

БИОЛОГИЯ СТАРЕНИЯ

"Пробл. старения и долголетия", 2015, 24, № 2. — С. 111–119

УДК 575.116:611.311.018.1(477.41)

Д. С. Красненков^{1,2}, Д. А. Лосева², А. К. Коляда¹, В. М. Кухарский¹,
Т. И. Махний¹, А. М. Вайсерман¹, М. Р. Ивасюк³

¹Государственное учреждение "Институт геронтологии
им. Д. Ф. Чеботарева НАМН Украины, 04114 Киев

²Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, 01601 Киев

³Национальный университет "Киево-Могилянская академия", 04070 Киев

ДЛИНА ТЕЛОМЕР В БУККАЛЬНОМ ЭПИТЕЛИИ У ЖИТЕЛЕЙ РАЗНОГО ВОЗРАСТА КИЕВСКОЙ ОБЛАСТИ

У 120 жителей Киевской области (60 мужчин и 60 женщин в возрасте от 20 до 80 лет) в буккальном эпителии определяли относительную среднюю длину теломер (ОСДТ) с помощью мультиплексной монохроматической количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени. Показано, что у женщин ОСДТ больше, чем у мужчин: медиана (25–75 % квартиль) мужчины — 0,8 (0,7, 0,95), женщины — 0,9 (0,78, 1,11; $P < 0,002$). Выявлена отрицательная корреляция ОСДТ с возрастом: мужчины — $r = -0,57$, $P < 0,001$; женщины — $r = -0,46$, $P < 0,01$. Также установлена отрицательная корреляция ОСДТ с курением ($r = -0,24$, $P < 0,05$), употреблением алкоголя ($r = -0,22$, $P < 0,05$) и массой тела ($r = -0,33$, $P < 0,01$).

Ключевые слова: длина теломер, отношение T/S, возраст, украинская популяция, мультиплексная монохромная количественная ПЦР, буккальный эпителий.

Теломеры — это специфические структуры ДНК, которые расположены на терминальных участках эукариотических хромосом [7], где они представлены последовательностями тандемных повторов (у людей и других млекопитающих — *TTAGGG*), ассоциированных с рядом специализиро-

© Д. С. Красненков, Д. А. Лосева, А. К. Коляда, В. М. Кухарский, Т. И. Махний,
А. М. Вайсерман, М. Р. Ивасюк, 2015.

ванных белков-шелтеринов [15]. Одной из основных функций теломер является поддержание стабильности генома. Из-за "проблемы концевой недорепликации" (то есть неспособности ДНК-полимеразы к полной репликации "отстающей" цепи ДНК) теломеры сокращаются с каждым делением клетки и, таким образом, с возрастом [6, 24, 29]. В большинстве соматических клеток человека теломеры укорачиваются на 20–200 пар оснований при каждом клеточном делении [28]. Теломеры предотвращают распознавание концевых участков хромосом при двухцепочечных разрывах ДНК и противодействуют потерям концевой ДНК, которые возникают вследствие концевой недорепликации [2, 14, 20].

В половых, стволовых и большинстве раковых клеток работает фермент — теломераза. Она является специализированной обратной транскриптазой, которая может удлинять теломеры с помощью РНК-шаблона и, таким образом, способствует поддержанию функциональных теломер. Более дифференцированные, но пролиферативно активные соматические клетки не проявляют значительной теломеразной активности, и в таких клетках происходит укорочение теломер вследствие как клеточных делений, так и оксидативного стресса [13, 18, 22].

Одним из ключевых факторов, который способствует укорочению теломер, является оксидативный стресс [12], который возникает вследствие дисбаланса между образованием активных форм кислорода и способностью организма утилизировать свободные радикалы. Нарушение редокс-состояния клетки может приводить к окислению липидов, белков и ДНК. [12] Так как наиболее легко окисляется гуанин, а теломеры богаты этим азотистым основанием, теломерные участки являются особо чувствительными к оксидативному стрессу. Из-за того, что теломерная ДНК не репарируется, теломеры значительно укорачиваются под воздействием оксидативного стресса, что также приводит к освобождению шелтеринов. Таким образом теломеры укорачиваются каждый раз, когда в клетке возникает оксидативный стресс, что дает возможность использовать их в качестве маркеров оксидативного стресса [23]. Арест клеточного цикла и апоптоз, вызванный короткими теломерами и несвязанными шелтеринами, позволяют элиминировать клетки, которые содержат нефункциональные белки, митохондрии и ДНК со значительным количеством мутаций [26]. Оксидативный стресс влияет на развитие таких патологических процессов, как воспаление, канцерогенез, ишемия, а также на развитие ряда заболеваний, включая СПИД, болезнь Паркинсона, Альцгеймера, сахарный диабет и др. [11].

При рождении длина теломер у людей может значительно различаться (от 5 до 20 килобаз), так как она в значительной степени наследуется от родителей. На нее также влияет возраст отца и матери при зачатии (чем старше мужчина — тем длиннее теломеры у ребенка, для женщин же обнаружена противоположная зависимость) [8, 27, 29]. Также было показано, что у женщин теломеры длиннее по сравнению с мужчинами, что согласуется с теми данными, что женщины живут дольше [5]. Существенное влияние на длину теломер оказывает образ жизни (физическая активность, диета, сон и т. д.) и факторы окружаю-

щей среды [30]. Много работ подтверждают факт корреляции длины теломер в разных тканях донора с возрастом и с пролиферативным потенциалом клетки, а также было показано, что длина теломер уменьшается во всех тканях синхронно [4, 9, 20, 21]. Таким образом, длина теломер является ключевым фактором, определяющим нормальную продолжительность жизни клетки и тесно связана с клеточным циклом, пролиферативным потенциалом клетки, а также с репликативным старением [2, 3, 16]. Слишком короткие теломеры приводят к снижению функциональности клеток и способствуют дисфункции тканей и органов. Разброс по длине теломер для людей одного возраста является значительно большим по сравнению с разбросом по длине теломер для разных субпопуляций соматических клеток [32, 33]. Исходя из этого, можно предположить, что средняя длина теломер (СДТ) является хорошим маркером функционального состояния тканей и биологического возраста организма, а также может быть использована в качестве диагностического маркера при определении предрасположенности к возрастзависимым заболеваниям, ассоциированных с репликативным потенциалом. Широкая межиндивидуальная вариация длины теломер усложняет процесс определения общей границы между их физиологическим и патологическим истощением, что требует корректного отбора людей для групп сравнения.

Следует учитывать, что СДТ неодинакова в разных популяциях. Например, при сравнении итальянской и бельгийской популяций показано, что СДТ в группах молодых людей одного возраста составляла от 5,1 килобаз у итальянцев до 18,64 килобаз у бельгийцев [14]. Данные этого и других подобных исследований свидетельствуют, что длина теломер зависит как от наследственных [24], так и от средовых [31] факторов.

Для исследования длины теломер принято использовать кровь, но поскольку коэффициент корреляции длины теломер в крови и в буккальном эпителии достигает 0,9, буккальный эпителий является перспективным материалом для исследования длины теломер ввиду неинвазивного забора [17]. На данный момент недостаточно данных о длине теломер в буккальном эпителии для разных возрастных групп, в том числе и для украинской популяции. Вот почему исследована величина относительной средней длины теломер (ОСДТ) в буккальном эпителии у жителей разного возраста Киевской области Украины, что и стало целью нашей работы.

Обследуемые и методы. Обследовано 120 жителей Киевской области (60 мужчин и 60 женщин) в возрасте от 20 до 80 лет. Забор буккального эпителиа производили в Киевском городском центре крови и в Институте геронтологии им. Д. Ф. Чеботарева. Анкетировали людей без выраженных патологий, которые подписали информированное согласие на участие в исследовании. Количественную оценку употребления алкоголя делали в пересчете на объем этилового спирта, а количественную оценку курения — в пересчете на количество выкуриваемых сигарет в день. Образцы буккального эпителиа собирали с помощью стерильной

ватной палочки, которую впоследствии помещали в пробирку с транспортной средой.

Длину теломера определяли по методике [25]. ДНК из буккального эпителия экстрагировали, используя метод фенол-хлороформной очистки [18]. Для определения ОСДТ каждого образца использовали унифицированный метод количественной монохромной мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, протокол которой был предложен *R. Cawthon* [10]. При постановке ПЦР использовали стрипы по 8 пробирок, совместимых с *Bio-Rad Chromo4*, в которые вносили предварительно приготовленную реакционную смесь для проведения ПЦР объемом 8 мкл и 2 мкл ДНК. Для построения калибровочной прямой ПЦР проводили на четырех концентрациях референсной ДНК в дуплетах, которые охватывали диапазон 27-кратного разведения и были приготовлены при помощи серии разведений; для определения ОСДТ использовали калибровочные прямые. Все образцы ДНК были проанализированы в триплетах.

Реакционная смесь для ПЦР была приготовлена на основе "Набора для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя *SYBR Green I*" ("Синтол", РФ) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Для проведения мультиплексной количественной ПЦР смесь теломерной пары праймеров *telg* и *telc* (финальная концентрация каждого составляла 450 нМ) с альбуминовыми праймерами *albu* и *albd* (конечная концентрация каждого — по 250 нМ) была добавлена в мастер-микс.

Профили термоциклирования были взяты из оригинальной методики без изменений. После завершения термоциклирования для генерирования двух стандартных кривых была использована программа *Opticon Monitor 3*: одна для теломерного сигнала, а другая для сигнала от однокопийного гена. По циклу выхода теломерного сигнала (*Ct*) с помощью калибровочной прямой определяли количество теломерной ДНК (*T*) относительно референсной ДНК, аналогично были получены данные для количества альбуминовой ДНК (*S*). Значения ОСДТ получали делением *T* на *S*.

Для проверки на нормальность распределения значений показателя *T/S* использовали критерий Шапиро — Вилко. Так как значения показателя *T/S* не соответствовали нормальному распределению ($P < 0,001$), для анализа использовали методы непараметрической статистики. Для оценки разницы в ОСДТ у мужчин и женщин использовали критерий Вилкоксона — Манна — Уитни. Влияние пола и возраста на длину теломер определяли при помощи регрессионного анализа и критерия Краскела — Уоллиса. Корреляционный анализ проводили непараметрическим методом по Спирмену. Исследуемая когорта была проанализирована как в целом, так и в шести возрастных группах: 21–30, 31–40, 41–50, 51–60, 61–70 и 71–80 лет. Группы сравнивали при помощи двухфакторного дисперсионного анализа (в качестве влияющих факторов использованы пол и возраст) с последующими апостериорными (*post hoc*) сопоставлениями.

Результаты и их обсуждение. У женщин ОСДТ оказалась большей, чем у мужчин (рис. 1): медиана (25–75 % квартиль) мужчины — 0,8 (0,7, 0,95), женщины — 0,9 (0,78, 1,11; $P < 0,002$). Это согласуется с тем фактом, что женщины в Украине имеют большую среднюю продолжительность жизни, чем мужчины [1].

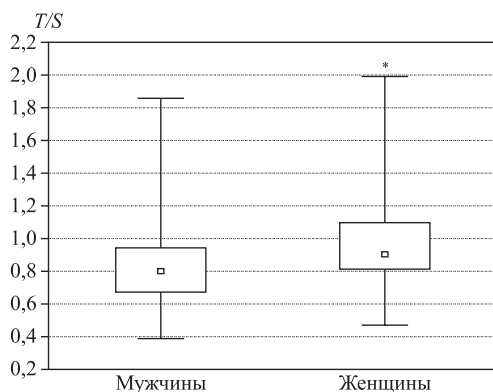


Рис. 1. Относительная средняя длина теломер (T/S) у мужчин и женщин. * — $P < 0,002$ по сравнению с мужчинами. Здесь и на рис. 3: \square — медиана, \square — 25–75 % квартиль, \perp — мин.-макс. значения.

Для оценки зависимости длины теломер от возраста у мужчин и женщин были построены регрессионные модели (рис. 2). Коэффициент корреляции Спирмена ОСДТ с возрастом для мужчин составил $-0,57$ ($P < 0,001$), а для женщин $-0,46$ ($P < 0,01$).

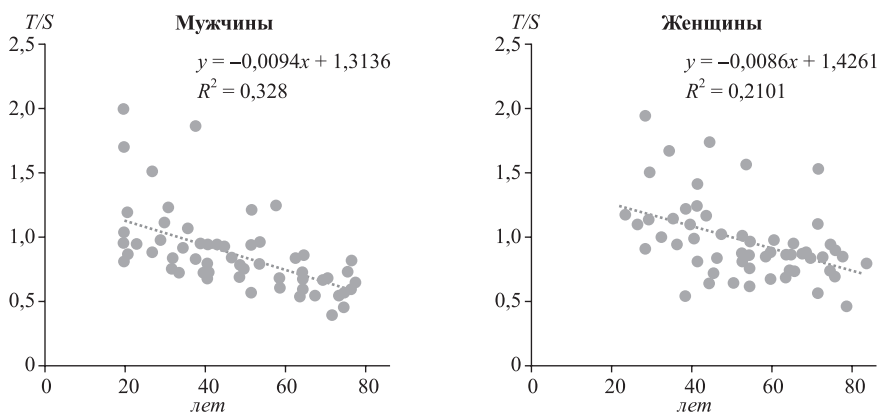


Рис. 2. Зависимость относительной средней длины теломер (T/S) от возраста.

Значения ОСДТ в разных возрастных группах для мужчин и женщин представлены на рис. 3. Как видно из этого рисунка, статис-

тически достоверные различия ОСДТ есть только между самыми молодыми и самыми пожилыми группами, что согласуется с данными других исследований [19].

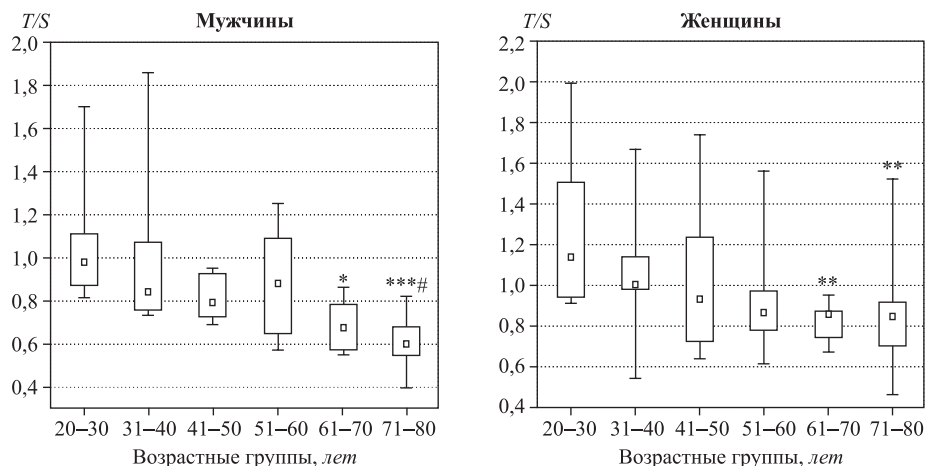


Рис. 3. Относительная средняя длина теломер (T/S) в разных возрастных группах у мужчин и женщин. * — $P < 0,01$, ** — $P < 0,003$, *** — $P < 0,0004$ по сравнению с возрастом 20–30 лет; # — $P < 0,01$ по сравнению с возрастом 31–40 лет.

Корреляция между ОСДТ и уровнем курения ($r = -0,24$, $P < 0,05$), потребления алкоголя ($r = -0,22$, $P < 0,05$), а также массой тела ($r = -0,33$, $P < 0,01$) и возрастом матери при рождении ($r = -0,17$, $P < 0,07$) была отрицательной и статистически значимой (кроме возраста матери при рождении). Этим показано, что при увеличении выраженности этих факторов уменьшается длина теломер.

Установлена достоверная корреляция длины теломер с возрастом как у мужчин ($P < 0,001$), так и у женщин ($P < 0,01$), что согласуется с данными других авторов [8]. То, что достоверные отличия от возрастной группы 20–30 лет обнаружены только в старших возрастных группах, может свидетельствовать о том, что, поскольку при рождении у людей длина теломер может существенно различаться (в зависимости от образа жизни, генетических факторов и т. д.), для обнаружения разницы в более близких по возрасту группах нужны большие выборки [12, 23]. Исходя из того, что женщины живут дольше, ОСДТ у них больше, а корреляция этого показателя с возрастом ниже, можно предположить, что длина теломер влияет на продолжительность жизни и в некоторой степени определяет ее. Уровни корреляции, обнаруженные в нашем исследовании, имеют порядок, соразмерный с таковым в аналогичных исследованиях других авторов [26].

Таким образом, выявлено, что как у мужчин, так и у женщин в буккальном эпителии происходит статистически значимое уменьшение длины теломер с возрастом.

Список использованной литературы

1. *Населення* (1990–2014 pp.) [Электрон. ресурс]. — Режим доступа: http://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2007/ds/nas_rik/nas_u/nas_rik_u.html
2. *Оловников А. М.* Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов // Докл. Акад. Наук СССР. — 1971. — **201**, № 6. — С. 1496–1499.
3. *Allsopp R. C., Harley C. B.* Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts // Exp. Cell Res. — 1995. — **219**, № 1. — P. 130–136.
4. *Allsopp R. C., Vaziri H., Patterson C.* et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts // Proc. Natl. Acad. Sci. — 1992. — **89**, № 21. — P. 10114–10118.
5. *Barrett E. L., Richardson D. S.* Sex differences in telomeres and lifespan // Aging Cell. — 2011. — **10**, № 6. — P. 913–921.
6. *Blackburn E. H.* Switching and signaling at the telomere // Cell. — 2001. — **106**, № 6. — P. 661–673.
7. *Blackburn E. H., Gall J. G.* A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena // J. Mol. Biol. — 1978. — **120**, № 1. — P. 33–53.
8. *Broer L., Codd V., Nyholt D. R.* et al. 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. — P. 1163–1168.
9. *Canela A., Vera E., Klatt P.* et al. High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies // Proc. Natl. Acad. Sci. — 2007. — **104**, № 13. — P. 5300–5305.
10. *Cawthon R. M.* Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method // Nucleic Acids Res. — 2009. — **37**, № 3. — doi: 10.1093/nar/gkwr.7.
11. *Chandra J., Samali A., Orrenius S.* Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress // Free Radical Biol. Med. — 2000. — **29**, № 3. — P. 323–333.
12. *Chandra K., Salman A. S., Mohd A.* et al. Protection against FCA induced oxidative stress induced DNA damage as a model of arthritis and *In vitro* anti-arthritic potential of costus speciosus rhizome extract // Int. J. Pharmacognosy and Phytochemical Research. — 2015. — **7**, № 2. — P. 383–389.
13. *Collins K., Mitchel J. R.* Telomerase in the human organism // Oncogene. — 2002. — **21**, № 4. — P. 564–579.
14. *d'Adda di Fagagna F., Reaper P. M., Clay-Farrace L.* et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence // Nature. — 2003. — **426**, № 6963. — P. 194–198.
15. *Dan T. A., Klelia D. S., Kuzawa C. W.* et al. Substantial variation in qPCR measured mean blood telomere lengths in young men from eleven European countries // Am. J. Hum. Biol. — 2011. — **23**, № 2. — P. 228–231.
16. *Edo M. D., Andrés V.* Aging, telomeres and atherosclerosis // Cardiovasc. Res. — 2005. — **66**, № 2. — P. 213–221.
17. *Gadalla S. M., Cawthon R., Giri N.* et al. Telomere length in blood, buccal cells, and fibroblasts from patients with inherited bone marrow failure syndromes // Aging (Albany NY). — 2010. — **2**, № 11. — P. 867–874.
18. *Greider C. W., Blackburn E. H.* Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts // Cell. — 1985. — **43**, № 2. — P. 405–413.
19. *Guan J. Z., Maeda T., Sugano M.* et al. Change in the telomere length distribution with age in the Japanese population // Mol. Cell. Biochem. — 2007. — **304**, № 1. — P. 353–360.

20. *Harley C. B., Fitcher A. B., Greider C. W.* Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts // *Nature*. — 1990. — **345**, № 6274. — P. 458–460.
21. *Hayflick L., Moorhead P. S.* The serial cultivation of human diploid cell strains // *Exp. Cell. Res.* — 1961. — **25**. — P. 585–621.
22. *Kim N., Piatyszek M., Prowse K.* et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer // *Science*. — 1994. — **266**, № 5193. — P. 2011–2015.
23. *Koliada A., Krasnenkov D., Vaiserman A.* Telomeric aging: mitotic clock or stress indicator? // *Front. Genet.* — 2015. — **6**, № 82. — doi: 10.3389/fgenet.2015.00082.
24. *Lindsey J., McGill N. I., Lindsey L. A.* et al. *In vivo* loss of telomeric repeats with age in humans // *Mutat. Res.* — 1991. — **256**, № 1. — P. 45–48.
25. *Lombard D. B., Chua K. F., Mostoslavsky R.* et al. DNA repair, genome stability, and aging // *Cell*. — 2005. — **120**, № 4. — P. 497–512.
26. *Mucoz-Jordón J. L., Cross G.* Telomere shortening and cell cycle arrest in *Trypanosoma brucei* expressing human telomeric repeat factor TRF1 // *Mol. Biochem. Parasitol.* — 2001. — **114**, № 2. — P. 169–181.
27. *Njajou O. T., Cawthon R. M., Damcott C. M.* Telomere length is paternally inherited and is associated with parental lifespan // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2007. — **104**, № 29. — P. 12135–12139.
28. *Saliques S., Zeller M., Lorin J.* et al. Telomere length and cardiovascular disease // *Arch. Cardiovasc. Dis.* — 2010. — **103**, № 9. — P. 454–459.
29. *Slagboom P. E., Droog S., Boomsma D. I.* Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups // *Am. J. Hum. Genet.* — 1994. — **55**, № 5. — P. 876–882.
30. *Sun Q., Shi L., Prescott J.* et al. Healthy lifestyle and leukocyte telomere length in U.S. women // *PLoS One*. — 2012. — **7**, № 5. — doi: 10.1371/journal.pone.0038374.
31. *Valdes A. M., Andrew T., Gardner J. P.* et al. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women // *Lancet*. — 2005. — **366**, № 9486. — P. 662–664.
32. *Weng N. P., Granger L., Hodes R. J.* Telomere lengthening and telomerase activation during human B cell differentiation // *PNAS USA*. — 1997. — **94**, № 20. — P. 10827–10832.
33. *Weng N. P., Levine B. L., June C. H., Hodes R. J.* Human naive and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential // *PNAS USA*. — 1995. — **92**, № 24. — P. 11091–11094.

Поступила 10.05.2015

ДОВЖИНА ТЕЛОМЕР У БУКАЛЬНОМУ ЕПІТЕЛІІ У ЖИТЕЛІВ РІЗНОГО ВІКУ КИЇВСЬКОЇ ОБЛАСТІ

Д. С. Краснєнков, Д. А. Лосєва*, О. К. Коляда, В. М. Кухарський,
Т. І. Махній, О. М. Вайсерман, М. Р. Івасюк**

Державна установа "Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова
НАМН України", 04114 Київ

*Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, 01601 Київ

**Національний університет "Києво-Могилянська академія", 04070 Київ

У 120 жителів Київської області (60 чоловіків та 60 жінок у віці від 20 до 80 років) у букальному епітелії визначали відносну середню довжину теломер (ВСДТ) за допомогою

мультиплексної монохроматичної кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Показано, що у жінок ВСДТ більша, ніж у чоловіків: медіана (25–75 % кuartиль) чоловіки — 0,8 (0,7, 0,95), жінки — 0,9 (0,78, 1,11; $P < 0,002$). Встановлено негативну кореляцію ВСДТ з віком: чоловіки — $r = -0,57$, $P < 0,001$; жінки — $r = -0,46$, $P < 0,01$. Також виявлено негативну кореляцію ВСДТ з курінням ($r = -0,24$, $P < 0,05$), вживанням алкоголю ($r = -0,22$, $P < 0,05$) і масою тіла ($r = -0,33$, $P < 0,01$).

THE LENGTH OF TELOMERES IN BUCCAL EPITHELIUM OF THE RESIDENTS OF KYIV REGION

D. S. Krasnenkov^{1,2}, D. A. Loseva², A. K. Koliada¹, V. M. Kukharsky¹,
T. I. Makhniy¹, A. M. Vaiserman, M. R. Ivasiuk³

¹State Institution "D. F. Chebotarev Institute of Gerontology NAMS Ukraine",
04114 Kyiv

²Kyiv National Taras Shevchenko University, 01601 Kyiv

³National University of "Kyiv-Mohyla Academy", 04070 Kyiv

The relative average telomere length (RATL) was determined in buccal epithelium of 120 residents of Kyiv region (60 men and 60 women aged 18 to 80 years) using monochromatic multiplexed quantitative polymerase chain reaction (PCR) in real time. Women vs. men were shown to have longer RATL, the median (25–75 % quartile) for men — 0.8 (0.7, 0.95), and for women — 0.9 (0.78, 1.11) ($P < 0.002$). Negative correlation of RATL was revealed with age in men ($r = -0.57$, $P < 0.001$) and women ($r = -0.46$, $P < 0.01$). In all examined persons was negative correlation of RATL with smoking ($r = -0.24$, $P < 0.05$), alcohol consumption ($r = -0.22$, $P < 0.05$) and body weight ($r = -0.33$, $P < 0.01$).

Сведения об авторах

ГУ "Институт геронтологии им. Д. Ф. Чеботарева НАМН Украины"
Лаборатория эпигенетики

А. М. Вайсерман — зав. лаб., д.м.н.

Д. К. Красненков — м.н.с., аспирант Киевского национального университета им. Т. Шевченко (krasnenkovd@gmail.com)

А. К. Коляда — м.н.с.

В. М. Кухарский — н.с., к.б.н.

Т. И. Махний — н.с.

Киевский национальный университет им. Т. Шевченко

Д. А. Лосева — студентка

Национальный университет "Киево-Могилянская академия"

М. Р. Ивасюк — студент