

ГУЛЕЮК Н.Л.^{1✉}, ТИРКА М.²

¹ ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»,

Україна, 79008, м. Львів, вул. М. Лисенка, 31а, e-mail: huleyuk@yahoo.com

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 У МЕШКАНЦІВ ЛЬВІВСЬКОЇ ОБЛАСТІ

Теломери є спеціалізованими некодуючими ділянками ДНК, які, в асоціації з певними білками, утворюють захисні структури на кінцях хромосом. На кінцях теломер знаходяться 3'-одноланцюгові ділянки, які утворюють D-петлю [1, 2]. Формування теломерної петлі відбувається за допомогою білкового комплексу шелтерін (shelterin), який складається з 6-ти білків TRF1, TRF2, TIN2, RAP1, TPP1 та POT1. Ці білки приєднуються до одно- або дволанцюгових ділянок теломерної ДНК і утворюють захисні структури, які запобігають пошкодженню теломер [3].

У хребетних, і у людей зокрема, теломерна ДНК складається з довгих гексамерних повторів (TTAGGG)_n довжиною 10–15 кбп [4] і вкорочується на 50–200 пар при кожному клітинному поділі [5] внаслідок недореплікації [6] та дії екзонуклеаз [7]. Коли довжина теломер досягне критичної межі, спостерігається зупинка поділу клітини [8], її старіння та апоптоз. Тому теломери вважають своєрідним клітинним годинником, який контролює поділ та смерть клітин.

Водночас, у статевих, стовбурових, ембріональних клітинах на стадії бластоцисти відновлення довжини теломер відбувається за допомогою теломерази – РНК-залежної зворотної транскриптази. Її активність у диференційованих клітинах є недостатньою для запобігання вкорочування теломер під час клітинного поділу [9, 10]. Окрім того, існує механізм альтернативного видовження теломер (alternate lengthening of telomeres, ALT) незалежного від теломерази. Він базується на гомологічній рекомбінації теломерних ділянок.

У деяких випадках клітини продовжують поділ після досягнення критичної довжини теломер. Це провокує дволанцюгові розриви ДНК. У відповідь на пошкодження ДНК активуються білки, які викликають гомологічну рекомбіна-

цію або злиття негомологічних кінців хромосом. Клітини з нестабільними або аберантними хромосомами ідуть в апоптоз [11, 12]. Але ракові клітини обходять ліміт Хефліка і не зазнають апоптозу.

Теломери відіграють основну роль у захисті хромосом від дії ендонуклеаз. Вони запобігають деградації хромосомних кінців, злипанню і хромосомним аберациям.

Деякі дослідження показали існування асоціації між довжиною теломер та ожирінням [13], статевою приналежністю [14, 15], низьким соціоекономічним станом [16], хронічним емоційним стресом [17], палінням [18], смертністю [19] тощо. Довжина теломер була запропонована в якості корисного показника біологічного віку [20], хоча це було поставлено під сумнів von Zglinicki, 2012 [21].

Середня довжина теломер (СДТ) відрізняється в однакових вікових групах різних людських популяцій. Наприклад, у молодих італійців СДТ у 3,5 рази менша, ніж у бельгійців [22], у французів більша, аніж в італійців [23]. Це нашоє думку, що довжина теломер визначається як спадковими, так і факторами навколишнього середовища [18].

В Україні дослідження довжини теломер виконані у нечисельній групі мешканців (169) Київської області [24] та у пацієнтів із захворюванням Паркінсона [25]. Це свідчить про актуальність дослідження довжини теломер у населення України з урахуванням віку та статі.

Матеріали і методи

Дослідження відносної довжини теломер (Relative Telomere Length, RTL) виконали у 86 осіб Львівської області (47 чоловіків та 39 жінок) віком від 18 до 72 років. Усі вони на момент обстеження були здорові та не мали захворювань, які впливають на довжину теломер.

Забір венозної крові проводили у вакутейнери із ЕДТА. Виділення та очистку ДНК із лейкоцитів периферійної крові виконували методом висолювання [26] або ферментативного розщеплення та подальшої фенольної екстракції [27]. Густина ДНК вимірювали за допомогою Qubit® 2.0 Fluorometer (ThermoFisher Scientific, Inc). Визначення відносної довжини теломер (Relative Telomere Length, RTL) проводили за допомогою ПЦР з детекцією флуоресценції в реальному часі (RT-PCR). Реакції виконували за допомогою Eco Real-Time PCR System (Illumina, Inc) згідно з протоколом, описаним Sawthon R.M., 2002 [28]. Для ампліфікації теломерних (T) послідовностей використовували такі праймери, синтезовані фірмою biomers.net GmbH: tel 1 GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT; tel 2 TCCCGACTATCCCTSTCCSTATCCSTATCCSTATCCCTA. Для ампліфікації однокопійного (single copy gene, SCG) гена *36B4* використовували праймери: 36B4u CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC; 36B4d CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA. Для постановки реакції використовували 48-лункові планшетки фірми Eco Plates (Polygen sp. z o. o., Польща).

Готували два окремих мікси для кожної реакції – для ампліфікації теломерних повторів та гена *36B4*. Для цього використовували мастермікс GoTaq® qPCR Master Mix фірми Promega. Реакційну суміш готували безпосередньо перед нанесенням на планшетку. Для теломер вона складалася із праймерів tel 1, tel 2, мастерміксу та вільної від ДНК та РНК води. Для однокопійного гена відмінність полягала у внесенні відповідних праймерів 36B4u та 36B4d. До лунок вносили 12 мкл реакційної суміші та 7 мкл ДНК. Чотири концентрації референсної ДНК, які охоплювали діапазон розведення від 0,63 до 5 нг/мкл з кроком розведення 1,68, використані в двох паралельних пробах – для реакції теломерних послідовностей та окремо для однокопійного гена. Отримані дані використані для побудови калібрувальних кривих, необхідних

для оцінки середньої довжини теломер. Усі зразки ДНК аналізували в трьох повторностях.

Профілі термоциклювання не відрізнялися від зазначених Sawthon R.M., 2002 [28]. Після завершення реакції отримані результати обробляли за допомогою програми Illumina Eco Software для генерування кривих для теломерного сигналу (T) чи сигналу однокопійного гена (S).

За RTL вважали різницю циклів, необхідних для генерування T та S сигналів, тобто $\Delta C_q = -(C_T - C_S)$.

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми Statistica 12 (StatSoft, Inc, США).

Результати та обговорення

Із метою встановлення RTL залежно від віку усіх обстежуваних поділили на 5 груп (табл.).

Оцінку залежності RTL від віку обстежуваних проводили за допомогою регресійної моделі (рис. 1). Як видно з рисунка, спостерігається тенденція до зменшення довжини теломер із віком. Невисока кореляція між RTL та віком може бути пов'язана з різними чинниками, зокрема: з гетерогенністю довжини теломер при народженні [29], хронічними соціоекономічними стресами, генетичною детермінованістю, чутливістю до екзогенних навантажень, розміром вибірки. Останнє може мати найбільший вплив, оскільки чисельність осіб різного віку коливалася від 6-ти до 29-ти (табл.).

Згідно з проведеним регресійним аналізом, не встановлено вірогідної відмінності RTL у осіб різної статі ($p=0,064$) (рис. 2), що відповідає висновками інших досліджень [19, 24, 30]. Хоча середні значення RTL відрізняються у осіб різної статі та різних вікових груп (рис. 2), відмінність не є значущою через значне коливання максимальних та мінімальних значень у кожній групі. Це свідчить про необхідність збільшення вибірок у вікових групах від 50 років.

Таблиця. Розподіл обстежуваних Львівської області за віком та статтю

Стать	Вік (роки)				
	18–29	30–39	40–49	50–59	60–72
чоловіки	7	12	22	3	4
жінки	22	7	6	4	1
Разом	29	19	28	7	6

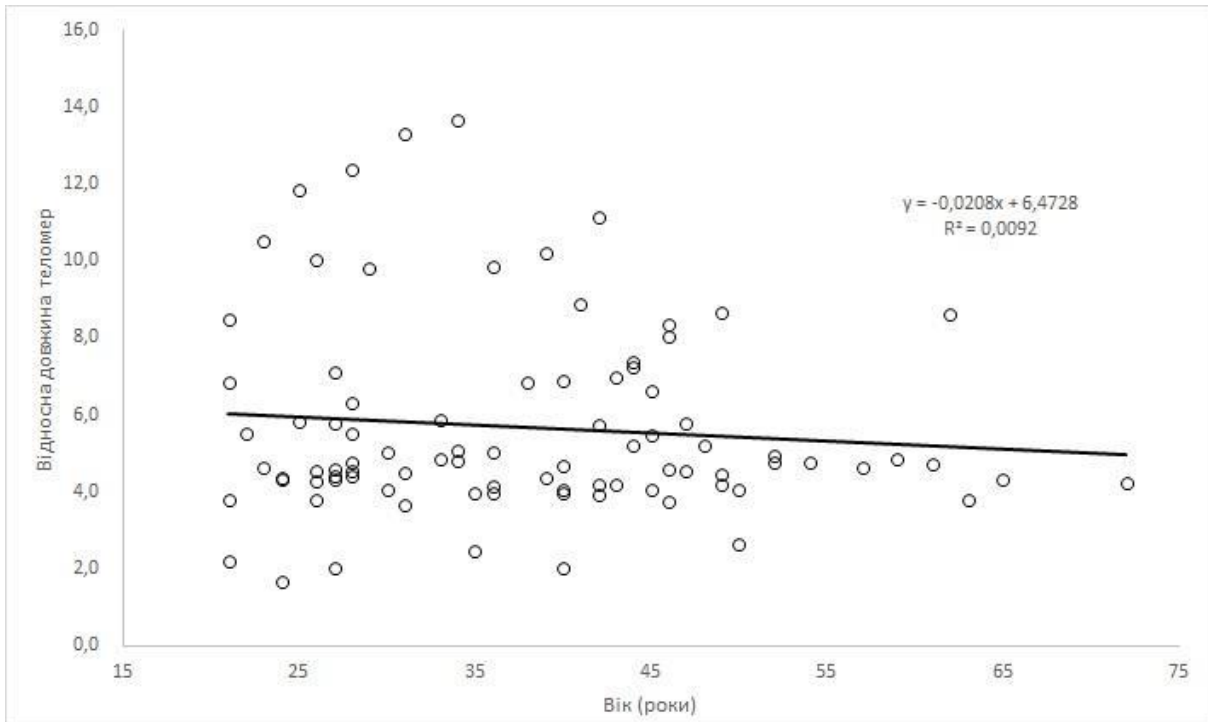


Рис. 1. Залежність відносної довжини теломер (RTL) від віку.

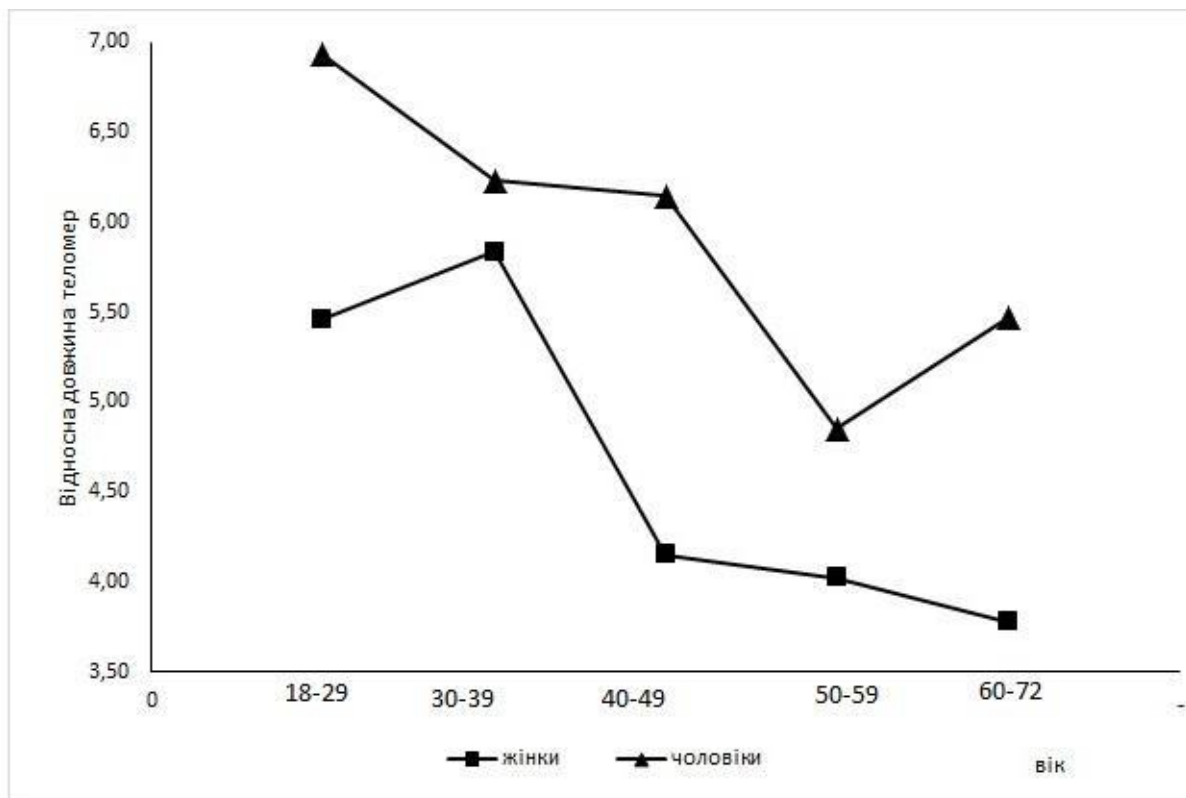


Рис. 2. Відносна довжина теломер у різних вікових та гендерних групах.

Висновки

Отримані результати свідчать про відсутність вірогідної відмінності відносної довжини теломер у осіб різної статі. Невисока кореляція між RTL та віком може бути пов'язана з різними

чинниками, зокрема, з недостатнім розміром вибірки осіб віком після 50 років. Тому в подальшому планується продовжити такі дослідження в осіб старшого віку.

Література

1. Griffith J.D., Comeau L., Rosenfield S., Stansel R.M., Bianchi A., Moss H., de Lange T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop // *Cell*. – 1999. – V. 97. – P. 503–514.
2. De Lange T. Protection of mammalian telomeres // *Oncogene*. – 2002. – V. 21. – P. 532–540.
3. De Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres // *Genes. Dev.* – 2005. – V. 19. – P. 2100–2110.
4. Cairney C.J., Keith W.N. Telomerase redefined: integrated regulation of hTR and hTERT for telomere maintenance and telomerase activity // *Biochimie*. – 2008. – V. 90. – P. 13–23.
5. 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. – V. 138. – P. 463–475.
6. Watson J.D. Origin of concatemeric T7 DNA // *Nat. Newiol.* – 1972. – V. 239 (94). – P. 197–201.
7. Sfeir A.J., Chai W., Shay J.W., Wright W.E. Telomere-end processing the terminal nucleotides of human chromosomes // *Mol. Cell*. – 2005. – V. 18 (1). – P. 131–138.
8. Hayflick L. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains // *Exp. Cell. Res.* – 1965. – V. 37. – P. 614–636.
9. Bischoff C., Graakjaer J., Petersen H.C., Jeune B., Bohr V.A., Koelvraa S., Christensen K. Telomere length among the elderly and oldest-old // *Twin Res. Hum. Genet.* – 2005. – V. 8 (5). – P. 425–432.
10. Blasco M.A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond // *Nat. Rev. Genet.* – 2005. – V. 6 (8). – P. 611–622.
11. Wong J.M., Collins K. Telomere maintenance and disease // *Lancet*. – 2003. – V. 362 (9388). – P. 98–108.
12. Wright W.E., Shay J.W. Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology // *Nat. Med.* – 2000. – V. 6 (8). – P. 849–851.
13. Nordfjall K., Eliasson M., Stegmayr B., Lundin S., Roos G., Nilsson P.M. Increased abdominal obesity, adverse psychosocial factors and shorter telomere length in subjects reporting early ageing; the MONICA Northern Sweden Study // *Scand. J. Public. Health*. – 2008. – V. 36. – P. 744–752.
14. Bekaert S., Rietzschel E.R., De Buyzere M.L., De Bacquer D., Langlois M., Segers P., Cooman L., Van Damme P., Cassiman P., Van Criekinge W., Verdonck P., De Backer G.G., Gillebert T.C., Van Oostveldt P. Telomere length and cardiovascular risk factors in a middle-aged population free of overt cardiovascular disease // *Aging. Cell*. – 2007. – V. 6. – P. 639–647.
15. Gardner M., Bann D., Wiley L., Cooper R., Hardy R., Nitsch D., Martin-Ruiz C., Shiels P., Sayer A.A., Barbieri M., Bekaert S., Bischoff C., Brooks-Wilson A., Chen W., Cooper C., Christensen K., De Meyer T., Deary I., Der G., Diez Roux A., Fitzpatrick A., Hajat A., Halaschek-Wiener J., Harris S., Hunt S.C., Jagger C., Jeon H.S., Kaplan R., Kimura M., Lansdorp P., Li C., Maeda T., Mangino M., Nawrot T.S., Nilsson P., Nordfjall K., Paolisso G., Ren F., Riabowol K., Robertson T., Roos G., Staessen J.A., Spector T., Tang N., Unryn B., van der Harst P., Woo J., Xing C., Yadegarfar M.E., Park J.Y., Young N., Kuh D., von Zglinicki T., Ben-Shlomo Y. Gender and telomere length: Systematic review and meta-analysis // *Exp. Gerontol.* – 2014. – V. 51. – P. 15–27.
16. Cherkas L.F., Hunkin J.L., Kato B.S., Richards J.B., Gardner J.P., Surdulescu G.L., Kimura M., Lu X., Spector T.D., Aviv A. The association between physical activity in leisure time and leukocyte telomere length // *Arch. Intern. Med.* – 2008. – V. 168. – P. 154–158.
17. Epel E.S., Blackburn E.H., Lin F., Dhabhar F.S., Adler N.E., Morrow J.D., Cawthon R.M. Accelerated telomere shortening in response to life stress // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2004. – V. 101. – P. 17312–17315.
18. Valdes A.M., Andrew T., Gardner J.P., Kimura M., Oelsner E., Cherkas L.F., Aviv A., Spector T.D. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women // *Lancet*. – 2005. – V. 366. – P. 662–664.
19. Cawthon R.M., Smith K.R., O'Brien E., Sivatchenko A., Kerber R.A. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older // *Lancet*. – 2003. – V. 361. – P. 393–395.
20. Hunt S.C., Chen W., Gardner J.P., Kimura M., Srinivasan S.R., Eckfeldt J.H., Berenson G.S., Aviv A. Leukocyte telomeres are longer in African Americans than in whites: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study and the Bogalusa Heart Study // *Aging. Cell*. – 2008. – V. 7. – P. 451–458.
21. von Zglinicki T. Will your telomeres tell your future? // *BMJ*. – 2012. – V. 344. – P. 1727. doi: 10.1136/bmj.e1727.
22. Dan T.A., Klelia D.S., Kuzawa C.W., Hayes M.G., Humphries S.E. Substantial variation in qPCR measured mean blood telomere lengths in young men from eleven European countries // *Am. J. Hum. Biol.* – 2011. – V. 23. – P. 228–231.
23. Canela A., Vera E., Klatt P., Blasco M.A. High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. – 2007. – V. 104, № 13. – P. 5300–5305.
24. Красенков Д.С., Коляда А.К., Ахаладзе Н.Г., Кухарский В.М., Поталицин П.Ю., Холод О.В., Кохичко Е.В., Вайсерман А.М. Длина теломер в клетках крови у жителей Киевской области разного возраста // *Пробл. старения и долголетия*. – 2014. – Т. 23 (3). – С. 254–261.
25. Коляда А.К., Вайсерман А.М., Красенков Д.С., Карабань И.Н. Исследование длины теломер у пациентов с болезнью Паркинсона // *Журнал Неврологии и психиатрии*. – 2014. – Т. 8 – С. 59–62.

26. Макух Г.В., Заставна Д.В., Тиркус М.Я., Третяк Б.І., Чорна Л.Б. Спосіб виділення ДНК з лейкоцитів периферійної крові. Пат. 32044 UA, МПК G01N33/49 (2006.01) заявник ДУ «Інститут спадкової патології АМНУ». – № u200801896; заяв. 14.02.2008; опубл. 25.04.2008, Бюл. № 8.
27. Маниатис Т., Фриз Е., Сэмбрук Ж. Молекулярное клонирование – М.: Мир, 1985. – 420 с.
28. Cawthon R.M. Telomere measurement by quantitative PCR // Nucl Acids Res. – 2002. – V. 30. – e 47.
29. Bekaert S., Derradji H., Baatout S. Telomere biology in mammalian germ cells and during development // Dev Biol. – 2004. – V. 274, N 1. – P. 15–30.
30. Diez Roux A.V., Ranjit N., Jenny N.S., Shea S., Cushman M., Fitzpatrick A., Seeman T. Race/ethnicity and telomere length in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis // Aging Cell. – 2009. – V. 8, N 3. – P. 251–257.

HULEYUK N.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: huleyuk@yahoo.com

² Rzeszow University of Technology, Poland, 35-959 Rzeszow, Al. Powstańców Warszawy, 6, e-mail: mtyrka@prz.edu.pl

RELATIVE TELOMERE LENGTH OF THE RESIDENTS OF LVIV OBLAST

Aim. Telomeres are short, tandem repeats of DNA that cap linear chromosome ends by binding members of the shelterin protein complex to form protective telomere loops. An insufficient number of telomere repeats leads to chromosome uncapping, cell senescence, and death. Aim of this thesis is the analysis of relative telomere length (RTL) in whole blood among residents of Lviv region. **Methods.** The RTL in the whole blood cells was measured in 86 residents of various age (47 men and 39 women aged 18–72) using quantitative real-time PCR (Cawthon's method). It is based on the simultaneous amplification of telomeric repeats (T) and a single copy gene (S). **Results.** There is a tendency to decrease RTL with age. The low correlation between RTL and age can be linked to various factors, including the heterogeneity of telomere length at birth, chronic socioeconomic stress, genetic determinism, sensitivity to exogenous pressures. Women and men did not differ significantly in the rate of RTL shortening. **Conclusions.** The results indicate the absence of reliable differences relative telomere length in individuals of different sexes. The low correlation between RTL and age can be linked to various factors, including insufficient sample size of people aged over 50 years. So in the future we plan to continue these studies in older people.

Keywords: relative telomere length, RT-PCR, age, gender.