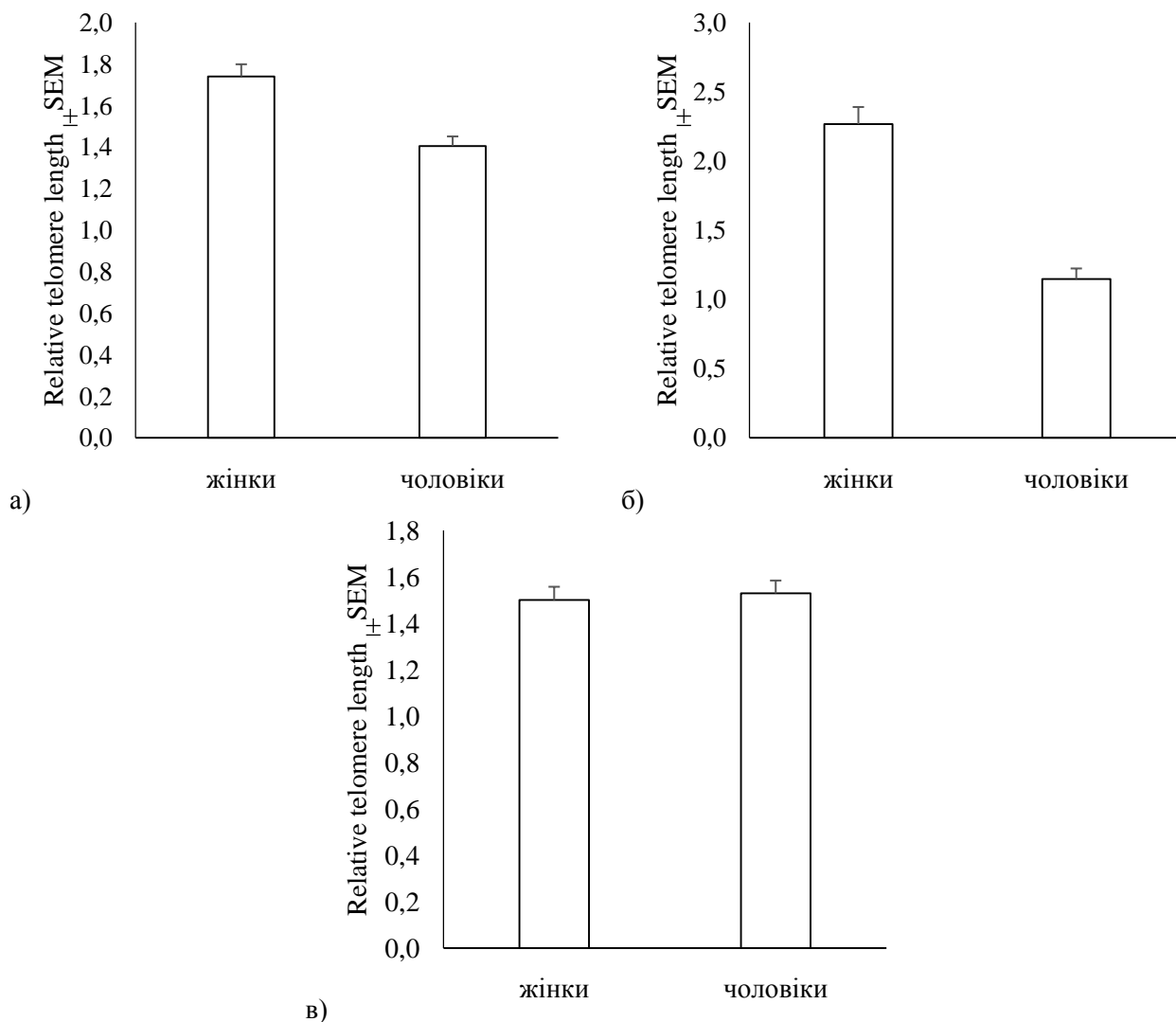


Рис. 2. RTL у осіб різної статі: а – загальна група, б – контрольна група, в – група з РРВ.

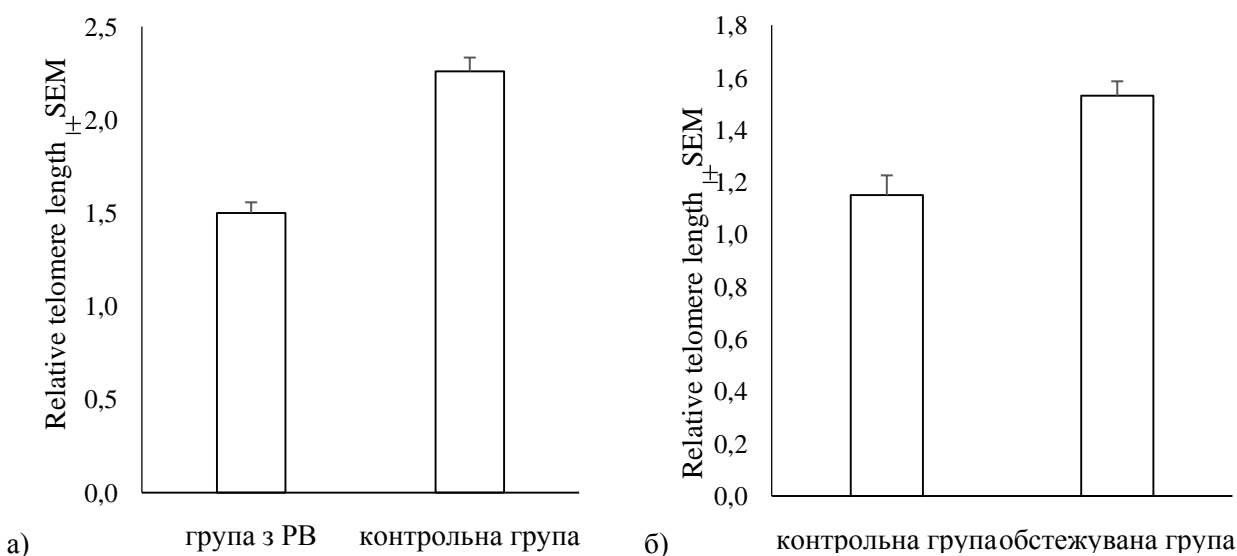


Рис. 3. Показники RTL у чоловіків та жінок із ранніми репродуктивними втратами та зі збереженою репродуктивною функцією: а) – жінки, б) – чоловіки.

Висновки

Жінки із збереженою репродуктивною функцією мають довші теломери порівняно з чоловіками. Для жінок із РРВ характерні коро-

тші теломери порівняно із жінками зі збереженою репродуктивною функцією. У групі із РРВ чоловіки та жінки мають аналогічну довжину теломер.

References

1. Turner K.J., Vasu V., Griffin D.K. Telomere biology and human phenotype. *Cells*. 2019. Vol. 8 (1). P. 73. doi.org/10.3390/cells8010073.
2. Zhao Y., Sfeir A.J., Zou Y., Buseman C.M., Chow T.T., Shay J.W., Wright W.E. Telomere extension occurs at most chromosome ends and is uncoupled from fill-in in human cancer cells. *Cell*. 2009. Vol. 138 (3). P. 463–475. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.026.
3. Blasco M.A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*. 2005. Vol. 6 (8). P. 611–622. doi: 10.1038/nrg1656.
4. Haycock P.C.; Heydon E.E.; Kaptoge S., Butterworth A.S., Thompson A., Willeit P. Leucocyte telomere length and risk of cardiovascular disease: Systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2014. Vol. 349. g4227. doi: 10.1136/bmj.g4227.
5. Kolyada A.K., Vaiserman A.M., Krasnenkov D.S., Karaban I.N. Studies of Telomere Length in Patients with Parkinson's Disease. *Neurosci Behav Physi*. 2016. Vol. 46. P. 344–347. doi.org/10.1007/s11055-016-0239-4.
6. Khalangot M., Krasnenkov D., Vaiserman A. Telomere length in different metabolic categories: Clinical associations and modification potential. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2020. Vol. 245 (13). P. 1115–1121. doi: 10.1177/1535370220931509.
7. Koliada A.K., Krasnenkov D.S., Vaiserman A.M. Telomeric aging: mitotic clock or stress indicator? *Front Genet*. 2015. Vol. 6. P. 82. doi: 10.3389/fgene.2015.00082.
8. Vaiserman A., Krasnenkov D. Telomere Length as a Marker of Biological Age: State-of-the-Art, Open Issues, and Future Perspectives. *Front Genet*. 2021. Vol. 11. P. 630186. doi: 10.3389/fgene.2020.630186.
9. Kresovich J.K., Parks C.G., Sandler D.P., Taylor J.A. Reproductive history and blood cell telomere length. *Aging (Albany NY)*. 2018. Vol. 10 (9). P. 2383–2393. doi: 10.18632/aging.101558.
10. Makukh H.V., Zastavna D.V., Tyrkus M.Ja., Tretjak B.I., Chorna L.B. Sposib vydilennia DNK z lejkocytiv peryferijnoji krovi : Patent 32044 Ukraine. № u200801896; applied on 14.02.2008, published on 25.04.2008, bulletin № 8. [in Ukrainian]
11. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.K. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Moskva : Mir, 1985. 420 p.
12. Cawthon R.M. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucl Acids Res*. 2002. Vol. 30. e 47. doi: 10.1093/nar/30.10.e47.
13. Samassekou O., Gadji M., Drouin R., Yan J. Sizing the ends: normal length of human telomeres. *Ann Anat*. 2010. Vol. 192 (5). P. 284–291. doi: 10.1016/j.aanat.2010.07.005.
14. Wagner M.M., Beshay M.M., Rooijackers S., Hermes W., Jukema J.W., Le Cessie S., De Groot C.J.M., Ballieux B.E.P.B., Van Lith J.M.M., Bloemenkamp K.W.M. Increased cardiovascular disease risk in women with a history of recurrent miscarriage. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2018. Vol. 97 (10). P. 1192–1199. doi: 10.1111/aogs.13392.
15. Rocca M.S., Foresta C., Ferlin A. Telomere length: lights and shadows on their role in human reproduction. *Biol Reprod*. 2019. Vol. 100 (2). P. 305–317. doi: 10.1093/biolre/iy208.
16. Hanna C.W., Bretherick K.L., Gair J.L., Fluker M.R., Stephenson M.D., Robinson W.P. Telomere length and reproductive aging. *Hum Reprod*. 2009. Vol. 24 (5). P. 1206–1211. doi: 10.1093/humrep/dep007.

HULEYUK N.L.¹, ZASTAVNA D.V.¹, HAIBONIUK I.Ye.¹, TKACH I.R.¹, TYRKA M.²

¹ Institute of Hereditary Pathology of Natl. Acad. Med. Sci. of Ukraine, Ukraine, 79008, Lviv, M. Lysenko str., 31a, e-mail: root@ihp.lviv.ua

² Rzeszow University of Technology,

Poland, 35-959, Rzeszow, Al. Powstańców Warszawy, 6, e-mail: mtyrka@prz.edu.pl

TELOMERE LENGTH IN INDIVIDUALS WITH EARLY PREGNANCY LOSSES

Aim. Over the past decade, telomere biology has become an important topic in the field of human reproduction. We focused on the relationship between relative telomere length (RTL) and tendency to early pregnancy loss (EPL) in humans. **Methods.** RTL was measured in DNA isolated from the blood samples using a real-time polymerase chain reaction approach. RTL was examined in control group (C) (N=209) – women (CW) (N=107) and men (CM) (N=102) who had healthy pregnancies with no history of infertility or miscarriage, and in group with EPL (N=445) – women (EPLW) (N=223) and men (EPLM) (N=212) who had single or more EPL. RTL data were analyzed by gender and reproductive history. **Results.** Women (CW+EPLW) have significantly higher RTL than men (CM+EPLM) (1.74±0.06 in women and 1.40±0.05 in men, P=0.000053). Average RTL were significantly lower in CM compared to CW (CW: 2.27±0.12 versus CM: 1.15±0.08, P=0.0000001), and were similar in EPLW and EPLM (1.50±0.06 in EPLW and 1.53±0.06 in EPLM, P=0.47). The EPLW group had significantly lower RTL than control (EPLW: 1.50±0.06 versus CW: 2.27±0.12, P=0.0000001). Average RTL were significantly lower in CM compared to EPLM (1.15±0.08 in CM and 1.53±0.06 in EPLM, P=0.00006). **Conclusions.** Women with no history of EPL have longer telomere than men. Woman with EPL have shorter telomere than women without miscarriage. In EPL group women and men have similar telomere length.

Keywords: telomeres, RT-PCR, gender, early reproductive loss.