

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Рязанский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Дорощук Наталья Александровна

**ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА ДЛИНУ ТЕЛОМЕРОВ В
ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ ПРИ РАЗЛИЧНОМ РИСКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ
СЕРДЕЧНО - СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ И ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ
СОСТОЯНИЯХ**

03.01.04 - Биохимия (медицинские науки)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
д.м.н., профессор Тихазе А.К.

Научный консультант:
д.м.н. Постнов А.Ю.

РЯЗАНЬ – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 4 |
| ВВЕДЕНИЕ..... | 5 |
| Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР..... | 12 |
| 1.1. Роль окислительного стресса при развитии сердечно - сосудистой патологии..... | 12 |
| 1.2. Строение теломеров..... | 13 |
| 1.3. Функции теломеров..... | 18 |
| 1.4. Регуляция длины теломеров..... | 20 |
| 1.4.1. Роль теломеразы в регуляции длины теломерной ДНК..... | 21 |
| 1.4.2. Влияние окислительного стресса на скорость укорочения теломерных повторов хромосом..... | 22 |
| 1.4.3. Механизмы регуляции длины теломерных повторов хромосом..... | 24 |
| 1.5. Влияние окислительного стресса и длины теломеров на процессы старения..... | 27 |
| 1.6. Окислительный стресс и длина теломеров при некоторых заболеваниях невоспалительного генеза..... | 31 |
| 1.7. Влияние аномальных факторов окружающей среды на здоровье человека..... | 34 |
| Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ..... | 37 |
| 2.1. Клиническая характеристика участников исследования..... | 37 |
| 2.1.1. Общая характеристика больных..... | 37 |
| 2.1.2. Характеристика добровольцев, включенных в исследование по влиянию искусственно созданных экстремальных климатических условий..... | 40 |
| 2.2. Биохимические методы исследования..... | 44 |
| 2.2.1. Выделение ЛНП..... | 44 |
| 2.2.2. Определение уровня окисленных липопротеидов низкой плотности..... | 44 |
| 2.2.3. Определение содержания малонового диальдегида в плазме крови..... | 46 |
| 2.3. Генетические методы исследования..... | 48 |
| 2.3.1. Выделение ДНК из замороженной крови..... | 48 |
| 2.3.2. Количественная полимеразно цепная реакция в реальном времени..... | 49 |
| 2.3.3. Расчет относительной длины теломерных повторов | |

| | |
|---|-----------|
| хромосом..... | 51 |
| 2.4. Статистическая обработка данных..... | 53 |
| Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ..... | 55 |
| 3.1. Характеристика длины теломерных повторов хромосом для всей выборки..... | 55 |
| 3.2. Определение нормальных значений длины теломерных повторов хромосом для различных возрастных групп..... | 58 |
| 3.3. Анализ пациентов различных групп риска развития сердечно - сосудистых осложнений..... | 60 |
| 3.4. Анализ неблагоприятных событий, произошедших в течение пяти лет после измерения длины теломерных повторов хромосом..... | 66 |
| 3.4.1. Сравнительная характеристика осложнений по группам риска..... | 66 |
| 3.4.2. Сравнительная характеристика длины теломерных повторов хромосом и уровня окЛПН в группах с различным риском развития сердечно-сосудистых осложнений, опрошенных по прошествии пяти лет после обследования..... | 71 |
| 3.5. Влияние экстремальных климатических условий на изменение длины теломерных повторов хромосом у добровольцев..... | 76 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... | 83 |
| ВЫВОДЫ..... | 85 |
| ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ..... | 86 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 87 |

Список сокращений

- АД – артериальное давление
АФК – активные формы кислорода
ВОЗ – всемирная организация здравоохранения
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ИБС – ишемическая болезнь сердца
ИМ – инфаркт миокарда
ИМТ – индекс массы тела
ЛНП – липопротеины низкой плотности
МТК – медико-технический комплекс
ОДТ – относительная длина теломерных повторов хромосом
окЛНП – окисленные липопротеины низкой плотности
ОНМК – острое нарушение мозгового кровоснабжения
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РМ – реваскуляризация миокарда
РНК – рибонуклеиновая кислота
СД 2 – сахарный диабет второго типа
ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
тпн – тысяч пар нуклеотидов
ALT – Alternative Lengthening of Telomeres
PinX1 – PIN2-interacting protein 1
Pot1 – Protection of telomeres
Rap1 – Ras-related protein 1
TERC – Telomerase RNA component
TERT – Telomerase Reverse Transcriptase
TIN2 – TRF1-inter acting nuclear factor 2
TPP1 – tripeptidyl peptidase I
TRF1 – Telomere Repeat Binding Factor 1
TRF2 – Telomere Repeat Binding Factor 2

Введение

Актуальность. В нашей стране сердечно - сосудистые заболевания стоят на первом месте по смертности и инвалидизации трудоспособного населения. В связи с этим, важно иметь критерии для предсказания сердечно - сосудистых осложнений с целью их возможного предотвращения. Окислительный стресс вносит важный вклад в патогенез заболеваний сердечно - сосудистой системы, таких, как атеросклероз, ИБС, инфаркт миокарда, сердечная недостаточность и артериальная гипертензия [6]. Развитие окислительного стресса сопровождается интенсификацией свободно-радикальных процессов, которая вызывает повреждения биополимеров (белков и нуклеиновых кислот), сопровождающиеся нарушением их функциональной активности [8]. В частности, активация свободно-радикальных процессов может приводить к окислительной деструкции молекул ДНК, что в итоге вызывает укорочение теломерных повторов в хромосомах клеток [73]. В зоне атеросклеротического поражения стенки сосуда происходит хроническое воспаление, при котором увеличивается количество активных форм кислорода, что приводит к развитию окислительного стресса и может провоцировать уменьшение длины теломерных повторов в хромосомах эндотелиоцитов [133]. Тем не менее, в доступной литературе нет достаточно убедительных данных, подтверждающих взаимосвязь между развитием окислительного стресса и уменьшением длины теломерных повторов хромосом при заболеваниях сердечно - сосудистой системы.

Исходя из вышесказанного, тема настоящей диссертации, посвященной изучению влияния окислительного стресса на окислительный катаболизм теломерной ДНК, представляется весьма актуальной.

Активные формы кислорода (АФК) и реакционноспособные карбонильные соединения - reactive carbonyl species (RCS) дикарбонилы

способны модифицировать аминокислотные остатки белков, приводя к изменению их структурно-функциональных свойств [3,129].

Свободно-радикальное окисление липидов приводит к накоплению липогидропероксидов и вторичных продуктов - дикарбонилов, таких, как малоновый диальдегид (МДА) [88,112]. Дикарбонил глиоксаль образуется при автоокислении шестиатомных сахаров [62] и их соокислении с ненасыщенными липидами [78,108], а метилглиоксаль - при окислительном метаболизме триозофосфатов [63]. Интенсификация свободно-радикального окисления липидов и увеличение генерирования АФК (окислительный стресс) с последующим накоплением дикарбонилов отмечены при развитии атеросклероза [3,129].

Первичные продукты свободно-радикального окисления, такие, как гидропикосиды, и вторичные продукты, дикарбонилы, весьма агрессивны и могут реагировать с аминокруппами биополимеров белков и нуклеиновых кислот, приводя к окислению этих молекул, а в ряде случаев и к их деструкции. В частности, показано, что при окислительном стрессе интегральным продуктом, характеризующим выраженность окислительного стресса, является 8-гидроксигуанин - продукт окислительной деструкции нуклеиновых кислот. В связи с этим, важным является исследование роли окислительного стресса в изменении длины теломеров при патологических состояниях и экстремальных состояниях организма.

Теломеры – это участки на линейных концах хромосом, содержащие многократно повторяющуюся шестинуклеотидную последовательность ДНК (TTAGGG) в комплексе с белками [120]. Теломеры обеспечивают стабильную репликацию клеток и предохраняют хромосомы от слияния [31]. В результате концевой недорепликации отстающей 3'-цепи ДНК при каждом митотическом делении клетки, длина теломерных повторов с возрастом сокращается. Многими исследователями показано, что развитие возрастных патологий связано с укорочением теломеров [50,140]. Хроническое

воспаление и окислительный стресс являются дополнительным фактором укорочения теломерных повторов хромосом [86,118]. Сокращение длины теломерных повторов до критических значений вызывает старение клетки и последующий ее апоптоз [104]. Чем короче теломеры, тем быстрее происходит старение организма. Проведенный сравнительный анализ продемонстрировал, что люди с сильно укороченными теломерами находятся в группе риска развития сердечно - сосудистых заболеваний [49,122].

Пожилой возраст является фактором риска развития целого ряда хронических заболеваний, в том числе и сердечно - сосудистых. Ускоренное «биологическое старение» взаимосвязано с риском развития ряда возрастных болезней, в том числе, сердечно - сосудистых заболеваний (ССЗ), рассеянного склероза, сахарного диабета 2-го типа (СД 2) и разных типов рака. Хорошо известно, что сердечно - сосудистая патология является причиной более, чем половины случаев смерти в мировой популяции [122].

Поэтому, очень важно проводить наиболее раннюю диагностику развития ССЗ. Одним из методов определения риска развития ССЗ может служить метод определения длины теломерных повторов хромосом. Данная методика [1,30] адаптирована для отечественных амплификаторов, что позволяет недорого и в короткие сроки определить относительную длину теломерных повторов, а также позволяет следить за динамикой изменения длины теломерных повторов. Таким образом, длина теломерной ДНК может служить показателем биологического возраста, а также может служить в качестве прогностического маркера риска развития сердечно - сосудистых заболеваний.

Цель исследования: изучить влияние окислительного стресса на длину теломеров в лейкоцитах крови у пациентов с различным риском развития сердечно - сосудистых заболеваний и у больных ИБС, а также у здоровых добровольцев, находившихся в искусственно созданных экстремальных климатических условиях (волны летней жары).

Задачи исследования:

1. Определить длину теломерных повторов хромосом в лейкоцитах крови практически здоровых людей в различных возрастных группах жителей г. Москвы.
2. Изучить связь между уровнем окЛНП плазмы крови и длиной теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов крови у пациентов с различным риском сердечно - сосудистых заболеваний и у больных ИБС.
3. Исследовать связь между развитием сердечно-сосудистых осложнений в течение 5 лет и длиной теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов крови.
4. Определить информативность определения длины теломеров на прогноз развития осложнений заболеваний сердечно - сосудистой системы.
5. Исследовать влияние искусственно моделируемых экстремальных климатических условий (волны летней жары) на содержание МДА в плазме крови и длину теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов крови у практически здоровых добровольцев.

Методология и методы исследования. Для характеристики выраженности окислительного стресса с использованием иммунохимических методов исследовали уровень окисленных липопротеидов низкой плотности в плазме крови больных, а также проводили спектрофотометрическое определение содержания вторичного продукта свободно-радикального окисления липидов в ЛНП плазмы крови - малонового диальдегида по образованию окрашенного аддукта с 2-тиобарбитуровой кислотой. Исследование уменьшения длины теломеров проводили с использованием биохимических и молекулярно-биологических методов при помощи ПЦР в реальном времени.

Научная новизна. Измерена относительная длина теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов крови жителей московского региона в различных возрастных группах с использованием модифицированного метода

количественной полимеразной цепной реакции. Впервые установлена связь между выраженностью окислительного стресса (увеличение уровня окЛНП в плазме крови) и проявлениями окислительной деструкции ДНК (уменьшение длины теломерных повторов в лейкоцитах крови) у пациентов с высоким риском ССС (по шкале SCORE) и больных ИБС. Впервые выявлены критические значения теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов крови, при которых у пациентов с ИБС и с различным риском развития этого заболевания достоверно возрастает вероятность развития сердечно - сосудистых событий (нестабильная стенокардия, реваскуляризация миокарда, ИМ, ОНМК, сердечно - сосудистая смерть) в течение последующих пяти лет. Установлено снижение длины теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов крови у добровольцев при моделировании действия неблагоприятных климатических факторов (гипертермия), способных индуцировать развитие окислительного стресса.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Увеличение уровня окисленных липопротеидов в плазме крови пациентов с различным риском развития заболеваний сердечно - сосудистой системы ассоциировано с укорочением длины теломеров.
2. Увеличение риска сердечно - сосудистых заболеваний или наличие клинических проявлений ишемической болезни сердца сопровождается снижением длины теломеров.
3. При значениях длины теломеров ниже 70%, от значений длины теломеров практически здоровых людей, риск развития сердечно - сосудистых заболеваний возрастает.
4. При моделировании экстремальных климатических условий у практически здоровых добровольцев длина теломеров снижается.

Теоретическая значимость работы. Результаты работы создают основу для понимания одного из молекулярных механизмов окислительного катаболизма молекул ДНК при патологических и экстремальных состояниях

организма, сопровождающихся развитием окислительного стресса. Кроме того, результаты работы позволяют выявить критерии для оценки риска заболеваний сердечно - сосудистой системы по изменению длины теломерных повторов в лейкоцитах крови.

Практическая значимость работы. Полученные результаты обосновывают возможность использования новых прогностических маркеров риска развития сердечно - сосудистых заболеваний, основанных на изучении таких показателей, как относительная длина теломер в лейкоцитах крови и уровень окЛНП в плазме крови.

1. Разработан оригинальный метод расчета длины теломерных повторов хромосом в лейкоцитах крови, адаптированный для лабораторного оборудования и реактивов российского производства.

2. Установлены значения длины теломерных повторов хромосом в лейкоцитах крови для практически здоровых жителей Московского региона.

3. Рассчитано критическое значение длины теломерных повторов хромосом в лейкоцитах крови, при которых риск развития сердечно - сосудистых осложнений увеличивается в 5 раз, что может служить прогностическим критерием и указывать на необходимость проведения регулярных обследований, а также разработки индивидуальной медикаментозной коррекции у такого рода больных.

Степень достоверности и апробации результатов

Результаты получены с помощью современных методов с использованием современного высокоточного оборудования. Объем выборки, а также количество независимых экспериментов, позволили получить достоверные результаты при проведении статистического анализа.

Результаты работы доложены на 5 конференциях: Всероссийской научно-практической конференции, 53 ежегодная сессия РКНПК (Москва, 2013), Всероссийской научно-практической конференции, 54 ежегодная

сессия РКНПК (Москва, 2014), Всероссийской научно-практической конференции, XXII Российский Национальный Конгресс «Человек и лекарство» (Москва, 2015), 56 ежегодная сессия РКНПК (Москва, 2016), 57 ежегодная сессия РКНПК (Москва, 2017).

Личный вклад автора: Все экспериментальные исследования, измерения генетических и биохимических параметров, а также статистическая обработка результатов, создание рисунков, таблиц и графиков выполнены автором самостоятельно.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Роль окислительного стресса при развитии сердечно - сосудистой патологии

В нормальных условиях в организме постоянно образуются активные формы кислорода, такие, как:

- супероксидный анион радикал O_2^- ;
- гидроксил-радикал $OH\cdot$;
- гидропероксидный радикал $H_2O_2\cdot$;
- пероксид водорода H_2O_2 .

АФК атакуют органические молекулы. Субстратом для АФК служат жирные кислоты. В результате окисления этих структур образуются свободные радикалы. При восстановлении свободных радикалов возникают первичные продукты окисления – гидропероксиды. Гидропероксиды подвергаются дальнейшей окислительной деструкции с образованием конечных продуктов дикарбониллов, подобных малоновому диальдегиду, глиоксалу, метилглиоксалу. Нормальная регуляция свободно-радикальных процессов в организме происходит с участием ферментных систем (антиоксидантных ферментов), главным образом, каталазы, супероксиддисмутазы, которые инактивируют и утилизируют супероксид кислорода O_2^- , пероксид водорода H_2O_2 и органические гидропероксиды. В регуляции этих процессов могут участвовать фенольные антиоксиданты, подобные альфа-токоферолу и восстановленной форме коэнзима Q, которые непосредственно взаимодействуют с органическими свободными радикалами и являются ловушками свободных радикалов. Антиоксидантные ферменты могут ингибироваться при воздействии свободных радикалов и

дикарбонилов, что приводит к разбалансировке между системами образования и утилизации свободно-радикальных продуктов [69].

Понятие окислительного стресса было введено Хельмунтом Сисом (Helmut Sies) в 1985 году. Он рассматривал окислительный стресс, как состояние, при котором происходит гиперпродукция АФК и свободных радикалов и/или снижена активность систем, которые утилизируют АФК и свободные радикалы. В настоящее время считается, что окислительный стресс является важным патогенетическим звеном ряда патологических состояний, таких, как атеросклероз, сахарный диабет 2 типа (СД2), нейро-дегенеративные заболевания, кроме того, окислительный стресс способствует преждевременному старению организма [5]. При различных патологиях проявления окислительного стресса различны. Так, при атеросклерозе развитие окислительного стресса сопряжено с повышенной окисляемостью ЛНП, которые становятся более атерогенными, и захватываются скэлэнджер-рецепторами в стенке сосуда. В результате этого, в стенку сосуда проникает большое количество липидов, что приводит к липоидозу (первичному повреждению) сосудистой стенки [129].

1.2. Строение теломеров

Теломерная ДНК человека и других млекопитающих состоит из многократно повторяющегося шестинуклеотидного повтора ТTAGGG [119]. Длина теломерной ДНК человека в соматических клетках составляет от 5 до 15 т.п.н. На конце 5'-3' теломерной ДНК находится одноцепочечный G-богатый фрагмент, который выступает на 100-150 нуклеотидов [119]. Этот одноцепочечный фрагмент встраивается в двухцепочечную цепь теломерной ДНК, образуя T-петлю.

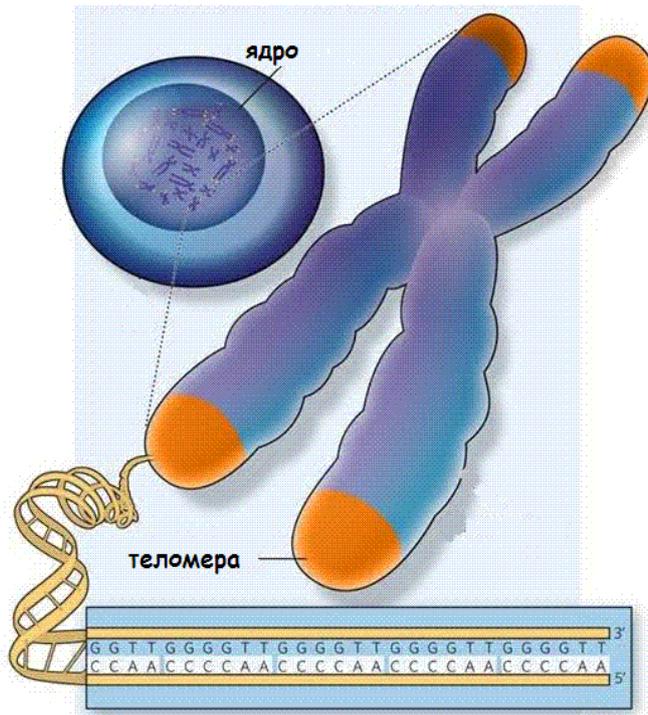


Рисунок 1 – Многократно повторяющиеся последовательности ТTAGGG в концевых отделах хромосом (модифицированный http://ic.pics.livejournal.com/masterok/50816465/915740/915740_original.png)

Концевые отделы теломеров имеют ненуклеосомную организацию [35]. При этом, у млекопитающих ненуклеосомную организацию имеет лишь незначительная часть теломерной последовательности, расположенной в терминальной части теломерной ДНК, остальная же часть теломерных последовательностей, которые расположены со стороны прителомерных областей, имеет нуклеосомную организацию, т.е. двойная спираль ДНК обернута вокруг белков. В состав этого фрагмента входят многократно повторяющийся повтор ДНК, состоящий из шести нуклеотидов ТTAGGG, а также белки: TRF1, TRF2, Rap1, TIN2, Pot1 и TPP1 [89,113].

Т-петля – это структура, которая образуется путем изгибания назад одноцепочечной ДНК, а край этой одноцепочечной ДНК вставляется в двухцепочечную часть теломерной ДНК (рис.1). Размер петли варьирует и составляет 200-300 нуклеотидов [64]. Для образования петли свободный одноцепочечный 3'-конец теломерной ДНК замещает гомологичный участок двухцепочечной области теломерной ДНК. Вытесненный фрагмент

становится одноцепочечным участком, а G-хвост теломеры, который произвел это вытеснение, взаимодействует с комплементарной цепью ДНК.

Одноцепочечная G-цепь образует гетеродуплекс с двухцепочечной теломерной ДНК, а двухцепочечная цепь частично расплетается и образуется D-петля. T-петля обеспечивает стабильность хромосом и предотвращает деградацию теломерной ДНК. Стабильность хромосом обеспечивается отсутствием свободного конца ДНК. T-петля защищает концы теломеров от действия теломеразы и ферментов репарационной системы. T-петля защищает конец теломерной ДНК от действия ферментов репарационной системы, т.к. в отличие двухцепочечного разрыва ДНК, она не узнается этими ферментами. Одновременно с этим, конец теломерной ДНК становится недоступным для присоединения теломеразы, в результате чего удлинение теломерной ДНК становится невозможным. При большом количестве белка TRF1, более активно образуются T-петли, что приводит к невозможности удлинения теломеров при помощи теломеразы и последующему укорочению теломеров по механизму концевой недорепликации (рис.2).

Теломеры могут образовывать структуры более высокого порядка, такие, как G-квадруплексы [7,91]. Гуаниновые азотистые основания способны к ассоциации друг с другом и четыре гуанина, которые лежат в одной плоскости, образуют водородные связи друг с другом. В результате образуется вторичная структура из квартетов гуанина. Каждый из квартета гуанина берется с гомологичной позиции теломерного повтора. Благодаря образующимся водородным связям между гуанинами в близлежащих тандемных квартетах, серия таких квартетов образует спиралевидную стопку [91].

Теломеры связаны с белковым комплексом, состоящим из белков, который называется «шелтерин». Эти белки можно разделить на три группы.

В первую группу входят белки TRF1 (Telomere Repeat Binding Factor 1) и TRF2 (Telomere Repeat Binding Factor 2), которые связывают одноцепочечные участки теломерной ДНК. Основной функцией теломерного ДНК-связывающего белка TRF1 является регуляция длины теломеров [51, 99]. Белок TRF1 участвует в образовании Т-петли [99] и препятствует доступу теломеразы к теломерным концам. Белок TRF1 взаимодействует с белком PinX1. Этот белок, в свою очередь, способен связывать каталитическую субъединицу теломеразы, ингибируя ее активность [99].

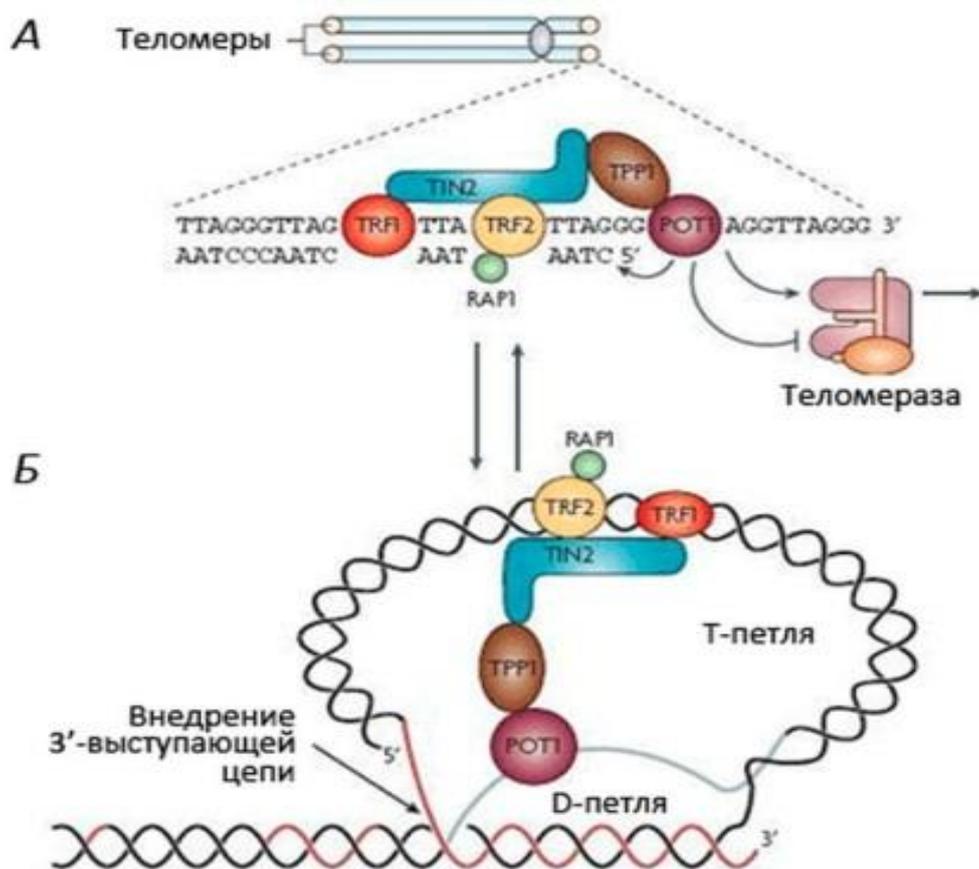


Рисунок 2 – Строение Т-петли теломера (модифицированный, http://www.moscowuniversityclub.ru/article/img/14193_80586955.png)

Белок TRF2 также участвует в регуляции длины теломеров. Помимо этого, главная его роль заключается в защите теломерных концов и в формировании Т-петли путем внедрения одноцепочечного фрагмента теломерной ДНК в двухцепочечный участок. Белок TRF1 облегчает данный процесс, способствуя изгибанию, перекручиванию и соединению с

двухцепочечной ДНК. Показано, что при снижении уровня экспрессии белка TRF2 и, соответственно, при снижении его количества, происходит потеря одноцепочечных концов теломерной ДНК, что приводит к слиянию хромосом, путем взаимодействия теломерных концов [138]. При недостатке белка TRF2 происходит запуск программы апоптоза с дальнейшей элиминацией этих клеток [89]. Показано, что при увеличении концентрации белка TRF2, происходит прогрессивное укорочение длины теломеров [125] и, предположительно, основной механизм такой же, как при увеличении продукции белка TRF1.

Ко второй группе относятся белки, связывающие одноцепочечные фрагменты теломерной ДНК. Для млекопитающих (в том числе, и для человека) это белок Pot1 (Protection of telomeres). Этот белок связывает G-богатые участки теломерной ДНК, защищая, тем самым, свисающие одноцепочечные концы теломерной ДНК и, соответственно, защищает концы хромосом от деградации [83]. Белок Pot1 связывается с другим теломерным белком TPP1, образуя комплекс с теломерной ДНК, который увеличивает активность теломеразы [43]. Комплекс Pot1—TPP1 служит неким переключателем доступа теломеразы к теломерам, регулируя тем самым их длину [93].

К третьей группе теломерных белков относятся белки, которые необходимы для формирования теломерного нуклеопротеинового комплекса более высокого порядка. В состав третьей группы входят белки Rap1, TIN2 (TRF1-inter acting nuclear factor 2) и TPP1. Белок Rap1 не связывается напрямую с теломерной ДНК, а взаимодействует с теломерной ДНК путем связывания с белком TRF2 [76]. Ранее было показано, что при ингибировании активности гена Rap1 (hRap1) происходит удлинение теломеров, следовательно, белок Rap1 можно отнести к отрицательному регулятору длины теломерной ДНК [18]. Также известно, что белок Rap1

взаимодействует с белками системы репарации Rad50, Mre11, Ku70/86 и PARP—1 [18]. С этим белком связывается другой теломерный белок – TRF2.

Таким образом, белки TRF2 и Rap1 способны активировать систему репарации ДНК, обеспечивая, тем самым, нормальную структуру теломеров.

В формировании нуклеопротеинового комплекса более высокого порядка участвуют белки TIN2 и TPP1. Белок TIN2 связывает между собой белки TRF1 и TRF2 [124]. Белок TIN2 контролирует активность танкиразы (поли-АДФ-рибозо-полимеразы), которая уменьшает способность TRF1 связываться с теломерной ДНК [124]. TPP1 участвует в связывании TRF1 и TRF2 белков, стабилизирует TRF1—TIN2—TRF2 комплекс и способствует образованию телосомы [18]. Белок TPP1 связывает Pot1, при этом образуется комплекс с теломерной ДНК, который играет важную роль в регуляции активности теломеразы, контролируя тем самым длину теломеров и защищая их.

Таким образом, белки шелтеринового комплекса выполняют защитную функцию, регулируют длину теломеров и участвуют в поддержании стабильности теломерных концов хромосом.

1.3. Функции теломеров

Теломерные повторы хромосом в клетке выполняют несколько функций.

Основная роль теломеров заключается в обеспечении стабильности хромосом за счет предотвращения слияния концов хромосом. При разрыве хромосомы образуются свободные концы, которые являются мишенью для систем репарации.

Одна из самых важных функций – решение проблемы концевой недорепликации ДНК. Во время деления клетки длина теломерных концов хромосом сокращается на 30-200 пар оснований [31]. Это происходит из-за того, что отстающая цепь репликативной вилки в синтезе ДНК не может

синтезироваться до 5'-конца в отсутствии рибопраймера, который, в свою очередь, не образуется непосредственно на конечном фрагменте. Потери концевой ДНК делают невозможной бесконечную пролиферацию. При укорочении хромосом до определенного размера индуцируются процессы клеточного старения. Длина теломерных повторов хромосом, по этим представлениям, может служить мерой пролиферативного потенциала клеток.

Еще одна функция теломерных концов хромосом заключается в создании специфической архитектуры и внутренней упорядоченности клеточного ядра.

Теломеры участвуют в фиксации хромосом к ядерному матриксу. Это необходимо для правильной ориентации хромосом в ядре, что предотвращает слияние хромосом во время митоза [36].

На стадии профазы мейоза происходят направленные перемещения концов хромосом на поверхности ядерной мембраны так, что концы гомологичных хромосом смыкаются, и с них начинается конъюгация этих хромосом строго однородными участками.

Теломеры сцепляют друг с другом концы сестринских хроматид, образующихся в хромосоме после S-фазы. Возможно, это сцепление происходит за счет гибридизации теломеров сестринских ДНК.

В то же время структура теломеров такова, что допускает расхождение хроматид в анафазе. Однако, возможна мутация, которая меняет нуклеотидную последовательность теломеров, тогда расхождение хроматид блокируется.

Теломерные концы хромосом участвуют в стабилизации клеточных ядер. При случайном разрыве хромосомы образуются фрагменты, на одном или на обоих концах которых нет теломерных повторов. В отсутствие теломеразы эти фрагменты претерпевают слияния и деградацию, что блокирует клеточный цикл и ведет клетку к апоптозу. В присутствии

теломеразы к местам разрыва присоединяется теломерная ДНК, что стабилизирует хромосомные фрагменты и позволяет им функционировать [7].

Данный феномен обнаружен у больных α -талассемией: в генах α -глобина происходят разрывы хромосомы 16q, и к поврежденному концу добавляются теломерные повторы [20].

Теломерные концы хромосом влияют на экспрессию генов.

Активность генов, расположенных рядом с теломерами, снижена (репрессирована). Такой эффект часто обозначается, как транскрипционное молчание, или сайленсинг [110].

При значительном же укорочении теломеров эффект положения пропадает и прителомерные гены активируются [110].

Сайленсинг может быть результатом действия белков (таких, как Rap1 или TFR1), взаимодействующих с теломерами. Тем более, эти белки снижают доступность теломерной ДНК для целого ряда ферментов [131].

С другой стороны, эффект положения может быть обусловлен близостью к ядерной оболочке. Так, по гипотезе А.М. Оловникова, в этой оболочке могут располагаться Са-каналы, и поток ионов Ca^{2+} влияет на взаимодействие белков с близлежащими генами.

Эффект положения может коснуться и внутренних генов, если какой-нибудь из таких генов становится транспозоном и встраивается в теломерную область, или если происходит разрыв хромосомы и образование на концах разрыва теломерных повторов, с помощью последних становится, возможно, связывание теломерных белков и прикрепление к ядерной мембране.

1.4. Регуляция длины теломеров

В клетке существуют механизмы, восстанавливающие укороченные концы теломерных участков хромосом. Среди них наиболее изученным является восстановление теломерных концов хромосом при помощи

фермента теломеразы, которое происходит в недифференцированных и слабо дифференцированных клетках. В то же время, существуют альтернативные механизмы, в основе которых лежат процессы рекомбинации [79] и ретротранспозиции [134].

1.4.1. Роль теломеразы в регуляции длины теломерной ДНК

Теломераза – это РНК-зависимая ДНК-полимераза (обратная транскриптаза), которая синтезирует G-богатые многократно повторяющиеся фрагменты ДНК теломеров. Основными компонентами теломеразы являются РНК-матрица TERC (Telomerase RNA component) и обратная транскриптаза (TERT). Длина РНК-матрицы составляет 451 нуклеотид и содержит в своем составе матричный участок, комплементарный двум теломерным повторам.

TERC также выполняет структурную функцию [41]. В состав теломеразы входят различные белки, такие как TRAF1, TRAF2, Ku86, TIN2 и т.д. [132]. Их функция заключается в регуляции различных этапов работы теломеразы. В работе теломеразы выделяют четыре основных этапа. На первом этапе происходит связывание 3'-конца теломеров с теломеразной РНК. На втором этапе происходит элонгация теломерного повтора. При этом, теломераза связывается с ДНК-последовательностью комплементарной РНК-матрице и синтезирует повтор TTAGGG. На третьем этапе теломераза передвигается на концы теломеров (транслокация) и вновь синтезирует соответствующий фрагмент ДНК. Удлинение теломеров происходит путем синтеза двух дополнительных повторов TTAGGG на концах. На четвертом этапе происходит диссоциация теломеразы от теломеров (рис.3).

Максимальная активность теломеразы наблюдается в эмбриональных клетках и репродуктивных органах. Сохраняется активность теломеразы в стволовых клетках, а также в некоторых быстро обновляющихся тканях, таких как эпителиальные ткани. Однако, следует отметить, что активность теломеразы в этом случае ниже. По мере дифференцировки клеток, происходит снижение активности фермента. В большинстве соматических

клеток человека теломеразная активность отсутствует [27]. Известно, что теломераза активируется в большинстве злокачественных опухолей [139].

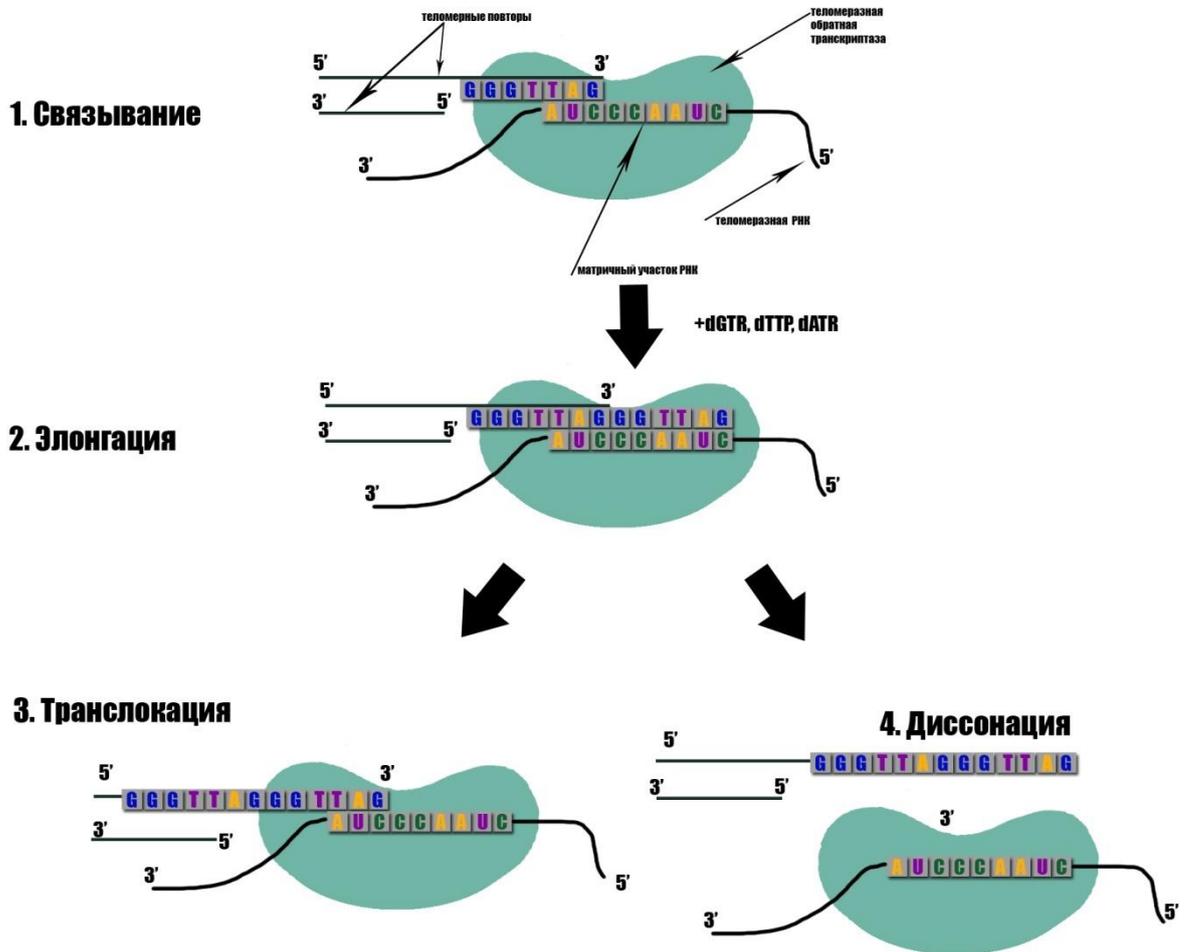


Рисунок 3 – Схема работы теломеразы

1.4.2. Влияние окислительного стресса на скорость укорочения длины теломерных повторов хромосом

Окислительный стресс, в результате которого в клетке образуется избыточное количество активных форм кислорода (АФК), является причиной систематического повреждения ДНК [94]. В нормальных условиях в организме постоянно образуются активные формы кислорода, такие, как супероксидный анион-радикал (O_2^-), гидроксил-радикал (OH^\cdot), гидропероксидный радикал (H_2O^\cdot), пероксид кислорода (H_2O_2) и др. [4].

АФК образуются в ходе нормального метаболизма в некоторых ферментативных системах. Одним из источников первичных радикалов являются фагоциты и тканевые макрофаги. АФК выполняют большое количество полезных функций. В качестве защитного механизма при различных инфекциях клетками иммунной системы используются реакции образования супероксидного анион-радикала и гипохлорита. Свободные радикалы, которые образуются в цитозоле клетки в ответ на стимуляцию факторами роста, участвуют в регуляции процесса пролиферации [102]. Оксид азота участвует в регуляции артериального давления [38].

Несмотря на важную роль образующихся в клетке АФК, их избыток вызывает окисление макромолекул в клетке, что приводит к повреждению клеточных структур и последующей гибели клеток. Для предотвращения потенциальной опасности в клетке существует многоуровневая система регуляции образования АФК. Тем не менее, антиоксидантная система зачастую не справляется со своей задачей, в результате чего в клетке образуется избыточное количество АФК, которые также повреждают компоненты этой системы, что приводит к нарушению ее функционирования. В 1985 году было введено понятие окислительного стресса, которое обозначает нарушение баланса между образованием АФК и работой антиоксидантной системы защиты [111].

В процессе окислительного стресса происходит повреждение основных клеточных структур, таких, как ДНК, липиды и белки. Известно более 20 типов повреждения молекулы ДНК во время окислительного стресса. Это различные повреждения азотистых оснований, возникновение одно- и двухцепочечных разрывов, сшивок между основаниями, хромосомные aberrации. Данные повреждения могут приводить к возникновению мутаций, которые возникают как напрямую, так и в результате ошибок репарации. Молекула ДНК может повреждаться гидроксид-радикалом. Основное повреждавшее действие на молекулу ДНК оказывает ОН-радикал, который

эффективно взаимодействует с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями, а также с остатками рибозы и дезоксирибозы [14].

Более избирательным действием обладает супероксид-анион, который взаимодействует с гуаниновыми основаниями, образуя его окисленные производные, в первую очередь, это 8-гидроксигуанин [13].

Теломерный повтор имеет большое количество остатков гуанина, благодаря чему происходит накопление 8-оксигуанина. Наличие 8-оксигуанина ингибирует активность теломеразы, уменьшает связывание теломерных белков с ДНК-последовательностью теломеров. Накопление 8-оксигуанина в отсутствие адекватной репарации приводит к одно- и двухцепочечным разрывам ДНК, которые вызывают нестабильность генома. Известно, что система репарации в районе теломерных концов ДНК работает значительно хуже, чем в геноме в целом. Все это приводит к нарушению длины теломеров [86].

Окисленная форма гуанина может блокировать репликационную вилку теломеров. Заблокированная или прерванная репликация приводит к разрыву ДНК последовательности. Кроме того, увеличивается длина нереплицированных фрагментов и нарушается связывание ДНК последовательности с белками шелтеринового комплекса. Наличие окисленного гуанина может привести к трансверсии АТ и GC после двух раундов репликации [86]. Наличие аденина может привести к нарушению связывания белков TRF1 и TRF2 с теломерной ДНК, препятствуя регуляции длины теломеров.

Следовательно, наличие 8-оксигуанина, который образуется в результате окислительного стресса, вызывает укорочение длины теломеров.

1.4.3. Механизмы регуляции длины теломерных повторов хромосом

Как было сказано выше, длина теломеров определяется множеством факторов, в том числе, и уровнем окислительного стресса [87,115], активностью теломеразы, изначальной длиной теломеров. Активность

теломеразы играет важную роль в регуляции длины. Так, клетки с короткими теломерами в отсутствие теломеразы стареют быстрее и апоптоз наступает быстрее, в отличие от клеток, в которых активность теломеразы сохранена [109,132]. Регуляция длины теломеров также зависит от активности белка Rad54, который поддерживает длину теломеров независимо от теломеразы [101].

В раковых клетках помимо экспрессии теломеразы найден ещё один механизм поддержания длины теломерных участков, так называемое, альтернативное удлинение теломеров (Alternative Lengthening of Telomeres или ALT). Этот механизм, включает гомологичную рекомбинацию теломерных участков сестринских хроматид. Более того, установлено, что данному механизму сопутствуют промиелоцитные лейкоемические тельца (promyelocytic leukemia (PML) bodies), которые включают теломеросвязывающие белки (т.е., TRF1 и TRF2) и теломерную ДНК. Данные тельца присутствуют только в клеточных линиях и опухолях, где работает такой механизм [25,139]. В последнее время было показано, что механизм альтернативного удлинения теломеров существует в нормальных соматических клетках млекопитающих. Скорость альтернативного удлинения теломеров, не превышает скорости деградации концевых отделов ДНК хромосом [24].

Регулирование длины теломеров зависит от уровня метилирования гистонов H2 и H3, связанных с субтеломерными регионами хромосом. Метилирование этих гистонов затрудняет доступ теломеразы к теломерным областям, уменьшая ее активность [32]. Следовательно, белки, которые участвуют в метилировании, влияют на длину теломеров. Так, белки ретинобластомы увеличивают уровень метилирования субтеломерных областей, при этом происходит уменьшение длины теломеров. В тоже время, белок ретинобластомы 2, который подавляет активность ДНК

метилтрансферазы, ответственной за метилирование субтеломерных регионов, играет важную роль в увеличении длины теломеров [37].

Было показано, что с теломеров при помощи РНК-полимеразы II транскрибируется теломерная РНК (TERRA или TelRNA), которая может иметь негативное влияние на длину теломеров [32]. Также, одним из основных механизмов укорочения теломеров является активность экзонуклеаз 5' -3' [127].

Еще одним из важных механизмов, влияющим на укорочение теломеров, является уровень свободных радикалов окислительного стресса. Окислительное повреждение теломерной ДНК появляется как образование аддукта гуанина, 8-oxodG, который инициирует нарушения в поддержании длины теломеров. Кроме того, АФК, и, особенно, гидроксильный радикал, вызывают разрывы ДНК и ухудшают репарацию ДНК [48]. В отличие от остальной части генома, теломеры, по-видимому, не могут восстанавливать однонитевые разрывы ДНК [90]. Из-за этого теломеры чувствительны к накоплению гуанин аддукта [67].

Показано, что одним из ключевых факторов укорочения теломерных участков является окислительный стресс, который сильнее воздействует на укорочение теломеров, чем репликативное старение. По причине высокого содержания гуанина в теломерах, последние очень чувствительны к активным формам кислорода (АФК). АФК вызывают одноцепочечные разрывы в теломерах, которые не могут быть устранены вследствие отсутствия необходимых ферментов. Также продемонстрировано, что антиоксидантная терапия способна противостоять укорочению теломеров и замедлять старение, защищая их от АФК. Таким образом, снижая действие окислительного стресса на организм, можно избежать ускоренного разрушения теломеров. Репликативное старение фибробластов человека в значительной степени зависит от стрессовых факторов. Было установлено, что репликативное старение и «раздевание» теломеров (telomere uncapping)

индуцирует образование одних и тех же сигналов, что и повреждения ДНК. Теломеры без белковой защитной оболочки (uncapped telomeres) активируют протеинкиназы и другие ферменты. Фосфорилирование гистонов способствует формированию локусов поврежденной ДНК (DNA damagefoci) вокруг «раздетых» теломеров, которые активируют киназы и p53- путь.

Результаты исследований предполагают, что возможно использовать антитела против данных локусов ДНК, которые будут являться маркерами старения клеток *in vivo* [57,126].

Таким образом, поддержание длины теломеров – это сложный процесс, в котором участвует множество факторов.

1.5. Влияние окислительного стресса и длины теломеров на процессы старения

Более пятидесяти лет тому назад D.Harman в США была высказана революционная идея о том, что свободно-радикальные реакции, вызывая повреждения клеточных структур, могут участвовать в механизме старения организма [55]. Практически одновременно F. Bernheim [33] обосновал представление о природных антиоксидантах, как регуляторах свободно-радикальных реакций в тканях, а Н.М. Эмануэль [17] высказал гипотезу о том, что свободные радикалы могут провоцировать возникновение и развитие различных патологических состояний. Регуляция свободно-радикального окисления в организме осуществляется хорошо сбалансированной системой, которая включает в себя неферментные реакции с участием низкомолекулярных «ловушек радикалов» и процессы с участием ферментов, утилизирующих активные формы кислорода или предотвращающие их образование [74]. Накопление АФК приводит к повреждению биополимеров: жирных кислот, нуклеиновых кислот и белков, что, в свою очередь вызывает метаболические нарушения и последующую гибель клеток. В частности, повреждение активными формами кислорода нуклеиновых кислот приводит к сокращению длины теломерной ДНК.

Теломеры у человека имеют максимальную длину при его рождении. Различия в длине теломеров у мальчиков и девочек не выявляются [75]. В течение жизни длина теломеров сокращается неравномерно. До подросткового возраста происходит значительное уменьшение длины, затем скорость укорочения теломеров замедляется. Еще в 1961 году Хейфликом было показано, что фибробласты эмбриона человека способны делиться только ограниченное количество раз (примерно 50 делений). После этого фибробласты теряли свою способность к пролиферации. Также было показано, что с увеличением возраста донора, количество делений, на которые способны фибробласты, уменьшается. Последняя фаза жизни клеток получила название «клеточное старение», а количество возможных делений клетки по автору получило название «предел Хейфлика» [56].

В процессе роста организма происходит укорочение теломеров и, таким образом, длина теломерной ДНК не является постоянной величиной. По данным одних авторов, с каждым клеточным циклом она уменьшается на 30-200 нуклеотидов [31], по данным других авторов с каждым клеточным делением она уменьшается на 50-800 нуклеотидов [44,54]. Длина теломерной ДНК является важной характеристикой. У человека она составляет 2-20 тысяч пар оснований (т.п.о.), в лейкоцитах периферической крови 5-12 т.п.о. Значительное укорочение теломерной ДНК приводит к тому, что клетка перестает делиться и умирает, а скорость укорочения теломеров напрямую влияет на скорость старения в целом.

Исходя из вышесказанного, можно предположить, что, чем короче теломеры, тем быстрее происходит старение организма. Существует корреляция между длиной теломеров и старением, как клеточной культуры, так и целого организма [47,50].

Длина фрагмента Оказаки составляет примерно 4-15 нуклеотидов (Frick D.N., Richardson C., 2001), в то время как укорочение теломеров за каждый раунд репликации составляет до 800 п.н. [44], что сопоставимо с

длиной Т-петли, составляющей 200-300 нуклеотидов [113], что в десятки раз превышает значения возможной потери ДНК теломеров при репликации с 3'-конца. Следует заметить, что если бы укорочение теломеров происходило бы только вследствие концевой недорепликации, то укорочение всех концов всех хромосом происходило бы равномерно, но в действительности в клетке происходит неравномерное укорочение концов хромосом [106], что также указывает на влияние нескольких факторов на уменьшение длины теломеров.

Механизмы укорочения теломеров можно разделить на две группы. К первой группе относится облигатный механизм, который происходит всегда, независимо от внешних условий. Так, во время митотического деления клеток, всегда происходит укорочение теломеров за счет концевой недорепликации 3'-конца (рис.4). Благодаря этому механизму объясняется ограниченное количество клеточных циклов. Ко второй группе относятся факультативные механизмы, при возникновении которых может произойти резкое укорочение теломеров. Воздействие таких эндогенных и экзогенных повреждающих агентов ДНК, как окислительный стресс, ультрафиолетовое облучение, воспаление могут привести к одномоментной потере значительных теломерных фрагментов [118,130]. К незапланированному уменьшению длины теломеров могут приводить экологические и психические стрессы. Показано, что воздействие на дрожжевые клетки таких экологических стрессов, как высокая температура, высокий уровень кофеина, а также низкое содержание гидроксимочевина ассоциировано с укорочением теломеров [104].

При исследовании скорости сокращения теломерной ДНК в условиях окислительного стресса, вызванного различными концентрациями кислорода в культурах человеческих фибробластов, показана прямая зависимость скорости сокращения теломерной ДНК от уровня АФК, причем, скорость сокращения теломерной ДНК не зависела от возраста донора, а также от происхождения фибробластов [100].

Исследования, проведенные в различных странах, показывают развитие окислительного стресса у лиц, находящихся длительное время в местах с высокой концентрацией выхлопных газов [21,34, 61]. Известно, что выхлопные газы содержат высокий уровень угарного газа. Однако, эти исследования не затрагивали измерение длины теломерной ДНК. Можно предположить, что выхлопные газы, а также его отдельные составляющие могут вызывать развитие окислительного стресса, тем самым вызвав ускоренное сокращение теломерной ДНК.

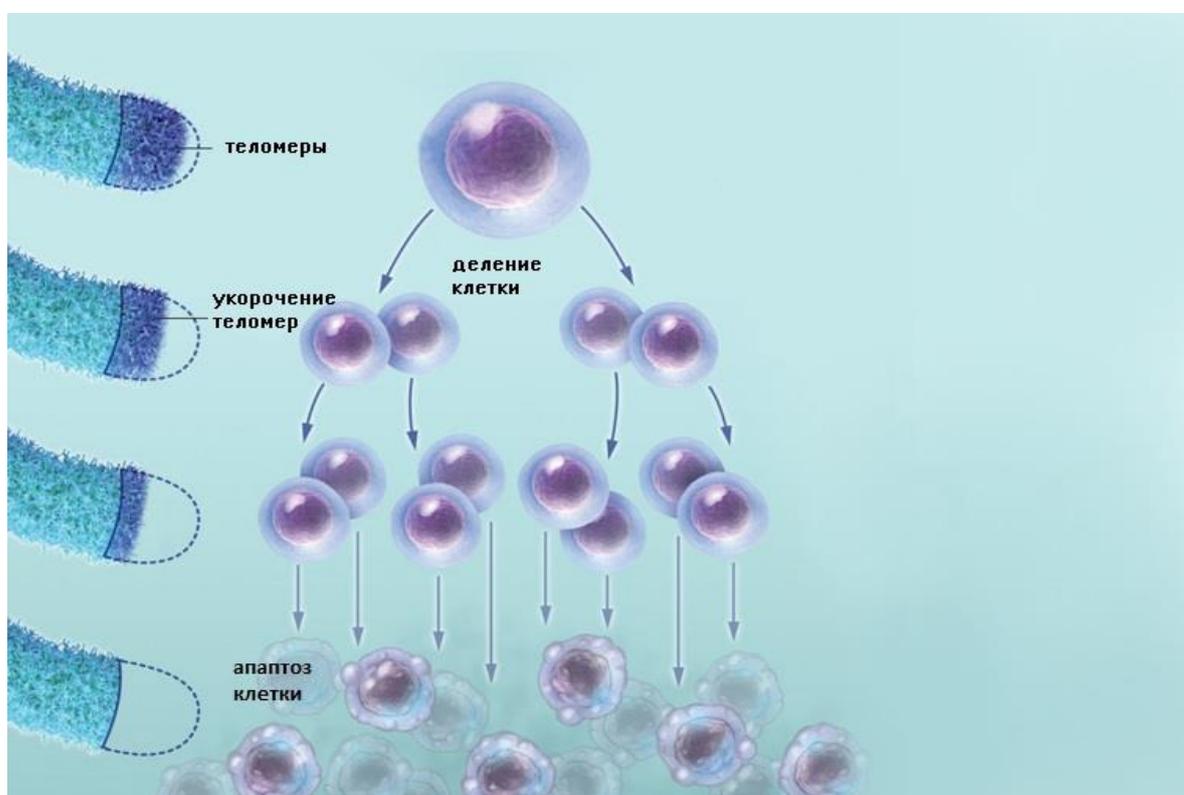


Рисунок 4 – Укорочение теломеров при митотическом делении клетки (модифицированный – URL: <http://www.buzzle.com/articles/is-there-a-connection-between-longevity-and-telomeres.html>)

Известно, что загрязнение воздуха твердыми частицами, вызывают развитие окислительного стресса, что, в свою очередь, приводит к сокращению длины теломеров [52]. Ускоренное сокращение теломеров

вызывает раннее старение клеток, что, в свою очередь, может ускорить биологическое старение и вызвать развитие различных возрастных патологий, таких, как сердечно - сосудистые заболевания, включая атеросклероз.

Изменения экологических факторов и аномальные повышения температурного фона могут приводить к развитию окислительного стресса, сопровождающегося укорочением теломеров, что, в свою очередь, может являться фактором преждевременного старения.

Таким образом, теломеры укорачиваются с возрастом, а скорость укорочения теломеров может указывать на темпы старения.

1.6. Окислительный стресс и длина теломеров при некоторых заболеваниях невоспалительного генеза

Пожилой возраст является фактором риска развития целого ряда хронических заболеваний, в том числе, и сердечно - сосудистых. Ускоренное «биологическое старение» взаимосвязано с риском развития ряда возрастных болезней, в том числе, сердечно - сосудистых заболеваний, рассеянного склероза, сахарного диабета 2-го типа и разных типов рака и др. [58].

С увеличением возраста происходит естественное клеточное старение, которому в большей степени подвержены гладкомышечные клетки сосудов, эндотелиальные клетки, моноциты и макрофаги в атеросклеротических бляшках [80]. Сокращение теломерной ДНК быстрее происходит в районе атеросклеротического поражения сонных артерий и аортального клапана [121], что свидетельствует о связи между клеточным старением и атеросклерозом. Секреторная деятельность эндотелиальных клеток способствует дегенеративным и пролиферативным возрастным изменениям, вызывая состояние хронического воспаления [97]. Хроническое воспаление вызывает развитие окислительного стресса [129], повреждение ДНК и, как следствие, происходит сокращение теломерной ДНК.

Образование липидных отложений в артериях при атеросклерозе происходит при нерегулируемом захвате богатых холестерином липопротеидов низкой плотности (ЛНП) макрофагами стенки сосудов. В результате, макрофаги превращаются в перегруженные липидами «пенистые клетки» и образуют зону липоидоза – первичное предатерогенное повреждение стенки сосуда [74]. В работах M.S. Goldstein и J.L. Brown было показано, что химически модифицированные частицы ЛНП – ацетилированные ЛНП – захватываются макрофагами более эффективно, чем нативные частицы ЛНП, поскольку этот процесс осуществляется с участием особых «скевенджер-рецепторов» [39]. Интенсификация перекисного окисления липидов способствует увеличению в плазме крови уровня малонового диальдегида (МДА), который является вторичным продуктом свободно-радикального окисления полиеновых липидов и образуется при окислительной деструкции первичных продуктов окисления – липогидропероксидов [72]. Было показано, что модифицированные МДА частицы ЛНП поглощаются макрофагами человека в культуре клеток более эффективно, чем нативные ЛНП [77]. Окисленные ЛНП являются более атерогенными (более интенсивно захватываются макрофагами), чем неокисленные ЛНП [140]. Содержание МДА в крови больных атеросклерозом значительно увеличено. Так, содержание липогидропероксидов в ЛНП больных атеросклерозом без гиперхолестеринемии более, чем в 4 раза выше, чем у практически здоровых лиц того же возраста, а у больных с гиперхолестеринемией – более, чем в 8 раз выше, чем в контроле [70].

Скорость сокращения теломерной ДНК зависит как от генетических факторов, так и от внешних. Это моделирует биологическое старение, влияющее на риск развития возраст зависимых заболеваний.

При эпидемиологическом исследовании, включившем в себя определение длины теломеров примерно 1500 практически здоровых

человек, было показано, что в группе лиц с более короткими теломерами впоследствии достоверно чаще развивались сердечно-сосудистые события [123]. Данный факт доказывает, что средняя длина теломеров лейкоцитов является независимым предиктором ССЗ, а не их следствием.

Другое исследование показало, что для лиц старше 60 лет уменьшение длины теломеров ниже средних значений ассоциируется с увеличением смертности более, чем в три раза в течение последующих 9 лет [30]. Также было показана взаимосвязь между короткими теломерами и повышенным риском инфаркта миокарда для лиц, моложе 50 лет [141]. Достоверное снижение длины теломеров ниже средних возрастных показателей было показано у больных кардиомиопатией старше 60 лет [58]. Укорочение теломерной ДНК может способствовать развитию ССЗ путем активации апоптоза клеток миокарда [29,82].

Вероятно, семейная предрасположенность к ССЗ может быть связана с длиной теломеров. Была измерена длина теломерной ДНК лейкоцитов крови у пациентов с ишемической болезнью сердца, а также у их детей, и у здоровых доноров и их детей. Показано достоверное уменьшение длины теломерной ДНК в группе лиц с отягощенным анамнезом по сравнению с контрольной группой [122].

Большинство исследований длины теломерной ДНК производится на лейкоцитах периферической крови. Было проведено сравнение скорости укорочения теломерной ДНК в различных типах клеток. В результате показано, что скорость сокращения теломерной ДНК в различных типах клеток сходна. Это позволяет использовать легкодоступные клетки лейкоцитов крови для оценки длины теломерной ДНК [28].

Нокаутные мыши по ферменту теломеразы имеют высокую скорость укорочения теломерной ДНК. Для этих мышей характерно снижение скорости деления миоцитов, высокий уровень апоптоза, а также гипертрофия миокарда и изменения в сердце, характерные для дилатационной

кардиомиопатии человека в стадии декомпенсации [19]. Данные факты свидетельствуют, что теломеры могут играть важную роль в развитии ССЗ, ускоряя процессы клеточного старения и апоптоза.

При СД 2 типа происходит укорочение длины теломеров значительно сильнее, чем при ССЗ [142]. Шансы развития СД 2 типа в группе с короткими теломерами в пять раз выше по отношению к группе с длинными теломерами [103]. Развитие СД 2 типа сопровождается увеличением окислительного стресса. При неконтролируемой гипергликемии происходит значительное сокращение длины теломеров, тогда как при тщательном контроле за нормальным уровнем сахара в крови происходит снижение скорости сокращения теломеров [142]. При диабетической гипергликемии создаются дополнительные возможности для образования активных форм кислорода и интенсификации свободно-радикального окисления ЛНП с их последующей атерогенной карбонильной модификацией [5]. В крови больных СД2 снижен уровень активности антиоксидантных ферментов, что является еще одним фактором, провоцирующим возникновение окислительного стресса [22].

Таким образом, окислительное повреждение теломеров может являться одним из основных факторов регуляции длины теломеров, способствуя, тем самым, развитию различных сердечно - сосудистых заболеваний (ССЗ).

1.7. Влияние аномальных факторов окружающей среды на здоровье человека

В последние годы изменение климата является одним из важных факторов, оказывающих влияние на здоровье и смертность населения, как нашей страны, так и мира в целом. По оценкам ВОЗ, климатические изменения в настоящее время являются причиной примерно 150 тысяч преждевременных случаев смерти [15].

Потепление климата существенно повышает риск возникновения пожаров, в том числе, торфяных и лесных, в результате чего происходит рост концентраций загрязняющих веществ в атмосферном воздухе.

В частности, при горении торфяников в Подмосковье летом 2010 года уровень угарного газа во вдыхаемом воздухе превышал предельно допустимые концентрации в 2,2 раза [128]. Показано, что при увеличении максимальной дневной температуры на 10⁰С показатель общей смертности возрастает на 8%. Так, во время летней жары 2003 года в Европе, смертность возросла до 60% в разных странах (табл.1).

Таблица 1 – Увеличение уровня смертности в европейских странах за период аномально высокой температуры лета 2002 года

| Страна | Увеличение уровня смертности (% к соответствующему периоду 2002 года) | Ссылка |
|------------|---|--------|
| Англия | 2091 смерть (17%) за период 4-13 августа | [46] |
| Италия | 3134 (15%) за период 1 июля-15 августа | [16] |
| Франция | 14 802 (60%) за период 1-20 августа | [84] |
| Португалия | 1854 (40 %) за август | [81] |
| Испания | 4151 (11%) за июль и август | [9] |

Для России самым аномальным периодом жары стало лето 2010 в г. Москве. Постоянная волна жары со среднесуточной температурой выше 25⁰С наблюдалась 40 дней [15]. В результате в июле – августе 2010 года превышение уровня смертности в Москве по сравнению с 2009 годом составило 11 тысяч случаев, или 55% (рис.5) [16].

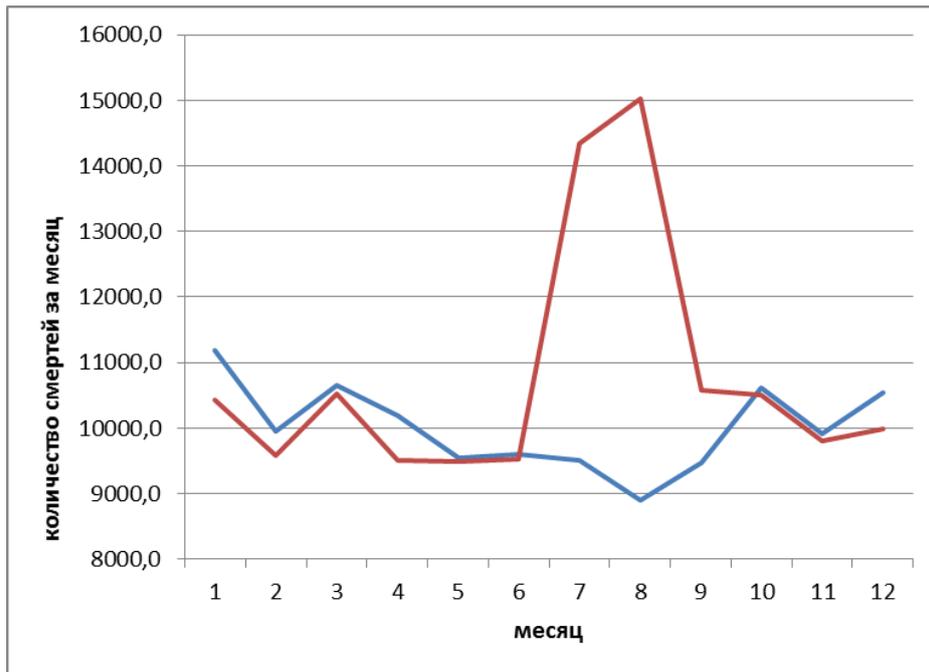


Рисунок 5 – Сравнение числа умерших за 2009 и 2010 гг. по месяцам в г. Москве. Резкое увеличение уровня смертности за июль-август 2010 года в г. Москве по сравнению с аналогичным периодом 2009 г.

В последнее время увеличилось количество исследований, направленных на изучение влияния климатических изменений на организм человека, однако не показано, влияние этих изменений на ДНК.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в отделе сердечно - сосудистой патологии (руководитель – проф., д.м.н. Тихазе А.К.) НИИ кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» МЗ РФ.

2.1. Клиническая характеристика участников исследования

2.1.1. Общая характеристика больных

Всего в исследование было включено 635 пациентов в возрасте от 18 до 69 лет (рис.6). Из них:

- 1) 629 человек проходили обследование ФГБУ «РКНПК» МЗ РФ по теме государственного контракта «Апробация и внедрение в практику амбулаторно-поликлинических учреждений новых алгоритмов предупреждения, диагностики и лечения атеросклероза на примере ЗАО г. Москвы» по научно-технической программе «Разработка и практическое освоение в здравоохранении новых методов и средств профилактики, диагностики и лечения атеросклероза и его осложнений»,
- 2) 6 здоровых добровольцев – участники климатического исследования, проводимого на базе медико-технического комплекса (МТК) Института медико-биологических проблем РАН.
- 3) По результатам клинического обследования была сформирована группа сравнения (N=187), в которую вошли 181 пациент из первой группы с низким и умеренным риском развития сердечно - сосудистой смерти по шкале SCORE, а также из 6 добровольцев климатического исследования. В группу сравнения были включены практически здоровые лица с нормальными значениями АД.

Из группы, проходившей обследование в ФГБУ «РКНПК» МЗ РФ 258 человек были опрошены через 5 лет об осложнениях различной этиологии за прошедший период.



Рисунок 6 – Распределение участников исследования по группам

Во всей исследуемой группе (635 человек) преобладали женщины (62,1%). Средний возраст больных составил $51,4 \pm 14$ года. Артериальной гипертонией страдало около $\frac{3}{4}$ пациентов, 74 человека перенесли ИМ. 146 человек курили в прошлом или настоящем. Примерно $\frac{1}{3}$ обследуемых страдали ожирением. Данные представлены в таблице 2.

Артериальную гипертонию диагностировали на основании рекомендаций [9].

Семейный анамнез по ССЗ считался отягощенным при указании на инфаркт миокарда, внезапную сердечную смерть или инсульт у родственников первой линии: у мужчин до 55 лет и женщин до 65 лет [2].

У всех больных был рассчитан индекс массы тела как отношение массы тела в кг к росту в метрах, выраженному в m^2 . Ожирение диагностировали при индексе массы тела свыше $30 \text{ кг}/m^2$.

Таблица 2 – Клинико-демографическая характеристика пациентов

| | |
|-------------------------------------|-----------------------|
| Мужчины/женщины, n (%) | 241/394 (37,9%/62,1%) |
| Возраст, лет (M±SD),(min÷max) | 51,4±14 (18÷75) |
| ИМТ, M±SD | 29,6±4,8 |
| Ожирение (ИМТ≥30) | 232 (36,5%) |
| Курение, n (%) | 146 (23%) |
| АГ, n (%) | 468 (76,2%) |
| ИМ | 74 (11,7%) |
| Отягощенный семейный анамнез, n (%) | 353 (55,6%) |
| Условно здоровые, n (%) | 187 (29,5%) |

Если у пациента концентрация ОХС превышала 5,0 ммоль/л и/или уровень триглицеридов был более 1,7 ммоль/л, диагностировали дислипидемию.

Все обследованные пациенты были разделены на три группы:

- 1) группа низкого/умеренного риска развития сердечно - сосудистой смерти по шкале SCORE. Средний возраст составил 49±7,3 лет;
- 2) группа высокого/очень высокого риска развития сердечно - сосудистой смерти по шкале SCORE. Средний возраст составил 57,7±5,4 лет;
- 3) группа с клиническими проявлениями ИБС (стенокардия, перенесенный ИМ, реваскуляризация миокарда). Средний возраст составил 60,6±6 лет.

Группы были сопоставимы по количественному составу. Однако, по возрастному составу между группами показаны достоверные ($p<0,01$) различия.

258 пациентов были опрошены по телефону о сердечно - сосудистых осложнениях, которые у них наблюдались в течение пяти лет после обследования.

2.1.2 Характеристика добровольцев, включенных в исследование по влиянию искусственно созданных экстремальных климатических условий

В исследование, которое проводили на базе медико-технического комплекса (МТК) Института медико-биологических проблем РАН, было включено 6 практически здоровых добровольцев мужского пола в возрасте от 22 до 46 лет. Все испытуемые прошли предварительное медицинское обследование и подписали информированное согласие на участие в исследовании. Предварительное обследование проводилось на базе ФГБУ «РКНПК» МЗ РФ.

Критерии исключения:

- Любое диагностированное хроническое заболевание, требующее постоянного приема препаратов
- АД > 140/90 мм рт.ст.
- ИБС
- Хроническая сердечная недостаточность
- Пороки сердца любой этиологии
- Нарушения ритма сердца и проводимости: постоянная и пароксизмальная форма мерцательной аритмии; жизнеопасные желудочковые нарушения ритма сердца; дисфункция синусового узла, АВ-блокада II-III степени
- Нарушение мозгового кровообращения в анамнезе
- Хроническая почечная недостаточность

- Хроническая печеночная недостаточность
- Хронические заболевания лёгких
- Участие в каком-либо ином клиническом исследовании.

МТК был предназначен для проведения исследований испытуемых в условиях искусственно регулируемой среды обитания. МТК состоит из жилого и медицинского модулей. В жилом модуле расположены 6 изолированных помещений для индивидуального проживания (площадь помещения по полу 3,1-3,5 м²), кухни-столовой на шесть человек, кают-компания (площадь ~ 15,5 м²), главного пульта управления и санузла. Общая площадь ~ 59 м². Жилой модуль соединён герметичными шлюзами с медицинским модулем, где проводились медицинские обследования и исследования. Медицинский модуль разделен на три зоны: лабораторию, процедурную зону и изолятор, и две вспомогательные: кухню и санузел (рис.7).

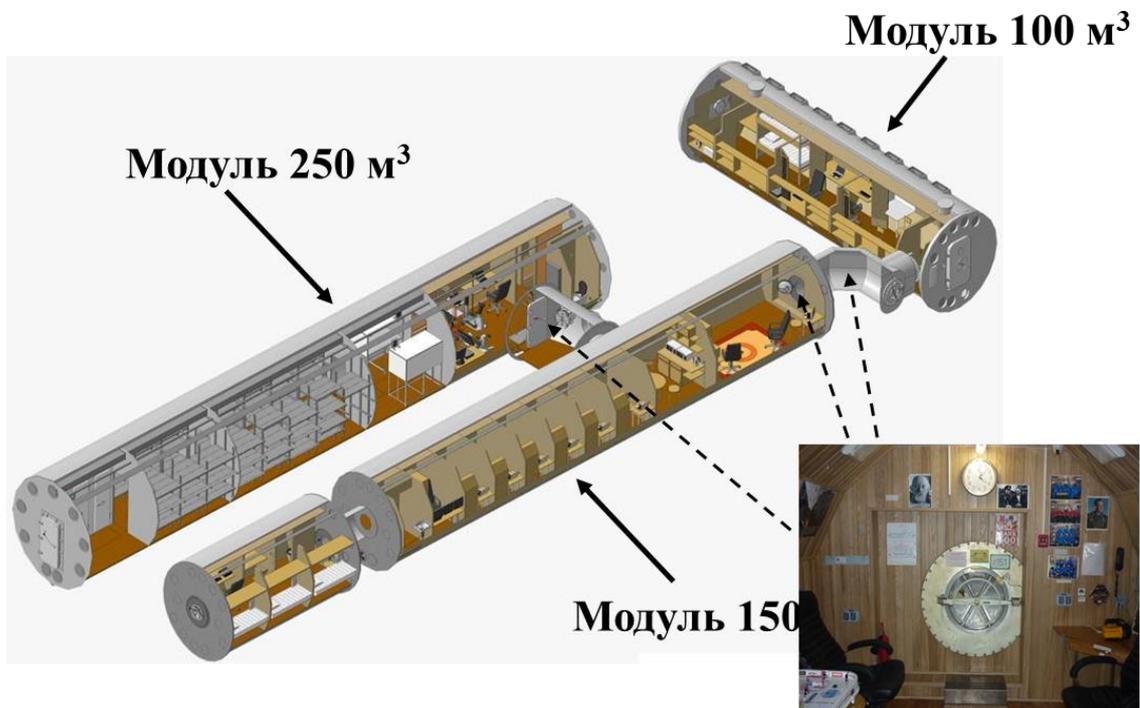


Рисунок 7 – Экспериментальный модуль медико-технического комплекса

В период нахождения испытуемых в МТК все перемещения между помещениями были строго регламентированы для предотвращения нарушений установленных параметров обитания; нормативный уровень микробной обсемененности газовой среды поддерживался за счет работы установки для обеззараживания воздуха (рис.7).

Условия проведения эксперимента были утверждены на этическом комитете НИИКК «РКНПК» МЗ РФ и ГНЦ РФ ИМБП РАН и соответствовали Хельсинской декларации по защите прав пациентов.

В течение 30 дней добровольцы проживали в МТК при искусственно созданных климатических условиях, соответствующих июлю-августу 2010 г. на территории г. Москвы, в соответствии с данными Росгидромета РФ. Условия проживания представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Условия проживания добровольцев в медико-техническом комплексе

| Сутки исследования | Т° С День (9-24 час) | Т° С Ночь (24-9) | Атм. Давл. | Влажность % День (9-24) | Влажность % Ночь (24-9) |
|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|-----------------------|--|--|
| 1 | 32 | 28 | 749 | 50 | 70 |
| 2 | 33 | 28 | 750 | 50 | 70 |
| 3 | 35 | 30 | 749 | 50 | 70 |
| 4 | 31 | 28 | 749 | 60 | 70 |
| 5 | 30 | 28 | 750 | 50 | 60 |
| 6 | 31 | 26 | 749 | 60 | 70 |
| 7 | 31 | 27 | 749 | 55 | 75 |
| 8 | 35 | 29 | 749 | 50 | 75 |
| 9 | 36 | 28 | 748 | 40 | 75 |
| 10 | 36 | 27 | 746 | 40 | 70 |
| 11 | 35 | 23 | 746 | 40 | 70 |

| Продолжение таблицы 3 | | | | | |
|------------------------------|----|----|-----|----|----|
| 12 | 37 | 29 | 748 | 40 | 70 |
| 13 | 33 | 30 | 750 | 35 | 50 |
| 14 | 37 | 31 | 746 | 40 | 50 |
| 15 | 38 | 27 | 743 | 50 | 60 |
| 16 | 31 | 25 | 749 | 50 | 70 |
| 17 | 33 | 26 | 751 | 60 | 75 |
| 18 | 30 | 27 | 750 | 40 | 60 |
| 19 | 35 | 31 | 747 | 50 | 60 |
| 20 | 34 | 29 | 747 | 30 | 70 |
| 21 | 37 | 30 | 746 | 40 | 60 |
| 22 | 36 | 29 | 748 | 50 | 75 |
| 23 | 36 | 27 | 752 | 60 | 75 |
| 24 | 35 | 26 | 753 | 40 | 70 |
| 25 | 36 | 27 | 751 | 40 | 75 |
| 26 | 35 | 30 | 749 | 45 | 75 |
| 27 | 32 | 27 | 748 | 40 | 75 |
| 28 | 33 | 29 | 750 | 35 | 75 |
| 29 | 30 | 29 | 750 | 40 | 75 |
| 30 | 28 | 26 | 750 | 35 | 70 |
| 31 | 27 | 26 | 750 | 35 | 65 |

Забор венозной крови для выделения ДНК и определения показателей окислительного стресса производился: за 4 месяца до начала исследования, на 1, 10, 20 и 31-й день, а также через 1 год после окончания исследования.

После завершения основного этапа испытуемые были переведены в ФГБУ «РКНПК» МЗ РФ для дальнейшего наблюдения и контрольного обследования.

2.2. Биохимические методы исследования

2.2.1. Выделение ЛНП

ЛНП выделяли методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности. Для этого к сыворотке добавляли NaBr из расчета 0,5 г на 1 мл сыворотки. Полученный раствор разливали в центрифужные пробирки фирмы Beckman, сверху аккуратно наслаивали раствор NaBr-PBS (16,33г NaBr на 1 л PBS pH 7,4). Центрифугирование проводили в течение 2 часов при 41000 об/мин на ультрацентрифуге L8-M (ротор 50 Ti Beckman), затем отбирали образовавшийся верхний слой, содержащий ЛНП. На отобранный верхний слой, содержащий ЛНП, повторно наслаивали NaBr-PBS и центрифугировали при тех же условиях. Отбирали супернатант, содержащий ЛНП, и проводили диализ в течение ночи при 4 0С против 2000 объемов PBS pH 7,4. После диализа ЛНП фильтровали через фильтры с диаметром пор 0,45 мкм [26]. Концентрацию белка в препаратах ЛНП определяли по методу Лоури [95], в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин.

2.2.2. Определение уровня окисленных липопротеидов низкой плотности

Содержание окисленных липопротеидов низкой плотности в плазме крови пациентов определяли иммунобиохимическим методом, используя тест наборы Mercodia (Швеция). Данный метод разработан как твердофазный иммуноферментный анализ, в основе которого лежит принцип взаимодействия двух типов моноклональных антител против различных антигенных детерминант молекулы окисленного аполипопротеина В.

Перед началом исследования необходимо нагреть до комнатной температуры все образцы и реагенты, затем развести образцы до конечного разведения в 6561 раз. Разведение проводится в два этапа. На первом этапе

берется 10 мкл тщательно перемешанного образца и 800 мкл буфера для образцов. Полученный раствор перемешать на вортексе, отобрать 10 мкл и добавить 800 мкл буфера для образцов.

Внести по 25 мкл калибратора, контролей и образцов в соответствующие лунки стрипов, добавить 100 мкл буфера для анализа и инкубировать полученные растворы при постоянном помешивании в течение 2 часов при комнатной температуре. Во время инкубации окЛНП образца взаимодействуют с антителами к окЛНП, которые иммобилизованы в лунках планшета. После проведения инкубации необходимо провести промывку планшета для удаления не прореагировавших компонентов плазмы с использованием конъюгата антител к аполипопротеину В, узнающих окЛНП, связавшиеся с твердой фазой лунок. Промывка проводится 6 раз, для этого удаляется содержимое лунок и затем вносится по 350 мкл промывочного раствора. После последней промывки остатки жидкости удаляются при помощи энергичного постукивания перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге. Затем в каждую лунку вносится по 100 мкл ферментного конъюгата с последующей инкубацией образцов в течение 1 часа при постоянном помешивании при комнатной температуре. По окончании инкубации проводится промывка, как описано выше. В ходе этой промывки удаляются несвязавшиеся антитела, меченые ферментом. После промывок необходимо внести в каждую лунку по 100 мкл субстрата ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) и инкубировать в течение 15 минут при комнатной температуре без встряхивания. После этого необходимо добавить по 50 мкл стоп-реагента в каждую лунку и хорошо перемешать жидкости на шейкере в течение 5-7 секунд. Оптическую плотность полученного раствора необходимо измерить при 450 нм, не позднее 30 минут после остановки реакции.

Концентрация окЛНП рассчитывается с использованием калибровочной кривой, где на оси Y откладывается оптическая плотность

калибраторов, а по оси X – концентрация окЛНП. Калибровочную кривую необходимо строить при каждом проведении анализа. По построенной калибровочной кривой определяется концентрация контролей и исследуемых образцов, которую необходимо умножить на коэффициент разведения, равный 6561. Измерение концентрации каждого образца производится дважды.

2.2.3. Определение содержания малонового диальдегида в плазме крови

Содержание МДА оценивали по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой, анализируя количество образовавшегося триметинового комплекса, с регистрацией оптической плотности при длине волны 532 нм на спектрофотометре Hitachi-557 и выражали в ΔD 532 на 1 мл плазмы [10].

Для определения содержания МДА в 30 опытных образцах плазмы крови, 150 мг тиобарбитуровой кислоты растворяли в 31 мл дистиллированной воды и нагревали до +60С в течение 10-15 минут. Затем полученный раствор охлаждали до комнатной температуры. Раствор стабилен при температуре +2- 8С в течение 2-х месяцев. Выпадение осадка при хранении не влияет на качество раствора, его можно использовать после растворения осадка.

Ортофосфорную кислоту (1,4%) и Н-Бутанол вносили в пробирки по схеме, представленной в таблице 4.

После внесения н-Бутанола пробирки интенсивно встряхивали до образования белой суспензии, имеющей розовый оттенок. Затем пробы центрифугировали 10 мин при 3000об/мин (1800g). Если после центрифугирования верхний слой бутанола не прозрачен, необходимо повторить центрифугирование, предварительно перемешав верхний слой бутанола стеклянной палочкой (табл. 4).

Таблица 4 – Схема внесения реактивов для определения содержания МДА в плазме крови

| Отмерить, мл | Опытная проба, мл | Контрольная (холостая) проба, мл |
|--|-------------------|----------------------------------|
| Ортофосфорная кислота | 3,0 | 3,0 |
| Плазма крови | 0,25 | нет |
| Дистиллированная вода | нет | 0,25 |
| Раствор ТБК | 1,0 | 1,0 |
| Пробирки накрывали конденсирующими колпачками и помещали в водяную баню на 45 минут при 100С, после чего пробирки охлаждали в холодной воде 3-5 минут и добавляли н-Бутанол. | | |
| Н-Бутанол | 4,0 | 4,0 |

Сразу после центрифугирования отбирали 3 мл супернатанта в чистую пробирку и измеряли оптическую плотность опытной пробы против холостой пробы при двух длинах волн: 535 и 570 нм в кювете с толщиной оптического пути 10 мм. Измерения необходимо провести в течение 1,5 часов после центрифугирования.

Расчет содержания ТБК-активных продуктов проводился по формуле:

$$C = (D_{535} - D_{570}) / 0,156 \times 16$$

Где: С – концентрация МДА в опытной пробе в мкмоль/литр;

D_{535} – оптическая плотность при 535 нм;

D_{570} – оптическая плотность при 570 нм;

0,156 – коэффициент молярной экстинкции комплекса триметинового комплекса (розовое окрашивание) ($\text{мкмоль}^{-1}/\text{см}^{-1}$)

16 – коэффициент разведения плазмы крови.

2.3. Генетические методы исследования

2.3.1. Выделение ДНК из замороженной цельной крови

В работе использовали ДНК, выделенную из лимфоцитов периферической крови. При заборе крови использовали вакутейнеры, содержащие антикоагулянт ЭДТА. ДНК выделяли с использованием набора для выделения ДНК «ДНК-Экстран1» (ЗАО «Синтол» Россия).

Для этого пробирку с кровью тщательно перемешивали пипетированием. Во избежание скопления осадка ядродержащих клеток на дне пробирки, отбирали 300 мкл крови и смешивали с 900 мкл лизирующего буфера. Полученную смесь перемешивали переворачиванием пробирки 8-10 раз и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут при периодическом перемешивании. После инкубации проводили центрифугирование в течение 2 минут при скорости 13000 оборотов в минуту. Удаляли супернатант и оставляли 20 мкл надосадочной жидкости. К видимому осадку ядродержащих клеток добавляли 300 мкл лизирующего буфера и 10 мкл протеиназы К концентрации 10мг/мл. При помощи пипетирования разбивали осадок. Полученную смесь инкубировали при температуре 60⁰С в течение 20-30 минут и охлаждали на льду в течение 1-2 минут. К полученному лизату добавляли 100 мкл охлажденного на льду осаждающего раствора и тщательно перемешивали на вортексе до появления хлопьев. После этого, проводили центрифугирование в течение 2 минут при скорости 13000 оборотов в минуту. Супернатант, содержащий ДНК, переносили в чистую пробирку и добавляли равный объем осаждающего раствора. Содержимое пробирки перемешивали переворачиванием до появления видимых нитей ДНК. Центрифугировали в течение 2 минут при скорости 13000 оборотов в минуту. Осторожно сливали супернатант, следя за осадком ДНК. Высушили осадок ДНК в открытой пробирке при комнатной температуре в течение 1-2 минут. К осадку добавляли 400 мкл промывочного раствора, предварительного охлажденного до -20⁰С и перемешивали

содержимое, переворачивая пробирку 10-12 раз. Центрифугировали в течение 2 минут при скорости 13000 оборотов в минуту и аккуратно удаляли супернатант, следя за осадком ДНК. Высушивали открытые пробирки с осадком ДНК при комнатной температуре до полного испарения спирта. К осадку добавляли 100 мкл элюирующего раствора, прогретого до температуры 65⁰С, перемешивали и прогревали при 65⁰С 5 минут до полного растворения ДНК. Измерение концентрации ДНК проводили при помощи нанофотометра IMPLEN (Германия). Полученный раствор ДНК хранили при температуре -20⁰С.

2.3.2. Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени

Для измерения относительной длины теломеров в лейкоцитах крови использовали метод количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Реакционная смесь содержала: 20 нг ДНК, 10 мкл смеси SIBR Green, по 1 мкл праймеров telg, telc, albu, albd (концентрация 900нМ каждого) (табл. 5.).

Полученную смесь доводили до объема 25 мкл деонизированной водой.

Реакционная смесь для каждого образца содержала как праймеры для теломерной ДНК, так и праймеры для гена альбумина.

Температура гибридизации праймеров к теломерным повторам составляла 74⁰С, а температура гибридизации праймеров к альбумину составляла 84⁰С. Альбумин служил внутренним контролем, относительно которого определяли длину теломерного повтора.

В качестве негативного контроля мы использовали реакционную смесь, не содержащую ДНК, с двумя парами праймеров, а также реакционную смесь, содержащую только специфические праймеры для гена альбумина.

Таблица 5 – Нуклеотидные последовательности праймеров для определения ОДТ

| | Нуклеотидная последовательность праймера |
|------|--|
| Telg | 5'-АСАСТААGGТТТGGGТТТGGGТТТGGGТТТGGGТТАGТGT-3' |
| Telc | 3'-TGТТАGГТАТСССТАТСССТАТСССТАТСССТАТСССТААСА-5' |
| albu | 5'-CGGCGGGCGGGCGGGCGGGCTGGGGCGGaaatgctgcacagaatccttg -3' |
| albd | 3'-GCCCCGGCCCCGCCGCGCCCCGTCCCCGCCGgaaaagcatggtcgctgtt-5' |

Амплификацию в реальном времени проводили на анализаторе нуклеиновых кислот «АНК-32» (Россия) в следующем режиме [40]:

- Денатурация ДНК: 15мин 95⁰С
- Синтез синтетической матрицы теломерного повтора: 2 цикла 15сек 94⁰С, 15сек 49⁰С.
- Амплификация теломерного повтора и гена альбумина: 50 циклов 15 сек 94⁰С, 10 сек 62⁰С, 15 сек 74⁰С, 10 сек 84⁰С, 15 сек 88⁰С (рис.8).

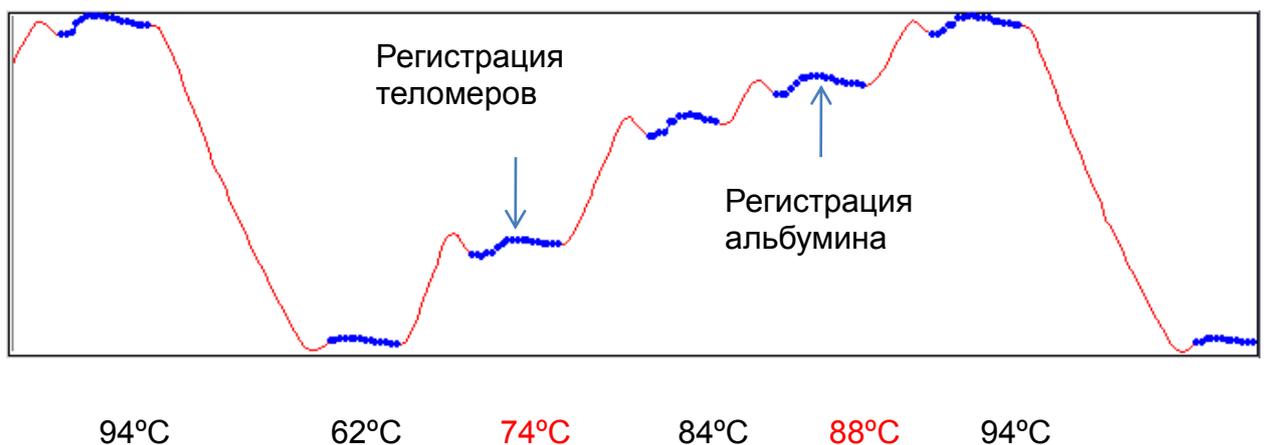


Рисунок 8 – Температурная кривая одного цикла ПЦР-РВ

Синтез матрицы теломерного повтора происходит следующим образом: на первом цикле происходила гибридизация праймера Telg и дальнейший матричный синтез с места его прикрепления. Праймер Telc сконструирован таким образом, что его 3'-концевой нуклеотид не комплементарен нативной цепи ДНК, вследствие чего синтез второй цепи ДНК в направлении 5'-3' на этом этапе не осуществляется. Продукт, полученный путем синтеза в направлении 3'-5' с праймера Telg полностью комплементарен праймеру Telc. В результате синтезируется двухцепочечная матрица, с которой происходит дальнейшая амплификация ДНК продукта [40].

2.3.3. Расчет относительной длины теломеров

Кривые накопления продукта, полученные в процессе ПЦР в реальном времени, были подвергнуты математической обработке. Нами был разработан метод математической обработки данных, который ранее не был описан в литературе.

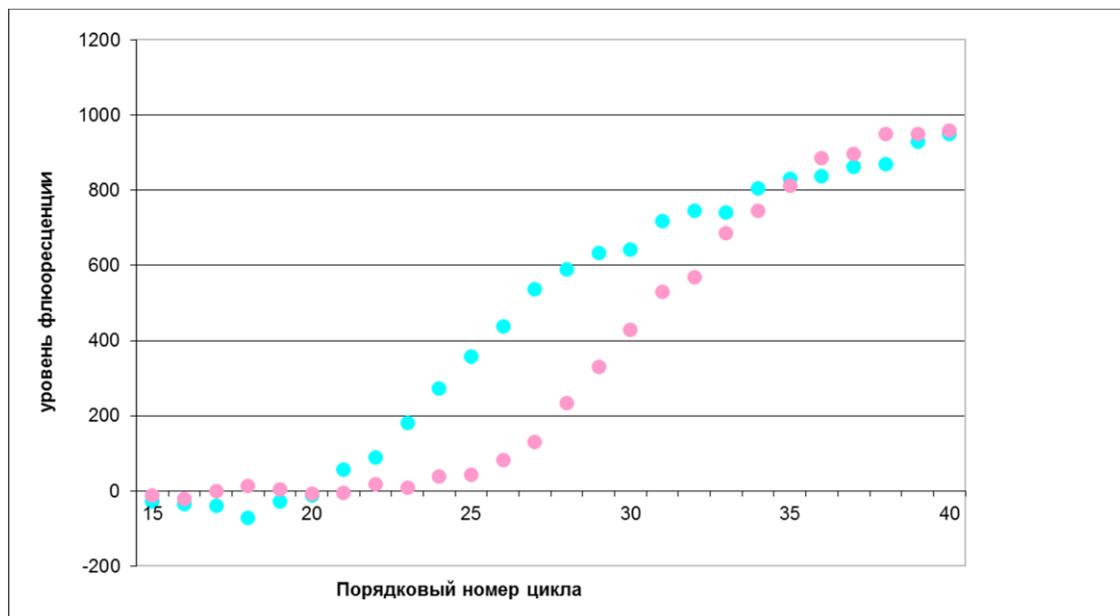


Рисунок 9 – Рост флюоресценции для теломерных повторов и для альбумина после математической обработки. Голубым цветом показана кривая роста флюоресценции теломеров, розовым цветом показана кривая роста уровня флюоресценции альбумина

Показания уровня флюоресценции для теломеров снимали при температуре 74°C, а для альбумина 88°C. Для этого, перейдя в режим ручной обработки данных, мы снимали показания уровня флюоресценции для всех точек всех циклов. Далее, эти значения переносили в программу Microsoft Office Excel и выделяли те показания флюоресценции, которые соответствовали температуре 74°C (для теломеров) и 88°C для альбумина. На основании полученных показаний мы строили две отдельные кривые роста уровня флюоресценции для теломеров и для альбумина (рис. 9).

Полученные данные использовали для построения логарифмических прямых, расстояние между которыми определялось как ΔCT (рис. 10).

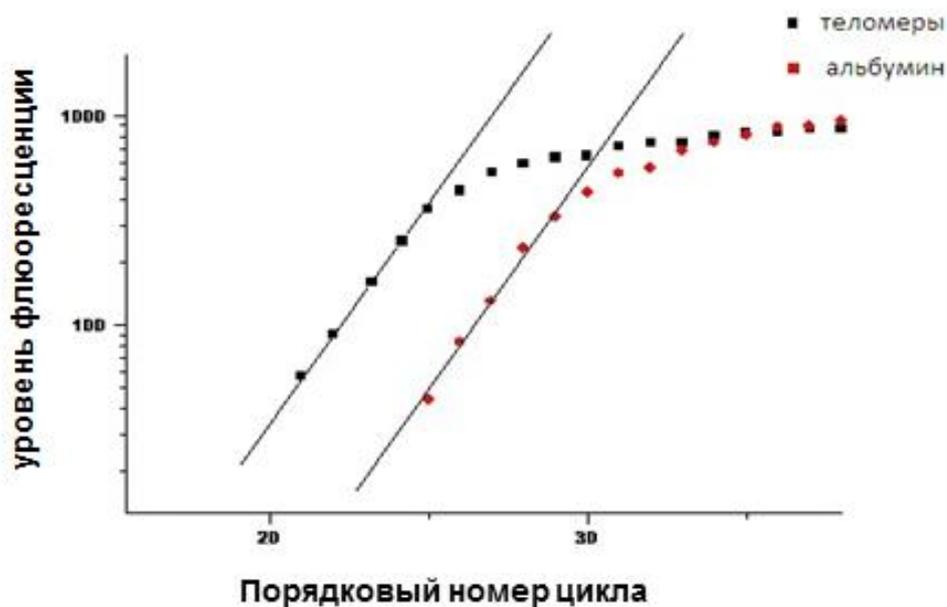


Рисунок 10 – Логарифмические прямые роста флюоресценции. По расстоянию между прямыми определялся ΔCT

Относительная длина теломеров (ОДТ) вычислялась по формуле: $2^{\Delta CT}$. Результаты обработки ОДТ представлены в процентах от величины калибратора.

В качестве калибратора использовали ДНК, выделенную из клеточной линии HeLa. Клеточная линия HeLa была получена из раковой опухоли шейки матки в 1951 году [105]. В клетках HeLa теломераза имеет высокий уровень активности, в результате чего эти клетки способны к бесконечной пролиферации и не имеют предел Хейфлика. Клетки HeLa имеют одинаковую длину теломеров, соответствующую эмбриональным клеткам, поэтому ДНК, выделенную из этих клеток и целесообразно использовать в качестве калибратора.

Определение ОДТ проводилось 3 раза для каждого образца ДНК. Для образцов, в которых при сравнении значений ОДТ для трех повторов разброс величин превышал 10%, эксперимент проводился заново. Количество образцов, измерение для которых проводилось неоднократно, не превышало 15%.

2.4. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы SPSS 21.0 (SPSS Inc., США).

При сравнении групп по количественному признаку использовались параметрический (t-критерий Стьюдента) метод. При сравнении групп по качественному признаку использовался критерий χ^2 и точный критерий Пирсену. Для выявления взаимосвязи между длиной теломерных повторов и возрастом, а также длиной теломерных повторов и уровнем окЛНП применяли метод корреляционного анализа по Спирману. Параметры, имеющие нормальное распределение признака, представлены в виде среднего значения и доверительного интервала (Mean; 95%CI). Анализ межгрупповых различий по количественным признакам, имеющим непараметрическое распределение, проводили с помощью U-критерия Манна-Уитни.

О динамике длины теломерных повторов в климатическом исследовании судили по показателю $\Delta\%$, который рассчитывался по

формуле $\Delta\% = \frac{\text{ОДТ}_1 - \text{ОДТ}_n}{\text{ОДТ}_1} \times 100$, где ОДТ_1 – относительная длина теломерных повторов в первый день исследования, n – значение ОДТ на 10-й, 20-й или 30-й день климатического исследования. Динамику длины теломерных повторов в период пребывания в МТК оценивали при помощи критерия Вилкоксона для зависимых выборок.

Статистически значимыми считали значения $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Характеристика длины теломерных повторов хромосом для всей выборки

В ходе работы были определены значения относительной длины теломеров у 635 человек. Полученные значения длины теломеров имели нормальное распределение, что в дальнейшем использовали при статистических расчетах. Значения длины теломеров колебались в пределах от 39 до 97 относительных единиц, среднее значение составило $66,5 \pm 11$ (рис.11).

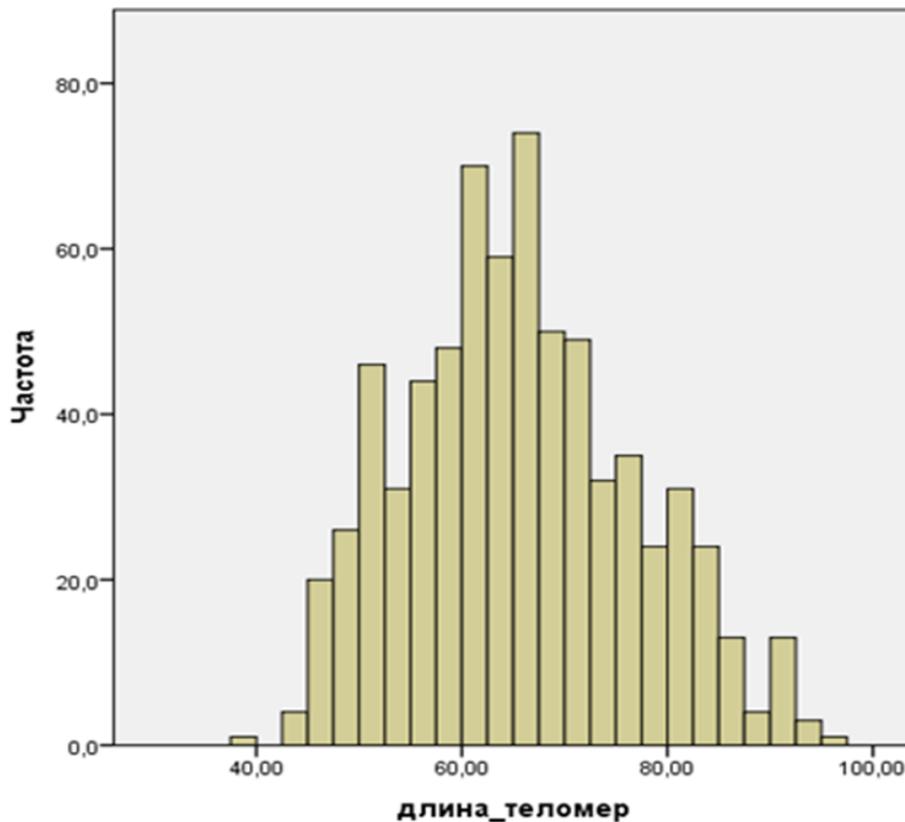


Рисунок 11 – Распределение значений длины теломеров для жителей московского региона

Для всей когорты обследованных лиц $N=635$, в состав которой, помимо контрольной группы, входили пациенты с высоким уровнем артериального давления, высоким содержанием сахара в крови, холестерина, а также имеющие в анамнезе инфаркт миокарда, ОНМК. Была построена

корреляционная зависимость длины теломеров от возраста. Отмечена отрицательная корреляция для этой выборки. Коэффициент корреляции по Спирмену составил $R=-0,6$, $P<0,001$ (рис. 12). Полученная нами отрицательная корреляция длины теломеров от возраста согласуется с литературными данными [28,122,142].

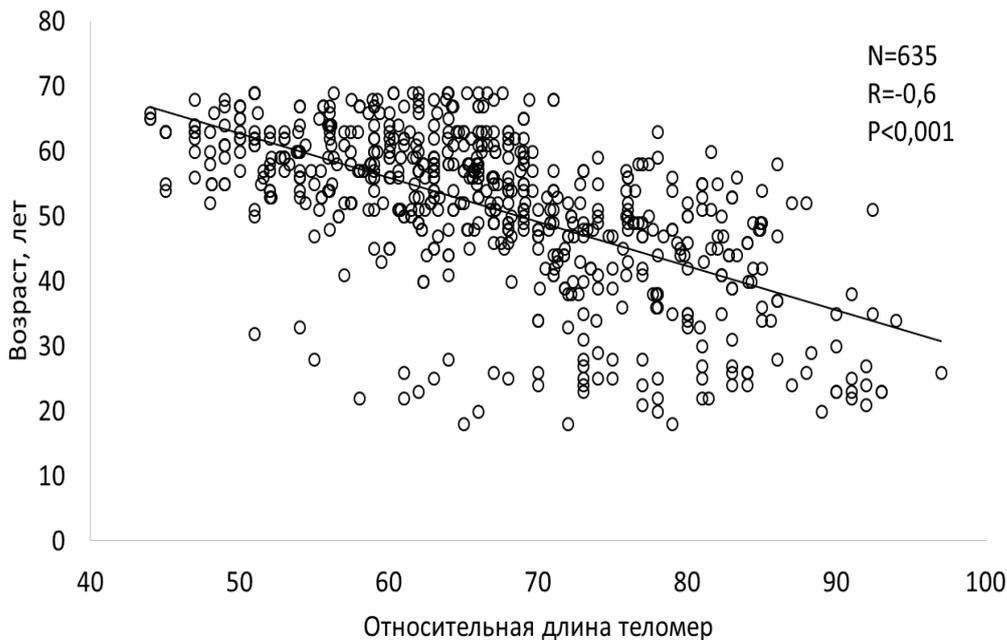


Рисунок 12 – Корреляционная зависимость относительной длины теломеров от возраста

Существенных различий длин теломеров у мужчин и женщин выявлено не было. У женщин длина теломеров колебалась в пределах от 39 до 93 (среднее значение $66,1\pm 11$). Для мужчин эти показатели были в пределах от 44 до 97, (среднее значение $67,4\pm 11$). Как видно из рисунка 13, коэффициент корреляции относительной длины теломеров у мужчин был равен $R=-0,58$ ($P<0,001$), у женщин этот показатель был выше и составил $R=-0,63$ ($P<0,001$) (рис.13, 14).

В литературе существуют противоречивые данные о половой зависимости уровня корреляции длины теломерной ДНК от возраста. Так, в некоторых исследованиях показано, что при рождении длина теломеров у мальчиков и девочек не имеет различий. Однако, по достижении возраста 50-

55 лет показано, что длина теломеров у женщин этого возраста больше, чем у мужчин, благодаря эстрогену, который активирует теломеразу и ингибирует укорочение теломеров [107].

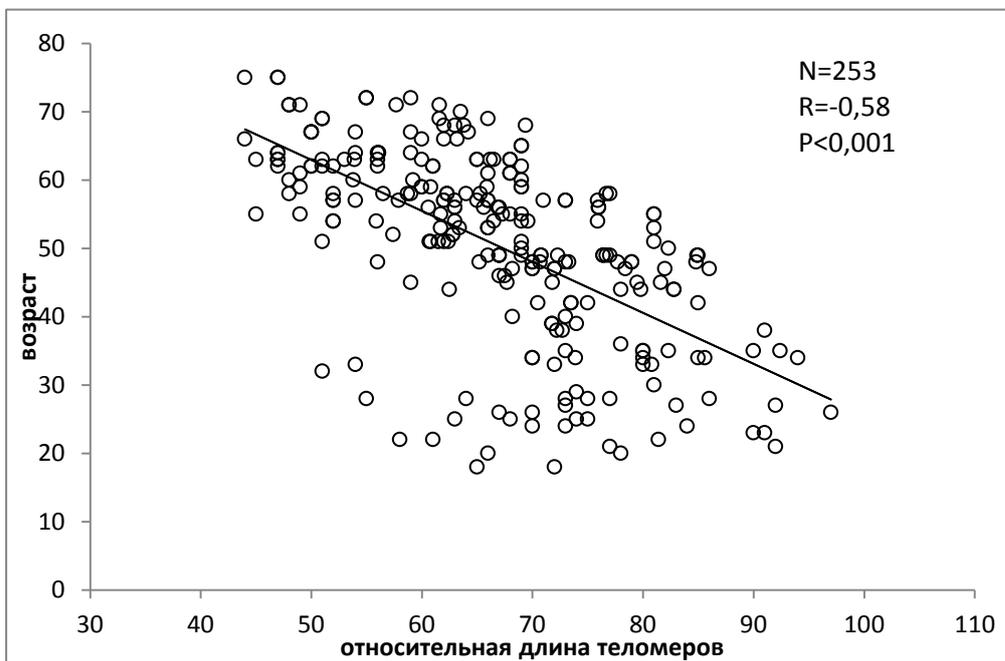


Рисунок 13 – Корреляционная зависимость относительной длины теломеров от возраста у мужчин

Из литературных источников известно, что длина теломеров у женщин больше, чем у мужчин соответствующего возраста [96]. Однако, в полученных нами данных средняя длина теломеров у мужчин и женщин не различается. Полученные результаты можно объяснить тем, что в нашей выборке среди обследованных лиц молодого возраста преобладали мужчины, в то время как среди пожилых людей преобладали женщины.

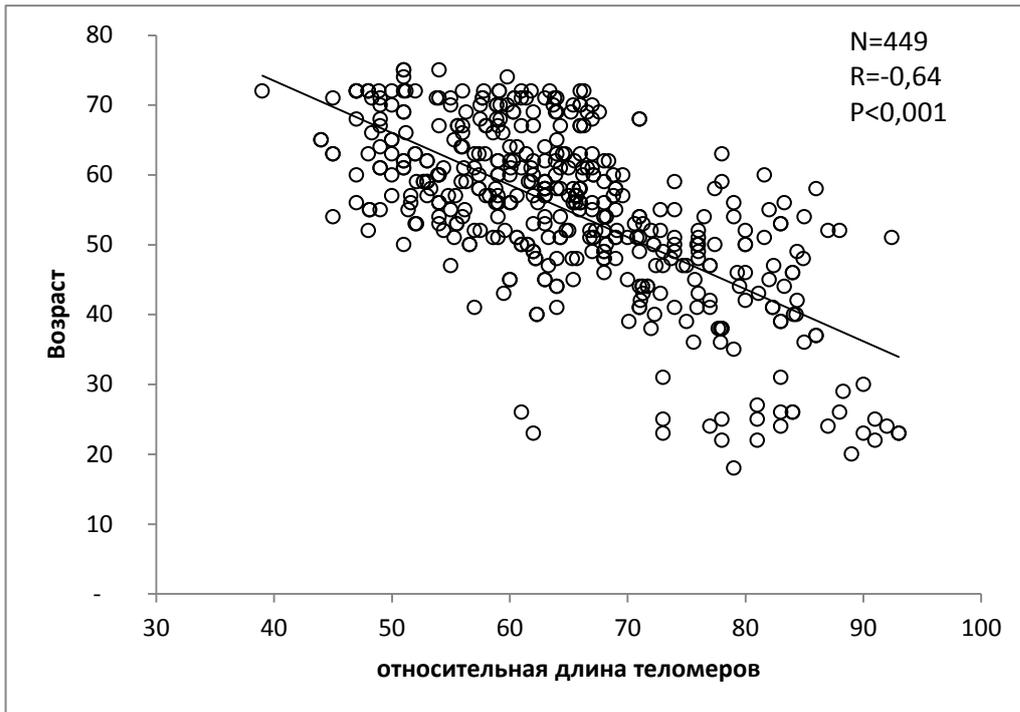


Рисунок 14 – Корреляционная зависимость относительной длины теломеров от возраста у женщин

3.2. Определение нормальных значений длины теломерных повторов хромосом для различных возрастных групп

В настоящее время существует несколько методик определения длины теломеров. Золотым стандартом служит метод гибридизации *in situ*, который позволяет наиболее точно определять длину теломеров [85]. Однако, этот метод очень трудоемкий, требующий специальной подготовки проб, занимает много времени для определения длины теломеров в нескольких образцах ДНК. Поэтому, наибольшее распространение получил метод определения относительной длины теломеров при помощи количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени [30,40]. Ранее были проведены работы по сравнению этих методов, где было показано наличие корреляции между результатами, полученными различными методами [60].

Различные группы исследователей вносят свои изменения в методики определения длины теломеров. В связи с этим, на сегодняшний день не определены стандартные значения нормальных длин теломеров для каждого

метода в различных возрастных группах. Каждая группа исследователей создает свои показатели нормы.

Для определения нормальных значений длины теломеров в данном исследовании были использованы значения ОДТ пациентов группы сравнения, которая состояла из практически здоровых лиц. Для этого всех членов группы сравнения распределили по возрасту: 18 человек – 20-29 лет, 12 человек – 30-39, 28 человек – 40-49, 47 человек – 50-59, 22 человека – 60-69 лет. Длина теломеров для мужчин и женщин в контрольной группе не имели достоверных различий, поэтому при определении возрастных норм не проводили деления по полу. Полученные в работе значения возрастных норм представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Нормальные значения длин теломеров в различных возрастных группах

| Возраст (n) | среднее значение относительной длины теломеров (\pm ДИ) |
|-------------|--|
| 20-29 (18) | 80,5 \pm 3,4 |
| 30-39 (12) | 74,3 \pm 6,2 |
| 40-49 (28) | 70,2 \pm 3,3 |
| 50-59 (47) | 68,4 \pm 3,1 |
| 60-69 (22) | 62,7 \pm 4,2 |
| 70-79 (25) | 60,0 \pm 3,0 |

Как видно из таблицы 6, достоверных различий в длине теломеров между соседними возрастными группами выявлено не было, что объясняется плавным сокращением длины теломеров в течение жизни у практически здоровых людей при отсутствии влияния экстремальных факторов.

Коэффициент корреляции между возрастом и ОДТ для группы контроля составил $R=-0,65$, $P<0,001$ (рис.15). Этот показатель оказался выше на 8,3% для контрольной группы, чем для всей выборки в целом. Это можно объяснить тем, что при хронических неинфекционных заболеваниях происходит более быстрое укорочение длины теломеров [50,126].

Таким образом, в группе практически здоровых лиц разброс длины теломеров закономерно ниже по сравнению с общей выборкой, что увеличивает коэффициент корреляции длины теломеров в зависимости от возраста.

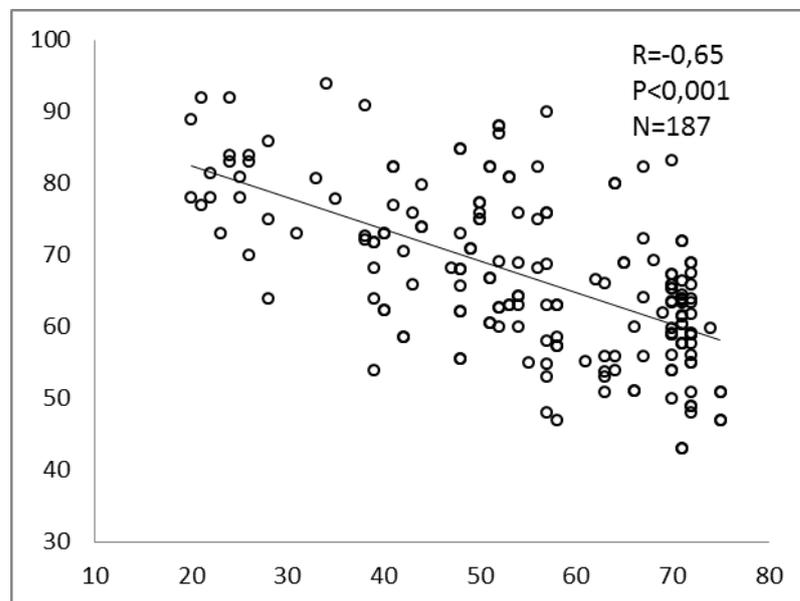


Рисунок 15 – Корреляционная зависимость длины теломеров от возраста в группе контроля

3.3. Анализ пациентов различных групп риска развития сердечно-сосудистых осложнений

Вся когорта обследованных пациентов была разделена на три группы риска развития сердечно-сосудистых осложнений. Группы были сопоставимы по количественному составу.

Таблица 7 – Сравнительная характеристика пациентов с различным риском ССО

| Группа (n) | группа 1 (211) низкого и умеренного риска развития сердечно- сосудистой смерти по шкале SCORE | группа 2 (217) высокого и очень высокого риска развития сердечно- сосудистой смерти по шкале SCORE | Группа 3(201) с клиничес кими проявлен иями ИБС | P |
|---|---|---|--|--|
| Средний возраст, лет | 48,5±1,4 | 58±1,2 | 61,5±1,3 | P ₁₋₂ <0,05 P ₂₋₃ <0,05 |
| Среднее значение относительной длины теломеров в лейкоцитах крови | 70,6±1,7 | 61,2±1,5 | 57,1±1,5 | P ₁₋₂ <0,005 P ₂₋₃ <0,005 |
| Уровень окисленных ЛПН плазмы крови | 66,1±2,8 | 73,5±3,4 | 80,3±3,4 | P ₁₋₂ <0,05 P ₂₋₃ <0,05 |

В группе пациентов с низким и умеренным риском развития сердечно - сосудистой смерти по шкале SCORE средняя длина теломеров составила 70,6±1,7 (табл.7, рис.16). В плазме крови пациентов первой группы был измерен уровень окисленных липопротеинов низкой плотности (окЛНП), который был равен 66,1±2,8 (рис.16).

В группе пациентов без признаков ИБС, но с высоким и очень высоким риском развития сердечно - сосудистой смерти по шкале SCORE (табл.7), относительная длина теломеров составила $61,2 \pm 1,5$ (рис.16), а уровень окЛНП $71,5 \pm 3,4$ (рис.16). При сравнении с 1-й группой наблюдается снижение длины теломеров при одновременном повышении одного из параметров окислительного стресса – окЛНП (рис.16).

В третьей группе были больные с клиническими проявлениями ИБС. В третьей группе средний возраст был ожидаемо больше ($61,5 \pm 1,3$ лет), чем в первой ($48,5 \pm 1,4$ лет) или второй ($58 \pm 1,2$ лет) (табл. 7). Для этой группы относительная длина теломеров составила $57,1 \pm 1,5$ (рис.16), уровень окЛНП $80,3 \pm 3,4$ (рис.16). Показано достоверное снижение длины теломеров с одновременным повышением уровня окЛНП в плазме крови по сравнению как с первой, так и со второй группой.

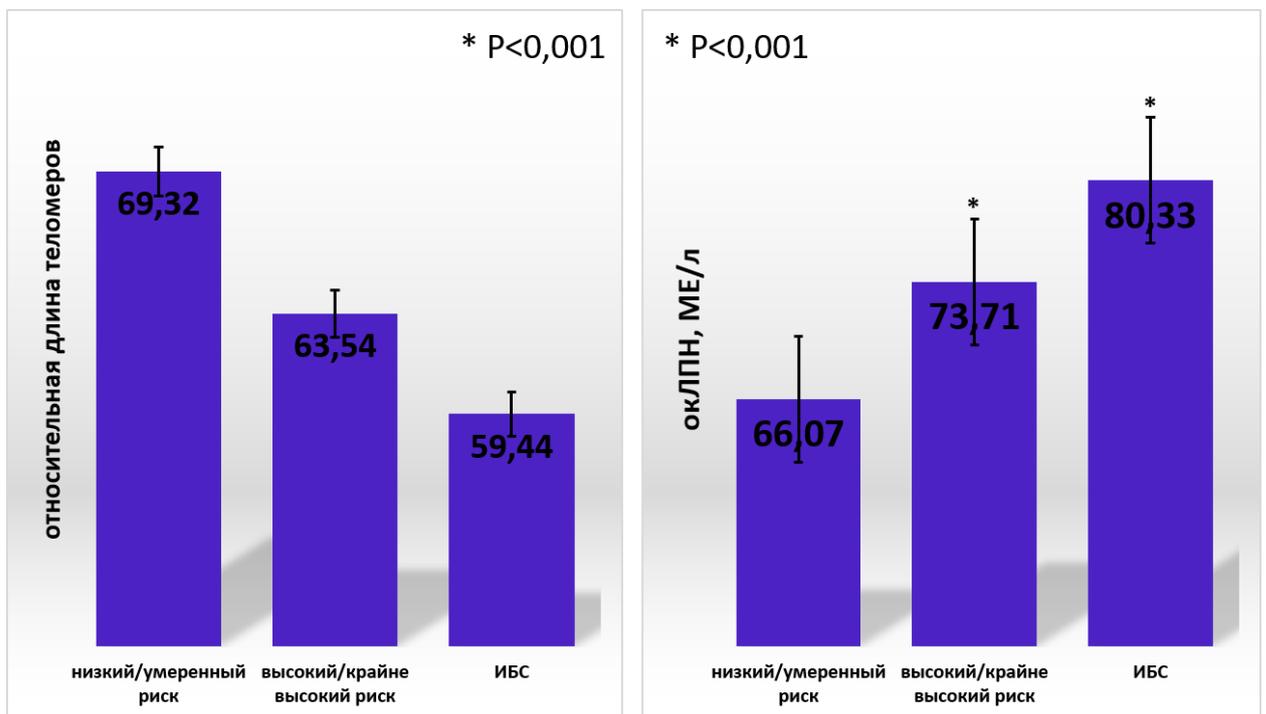


Рисунок 16 – Сопоставление относительной длины теломеров и уровня окЛНП у пациентов с различным риском сердечно - сосудистой смерти по SCORE и с клиническими проявлениями ИБС

Различия в длине теломеров между отдельными группами были статистически значимыми ($P < 0,001$).

Следует отметить, что средний возраст пациентов 1-й группы с низким развитием СС смерти по шкале SCORE был $48,5 \pm 1,4$ лет.

Среди пациентов 2-й группа с высоким и крайне высоким риском развития СС смерти по шкале SCORE средний возраст составил $58 \pm 1,2$ лет.

Для третьей группы этот показатель был равен $61,5 \pm 1,3$ лет.

Группы риска развития СС смерти по шкале SCORE различались по возрасту. Также известно, что длина теломеров является величиной, зависимой от возраста.

Для того, чтобы ввести поправку на возрастные изменения длины теломеров, при исследовании пациентов с различным риском нами была построена кривая зависимости длины теломеров от возраста практически здоровых людей (рис.17).

Видно, что с возрастом длина теломеров, как и следовало ожидать, снижается. Как видно из рисунка 17, у обследованных с низким и умеренным риском длина теломеров совпадает с длиной теломеров практически здоровых людей соответствующего возраста.

При этом, у обследованных с высоким риском и у больных с клиническими проявлениями ИБС длина теломеров была достоверно ниже, чем у практически здоровых лиц соответствующего возраста.

Таким образом, изменение длины теломеров, которое мы наблюдали у обследованных с высоким риском и у больных ИБС, не могла быть связана только с возрастными изменениями и, по всей вероятности, может быть объяснена наличием окислительного стресса у этих пациентов, как и говорилось ранее.

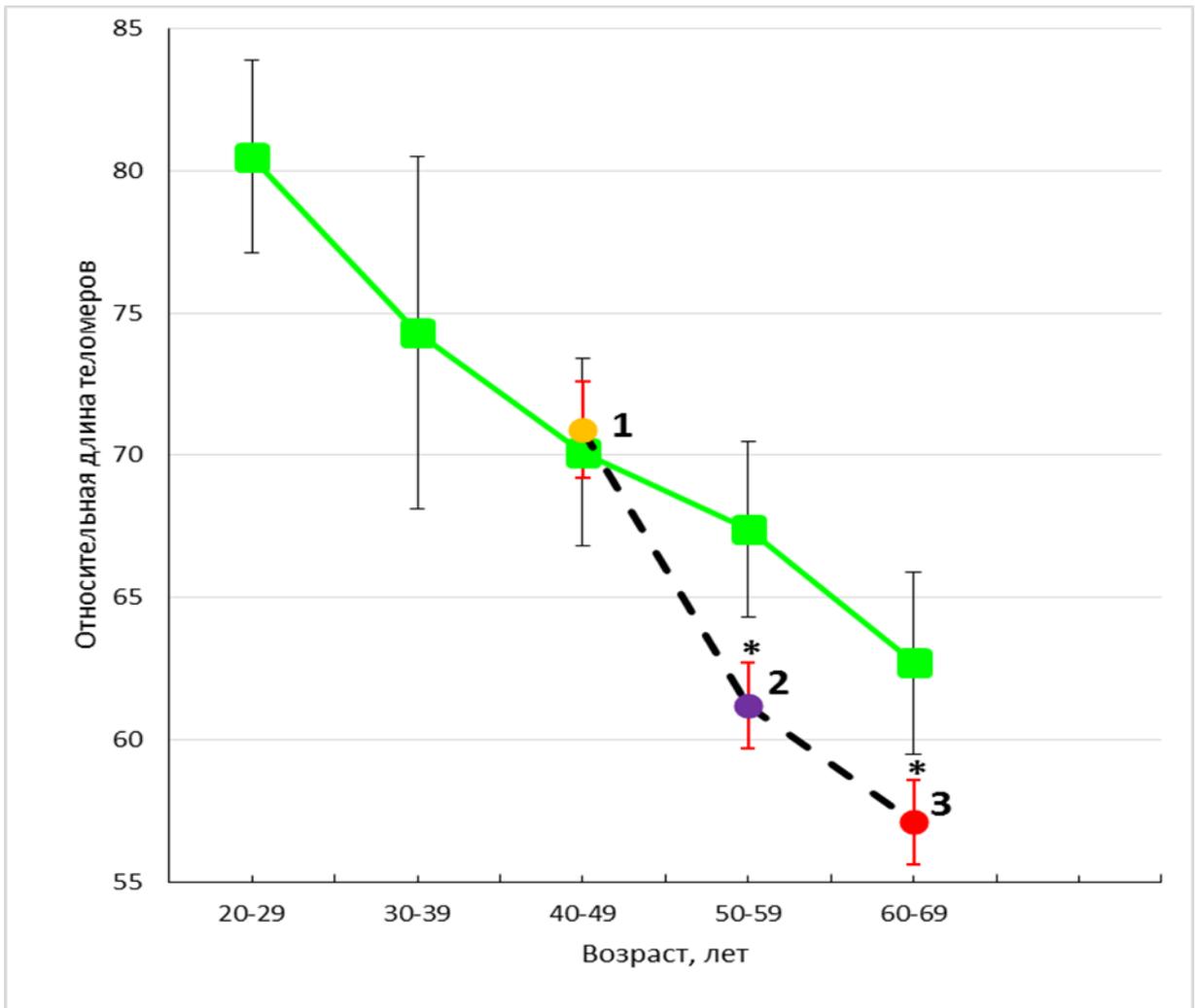


Рисунок 17 – Возрастные изменения длины теломеров у практически здоровых людей и у пациентов с различным риском сердечно-сосудистой смерти (по шкале SCORE) и с клиническими проявлениями ИБС. 1– длина теломеров у пациентов с низким и умеренным риском, 2- длина теломеров у пациентов с высоким и крайне высоким риском, 3- длина теломеров у больных ИБС

Полученные результаты согласуются с литературными данными, где показано, что при сердечно - сосудистых заболеваниях происходит снижение длины теломеров [50,121]. Однако, ранее не было показано, у лиц без признаков ИБС, при нарастании риска развития СС смерти по шкале SCORE, происходит укорочение длины теломеров. Известно, что при сердечно - сосудистых заболеваниях происходит интенсификация свободно-радикального окисления (окислительный стресс) [4,5,42].

Была построена корреляционная зависимость длины теломеров, нормированных по возрасту от уровня окЛНП в плазме. Из представленного графика видна умеренная отрицательная зависимость ($r=-0,43$, $p=0,01$) нормированной длины теломеров от уровня окЛНП (рис.18), что свидетельствует о взаимосвязи развивающегося окислительного стресса с сокращением длины теломерных повторов хромосом.

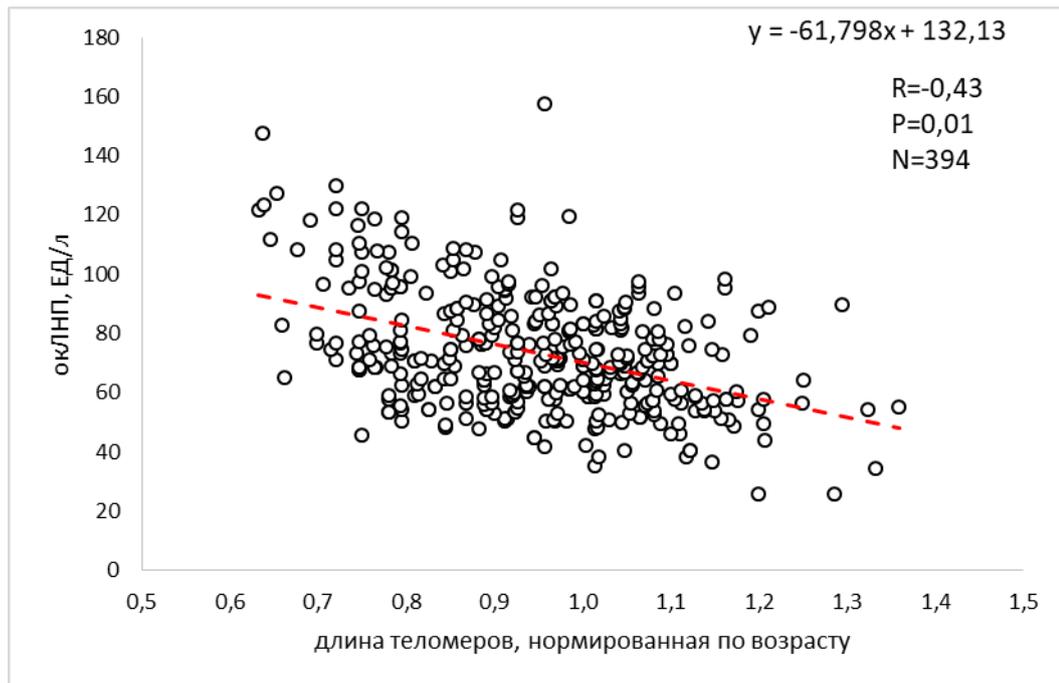


Рисунок 18 – Зависимость длины теломерных повторов хромосом от уровня окЛНП

В результате окислительный стресс приводит к сокращению длины теломеров, за счет повреждения ДНК активными формами кислорода [59], что вызывает накопление однонитевых и двунитевых разрывов ДНК и в отсутствии репарации в системе теломерных повторов приводит к быстрому сокращению длины теломерной ДНК.

Исходя из того, что уровень окЛНП в плазме крови является одним из объективных показателей интенсивности свободно-радикальных процессов [4,42], одновременное уменьшение длины теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов у обследованных пациентов может быть объяснено

повышенной окислительной деструкцией ДНК при окислительном стрессе, сопутствующем развитию ИБС.

3.4. Анализ неблагоприятных событий, произошедших в течение пяти лет после измерения длины теломерных повторов хромосом

3.4.1. Сравнительная характеристика осложнений по группам риска

Через пять лет после проведенного обследования, было опрошено 278 человек о возникших у них осложнениях различной этиологии. Опрошенные распределились следующим образом: 76 человек - из первой группы, 91 человек из второй группы, 90 человек из третьей группы (рис.19).

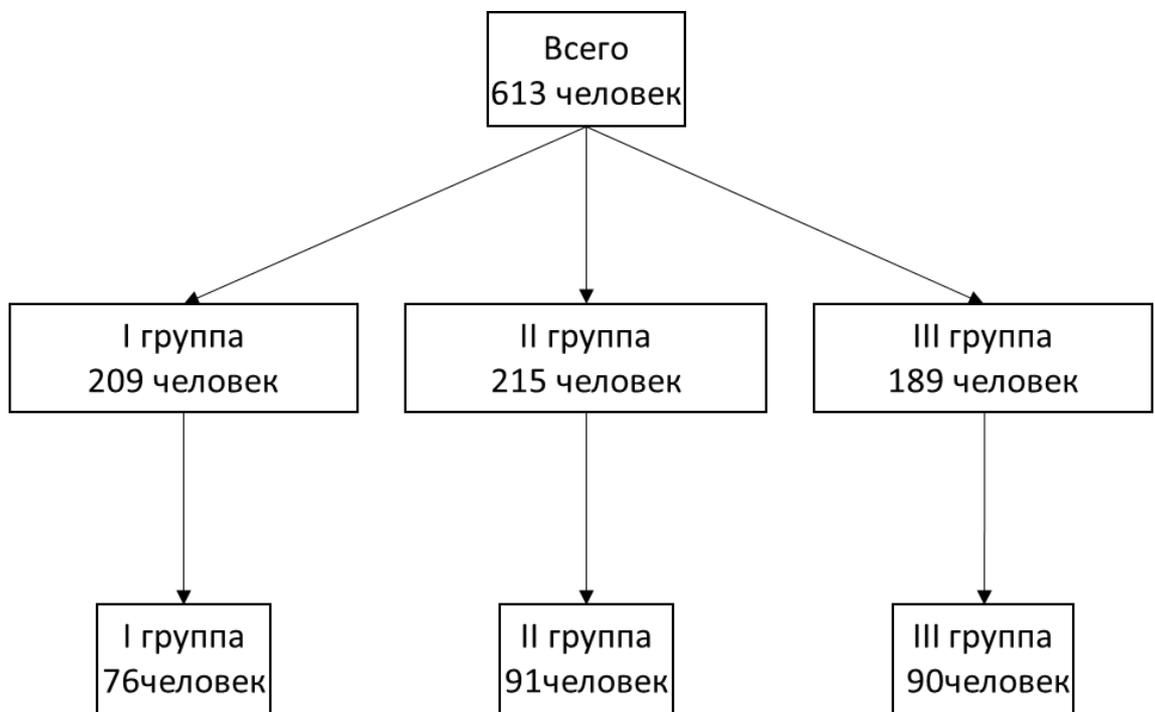


Рисунок 19 – Распределение опрошенных пациентов по группам риска развития сердечно-сосудистых событий (по шкале SCORE)

Из 258 опрошенных за пять лет ССО были у 45 человек (17,5% от опрошенных). Количественные данные о сердечно-сосудистых событиях представлены в таблице 7. Было выявлено развитие следующих сердечно-сосудистых событий: 17 случаев инфаркта миокарда, 7 – ОНМК, 12 человек перенесли реваскуляризацию миокарда, 18 человек – нестабильную стенокардию, 5 случаев – сердечно-сосудистых смертей.

Таким образом, было зафиксировано 59 неблагоприятных сердечно - сосудистых событий у 45 пациентов. Более одного события имели 12 человек (табл. 8).

Таблица 8 – Сердечно - сосудистые события в течение 5 лет среди всех опрошенных пациентов (N=278)

| Осложнения | кол-во | % |
|----------------------------|--------|-----|
| ИМ | 17 | 6,4 |
| ОНМК | 7 | 2,6 |
| Реваскуляризация миокарда | 12 | 4,5 |
| Нестабильная стенокардия | 18 | 6,8 |
| Сердечно-сосудистая смерть | 5 | 1,9 |

Средняя длина теломеров лиц, у которых не было сердечно - сосудистых событий в течение пяти лет, после измерения теломеров составила $66,1 \pm 0,03$.

Для пациентов у которых были зафиксированы различные сердечно-сосудистые события, средняя длина теломеров составила $57,6 \pm 0,07$ ($P < 0,001$) относительных единиц (рис.20).

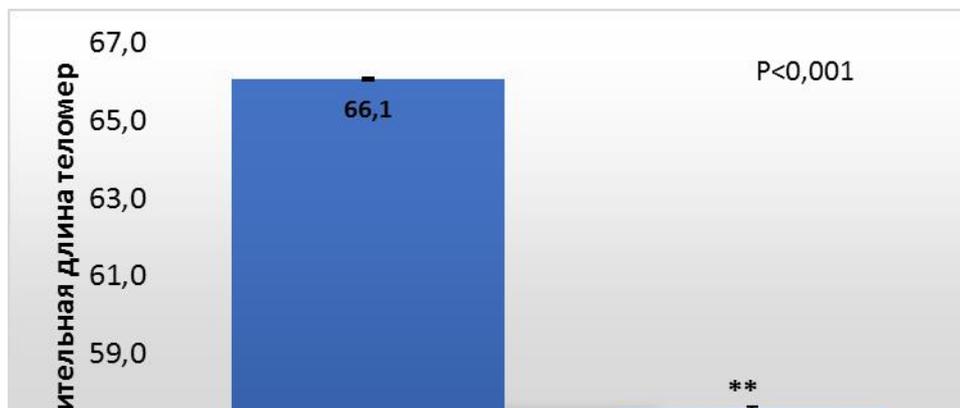


Рисунок 20 Средняя длина теломерных повторов хромосом лиц с наличием сердечно-сосудистых событий в течение пяти лет после измерения длины теломеров и без событий. $P < 0,001$

Было показано неравномерное распределение количества осложнений в различных группах.

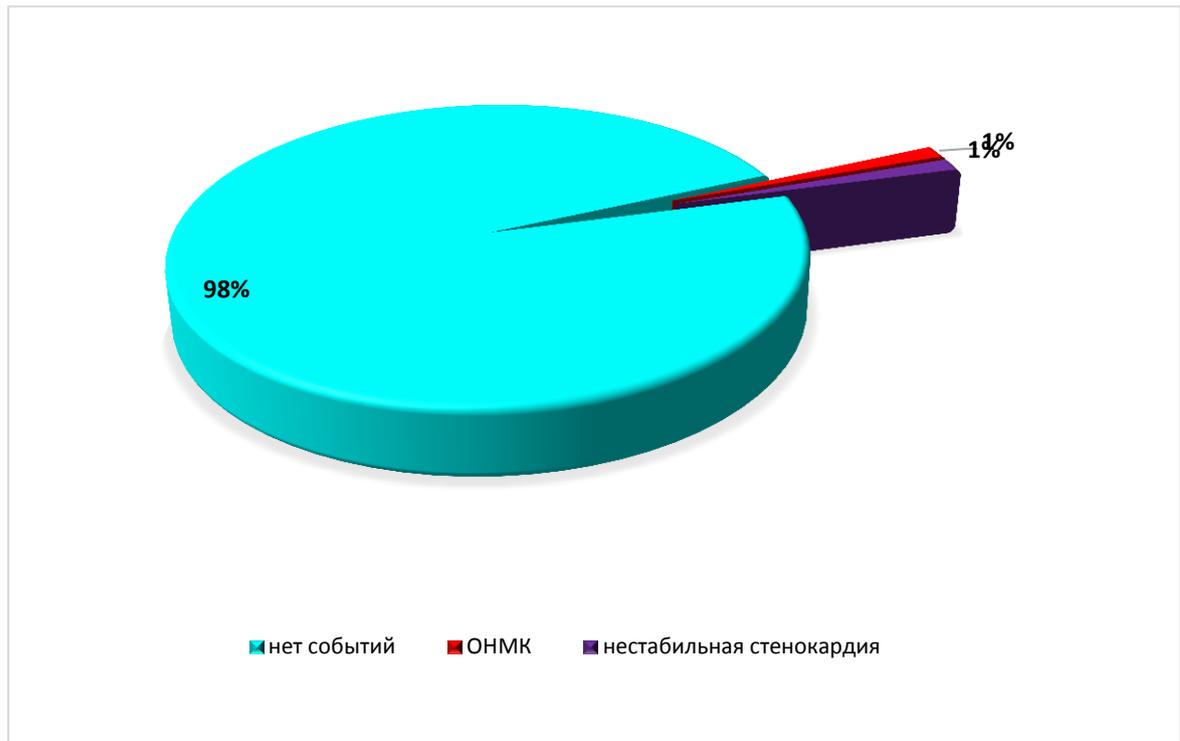


Рисунок 21 – Выявленные сердечно - сосудистые события в течение 5 лет, после проведенного обследования среди пациентов первой группы

Среди 76 пациентов 1-й группы, в которой находились лица с низким уровнем риска развития сердечно - сосудистой смерти по шкале SCORE и нормальными значениями длины теломерных повторов хромосом, развилось минимальное количество сердечно - сосудистых событий (2 события), что составило 2,4% от опрошенных пациентов 1-й группы.

Среди пациентов данной группы был выявлен 1 случай ОИМК и у 1 пациента - нестабильная стенокардия. В связи с тем, что в 1-ю группу вошли лица, с низким и средним риском развития сердечно - сосудистой смерти по шкале SCORE, то вполне закономерно было выявлено незначительное количество ССО.

Причем, не было выявлено таких неблагоприятных исходов, как ИМ или смерть (рис. 21).

Во второй группе, в которую вошли лица с высоким риском развития сердечно-сосудистых смерти по шкале SCORE, был опрошен 91 пациент. Из них у 8 были выявлены неблагоприятные события. 2 человека перенесли ИМ, 1 – ОНМК, 7 – впервые выявлена нестабильная стенокардия. Одному пациенту было проведено аортокоронарное шунтирование. Летальных исходов среди опрошенных лиц 2-й группы не было. Таким образом, было зафиксировано 11 случаев ССО, что составило 12.1% от всех случаев выявленных ССО в данной группе. Отмечается большее число развития ССО среди опрошенных лиц второй группы риска по сравнению с первой группой, что вполне закономерно в связи с тем, что в данную группу входят пациенты с высоким риском развития сердечно - сосудистых осложнений (рис. 22).

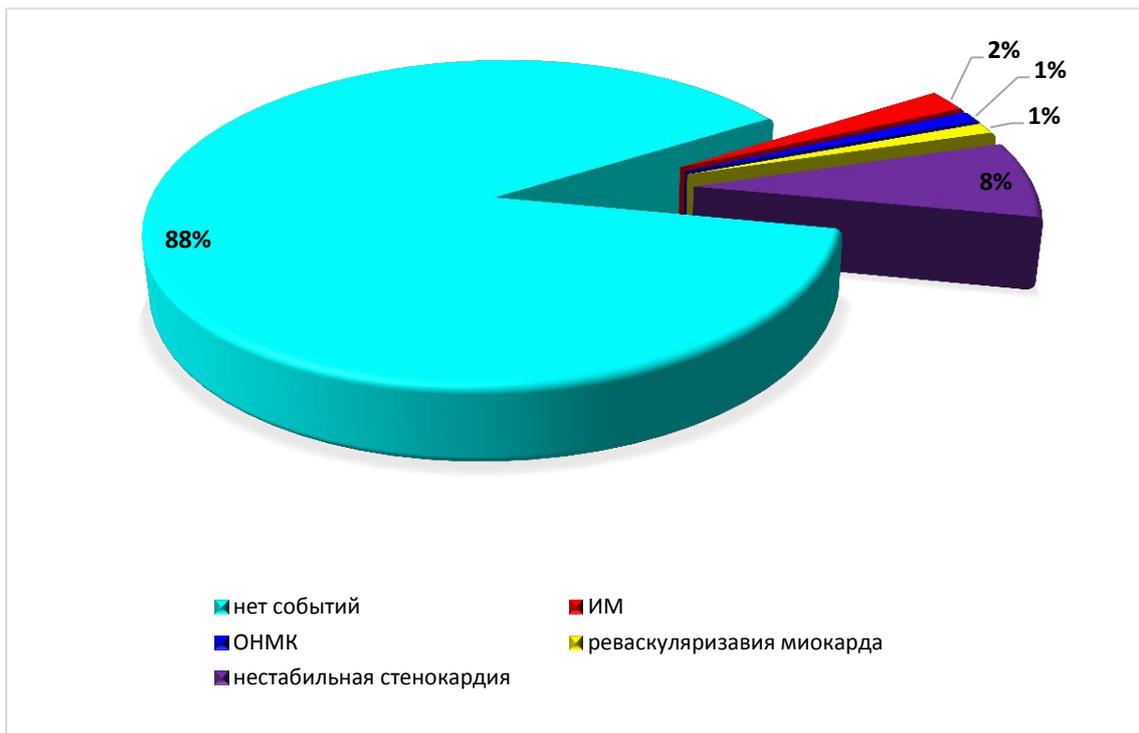


Рисунок 19 – Выявленные сердечно - сосудистые события в течение 5 лет, после проведенного обследования среди пациентов второй группы

Из третьей группы было опрошено 90 пациентов, среди которых у 35 человек были выявлены сердечно - сосудистые события. В данную группу входят пациенты с клиническими проявлениями ИБС. Отмечено 16 случаев ИМ, в то время как в первой группе таких осложнений зафиксировано не было, а во второй группе – 2 случая. ОНМК развился у 5 человек, тогда как в первой и второй группах по 1 человеку перенесли данное осложнение. Количество пациентов, нуждающихся в реваскуляризации миокарда, составило 11 человек, против 0 и 1 человека в первой и второй группах соответственно. Вновь возникшая нестабильная стенокардия была у 10 пациентов против 7 человек во 2-й группе риска. Следует отметить летальные исходы (5 случаев) среди пациентов третьей группы, что несомненно связано с тем, что в данной группе находились пациенты с клиническими признаками ИБС (рис.23).

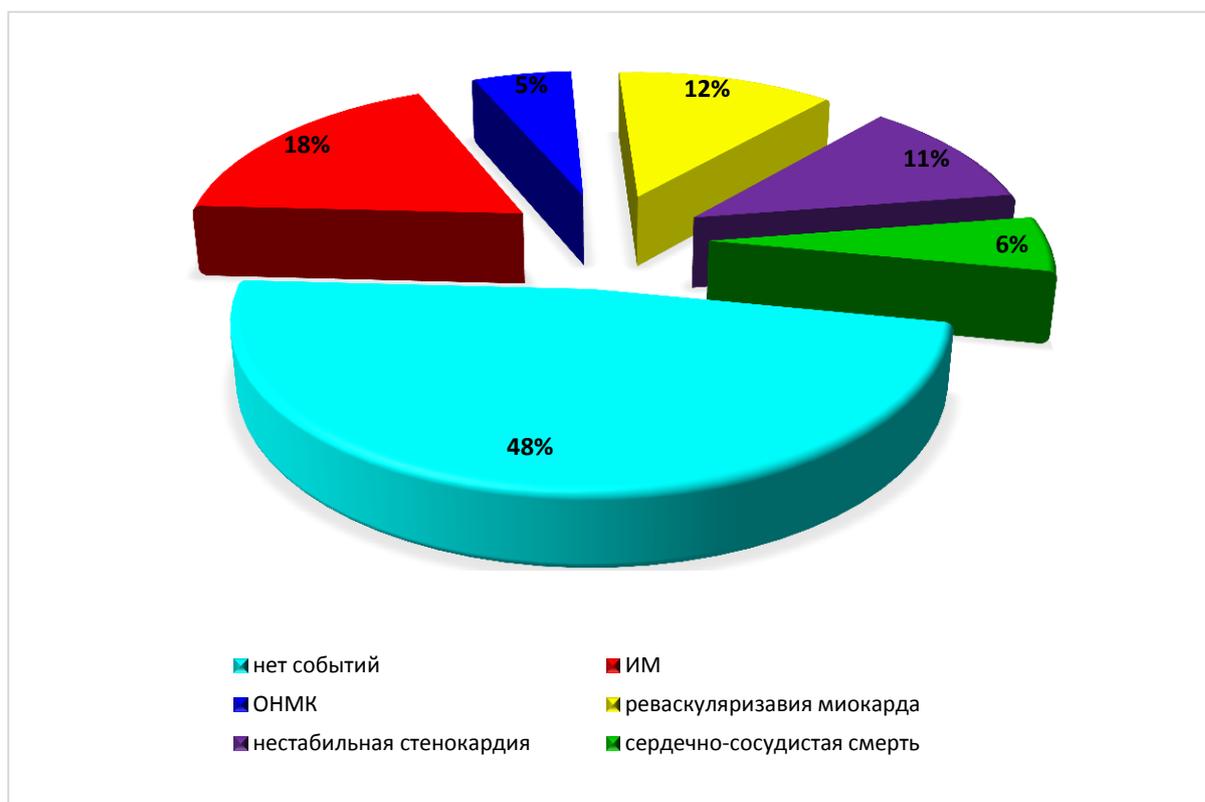


Рисунок 20 – Выявленные сердечно - сосудистые события в течение 5 лет, после проведенного обследования среди пациентов третьей группы

3.4.2. Сравнительная характеристика длины теломерных повторов хромосом и уровня окЛНП в группах с различным риском развития сердечно-сосудистых осложнений, опрошенных по прошествии пяти лет после обследования

Было проведено сравнение длины теломеров в группах лиц, у которых произошло развитие сердечно - сосудистых осложнений в течение пяти лет после измерения длины теломеров, с контрольной группой, а также с нормальными значениями длин теломеров для каждой возрастной группы.

В каждой группе опрошенных через пять лет после обследования пациентов было рассчитано среднее значение длины теломеров и определен уровень окЛНП. В первой группе средняя длина теломеров составила $70 \pm 9,6$, во второй группе – $64,54 \pm 7,5$, в третьей – $59,4 \pm 8,2$.

Было проведено сравнение длины теломеров пациентов, у которых были зафиксированы сердечно - сосудистые события в течение 5 лет после измерения длины теломеров с длиной теломеров опрошенных лиц, не перенесших СС события. При сравнении средних значений длин теломеров достоверное снижение ($P < 0,05$) по сравнению с контрольной группой наблюдалось при перенесенном инфаркте миокарда ($52,6 \pm 6,8$), инсульте ($54,1 \pm 6,3$), а также у лиц, смерть которых наступила в течение пяти лет после измерения ($49,4 \pm 4$) (рис.24). При наличии развития нестабильной стенокардии, а также при развитии состояний, требующих оперативного вмешательства, длина теломеров была несколько ниже, чем у лиц без событий и составила $60,7 \pm 9,6$ ($P = 0,07$) и $62 \pm 10,1$ ($P = 0,09$) соответственно. Для этих групп показана тенденция к снижению, однако, достоверных ($P = 0,09$) различий в длине теломеров выявлено не было (рис.24).

Различий по возрасту в полученных группах лиц с различными сердечно - сосудистыми событиями выявлено не было (табл. 9). В связи с этим нормирование длины теломеров по возрасту не проводилось.

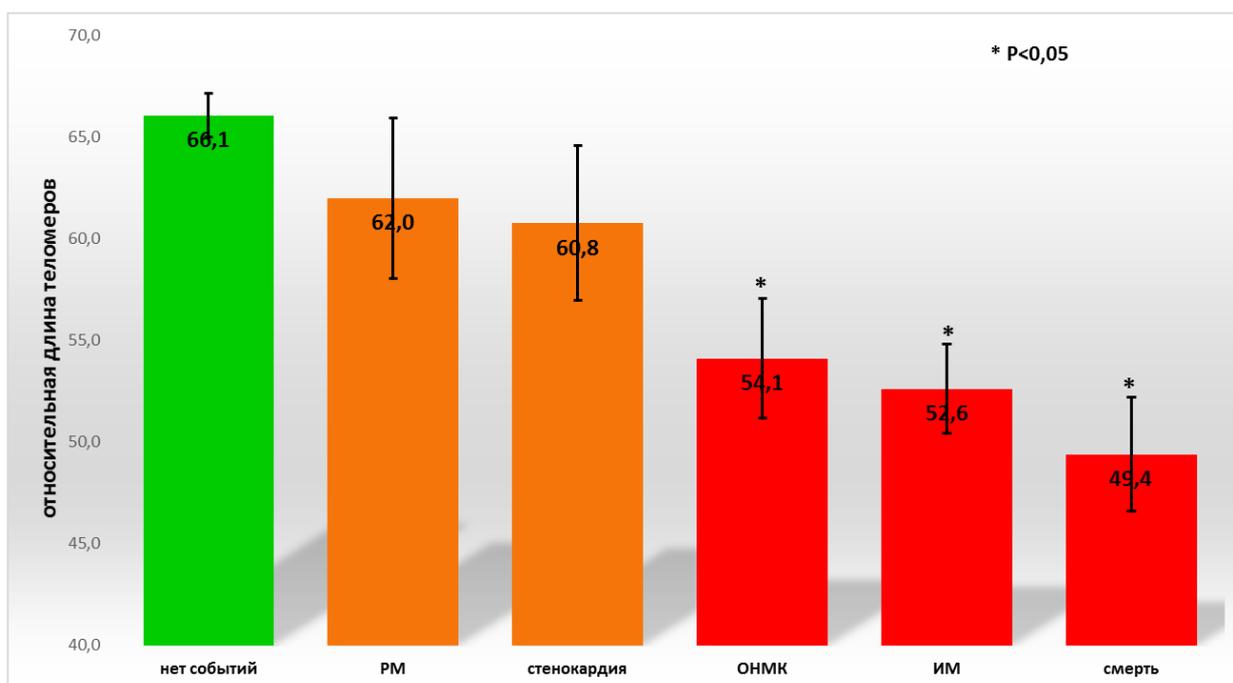


Рисунок 21 Средние значения длины теломерных повторов хромосом в группе опрошенных с различными сердечно-сосудистыми событиями, возникшими в течение 5 лет после обследования и без событий

Таблица 9 – Длина теломерных повторов хромосом лиц, у которых развились сердечно - сосудистые осложнения в течение пяти лет после обследования

| | нет СС событий | ИМ | ОНМК | Реваскуляризация миокарда | стенокардия | смерть |
|---------------|----------------|----------|----------|---------------------------|-------------|----------|
| ОДТ, % | 66,1±8,0 | 52,6±4,6 | 54,1±4,0 | 62,0±7,0 | 60,8±8,2 | 49,4±3,2 |
| Возраст (лет) | 55,9±7,4 | 59,4±6,5 | 58,3±4,8 | 57,1±7,4 | 57,8±6,4 | 60,6±3,7 |

Таким образом, существует ассоциация между более короткими теломерами и повышенным риском развития инфаркта миокарда, ОНМК, а также с риском смерти.

По литературным данным на сегодняшний день нельзя однозначно ответить на вопрос, приводит ли развитие заболеваний к укорочению теломеров или короткие теломеры способствуют развитию патологии.

Исходя из полученных данных, можно предположить, что короткие теломеры, вызывая клеточное старение, способствуют развитию таких сердечно - сосудистых осложнений как ИМ, ОНМК, а также увеличению риска смерти.

Таким образом, длина теломеров может служить маркером развития сердечно - сосудистых осложнений.

Для оценки диагностической значимости длины теломерной ДНК, как генетического биомаркера ССЗ, был проведен метод построения ROC-кривой (рис. 25), а также была проведена оценка чувствительности, специфичности и точности применяемой методики, и рассчитано отношение шансов (рис.26). Показатели ROC-анализа имели следующие значения: площадь под кривой составила – 0,73 (95% доверительный интервал), чувствительность метода – 68,9%, специфичность – 70,3% ($P=0,0005$) (рис. 25 и 26).

Данные проведенного ROC-анализа свидетельствуют о высокой связи длины теломерной ДНК с предрасположенностью к ССЗ.

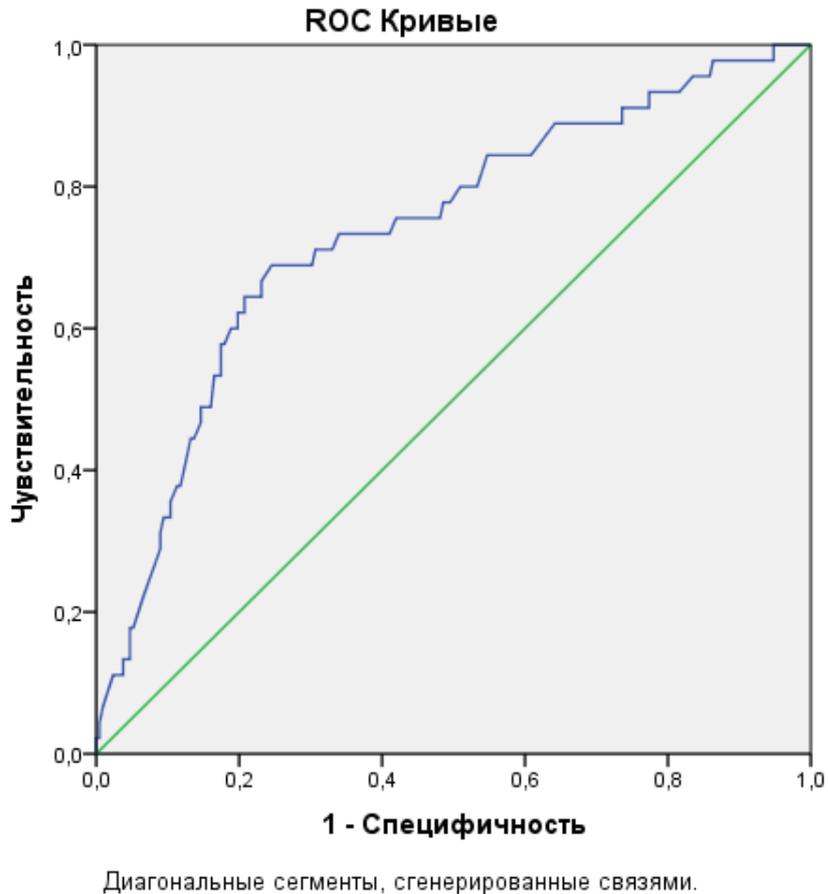


Рисунок 25 – ROC кривая для прогностической значимости длины теломеров в развитии сердечно - сосудистых осложнений

Пороговое значение переменной было равно 39,1, что составило 57% нормального значения соответствующего возраста. Отношение шансов развития СС событий при длине теломерных повторов равных 39,1 (ниже порогового значения) составило 5,24 ($P=0,0005$). Относительный риск равен 1,4 ($P=0,0005$). Прогностичность положительного результата составила 0,9, отрицательного результата 0,3.

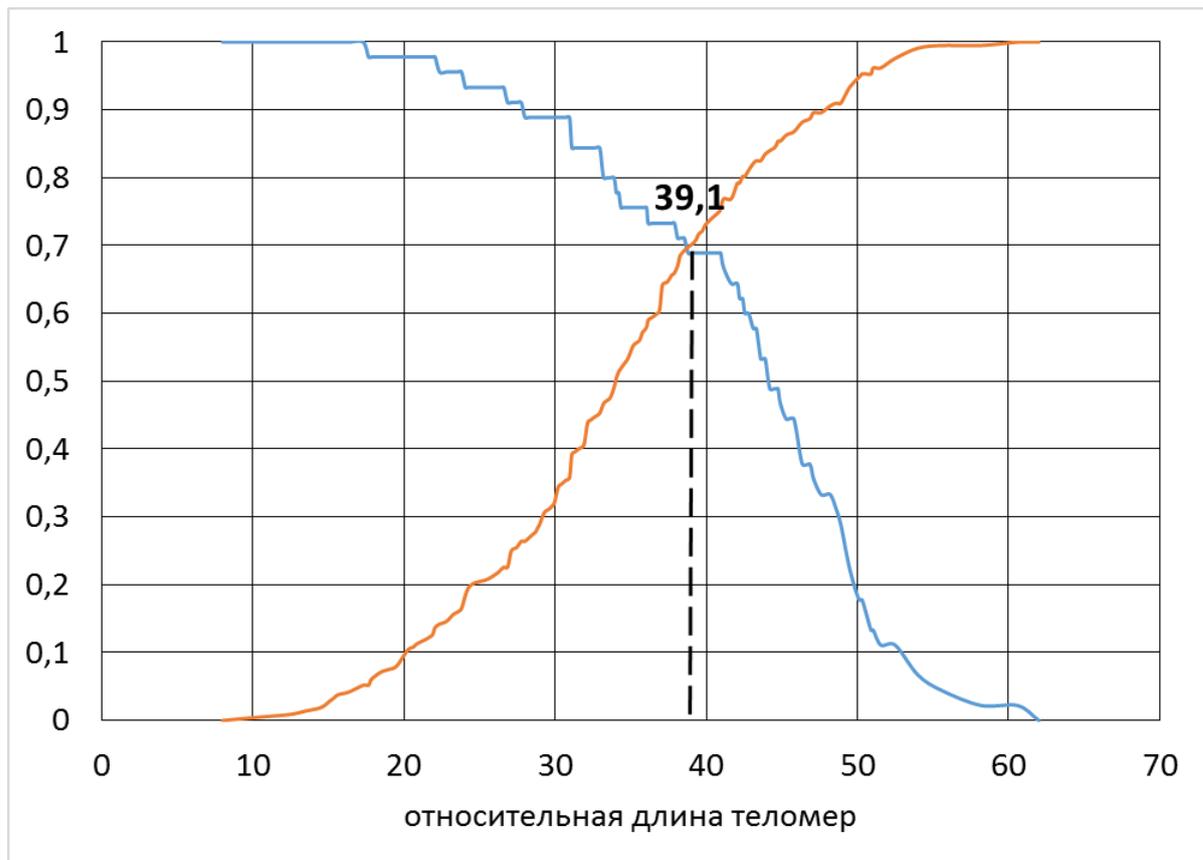


Рисунок 22 График чувствительность-специфичность при проведении ROC-анализа прогностической способности модели риска развития СС осложнений у лиц с короткими теломерами

Таким образом, при длине теломер равной и ниже 39,1, вероятность неблагоприятных исходов повышается в 5,24 раза (рис.26).

3.5 Влияние экстремальных климатических условий на изменение длины теломерных повторов хромосом у добровольцев

Средние значения ОДТ лейкоцитов периферической крови 6 участников климатического исследования за 4 месяца до начала испытания и на момент начала испытания были практически равны и составили $81,7 \pm 3,8\%$ и $81 \pm 3,5\%$ соответственно. Показано ожидаемое уменьшение длины теломерных повторов хромосом с увеличением возраста испытуемых (рисунок. 27)

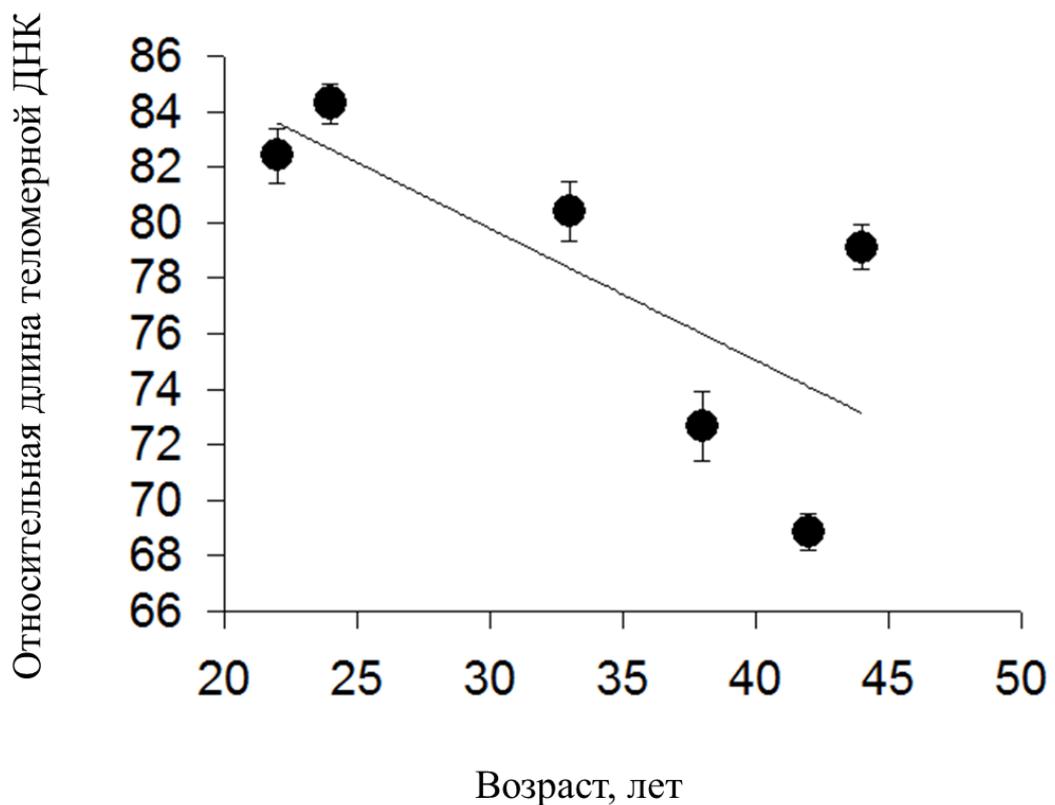


Рисунок 23 Зависимость относительной длины теломерных повторов (ОДТ) хромосом от возраста. Показано ожидаемое снижение ОДТ с увеличением возраста испытуемых

Как видно из представленных графиков (рис. 28, 29), в течение четырех месяцев до начала исследования значения относительной длины теломерных повторов хромосом практически не изменились.

За время пребывания в медико-техническом комплексе в течение 30 дней при неблагоприятных климатических условиях произошло снижение относительной длины теломерных повторов хромосом от 10 до 15% (в среднем на 12%). Как видно из рисунка, укорочение теломеров происходит неравномерно. За первые 10 дней пребывания испытуемых в экстремальных условиях произошло незначительное снижение длины теломеров (примерно на 3%). В течение следующего отрезка времени снижение длины теломеров не показано. Самое значительное укорочение теломеров в среднем примерно на 10% произошло за последний период. Подобная динамика характерна для всех добровольцев (рис.29).

Таблица 10 – Динамическое изменение параметров окислительного стресса и длины теломеров у добровольцев за период пребывания в МТК

| пациент | возраст | за 4 месяца до исследования | | начало исследования | | окончание исследования | |
|---------|---------|-----------------------------|-----|---------------------|------|------------------------|------|
| | | ОДТ | МДА | ОДТ | МДА | ОДТ | МДА |
| 1 | 44 | 84,9 | | 84,3 | 1,36 | 69,4 | 1,88 |
| 2 | 42 | 81,3 | | 80,4 | 1,67 | 66,6 | 2,41 |
| 3 | 33 | 88,9 | | 88,9 | 2,61 | 77,2 | 2,09 |
| 4 | 22 | 70,5 | | 68,9 | 1,88 | 62,5 | 2,61 |
| 5 | 24 | 85,6 | | 85,6 | 1,88 | 75,4 | 2,2 |
| 6 | 38 | 72,7 | | 72,7 | 1,88 | 60,6 | 2,09 |

Через один год длина теломерной ДНК вновь была измерена у этих 6-ти добровольцев. На протяжении года добровольцы вели обычный образ жизни. В течение года не было зафиксировано значимого изменения длины

теломеров. Так, если после проведения исследования средняя длина теломеров составила $68,6 \pm 1,98$ относительных единиц, то через 1 год длина теломеров была равна $68,1 \pm 2,4$. Достоверных различий в длине теломеров выявлено не было (рис.28).

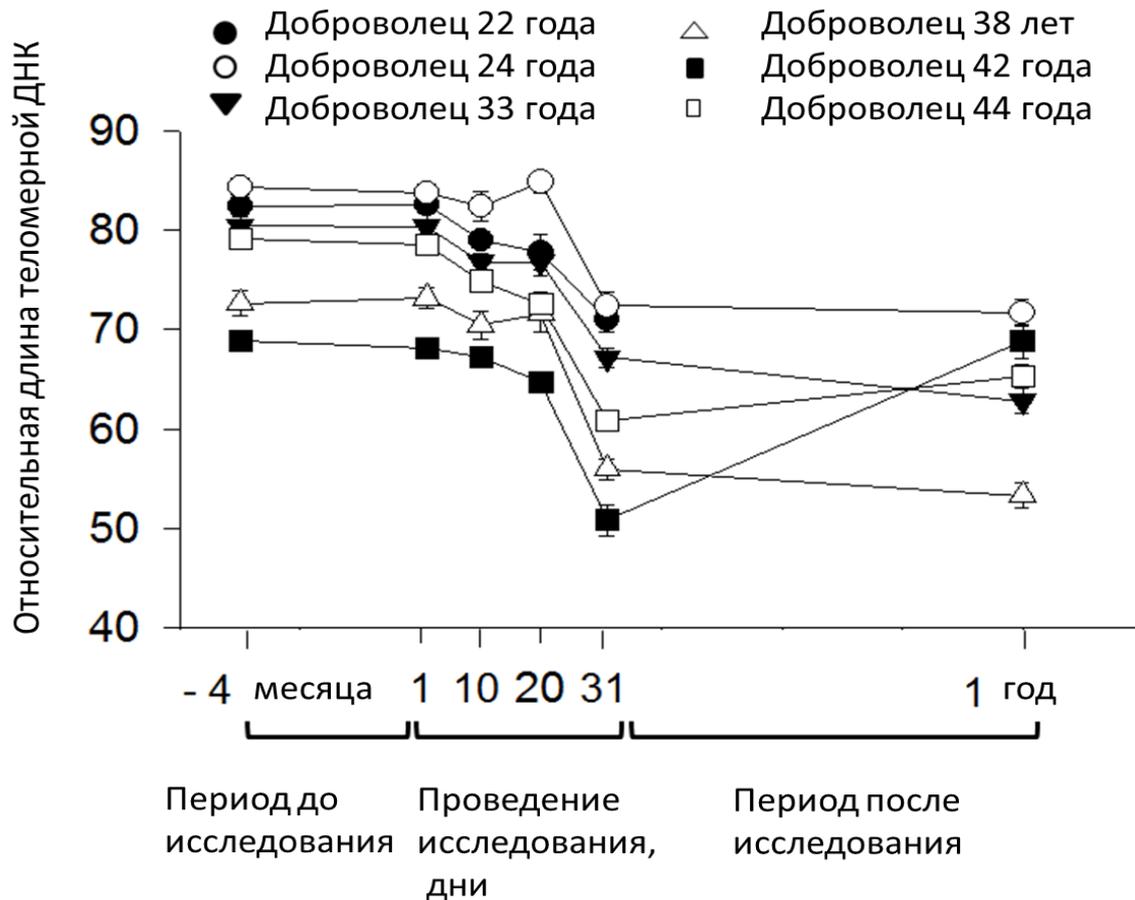


Рисунок 28 – Динамика изменения длины теломерной ДНК для каждого испытуемого

Таким образом, можно предположить, что причиной укорочения теломерной ДНК послужили внешние факторы, такие, как высокие концентрации угарного газа (превышающее предельно допустимые концентрации в 2 раза) и высокий температурный фон.

Сокращение длины теломерной ДНК у добровольцев разного возраста происходило не одинаково: у более молодых (22 и 24 года) длина теломеров уменьшилась на 11,4% и 12,5% соответственно (рис.29). У добровольцев в

возрасте 42 и 44 года длина теломерной ДНК уменьшилась на 17,6% и 14,8% соответственно.

Таким образом, показано, что с увеличением возраста испытуемых происходит увеличение скорости укорочения теломеров. Можно предположить, что с увеличением возраста происходит накопление продуктов перекисного окисления липидов, в результате чего происходит интенсификация свободно-радикальных процессов, в конечном итоге приводящих к более быстрому сокращению длины теломеров.

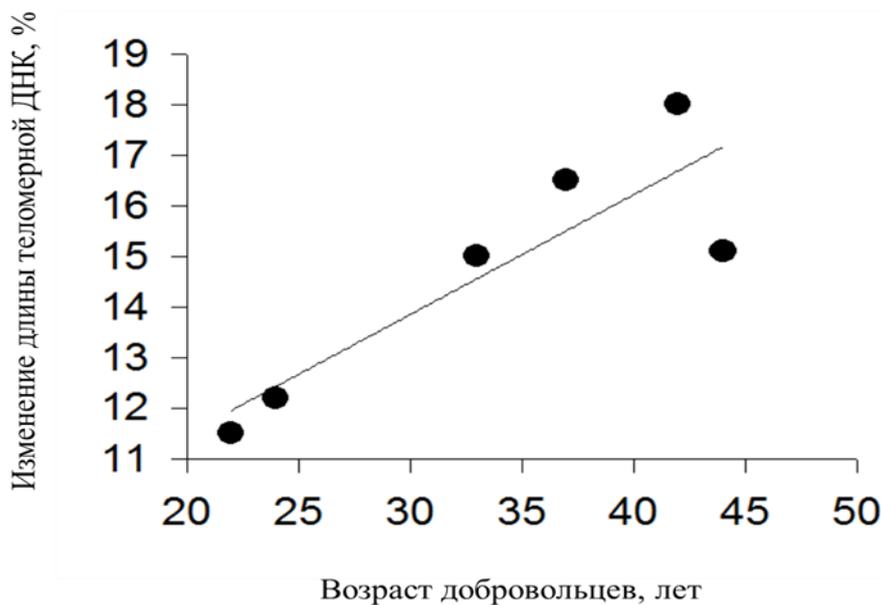


Рисунок 29 – Динамика скорости изменения длины теломеров в зависимости от возраста испытуемых. С увеличением возраста испытуемых происходит ускоренное укорочение теломеров ($r = 0.88$; $p < 0.02$)

Известно, что гипертермия вызывает образование свободных радикалов [6,13]. Действительно, как следует из опубликованных ранее результатов биохимических исследований, в течение месяца пребывания в МТК у испытуемых существенно вырос уровень одного из основных продуктов свободно-радикального окисления (МДА) в плазме крови. Параллельно в эритроцитах достоверно снизились активности антиоксидантных ферментов каталазы и GSH-Px, ответственных за утилизацию пероксида водорода и липогидропероксидов [12].

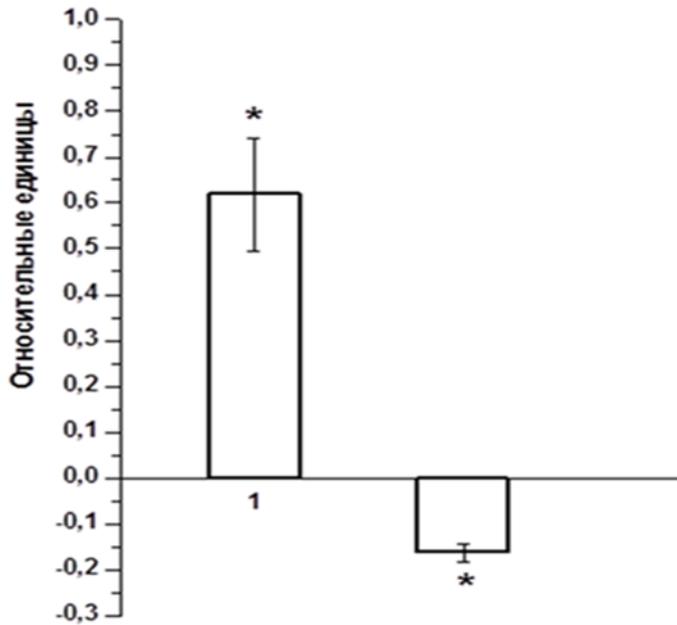


Рисунок 30 – Относительные изменения уровня МДА и длины теломеров в крови испытуемых, подвергшихся действию гипертермии в течение 30 дней 1- содержание малонового диальдегида в плазме крови; 2- относительная длина теломеров в лейкоцитах крови

Эти данные свидетельствуют о том, что через 30 дней пребывания в МТК у испытуемых были выявлены характерные изменения, свидетельствующие о наличии у них окислительного стресса, а именно, увеличение содержания продуктов свободно-радикального окисления на фоне снижения эффективности утилизации АФК (рис. 30).

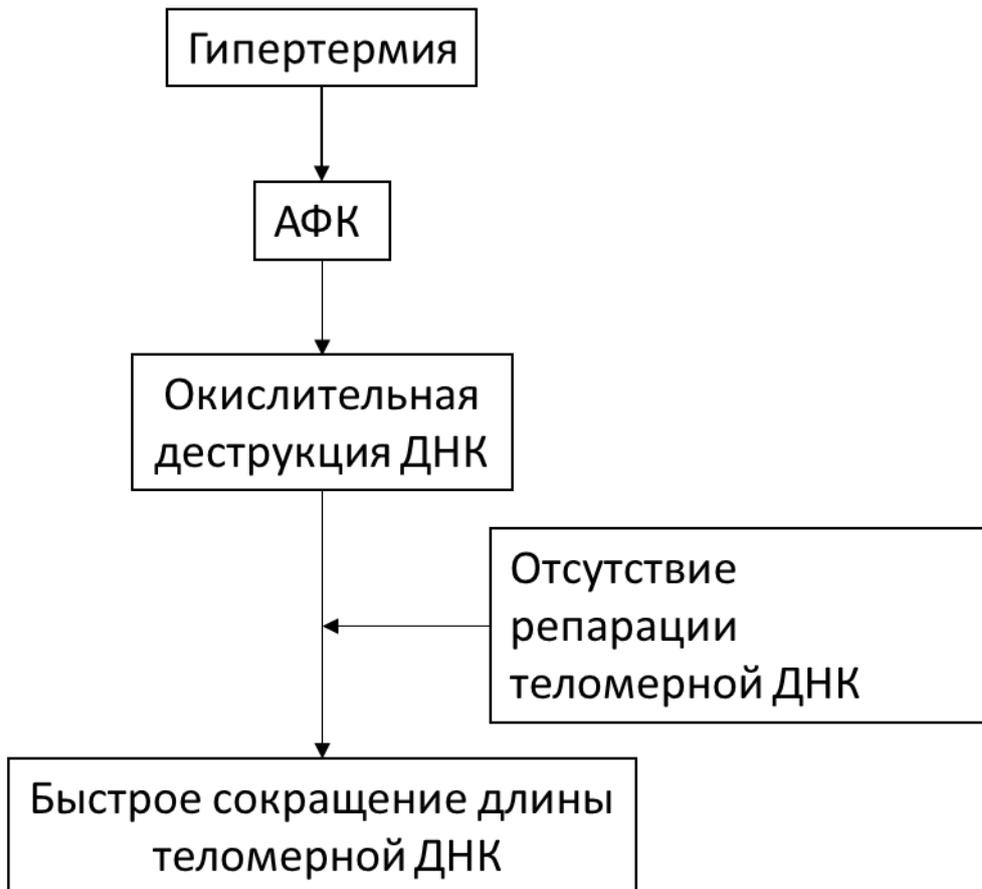


Рисунок 31 – Предполагаемый механизм сокращения теломерной ДНК на фоне высокой температуры окружающей среды

Как видно из рисунка 31, АФК и, особенно, гидроксильный радикал, вызывают разрывы ДНК преимущественно в области теломерных концов хромосом [68]. Окислительное повреждение теломерной ДНК происходит за счет образования аддукта гуанина - 8-гидроксигуанина, который способствует нарушениям в поддержании длины теломеров. В отличие от остальной части генома, теломеры не могут восстанавливать однонитевые разрывы ДНК [117]. Из-за этого теломеры особо чувствительны к накоплению гуанин аддукта [98], при накоплении которого происходит более быстрое укорочение теломерных концов хромосом. Скорость укорочения теломерных повторов напрямую влияет на скорость старения всего организма [65,92].

Также известно, что в теломерах снижена активность системы репарации [45,137]. Таким образом, возможно, что образовавшиеся АФК вызвали повреждения теломерных концов ДНК, которые не подвергаются репарации, что привело к существенному сокращению длины теломерных концов хромосом лейкоцитов периферической крови.

Заключение

Свободно-радикальная теория старения в настоящее время является общепринятой и имеет большое количество экспериментальных подтверждений [5,73]. В то же время, снижение длины теломерных повторов в хромосомах клеток рассматривают, как непосредственное проявление старения клеток и организма [53].

Результаты, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о том, что интенсификация свободно-радикальных процессов у пациентов с ИБС и высоким риском сердечно - сосудистой смерти (оцененная по такому объективному параметру окислительного стресса как накопление окисленных ЛНП в плазме крови) сопровождается достоверным снижением длины теломерных повторов в хромосомах форменных элементов крови.

Данные нашего исследования прямо указывают на то, что усиление свободно-радикальных реакций, приводя к окислительной деструкции молекул ДНК, может являться одним из механизмов преждевременного старения, причем, процессы биологического старения, как показано нами, усиливаются при увеличении риска сердечно - сосудистой смерти и/или наличии сердечно - сосудистых заболеваний.

Таким образом, изменения экологических факторов и аномальные повышения температурного фона могут приводить к развитию окислительного стресса, сопровождающегося укорочением теломеров, что, в свою очередь, может являться фактором преждевременного старения.

Укороченные теломеры рассматривают в качестве маркеров старения, а окислительный стресс считают одним из основных механизмов преждевременного старения [116].

Важно отметить, что связанные с образованием АФК повреждения ДНК были продемонстрированы в условиях повышения температуры и в модельной системе [11,136], причем, повышение температуры может

способствовать также генерированию пероксида водорода и гидроксил-радикала с участием некоторых аминокислот [136].

В последние годы обсуждается возможность увеличения осложнений заболеваний сердечно - сосудистой системы, связанных с глобальным изменением климатических условий. Поскольку можно считать установленным, что окислительный стресс играет важную роль в этиологии и патогенезе атеросклероза и его осложнений [23,71], исходя из результатов настоящего исследования, негативное влияние гипоксии и аномальных повышений температуры окружающей среды в прогрессировании атеросклероза нельзя недооценивать.

Полученные нами данные позволяют полагать, что окислительный стресс в результате неблагоприятных климатических условий может действовать в качестве дополнительного фактора риска возникновения и прогрессирования сердечно - сосудистых заболеваний и преждевременного старения организма.

Выводы

1. Установлены пределы длины теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов крови практически здоровых жителей г.Москвы для различных возрастных групп (20-29 лет, 30-39 лет, 40-49 лет, 50-59 лет, 60 и старше).
2. Выявлена отрицательная корреляция ($R=-0,43$) между длиной теломеров в лейкоцитах крови и уровнем окЛНП в плазме крови пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы.
3. Обнаружено уменьшение длины теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов крови при увеличении риска развития сердечно-сосудистых заболеваний или наличие клинических проявлений ИБС.
4. Установлены критические значения длины теломеров в лейкоцитах крови, при которых риск развития осложнений сердечно-сосудистых заболеваний достоверно возрастает.
5. Обнаружено достоверное уменьшение длины теломеров в лейкоцитах крови практически здоровых добровольцев при моделировании экстремальных климатических условий (волны летней жары).

Практические рекомендации

Больным сердечно-сосудистыми заболеваниями целесообразно проводить измерение длины теломеров, поскольку снижение длины теломеров более чем на 70% от нормального значения соответствующего возраста может свидетельствовать об опасности сердечно-сосудистых осложнений, что необходимо учитывать при проведении терапии.

Список литературы

1. Болезни органов кровообращения: руководство для врачей [Текст] / под ред. Е.И. Чазова. – М.: Медицина, 2001.
2. Воевода, М.И. Семейный анамнез и его связь с сердечно - сосудистыми заболеваниями в мужской популяции Новосибирска [Текст] / М.И. Воевода, В.Н. Максимов, С.К. Малютин // Бюллетень СО РАМН. – 2006. – №4 (122) . – С.56-62.
3. Ланкин, В.З. Итоги изучения патофизиологических последствий нарушения регуляции свободнорадикальных процессов: тупик или новый импульс? [Текст] / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе // Бюл. Вост. – Сиб. НЦ СО РАМН. – 2016. – Т. 1, № 3/2. – С.104-108.
4. Ланкин, В.З. Окислительный стресс и заболевания сердечно - сосудистой системы [Текст] / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе // Руководство по кардиологии / под ред. Е.И. Чазова. – Москва: Практика, 2014. – Т.1. – С.327-359.
5. Ланкин, В.З. Свободно-радикальные процессы играют важную роль в этиологии и патогенезе атеросклероза и сахарного диабета [Текст] / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе // Кардиология. – 2016. – Т.56, № 12. – С. 97-105.
6. Ланкин, В.З. Свободно-радикальные процессы при заболеваниях сердечно - сосудистой системы [Текст] / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Ю.Н. Беленков // Кардиология. – 2001. – Т.40, №7. – С. 48-61.
7. Льюин, Б. Гены [Текст] / Б. Льюин. – Москва: БИНОМ, Лаборатория знаний, 2012. – С. 762-766.
8. Механизм окислительной модификации липопротеидов низкой плотности при окислительном и карбонильном стрессе [Текст] / В.З. Ланкин [и др.] // Биохимия. – 2007. – Т.72, № 10. – С.1081-1090.
9. Национальные рекомендации по диагностике и лечению артериальной гипертонии [Текст]. – М., 2013.

10. Нордеврاند, К. Определение одного из конечных продуктов перекисного окисления - малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты [Текст] / К. Нордевранд // Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – Москва: Наука, 1972. – С. 241-243.
11. Образование перекиси водорода и гидроксильных радикалов в водных растворах L-аминокислот при воздействии рентгеновского излучения и тепла [Текст] / И.Н. Штаркман [и др.] // Биофизика. – 2008. – Т.53, №1. – С. 1-14.
12. Окислительный стресс как фактор риска осложнения сердечно - сосудистых заболеваний и преждевременного старения при действии неблагоприятных климатических условий [Текст] / В.З. Ланкин [и др.] // Кардиологический вестник. – 2013. – № 1. – С. 22-25.
13. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания [Текст] / Е.Б. Меньщикова [и др.]. – Новосибирск: Арта, 2008.
14. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты [Текст] / Е.Б. Меньщикова [и др.]. – Москва: Фирма «Слово», 2006. – С. 136-141.
15. Оценка макроэкономических последствий изменений климата на территории Российской Федерации до 2030 года и дальнейшую перспективу [Текст] / под ред. В.М. Катцова, Б.Н. Порфирьева. – 2011. – Электрон. дан. – Режим доступа: <http://www.meteorf.ru/product/climat/>
16. Ревич, Б.А. Волны жары, качество атмосферного воздуха и смертность населения европейской части России летом 2010 г.: результаты предварительной оценки [Текст] / Б.А. Ревич // Экология человека. – 2011. – №3. – С.
17. Эмануэль, Н.М. Лейкоз у мышей и особенности его развития при воздействии ингибиторов цепных окислительных процессов [Текст] / Н.М. Эмануэль, Л.П. Липчина // Докл. АН СССР. – 1958. – Т.121, № 1. – С. 141–144.

18. A critical role for TPP1 and TIN2 interaction in high-order telomeric complex assembly [Text] / M.S. O'Connor [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol. 103. – P. 11874-11879.
19. Ablation of telomerase and telomere loss leads to cardiac dilatation and heart failure associated with p53 upregulation [Text] / A. Leri [et al.] // EMBO J. – 2003. – Vol. 22. – P. 131–9.
20. Accelerated telomere shortening in β -thalassemia/HbE patients [Text] / P. Chaichompoo [et al.] // Blood Cells Mol Dis. – 2015. – Vol. 17, № 15. – P. 23-26.
21. Air Pollution Exposures and Circulating Biomarkers of Effect in a Susceptible Population: Clues to Potential Causal Component Mixtures and Mechanisms [Text] / R.J. Delfino [et al.] // Environ Health Perspect. – 2009. – Vol. 117. – P.1232–1238.
22. Aldehyde inhibition of antioxidant enzymes in blood of diabetic patients [Text] / V.Z. Lankin [et al.] // J Diabetes. – 2016. – Vol. 8, №3. – P. 398-404.
23. Aldehyde-dependent modification of low density lipoproteins [Text] / V.Z. Lankin [et al.] // Handbook of Lipoprotein Research. – New York: Nova Sci. Publishers, 2011. – P.85-107.
24. Alternative lengthening of telomeres in normal mammalian somatic cells [Text] / Axel A. Neumann [et al.] // Genes & Dev. – 2013. – Vol. 27. – P. 18-23.
25. Alternative lengthening of telomeres is characterized by high rates of telomeric exchange [Text] / J.A. Londono-Vallejo [et al.] // Cancer Res. – 2004. – Vol. 64. – P. 2324-2327.
26. Apolipoprotein B-bound lipids as a marker for evaluation of low density lipoprotein oxidation in vivo [Text] / V.V. Tertov [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1995. – Vol. 214, № 2. – P. 608-613.

27. Armanios, M. Telomeres and age-related disease: How telomere biology informs clinical paradigms [Text] / M. Armanios // *J Clin Invest.* – 2013. – Vol.123. – P. 996–1002.
28. Association between left ventricular mass and telomere length in a population study [Text] / T. Kuznetsova [et al.] // *Am J Epidemiol.* – 2010. – Vol. 172. – P. 440–450.
29. Association between shortened leukocyte telomere length and cardiometabolic outcomes: Systematic review and meta-analysis [Text] / M.J.J. D’Mello [et al.] // *Circ. Cardiovasc. Genet.* – 2015. – Vol. 8. – P. 82–90.
30. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older [Text] / R.M. Cawthon [et al.] // *Lancet.* – 2003. – Vol. 361. – P. 393–395.
31. Aubert, G. Telomere length measurement V Caveats and a critical assessment of the available technologies and tools [Text] / G. Aubert, M. Hills, P.M. Lansdorp // *Mutation Research.* – 2012. – Vol.730, № 1-2. – P.59-67.
32. Avin, B.A. Human telomerase reverse transcriptase regulation by DNA methylation, transcription factor binding and alternative splicing (Review) [Text] / B.A. Avin, C.B. Umbricht, M.A. Zeiger // *Int J Oncol.* – 2016. – Vol. 49, № 6. – P. 2199-2205.
33. Bernheim, F. Biochemical implications of pro-oxidants and antioxidants [Text] / F. Bernheim // *Radiation Res.* – 1963. – Vol. 3(Suppl.). – P.17-32.
34. Biomarkers of oxidative stress and its association with the urinary reducing capacity in bus maintenance workers [Text] / J.-J. Sauvain [et al.] // *J of Occup Med Toxicol.* – 2011. – Vol. 6. – P.1–13.
35. Blackburn, E.H. Switching and signaling at the telomere [Text] / E.H. Blackburn // *Cell.* – 2001. – Vol. 106. – P. 661-673.

36. Blackburn, E.H. Telomeres and telomerase: The path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging [Text] / E.H. Blackburn, C. Greider, J. Szostak // *Nature Medicine*. – 2006. – Vol.12, № 10. – P. 1133-8.
37. Blasco, M.A. Chromatin regulation and non-coding RNAs at mammalian telomeres [Text] / M.A. Blasco // *Semin Cell Dev Biol*. – 2010. – Vol. 21, № 2. – P. 186-93.
38. Blood Pressure in Healthy Humans Is Regulated by Neuronal NO Synthase [Text] / H. Shabeeh [et al.] // *Hypertension*. – 2017. – Vol. 69, № 5. – P. 970-976.
39. Brown, M. Atherosclerosis scavenging for receptors [Text] / M. Brown, J. Goldstein // *Nature*. – 1990. – Vol. 343, №6258. – P. 508–509.
40. Cawthon, R.M. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method [Text] / R.M. Cawthon // *Nucleic Acids Res*. – 2009. – Vol. 37, № 3. – P. e21.
41. Chatterjee, Shailja. Telomeres in health and disease [Text] / Shailja Chatterjee // *J Oral Maxillofac Pathol*. – 2017. – Vol. 21, № 1. – P. 87–91.
42. Comprehensive metabolomics identified lipid peroxidation as a prominent feature in human plasma of patients with coronary heart diseases [Text] / J. Lu [et al.] // *Redox Biol*. – 2017. – Vol. 12. – P. 899-907.
43. Coordinated interactions of multiple POT1-TPP1 proteins with telomere DNA [Text] / M. Corriveau [et al.] // *J Biol Chem*. – 2013. – Vol. 288, № 23. – P.16361-70.
44. Developmental differences in the immortalization of lung fibroblasts by telomerase [Text] / N.R. Forsyth [et al.] // *Aging Cell*. – 2003. – Vol. 2. – P.235-243.
45. Doksani, Y. Telomere-Internal Double-Strand Breaks Are Repaired by Homologous Recombination and PARP1/Lig3-Dependent End-Joining

- [Text] / Y. Doksani, T. de Lange // *Cell Rep.* – 2016. – Vol. 17, № 6. – P.1646-1656.
46. Epidemiologic study of mortality during the Summer 2003 heat wave in Italy [Text] / S. Conti [et al.] // *Environ Res.* – 2005. – Vol. 98. – P. 390–9.
47. Estimating age of humans based on telomere shortening [Text] / A. Tsuji [et al.] // *Forensic Science International.* – 2002. – Vol. 126. – P. 197–199.
48. Fotiadou, P. DNA polymerase beta interacts with TRF2 and induces telomere dysfunction in a murine mammary cell line [Text] / P. Fotiadou, O. Henegariu, J.B. Sweasy // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64. – P. 3830-57.
49. Fyhrquist, F. Association of leukocyte telomere length with breast cancer risk: nested case-control findings from the Shanghai Women's Health Study [Text] / F. Fyhrquist, O. Saijonmaa, T. Strandberg // *Am J Epidemiol.* – 2013. – Vol. 178, № 4. – P. 662-3.
50. Fyhrquist, F. The roles of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease [Text] / F. Fyhrquist, O. Saijonmaa, T. Strandberg // *Nat Rev Cardiol.* – 2013. – Vol. 10, № 5. – P. 274-83.
51. Genome-wide analysis of in vivo TRF1 binding to chromatin restricts its location exclusively to telomeric repeats [Text] / I. Garrobo [et al.] // *Cell Cycle.* – 2014. – Vol.13, № 23. – P. 3742-9.
52. Grahame, T.J. Oxidative stress-induced telomeric erosion as a mechanism underlying airborne particulate matter-related cardiovascular disease [Text] / T.J. Grahame, R.B. Schlesinger // *Part Fibre Toxicol.* – 2012. – Vol. 9. – P. 21.
53. Greider, C.W. Regulating telomere length from the inside out: the replication fork model [Text] / C.W. Greider // *Genes Dev.* – 2016. – Vol. 30, № 13. – P. 1483-1491.
54. Harley, C.B. Telomeres shorten during ageing in human fibroblasts [Text] / C.B. Harley, A.B. Futcher, C.W. Greider // *Nature.* – 1990. – Vol. 345. – P. 458-460.

55. Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry [Text] / D. Harman // J Gerontol. – 1956. – Vol. 11, № 3. – P. 298-300.
56. Hayflick, L. How and why we age [Text] / L. Hayflick // Exptl Gerontol. – 1998. – Vol. 33, № 7-8. – P. 639-53.
57. Human cell senescence as a DNA damage response [Text] / T. von Zglinicki [et al.] // Mechanisms of Ageing and Development. – 2005. – Vol. 126. – P. 111-117.
58. Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease [Text] / Veryan Codd [et al.] // Nature Genetics. – 2013. – Vol. 45. – P. 422-427.
59. Impact of Oxidative Stress in Premature Aging and Iron Overload in Hemodialysis Patients [Text] / B. Murillo-Ortiz [et al.] // Oxid Med Cell Longev. – 2016;2016:1578235
60. Impartial comparative analysis of measurement of leukocyte telomere length/DNA content by Southern blots and qPCR [Text] / A. Aviv [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2011. – Vol. 39, № 20. – P. e134.
61. Increase of urinary concentrations of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in diesel exhaust emission inspector exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons [Text] / M.-W. Lee [et al.] // Int Arch Occup Environ Health. – 2011. – Vol. 85, № 3. – P. 273–282.
62. Increased Dicarbonyl Stress as a Novel Mechanism of Multi-Organ Failure in Critical Illness [Text] / B.C. van Bussel [et al.] // Int J Mol Sci. – 2017. – Vol. 18, № 2. – P. 346.
63. Increased DNA dicarbonyl glycation and oxidation markers in patients with type 2 diabetes and link to diabetic nephropathy [Text] / S. Waris [et al.] // J Diabetes Res. – 2015. – Vol. 2015. – P. 915486.
64. Interaction of G-quadruplexes in the full-length 3' human telomeric overhang [Text] / Abraham J. Punnoose [et al.] // Am Chem Soc. – 2014. – Vol. 136, № 52. – P. 18062-9.

65. Jylhävä, J. Biological Age Predictors [Text] / J. Jylhävä, N.L. Pedersen, S. Hägg // *EBioMedicine*. – 2017. – Apr 1. pii: S2352-3964(17)30142-1
66. Kao, L.W. Toxicity associated with carbon monoxide [Text] / L.W. Kao, K.A. Nanagas // *Clinics in Laboratory Medicine*. – 2006. – Vol. 26, №1. – P. 99–125.
67. Kawanishi, S. Mechanism of telomere shortening by oxidative stress [Text] / S. Kawanishi, S. Oikawa // *Ann N Y Acad Sci*. – 2004. – Vol. 1019. – P.278-84.
68. Keefe, D.L. Telomeres, Reproductive Aging, and Genomic Instability During Early Development [Text] / D.L. Keefe // *Reprod Sci*. – 2016. – Vol. 23, № 12. – P. 1612-1615.
69. Lankin, V. Z. The enzymatic systems in the regulation of free radical lipid peroxidation [Text] / V.Z. Lankin // *Free Radicals, Nitric Oxide, and Inflammation: Molecular, Biochemical, and Clinical Aspects* / eds.: A. Tomasi [et al.]. – Amsterdam, etc.: IOS Press, 2003. – Vol. 344. – P. 8-23. – (NATO Science Series).
70. Lankin, V.Z. [et al.] // *Handbook of Lipoprotein Research*. – NY: Nova Sci., 2010. – P. 85-107.
71. Lankin, V.Z. Atherosclerosis as a free radical pathology and antioxidative therapy of this disease [Text] / V.Z. Lankin, A.K. Tikhaze // *Free radicals, nitric oxide, and inflammation: molecular, biochemical, and clinical aspects* / eds.: A. Tomasi, T. Özben, V.P. Skulachev. – Amsterdam etc.: IOS Press, 2003. – Vol. 344. – P.218-231. – (NATO Science Series).
72. Lankin, V.Z. Free radical lipoperoxidation during atherosclerosis and antioxidative therapy of this disease [Text] / V.Z. Lankin, A.K. Tikhaze // *Free Radicals, Nitric Oxide and Inflammation: Molecular, Biochemical and Clinical Aspects* / eds.: A. Tomasi [et al.]. – Amsterdam, etc.: IOS Press, NATO Science Series. – 2003. – Vol. 344. – P.218-231.

73. Lankin, V.Z. Role of Oxidative Stress in the Genesis of Atherosclerosis and Diabetes Mellitus: A Personal Look Back on 50 Years of Research [Text] / V.Z. Lankin, A.K. Tikhaze // *Curr Aging Sci.* – 2017. – Vol.10. – P.
74. Lankin, V.Z. The enzymatic systems in the regulation of free radical lipid peroxidation [Text] / V.Z. Lankin // *Free Radicals, Nitric Oxide, and Inflammation: Molecular, Biochemical, and Clinical Aspects* / eds.: A. Tomasi [et al.]. – Amsterdam, etc.: IOS Press, 2003. – Vol. 344. – P.8-23. – (NATO Science Series).
75. Leucocyte telomere dynamics and human hematopoietic stem cell kinetics during somatic growth [Text] / I. Sidorov [et al.] // *Exp. Hematol.* – 2009. – Vol. 37. – P. 514-524.
76. Li, B. Identification of human Rap1: implications for telomere evolution [Text] / B. Li, S. Oestreich, T. de Lange // *Cell.* – 2000. – Vol.101. – P. 471-483.
77. Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to the cholesteryl ester accumulation in human monocyte macrophages [Text] / A.M. Fogelman [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1980. – Vol. 77, № 4. – P. 2214-2218.
78. Methylglyoxal-Glyoxalase 1 Balance: The Root of Vascular Damage [Text] / C. Nigro [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2017. – Vol.18, № 1. – P. 188.
79. Min, J. Alternative lengthening of telomeres can be maintained by preferential elongation of lagging strands [Text] / J. Min, W.E. Wright, J.W. Shay // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – Vol. 45, № 5. – P. 2615-2628.
80. Mitochondrial DNA damage can promote atherosclerosis independently of reactive oxygen species through effects on smooth muscle cells and monocytes and correlates with higher-risk plaques in humans [Text] / E. Yu [et al.] // *Circulation.* – 2013. – Vol. 128, № 7. – P. 702-12.
81. Mortality in Spain during the heat waves of summer 2003 [Text] / F. Simon [et al.] // *Euro Surveill.* – 2005. – Vol. 10. – P.156–60.

82. Muezzinler, A. Body mass index and leukocyte telomere length in adults: A systematic review and meta-analysis [Text] / A. Muezzinler, A.K. Zaineddin, H. Brenner // *Obes. Rev.* – 2014. – Vol. 15. – P.192–201.
83. NEK6-mediated phosphorylation of human TPP1 regulates telomere length through telomerase recruitment [Text] / Y. Hirai [et al.] // *Genes Cells.* – 2016. – Vol. 21, № 8. – P. 874-89.
84. Onda de calor de Agosto de 2003. Os seus efeitos sobre a mortalidade da populacao portuguesa [Text] / J. Botelho [et al.]. – Lisboa: Instituto nacional de Saude Dr. Ricardo Jorge, 2003.
85. Ourliac-Garnier, I. Telomere Length Analysis by Quantitative Fluorescent in Situ Hybridization (Q-FISH) [Text] / I. Ourliac-Garnier, A. Londoño-Vallejo // *Methods Mol Biol.* – 2017. – Vol. 1587. – P. 29-39.
86. Oxidative Stress Induces Persistent Telomeric DNA Damage Responsible for Nuclear Morphology Change in Mammalian Cells [Text] / Elisa Colluzi [et al.] // *PLoSOne.* – 2014. – Vol. 9, № 10. – P. e110963.
87. Oxidative guanine base damage regulates human telomerase activity [Text] / E. Fouquerel [et al.] // *Nat Struct Mol Biol.* – 2016. – Vol. 23, № 12. – P.1092-1100.
88. Oxidized LDL induced extracellular trap formation in human neutrophils via TLR-PKC-IRAK-MAPK and NADPH-oxidase activation [Text] / D. Awasthi [et al.] // *Free Radic Biol Med.* – 2016. – Vol. 93. – P.190-203.
89. Palm, W. How shelterin protects mammalian telomeres [Text] / W. Palm, T. de Lange // *Annu. Rev. Genet.* – 2008. – Vol. 4. – P. 301–334.
90. Petersen, S. Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts [Text] / S. Petersen, G. Saretzki, T. von Zglinicki // *Exp. Cell. Res.* – 1998. – Vol. 239. – P.152-60.
91. Petraccone, L. Higher-order quadruplex structures [Text] / L. Petraccone // *Top Curr Chem.* – 2013. – Vol. 330. – P. 23-46.

92. Physical activity and telomere length: Impact of aging and potential mechanisms of action [Text] / N.C. Arsenis [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Mar 30. – doi: 10.18632.
93. POT1-TPP1 Binding and Unfolding of Telomere DNA Discriminates against Structural Polymorphism [Text] / M.R. Mullins [et al.] // *J Mol Biol*. – 2016. – Vol. 428, № 13. – P. 2695-708.
94. Prasad, K.N. Telomere shortening during aging: Attenuation by antioxidants and anti-inflammatory agents [Text] / K.N. Prasad, M. Wu, S.C. Bondy // *Mech Ageing Dev*. – 2017. – Vol. 164. – P. 61-66.
95. Protein measurement with the Folin phenol reagent [Text] / O.H. Lowry [et al.] // *J. Biol. Chem*. – 1951. – Vol. 193. – P. 265-275.
96. Race, Ethnicity, Psychosocial Factors, and Telomere Length in a Multicenter Setting [Text] / Shannon M. Lynch [et al.] // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11, № 1. – P. 1-17
97. Reactive oxygen species and the cardiovascular system [Text] / Y.J. Taverne [et al.] // *Oxid. Med. Cell Longev*. – 2013; 2013:862423. doi: 10.1155/2013/862423
98. Repair of O6-methylguanine adducts in human telomeric G-quadruplex DNA by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase [Text] / L.M. Hellman [et al.] // *Nucleic Acids Res*. – 2014. – Vol. 42, № 15. – P. 9781-91.
99. Repetitive DNA loci and their modulation by the non-canonical nucleic acid structures R-loops and G-quadruplexes [Text] / A.C. Hall [et al.] // *Nucleus*. – 2017. – Vol. 8, № 2. – P. 162-181.
100. Richter, T. A Continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts [Text] / T. Richter, T. van Zglinicki // *Exp Gerontol*. – 2007. – Vol. 42. – P.1039–1042.
101. Role of mammalian Rad54 in telomere length maintenance [Text] / I. Jaco [et al.] // *Mol Cell Biol*. – 2003. – Vol. 23. – P. 5572–5580.

102. Role of mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism [Text] / S. Nemoto [et al.] // *Mol.Cell.Biol.* – 2000. – Vol.20. – P. 7311-7318.
103. Role of telomeres and associated maintenance genes in Type 2 Diabetes Mellitus: A review [Text] / I. Sethi [et al.] // *Diabetes Res Clin Pract.* – 2016. – Vol. 122. – P. 92-100.
104. Romano, Gal. Hagit Environmental Stresses Disrupt Telomere Length Homeostasis [Text] / Gal Hagit Romano, Yaniv Harari, Tal Yehuda // *PLOS Genetics.* – 2013. – Vol.9. – P.1-9.
105. Scherer, William F. Viral Multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HELA) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix [Text] / William F. Scherer, Jerome T. Syverton, George O. Gey // *The Journal of Experimental Medicine.* – 1953. – Vol. 7. – P. 695–715.
106. Shay, J.W. Senescence and immortalization role of telomeres and telomerase [Text] / J.W. Shay, W.E. Wright // *Carcinogenesis.* – 2005. – Vol. 26. – P. 867- 874.
107. Shin, Y.A. Low estrogen levels and obesity are associated with shorter telomere lengths in pre- and postmenopausal women [Text] / Y.A. Shin, K.Y. Lee // *J Exerc Rehabil.* – 2016. – Vol.12,№ 3. – P. 238-46.
108. Short communication: Study on the formation of 2-methylimidazole and 4-methylimidazole in the Maillard reaction [Text] / X. Wu [et al.] // *J Dairy Sci.* – 2015. – Vol. 98,№ 12. – P. 8565-71.
109. Short-term inhibition of TERT induces telomere length-independent cell cycle arrest and apoptotic response in EBV-immortalized and transformed B cells [Text] / A. Celeghin [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2016. – Vol. 7,№ 12. – P. e2562.
110. SHREC, an Effector Complex for Heterochromatic Transcriptional Silencing [Text] / T. Sugiyama [et al.] // *Cell.* – 2006. – P. 491-504.

111. Sies, H. Oxidative stress II. Oxidants and antioxidants [Text] / H. Sies. – London: Academic Press, 1991.
112. Singh, M. Oxidative and reductive metabolism of lipid-peroxidation derived carbonyls [Text] / M. Singh, A. Kapoor, A. Bhatnagar // Chem Biol Interact. – 2015. – Vol. 234. – P. 261-73.
113. Stansel, R.M. T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang [Text] / R.M. Stansel, T. de Lange, J.D. Griffith // EMBO J. – 2001. – Vol. 20. – P. 5532-5540.
114. Steinberg, D. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis [Text] / D. Steinberg, J.L. Witztum // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 2010. – Vol. 30, № 12. – P. 2311-2316.
115. Stressful life events and leucocyte telomere length: Do lifestyle factors, somatic and mental health, or low grade inflammation mediate this relationship? Results from a cohort of Danish men born in 1953 [Text] / M. Osler [et al.] // Brain Behav Immun. – 2016. – Vol. 58. – P. 248-253.
116. Tchirkov, A. Role of oxidative stress in telomere shortening in cultured fibroblasts from normal individuals and patients with ataxia-telangiectasia [Text] / A. Tchirkov, P.M. Lansdorp // Human Molecular Genetics. – 2003. – Vol. 12, № 3. – P. 227-232.
117. Telomere and telomerase biology [Text] / M.A. Giardini [et al.] // Prog Mol Biol Transl Sci. – 2014. – Vol. 125. – P. 1-40.
118. Telomere dynamics in human mesenchymal stem cells after exposure to acute oxidative stress [Text] / M. Harbo [et al.] // DNA Repair (Amst). – 2012. – Vol. 11, № 9. – P. 774-9.
119. Telomere extension by telomerase and ALT generates variant repeats by mechanistically distinct processes [Text] / Michael Lee [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2014. – Vol. 42, № 3. – P. 1733–1746.

120. Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? [Text] / J.M. Houben [et al.] // *Free Radic Biol Med.* – 2008. – Vol. 44, № 3. – P.235-46.
121. Telomere length in vascular tissues from patients with atherosclerotic disease [Text] / R. Nzietchueng [et al.] // *J Nutr Health Aging.* – 2011. – Vol. 15, № 2. – P. 153-6.
122. Telomere length of circulating leukocyte subpopulations and buccal cells in patients with ischemic heart failure and their offspring [Text] / L.S.M. Wong [et al.] // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6. – P. 23118. doi:10.1371
123. Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study [Text] / S.W. Brouillette [et al.] // *Lancet.* – 2007. – Vol. 369. – P. 107–114.
124. Telomere protection by TPP1/POT1 requires tethering to TIN2 [Text] / K.K. Takai [et al.] // *Mol Cell.* – 2011. – Vol. 44, № 4. – P. 647-59.
125. Telomere Recognition and Assembly Mechanism of Mammalian Shelterin [Text] / F. Erdel [et al.] // *Cell Rep.* – 2017. – Vol. 18, № 1. – P.41-53.
126. Telomere shortening and metabolic compromise underlie dystrophic cardiomyopathy [Text] / A.C. Chang [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2016. – Vol. 113, № 46. – P. 13120-13125.
127. Telomeric overhang length determines structural dynamics and accessibility to telomerase and ALT-associated proteins [Text] / H. Hwang [et al.] // *Structure.* – 2014. – Vol. 22, № 6. – P. 842-53.
128. The impact of the 2003 heatwave on mortality and hospital admissions in England [Text] / H. Johnson [et al.] // *Health Stat Q.* – 2005. – Vol. 25. – P. 6–11.
129. The initiation of free radical peroxidation of low-density lipoproteins by glucose and its metabolite methylglyoxal: a common molecular

- mechanism of vascular wall injure in atherosclerosis and diabetes [Text] / V. Lankin [et al.] // *Mol Cell Biochem.* – 2014. – Vol. 395, № 1-2. – P.241-252.
130. The load of short telomeres, estimated by a new method, Universal STELA, correlates with number of senescent cells [Text] / L. Bendix [et al.] // *Aging Cell.* – 2010. – Vol.9, № 3. – P. 383-97.
131. The nucleation and maintenance of heterochromatin by a histone deacetylase in fission yeast [Text] / T. Yamada [et al.] // *Mol. Cell.* – 2005. – Vol. 20. – P. 173–185.
132. The protein subunit of telomerase displays patterns of dynamic evolution and conservation across different metazoan taxa [Text] / A.G. Lai [et al.] // *BMC Evol Biol.* – 2017. – Vol. 17, № 1. – P.107.
133. The Role of Oxidative Stress in Diabetic Neuropathy: Generation of Free Radical Species in the Glycation Reaction and Gene Polymorphisms Encoding Antioxidant Enzymes to Genetic Susceptibility to Diabetic Neuropathy in Population of Type I Diabetic Patients [Text] / M.A. Babizhayev [et al.] // *Cell Biochem Biophys.* – 2015. – Vol. 71. – P.1425-1443.
134. Transient ALT activation protects human primary cells from chromosome instability induced by low chronic oxidative stress [Text] / E. Coluzzi [et al.] // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P.43309.
135. Treatment in carbon monoxide poisoning patients with headache: a prospective, multicenter, double-blind, controlled clinical trial [Text] / T. Ocak [et al.] // *Am J Emerg Med.* – 2016. – Vol. 34, № 11. – P. 2140-2145.
136. Urinary 8-oxo-2-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo? [Text] / J. Lunec [et al.] // *Free Radic Biol Med.* – 2002. – Vol. 33, № 7. – P. 875-885.
137. von Zglinicki, T. Telomeres, cell senescence and human ageing [Text] / T. von Zglinicki, C. Martin-Ruiz, G. Saretzki // *Signal Transduct.* – 2005. – №3. – P. 103-114.

138. Walker, J.R. Post-translational modifications of TRF1 and TRF2 and their roles in telomere maintenance [Text] / J.R. Walker, X.D. Zhu // *Mech Ageing Dev.* – 2012. – Vol. 133, № 6. – P. 421-34.
139. Wang, C. Role of TERRA in the regulation of telomere length [Text] / C. Wang, L. Zhao, S. Lu // *Int J Biol Sci.* – 2015. – Vol. 11, № 3. – P. 316-23.
140. Wang, J.C. Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence [Text] / J.C. Wang, M. Bennett // *Circ Res.* – 2012. – Vol. 111, № 2. – P. 245-59.
141. Yeh, J.K. Telomeres and Telomerase in Cardiovascular Diseases [Text] / J.K. Yeh, C.Y. Wang // *Genes (Basel).* – 2016. – Vol. 7, № 9. – P.58.
142. Zhou, X.Z. The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor [Text] / X.Z. Zhou, K.P. Lu // *Cell.* – 2001. – Vol. 107. – P.347-359.