Исследование длины теломер у пациентов с болезнью Паркинсона

А.К. КОЛЯДА*, А.М. ВАЙСЕРМАН, Д.С. КРАСНЕНКОВ, И.Н. КАРАБАНЬ

ГУ «Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарева Национальной академии медицинских наук Украины», Киев, Украина

The study of telomere length in patients with Parkinson's disease

A.K. KOLIADA, A.M. VAISERMAN, D.S. KRASNENKOV, I.N. KARABAN

D.F. Chebotarev State Institute of Gerontology National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

Цель исследования. Короткие теломеры, которые образуются в результате разрывов двойной нити ДНК и недорепликации, вызывают остановку клеточного цикла, результатом чего являются клеточное старение и апоптоз. Эрозия теломер служит важным механизмом регуляции процессов старения, ограничивая клеточную пролиферацию. За последние десятилетия многие исследования в области теломерной биологии показали, что теломерная ДНК и теломерные белки вовлечены в патогенез некоторых заболеваний человека. Цель исследования — изучение длины теломер при болезни Паркинсона (БП). **Материал и методы.** Длину теломер определяли в клетках буккального эпителия и в лейкоцитах у пациентов с БП и в контрольной группе. **Результаты и заключение.** Выявлено, что теломеры в клетках буккального эпителия более короткие у пациентов с БП, чем в контрольной группе; в клетках крови длина теломер была одинаковой. Высказано предположение, что укорочение теломер в клетках буккального эпителия может быть следствием оксидативного стреса и, следовательно, может быть использовано в качестве маркера БП на ранних этапах заболевания.

Ключевые слова: *болезнь Паркинсона, теломеры, теломерная теория старения.*

Objective. Telomeres which are formed by double-strand breaks and DNA underreplication, cause cell cycle arrest resulting in cellular senescence and apoptosis. The erosion of telomeres is an important mechanism for regulating the aging process by limiting cell proliferation. Over the last decade, many investigations in the field of telomeric biology showed that telomeric DNA and telomeric proteins are involved in the pathogenesis of some human diseases. The aim of the study was to compare telomere length in patients with Parkinson's disease (PD). **Material and methods**. Telomere length was measured in buccal epithelial cells and leukocytes in PD patients and controls. **Results and conclusion**. The length of telomeres in cells of buccal epithelium was shorter in patients with PD than in the control group. In blood cells, telomere length did not differ. It is suggested that shortening of telomeres in buccal epithelial cells may be due to oxidative stress and, hence, it can be used as a marker for the early stages of disease.

Key words: *Parkinson's disease, telomeres, telomeric theory of aging.*

Концы линейных эукариотических хромосом представляют собой потенциальные сайты репарации двойных разрывов ДНК (DNA double-strand breaks, DSBs), гомологической репарации и негомологичного объединения концов хромосом (non-homologous end joining, NHEJ) [1]. Теломеры представляют собой гетерохроматиновые структуры на концах хромосом, состоящие из тандемных повторов 5'-TTAGGG-3'. На концах теломер находятся одноцепочечные участки 3'-цепи, образующей D-петлю, которая играет важную роль в защите концов хромосомы [2, 3]. Формирование структуры теломерной петли также обеспечивает белковый комплекс шелтерин (shelterin), который состоит из 6 основных белков, специфически связывающихся с теломерной последовательностью: TRF1, TRF2, TIN2, RAP1, TPP1 и POT1. Эти белки присоединяются к 1- или 2-цепочечным участкам ДНК и защищают теломеры, тем самым поддерживая их длину и предотвращая от эрозии [4].

У человека средняя длина теломер обычно составляет от 10 000 до 15 000 пар нуклеотидов [5] и неизбежно сокращается со скоростью от 50 до 200 пар оснований при каждом акте клеточной репликации [6] в результате недорепликации, а также действия нуклеаз. Процесс укорочения продолжается до тех пор, пока размер теломер не достигнет критической длины [7], что вызывает остановку клеточного цикла, приводящую к старению или апоптозу. Это позволяет рассматривать теломеры в качестве митотических часов, которые регулируют способность клетки к делению. Половые и стволовые клетки тем не менее справляются с прогрессирующей эрозией теломер с помощью теломеразы — РНК-зависимой обратной транскриптазы, которая может достраивать ДНК теломер.

Теломераза состоит из обратной транскриптазы (telomerase reverse transcriptase, TERT) — фермента, который отвечает за синтез теломерных повторов, а также РНК (telomerase RNA, TER), которая служит матрицей для удлинения теломерной ДНК. Каталитический комплекс теломеразы состоит из 2 молекул TERT и TER, а также дискерина белка, который участвует в процессинге 3'-конца TER и его встраивании в активный комплекс те-

© Коллектив авторов, 2014

*e-mail: alex.genetic@gmail.com

ломеразы [8]. Кроме того, удлинение теломер может осуществляться посредством теломераза-независимого альтернативного удлинения теломер (alternate lengthening of telomeres, ALT), которое представляет собой гомологичную рекомбинацию теломерных участков.

В последние годы получены новые данные относительно роли теломер в регуляции клеточного старения и их связи со многими заболеваниями человека, в том числе врожденным дискератозом, синдромами Вернера, Блума, Неймегена, атаксией-телеангиэктазией, анемией Фанкони и др. Общим признаком этих заболеваний является то, что у пациентов обнаруживаются критически короткие теломеры по сравнению со здоровыми того же пола и возраста. Это подводит нас к новому пониманию заболеваний, а также ориентирует в направлении, в котором следует осуществлять поиск будущих диагностических и терапевтических стратегий.

В последнее время длину теломер в клетках периферической крови изучали в качестве основной модели при попытках расшифровать связи между изменением длины теломер и возрастными нарушениями и старением людей [9]. Высказано предположение, что причинами ускоренного укорочения теломер в клетках периферической крови лиц с возрастными заболеваниями являются повышенный уровень системного окислительного стресса и хроническое воспаление [9, 10]. Лейкоциты периферической крови являются прекрасным объектом для исследования динамики теломер [11]. Многие авторы полагают, что метод определения длины теломер (terminal restriction fragment measurement) в легкодоступных образцах, таких как периферическая кровь, может давать надежные данные для установления относительной длины теломер в других тканях [12]. Таким образом, укорочение теломер в лейкоцитах периферической крови может служить маркером не только старения, но и интенсивности окислительного стресса и хронического воспаления, которое может быть индикатором системного патологического стресса [13]. Например, средняя длина теломер лейкоцитов у больных с инфарктом миокарда оказалась значительно короче, чем у лиц контрольной группы. Существенное укорочение длины теломер в этом случае было ассоциировано с увеличением риска инфаркта миокарда примерно в 3 раза [14]. Аналогичным образом, теломеры эндотелиальных клеток, имеющих отношение к возникновению и прогрессии атеросклероза коронарных артерий, были значительно короче, чем в контроле, что может свидетельствовать об их патогенетической роли в развитии коронарных заболеваний [15].

Выраженное укорочение теломер в клетках периферической крови выявлено и при других заболеваниях (в том числе, сахарном диабете, болезни Альцгеймера, никотиновой зависимости и ожирении), а также у матерей с высоким уровнем психологического стресса, связанного с уходом за больными детьми [16—19].

В представленном исследовании определена длина теломер клеток крови и буккального эпителия у пациентов с болезнью Паркинсона (БП) и клинически здоровых лиц того же возраста.

Материал и методы

В исследовании были использованы образцы крови и буккального эпителия 30 пациентов с БП (12 мужчин и 18 женщин, средний возраст — 64,4±0,6 года), проходивших обследование в Институте геронтологии Национальной академии медицинских наук Украины.

В группу контроля входили 34 здоровых того же возраста, средний возраст которых был 65,0±0,7 года.

Поскольку предварительные расчеты показали, что половые различия не влияют на длину теломер, с целью усиления статистической мощности анализа окончательные расчеты были осуществлены в общей группе мужчин и женщин.

Выделение ДНК проводили с помощью набора «ДНК-Сорб» (Россия). Амплификацию изученных локусов осуществляли с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК на амплификаторе Corbett Rotor Gene 6000 (производства компании «Corbett LifeScience»).

Определение длины теломер в лизате клеток проводили методом ПЦР с детекцией флюоресценции в реальном времени [20, 21]. Для амплификации теломерных последовательностей использовали праймеры telg ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTG GGTTTGGGTTAGTGT и telc TGTTAGGTATCCCTATC CCTATCCCTATCCCTATCCCTAACA, для амплификации однокопийного референсного гена альбумина использовали праймеры albc CGGCGGCGGGCGGCGCG GGCTGGGCGGAAATGCTGCACAGAATCCTTG и albd GCCCGGCCCGCCGCGCCCGTCCCGCCGGAAAAGC ATGGTCGCCTGT.

Относительную длину теломер оценивали по показателю T/S, который рассчитывали как отношение числа копий теломерных повторов к числу копий гена альбумина. Статистическую значимость различий величины показателя T/S в контрольной группе и у пациентов с БП определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Корреляционно-регрессионный анализ был осуществлен при помощи пакета программ Statistica v.5.5 («StatSoft Inc.», США).

Результаты и обсуждение

Теломеры в клетках буккального эпителия оказались существенно короче у пациентов с БП, чем в контроле **(рис. 1)**. В лейкоцитах длина теломер не различалась. Эти данные свидетельствуют о том, что у пациентов с БП процесс зависимого от возраста укорочения длины теломер в клетках буккального эпителия ускорен. Длина теломер в этих клетках может быть показателем системных нарушений, которые возникают при БП, в том числе оксидантного стресса, и увеличения числа клеток под действием различных факторов роста. Отсутствие достоверных различий в длине теломер в лейкоцитах можно объяснить гетерогенностью популяции лейкоцитов в периферической крови человека и возможной разнонаправленностью происходящих в них процессов.

Обнаружена достоверная корреляция (r=0,55; p<0,01) между длинами теломер в клетках крови и буккального эпителия у пациентов с БП, но не в контрольной группе **(рис. 2)**. Это может свидетельствовать о сходстве механизмов эрозии теломер в клетках различных тканей при нейродегенеративном процессе. Отсутствие корреляции между длинами теломер в клетках крови и буккального эпителия в контрольной группе может быть связано с ее гетерогенностью в отношении различных «сценариев ста-

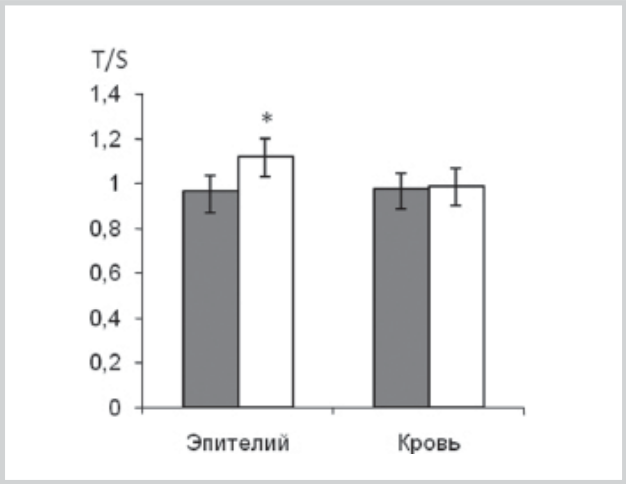

Рис. 1. **Относительная длина теломер (T/S) у пациентов с БП (темные столбцы) и в контрольной группе (светлые столбцы).**
* — $p<0,05$.

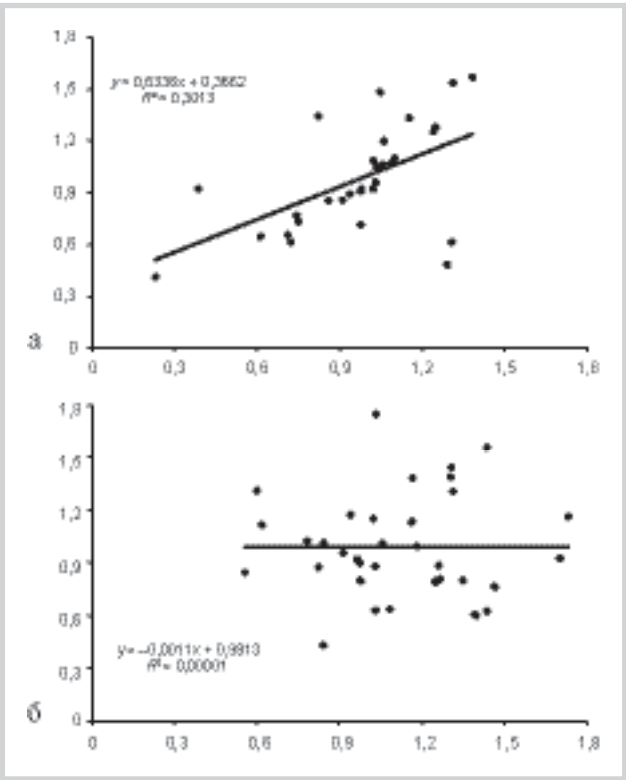

Рис. 2. **Корреляция длины теломер в клетках крови и буккального эпителия у пациентов с БП (а) и в контроле (б).**
По оси абсцисс — величина показателя T/S в клетках крови, по оси ординат — величина показателя T/S буккального эпителия.

рения» и, соответственно, различной патологической отягощенности включенных в эту группу лиц.

В предыдущих исследованиях анализ ассоциации длины теломер с БП приводил к противоречивым данным: при исследовании лейкоцитов периферической крови у 28 пациентов мужского пола и 27 лиц контрольной группы короткие теломеры (менее 5 т.п.н.) были выявлены только у пациентов с БП, в то время как средняя длина теломер в двух группах достоверно не различалась [22]. В другом исследовании H. Wang и соавт. [23] не обнаружили никакой разницы в длине теломер у 96 пациентов с БП и 172 лиц из контрольной группы. T. Maeda и соавт. [24] определили в своем исследовании среднюю длину теломер, а также статус метилирования субтеломерных регионов хромосом у 35 пациентов с БП и 42 лиц из контрольной группы. Было установлено, что лейкоциты у пациентов с БП имеют повышенный уровень метилирования субтеломерных областей, а также более короткие теломеры по сравнению с контролем. Эти данные подтверждают уже доказанный факт связи метилирования субтеломерных регионов хромосом с процессом укорочения теломер.

Возможную связь ускоренного укорочения теломер и БП можно объяснить несколькими факторами. Во-первых, теломеры укорачиваются при старении, и короткая длина теломер в лейкоцитах наблюдается именно у пациентов с нейродегенеративными расстройствами, в частности с БП [25]. Во-вторых, ряд работ показывает связь воспаления (которое, как известно, сопровождает процессы нейродегенерации при БП) с длиной теломер [18, 26—29]. В-третьих, показано, что оксидативный стресс приводит к укорочению длины теломер *in vitro* [10]. Известно, что теломеры обладают высокой чувствительностью к повреждениям, вызванным окислительным стрессом, что, возможно, связано с высоким содержанием гуанина [30, 31]. Окислительные повреждения ДНК накапливаются на протяжении всей жизни клетки, что, по-видимому, приводит к ее старению. Об этом, в частности, свидетельствуют данные исследования, проведенного T. von Zglinicki и соавт. [32], в соответствии с которыми в ДНК стареющих клеток выявлено на 30% больше окисленного гуанина и в 4 раза больше свободного 8-оксо-дезоксигуанозина, чем в молодых клетках. Кроме того, активные формы кислорода, особенно гидроксильные радикалы (OH), могут продуцировать однонитевые разрывы (либо непосредственно, либо посредством нарушения в системе репарации окислительных модификаций). В отличие от большинства последовательностей геномной ДНК, ДНК теломер менее подвержена репарации однонитевых разрывов [33] и в результате этого является более чувствительной к воздействиям факторов окислительного стресса.

Кроме того, окислительные повреждения теломерной ДНК менее эффективно репарируются по сравнению с другими последовательностями генома. Подобный дефицит репарации теломер может быть связан с предотвращением доступа ферментов репарации белком TRF2 или тем, что TRF2 подавляет фосфорилирование киназы ATM (ataxia telangiectasia mutated gene), что приводит к нарушению ответа на повреждения ДНК [34, 35].

В неврологии окислительный стресс имеет большое значение в реализации патогенетического каскада при острых и хронических заболеваниях ЦНС — от инсульта и эпилепсии до нейродегенеративной патологии [36—38]. Его роль велика также при БП [39—41]. Среди причин, способных привести к гибели нейронов при БП, отмечают резкое понижение активности митохондриальной супероксиддисмутазы (СОД) вследствие окислительных повреждений фактора транслокации Mn-СОД [42], а также окислительные повреждения митохондрий [43]. В процессе метаболизма дофамина образуются многочислен-

ные побочные свободнорадикальные продукты, в число которых входят супероксид-анион, перекись водорода и гидроксильные радикалы [44, 45]. Эти химически высокоактивные соединения, взаимодействуя с липидным слоем нейрональной мембраны, вызывают активацию перекисного окисления липидов, что в свою очередь приводит к нарушению целостности мембранного бислоя и в результате — к гибели нейронов.

Результаты проведенного нами исследования позволяют предположить, что меньшая длина теломер в клетках буккального эпителия может быть следствием оксидативного стресса, и показатель длины теломер может использоваться в качестве маркера БП на ранних этапах заболевания. При этом длина теломер в клетках крови непригодна для использования в качестве маркера БП.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Longhese M.P.* DNA damage response at functional and dysfunctional telomeres. Genes Dev 2008; 22: 125—140.
2. *Griffith J.D., Comeau L., Rosenfield S., Stansel R.M., Bianchi A., Moss H., de Lange T.* Mammalian telomeres end in a large duplex loop. Cell 1999; 97: 503—514.
3. *de Lange T.* Protection of mammalian telomeres. Oncogene 2002; 21: 532—540.
4. *de Lange T.* Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. Genes Dev 2005; 19: 2100—2110.
5. *Cairney C.J., Keith W.N.* Telomerase redefined: integrated regulation of hTR and hTERT for telomere maintenance and telomerase activity. Biochimie 2008; 90: 13—23.
6. *Zhao Y., Sfeir A.J., Zou Y., Buseman C.M., Chow T.T., Shay J.W., Wright W.E.* Telomere extension occurs at most chromosome ends and is uncoupled from fill-in in human cancer cells. Cell 2009; 138: 463—475.
7. *Hayflick L.* The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. Exp Cell Res 1965; 37: 614—636.
8. *Mitchell J.R., Cheng J., Collins K.* A box H/ACA small nucleolar RNA-like domain at the human telomerase RNA 3' end. Mol Cell Biol 1999; 19: 567—576.
9. *Aviv A., Valdes A., Gardner J.P., Swaminathan R., Kimura M., Spector T.D.* Menopause modifies the association of leukocyte telomere length with insulin resistance and inflammation. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91: 635—640.
10. *von Zglinicki T.* Oxidative stress shortens telomeres. Trends Biochem Sci 2002; 27: 339—344.
11. *Frenck R.W.Jr., Blackburn E.H., Shannon K.M.* The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. Proc Natl Acad Sci USA1998; 95: 5607—5610.
12. *Friedrich U., Gries E., Schwab M., Fritz P., Thon K., Klotz U.* Telomere length in different tissues of elderly patients. Mech Ageing 2000; 119: 89—99.
13. *Vaziri H., Dragowska W., Allsopp R.C., Thomas T.E., Harley C.B., Lansdorp P.M.* Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 9857—9860.
14. *Brouilette S., Singh R.K., Thompson J.R., Goodall A.H., Samani N.J.* White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23: 842—846.
15. *Ogami M., Ikura Y., Ohsawa M. et al.* Telomere shortening in human coronary artery diseases. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24: 546—550.
16. *Uziel O., Singer J.A., Danicek V. et al.* Telomere dynamics in arteries and mononuclear cells of diabetic patients: effect of diabetes and of glycemic control. Exp Gerontol 2007; 42: 971—978.
17. *Panossian L.A., Porter V.R., Valenzuela H.F. et al.* Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimer's disease status. Neurobiol Ageing 2003; 24: 77—84.
18. *Valdes A.M., Andrew T., Gardner J.P. et al.* Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. Lancet 2005; 366: 662—664.
19. *Epel E.S., Blackburn E.H., Lin F. et al.* Accelerated telomere shortening in response to life stress. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 17312—17315.
20. *Cawthon R.M.* Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. Nucl Acids Res 2009; 37: 21.
21. *Cawthon R.M.* Telomere measurement by quantitative PCR. Nucl Acids Res 2002; 30: 47.
22. *Guan J.Z., Maeda T., Sugano M. et al.* A percentage analysis of the telomere length in Parkinson's disease patients. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2008; 63: 467—473.
23. *Wang H., Chen H., Gao X. et al.* Telomere length and risk of Parkinson's disease. Mov Disord 2008; 23: 302—305.
24. *Maeda T., Guan J.Z., Oyama J., Higuchi Y., Makino N.* Aging-associated alteration of subtelomeric methylation in Parkinson's disease. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2009; 64: 949—955.
25. *Thomas P., O'Callaghan N.J., Fenech M.* Telomere length in white blood cells, buccal cells and brain tissue and its variation with ageing and Alzheimer's disease. Mech Ageing Dev 2008; 129: 183—190.
26. *Cipriano C., Tesei S., Malavolta M. et al.* Accumulation of cells with short telomeres is associated with impaired zinc homeostasis and inflammation in old hypertensive participants. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2009; 64: 745—751.
27. *Ilmonen P., Kotrschal A., Penn D.J.* Telomere attrition due to infection. PLoS One 2008; 3: 2143.
28. *Carrero J.J., Stenvinkel P., Fellstrom B. et al.* Telomere attrition is associated with inflammation, low fetuin-A levels and high mortality in prevalent haemodialysis patients. J Intern Med 2008; 263: 302—312.
29. *Aviv A.* Telomeres and human aging: facts and fibs. Sci Aging Knowledge Environ 2004; 51: 43.
30. *Kawanishi S., Oikawa S.* Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. Ann NY Acad Sci 2004; 1019: 278—284.
31. *Sitte N., Saretzki G., von Zglinicki T.* Accelerated telomere shortening in fibroblats after entended period of confluency. Free Radic Biol Med 1998; 24: 885—893.
32. *von Zglinicki T., Martin-Ruiz C., Saretzki G.* Telomeres, cell senescence and human ageing. Signal Transduct 2005; 3: 103—114.
33. *Petersen S., Saretzki G., von Zglinicki T.* Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts. Exp Cell Res 1998; 239: 152—160.
34. *Richter T., Saretzki G., Nelson G., Melcher M., Olijslagers S., von Zglinicki T.* TRF2 overexpression diminishes repair of telomeric single-strand breaks and accelerates telomere shortening in human fibroblasts. Mech Ageing Dev 2007; 128: 340—345.
35. *Beyne-Rauzy O., Recher C., Dastugue N., Demur C., Pottier G. et al.* Tumor necrosis factor alpha induces senescence and chromosomal instability in human leukemic cells. Oncogene 2004; 23: 7507—7516.
36. *Болдырев А.А.* Окислительный стресс и мозг. Соросовский образовательный журн 2001; 4: 21—28.
37. *Дюмаев К.М., Воронина Т.А., Смирнов Л.Д.* Антиоксиданты в профилактике и терапии патологий ЦНС. М: Изд-во Института биомедицинской химии РАМН 1995.
38. *Завалишина И.А., Яхно Н.Н., Гаврилова С.И.* Нейродегенеративные болезни и старение М: А.А.А. 2001.
39. *Koziorowski D., Jasztal J.* Factors which can play important role in pathogenesis of Parkinson disease. Neurol Neurochir Pol 1999; 33: 907—921.
40. *Moore D.J., West A.B., Dawson V.L., Dawson T.M.* Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. Annu Rev Neurosci 2005; 28: 57—87.
41. *Thomas B., Beal M.F.* Parkinson's disease. Hum Mol Genet 2007; 16: 183—194.
42. *Vaughan J.R., Farrer M.J., Wszolek Z.K. et al.* Sequencing of the alpha-synuclein gene in a large series of cases of familial Parkinson's disease fails to reveal any further mutations. Hum Mol Genet 1998; 7: 751—753.
43. *Fariss M.W., Chan C.B., Patel M. et al.* Role of mitochondria in toxic oxidative stress. Mol Interv 2005; 5: 94—111.
44. *Naoi M., Maruyama W.* Cell death of dopamine neurons in aging and Parkinson's disease. Mech Ageing Dev 1999; 111: 175—188.
45. *Ogawa N., Mori A.* Parkinson's disease, dopamine and free radicals. In: Oxidative stress and aging (ed. by R.G. Cutler). NY 1995; 303—309.