

УДК 612.112:616.15-093:616-001.28  
DOI: 10.15587/2313-8416.2016.63344

## ОСОБЛИВОСТІ ГЕННОЇ РЕГУЛЯЦІЇ ДОВЖИНИ ТЕЛОМЕР У ЛІМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ У РАННІЙ ТА ВІДДАЛЕНИЙ ПЕРІОДИ ПІСЛЯ ОПРОМІНЕННЯ

© І. М. Ільєнко, Д. А. Базика

*Досліджено особливості генної регуляції довжини теломер в імункомпетентних клітинах людини у ранньому та віддаленому періодах після опромінення. В учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС, опромінені в інтервалі доз більше 500 мЗв встановлено скорочення відносної довжини теломер та дисбаланс експресії генів TERF1 та TERF2 на фоні активації р53-опосередкованої теломеразної активності. Ранній період після опромінення у професійних лімітах на об'єкті «Укриття» характеризувався порушеннями протекторної функції теломер лімфоцитів*

**Ключові слова:** генна експресія, TERF1, TERF2, TERT, теломери, іонізуюча радіація, Чорнобиль, об'єкт «Укриття»

*Radiation-associated violations of gene regulation of lymphocytes telomere length in early and late period after exposure are investigated. In Chernobyl clean-up workers in the range of doses more than 500 mSv was set reduction of relative telomere length and imbalance in TERF1, TERF2 gene expression on the background of p53-mediated activation of telomerase activity. The early period after professional exposure in "Shelter" object characterized by impairment of protective function of telomeres*

**Keywords:** gene expression, TERF1, TERF2, TERT, telomere, ionizing radiation, Chernobyl, "Shelter" object

### 1. Вступ

Клітинне старіння – є генетичною програмою, в основі якої лежить вікова реорганізація геному, що супроводжується скороченням теломер, дефектами системи репарації ДНК та порушеннями експресії генів регуляторів теломеро-теломеразного комплексу. Молекулярно-генетична основа розвитку клітинного старіння після впливу іонізуючого випромінювання (ІВ) не є повністю зрозумілою. Наявність радіаційного старіння у постраждалих внаслідок аварії на ЧАЕС відноситься до найбільш контroversійних аспектів біологічних ефектів ІВ. Прискорене старіння встановлено в учасників ліквідації наслідків Чорнобильської катастрофи, зокрема, за показниками системи кровообігу, із старінням пов'язують всі порушення імунної системи, підвищення захворюваності на аутоімунний тиреоїд, алергічні захворювання та астму, які постійно зростають в забрудненій зоні у післяаварійний період. В учасників ліквідації наслідків Чорнобильської катастрофи показано скорочення теломерних послідовностей в лейкоцитах периферичної крові (ПК) у віддаленому періоді після опромінення. Однак, вказані зміни не можуть вважатися остаточно доведеними. Поряд із загрозою віддалених ефектів впливу ІВ постчорнобильської ери, сучасний стан ядерної та радіаційної безпеки на сьогодні є три-

герною точкою у наукових розробках та дослідженнях радіаційної медицини та радіобіології. Зокрема перетворення об'єкта «Укриття» на екологічно безпечну систему є однією з найважливіших державних програм України. Медичні та дозиметричні заходи, спрямовані на збереження здоров'я персоналу, який бере участь у цих роботах посідає чільне місце серед найактуальніших проблем сучасної клінічної радіобіології, радіаційної гігієни та радіаційного захисту.

### 2. Аналіз літературних даних та постановка проблеми

Останнє десятиліття дослідження в області клітинного старіння сфокусовані на визначенні ролі кінцевих ділянок хромосом – теломер та теломеразного комплексу, оскільки клітинне старіння у значній мірі обумовлено скороченням теломерних ділянок хромосом через кінцеву недореplikацію та відсутність теломерази [1]. Теломери – високоспеціалізовані гетерохроматинові ДНК-білкові структури, які захищають кінці хромосом еукаріотичних клітин від деградації, рекомбінації або об'єднання [2, 3]. Теломери мають широкий спектр функцій: вони необхідні для підтримки стабільності геному, точної репликації хромосом, опосередковують регуляцію клітинного циклу, переміщення та локалізацію хромосом в ядрі,

транскрипційну регуляцію субтеломерних генів та реплікативне клітинне старіння. Теломерна ДНК людини складається з 5000–15000 пар основ гексамерів TTAGGG, які повторюються та розташовані після одноланцюгового виступу розміром 100–400 нуклеотидів на 3'-кінці G-збагаченого ланцюга [4–6]. В нормі теломерні кінці не розпізнаються в якості uszkodженої ДНК, оскільки одноланцюгові 3'-виступи теломер захищені білками (у ссавців це POT-1), а також спеціалізованими ділянками ДНК – Т-петлею [2]. Структура Т-петлі формується шляхом згортання 3'-виступу у дволанцюгову ДНК та нагадує продукт гомологічної рекомбінації [3], що пояснює участь білків гомологічної рекомбінації Rad54 та Rad51D в кепінгу теломер та регуляції їх довжини [7]. Кінцеві ділянки теломер, які добудовуються за допомогою теломерази мають нуклеосомну організацію [1]. Регіон теломери із нуклеосомною організацією називають телосоною, до складу якої, окрім теломерної ДНК, також входить шість основних білків. Всі ці білки можна умовно розділити на три групи: перша – білки, які зв'язують дволанцюгові ділянки теломерної ДНК, друга – білки, які зв'язують одноланцюгові ділянки ДНК і третя – білки, які необхідні для формування нуклеопротейнового комплексу більш високого порядку. До першої групи у ссавців (в т. ч. у людини) відносяться білки TERC1 та TERC2.

Основною функцією білка TERC1 є регуляція довжини теломер. Як свідчать наукові дослідження, збільшення продукції TERC1 призводить до поступового та прогресивного скорочення теломер в клітинах людини, в той час як зменшення продукції веде до їх подовження [7]. Отже, TERC1 є супресором елонгації теломер та негативним регулятором їх довжини. Існує декілька можливих механізмів інгібуючого впливу TERC1 на активність теломерази: збільшення кількості білка TERC1 сприяє більш інтенсивному формуванню Т-петлі, що унеможливує подовження теломер теломеразою та їх подальше скорочення; регулювання білком TERC1 доступу теломерази до теломер шляхом взаємодії із іншими теломерними білками, такими як TIN2, TPP1 та Pot1; можливість TERC1 регулювати теломеразну активність шляхом взаємодії із білком PinX1, який здатен зв'язувати каталітичну субодиницю теломерази і, таким чином, інтенсивно інгібувати її активність [8]. Існують також дані, що білок TERC1 приймає участь у контролі довжини теломер шляхом формування мультибілкового комплексу, який включає TIN2, TANK1 та TANK2 полі- (АДФ-рибозо)полімерази, POT-1 та POT2/PIP1, а також TERC2 [7, 9].

Білок TERC2 подібно білку TERC1, також регулює довжину теломер, але поряд з цим, йому належить провідна роль у захисті кінців теломер та у формуванні Т-петлі. TERC2 залучає низку інших білків, які приймають участь у репарації, наприклад, комплекс MRE11, який складається з RAD50, MRE11 та NBS1 та є ключовим компонентом механізмів гомологічної рекомбінації та негомологічного злиття кінців, які приймають участь у репарації ДНК. Крім того, TERC2 взаємодіє з іншими білками репарації ДНК PARP-2, Ku, Werner, комплексом ексцизійної репара-

ції нуклеотидів XPF/ERCC1, а також специфічно зв'язує АТМ, що викликає блокування АТМ-залежної відповіді на uszkodження ДНК. Також TERC2 залучає до теломер білок hRAP1, гіперекспресія якого викликає подовження теломер [7].

Незважаючи на те, що ІВ низької інтенсивності не призводить до соматичної загибелі організму, воно здатне модифікувати клітинно-тканинні процеси (викликати утворення вільних радикалів, ривки ДНК, клітинне старіння, апоптоз та компенсаторну проліферацію), що врешті рещт призводить до змін такого показника як тривалість життя. Тривалість життя є найбільш комплексною ознакою, яка підлягає впливу ІВ та відноситься до віддалених наслідків опромінення [10]. Безпосередній зв'язок між старінням клітини та клітинною відповіддю на ІВ відбувається на декількох рівнях та завдяки вищеперахованим білкам та білковим комплексам.

Статеві та стовбурові клітини уникають проблемами критичного скорочення теломер завдяки наявності активного фермента теломерази. Цей фермент додає TTAGGG-повтори до кінцевих ділянок хромосом та складається з двох компонентів, які кодуються різними генами – геном зворотньої транскриптази (TERT), та геном РНК-компоненти (TERC), який є матрицею для синтезу нових теломерних повторів. Слід зазначити, що більшість нормальних соматичних клітин людини має наднизький рівень теломеразної активності та підлягають скороченню теломер з кожним наступним клітинним поділом [10]. Однак, теломераза попереджає критичне скорочення теломер більш ніж в 90 % злоякісних пухлин людини. Показаний високий рівень теломеразної активності (більш ніж в 10 разів) при гострій лімфо- та мієлоїдній лейкеміях [11]. Той факт, що теломераза експресується при більшості злоякісних новоутворень людини, робить її привабливою терапевтичною мішенню. Поява нової антителомеразної терапії, може виявитись корисною у боротьбі із деякими формами раку людини [12–14].

Таким чином, існують докази того, що клітинне старіння є генетичною програмою, в основі якої лежить вікова реорганізація геному, що супроводжується скороченням теломер, активацією транспозонів і дефектними системами репарації ДНК. Вплив ІВ на розвиток радіаційно-індукованого клітинного старіння є доведеним. Продемонстрована радіаційно-індукована активність теломерази як в умовах *in vitro* [15], так і *in vivo* [16]. Поряд з цим показано, що радіаційно-індукована активація теломерази залежить від дози опромінення, але не пов'язана з перерозподілом клітинного циклу або з індукцією клітинної смерті, та імовірно, є наслідком специфічної регуляторної відповіді на дію ІВ [17]. Отже, основа радіаційного клітинного старіння ще не є повністю зрозумілою, а результати досліджень є контроверсійними.

### 3. Ціль та завдання дослідження

Метою роботи було визначити особливості генної регуляції довжини теломер в імунокомпетентних клітинах людини у ранньому та віддаленому періодах після опромінення. Для досягнення поставленої мети було визначено наступні завдання:

– визначити відносну довжину теломер лімфоцитів ПК осіб учасників ліквідації наслідків аварії на Чорнобильській атомній електростанції (УЛНА на ЧАЕС) та осіб, опромінених у професійних лімітах на об'єкті «Укриття» та встановити особливості змін даного показника в залежності від віку та дози опромінення.

– провести визначення та встановити особливості експресії генів-регуляторів теломерно-теломеразного комплексу у лімфоцитах ПК в УЛНА на ЧАЕС та осіб, опромінених у професійних лімітах на об'єкті «Укриття».

#### 4. Матеріали та методи дослідження

##### 4.1. Групи обстеження

Дослідження було проведено в УЛНА на ЧАЕС та персоналу об'єкту «Укриття», які проходили комплексне обстеження у клінічних відділеннях ДУ «ННЦРМ НАМН України» та у поліклініці радіаційного реєстру «ННЦРМ НАМН України» за програмою Клініко-епідеміологічного реєстру. Індивідуальні дози зовнішнього опромінення коливались в межах від 1,00 мЗв до 3100 мЗв у УЛНА на ЧАЕС та від 2,16 мЗв до 84,16 мЗв у персоналу об'єкту «Укриття». Основну групу дослідження становили 310 УЛНА на ЧАЕС (віддалений період після опромінення) чоловічої статі, які мали задокументований радіаційний анамнез, із середньогруповою дозою зовнішнього опромінення  $360,82 \pm 32,32$  (M±m) мЗв та були розподілені на 3 підгрупи в залежності від дози опромінення, отриманої в 1986–1987 рр. Групи були розподілені у наступних дозових інтервалах: I підгрупа –  $0 < D \leq 100$  мЗв, II підгрупа –  $100 < D \leq 500$  мЗв, III підгрупа –  $D > 500$  мЗв. Середній вік загальної когорти УЛНА на ЧАЕС становив  $55,43 \pm 0,67$  (M±m). Групу порівняння склали 113 працівників об'єкту «Укриття» (ранній період після опромінення) чоловічої статі, які виконують роботи в особливо небезпечних умовах праці та небезпекою інкорпорації трансуранових елементів. Особи групи порівняння знаходилися на обстеженні в клініці ДУ «ННЦРМ АМНУ» для проведення спеціального медичного контролю. Середній вік осіб групи порівняння становив  $38,65 \pm 0,96$  (M±m). До контрольної групи увійшли 77 неопромінених осіб, середньогруповий показник віку становив  $52,93 \pm 6,00$  (M±m) років. Особи контрольної групи не брали участі у ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС і не мешкали на радіаційно забруднених територіях. Критеріями включення до контрольної групи були відсутність тяжких інфекційних та пухлинних захворювань, гематологічні та імунологічні показники яких коливались в межах вікових норм.

##### 4.2. Дослідження відносної довжини теломер методом flow-FISH

Матеріалом дослідження були лейкоцити ПК осіб, опромінених у діапазоні малих та середніх доз раннього та віддаленого періодів. Визначення від-

носної довжини теломер (RTL – relative telomere length) проводили за допомогою методики flow-FISH (флуоресцентної гібридизації in situ з використанням проточної цитометрії) та набору Telomere PNA Kit/FITC (DakoCytomation, Denmark). Набір рекомендовано для визначення відносної довжини теломер в ядерних гемопоетичних клітинах із використанням зв'язаних із флуоресцеїном зразків пептидної нуклеїнової кислоти (PNA). Методика підготовки зразків складалась з декількох етапів, а саме: попередня обробка, денатурація, гібридизація (1-ий день); промивання, фарбування ДНК, аналіз (2-ий день). В якості контрольних клітин, була використана лінія лейкемічних клітин K562, для яких характерні триплоїдність та наддовгі теломерні послідовності.

Зразки, які гібридизуються із пробою PNA міченою FITC показували флуоресцентний сигнал по FL1, вищий за фоновий/аутофлуоресцентний сигнал, отриманий від зразків таких самих клітин, гібридизованих за допомогою гібридизаційного розчину без проби PNA. Аналіз проводився у режимі dot plot : FL1–H/ FL3–H. Відокремлення лімфоцитів проводилось за світлооптичними характеристиками FSC та SSC (прямого та бокового світлорозсіяння) з окремим визначенням регіонів для дослідних та контрольних клітин у G<sub>0/1</sub> фазі. RTL розраховували за формулою (1).

$$RTL = \frac{\left( \frac{\text{середнє значення FL1 у дослідних клітин із PNA зондом} - \text{середнє значення FL1 у дослідних клітин без PNA зонду}}{\text{середнє значення FL1 у контрольних клітин із PNA зондом} - \text{середнє значення FL1 у контрольних клітин без PNA зонду}} \right) \times 100}{\left( \frac{\text{середнє значення FL1 у контрольних клітин із PNA зондом} - \text{середнє значення FL1 у контрольних клітин без PNA зонду}}{\text{середнє значення FL1 у контрольних клітин із PNA зондом} - \text{середнє значення FL1 у контрольних клітин без PNA зонду}} \right)} \quad (1)$$

Аналіз зразків проводився за допомогою проточної цитометрії та лазерного проточного цитофлуориметра FACSCalibur (BD, США). Первинні дані були оброблені з використанням програм CellQuestPro 5.1 та WinMDI 2.8. Статистичну обробку даних проводили за параметричними критеріями та з використанням програмного забезпечення Statistica 10.0.

##### 4.3. Дослідження відносного рівня генної експресії методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі

Проведено визначення відносного рівня експресії генів регуляторів теломерно-теломеразного комплексу *TERT* (Hs00972646\_m1), *TERF1* (Hs00744634\_s1), *TERF2* (Hs00194619\_m1) та гену онкосупресору *TP53* (Hs00153340\_m1). В якості референсного був використаний 18S ген рибосомальної РНК (*ID Assay* Hs99999901\_s1). Дослідження генної експресії проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі та TaqMan технології, а саме TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, USA) – набору специфічних зондів та праймерів для реалізації кількісної оцінки генної експресії. Основний алгоритм дослідження відносного рівня генної експресії складався з наступних етапів: виділення РНК із лейкоцитів ПК, проведення зворотньої транскрипції, підготовка реакційної сумі-

ші та завантаження TLDA (TaqMan Low Density Array)-плашок, ампліфікація кДНК у режимі ПЛР у реальному часі.

Виділення РНК проводили за допомогою автоматичної станції QIAcube (QIAGEN, Germany) для виділення нуклеїнових кислот та спін-колоночної технології з використанням набору для виділення РНК – NucleoSpin RNAII (Macherey-Nagel, Germany). Процес запуску системи складався з трьох кроків: завантаження буферів, завантаження ротор-адапторів, завантаження зразків. Виділення тотальної РНК проводили із лейкоцитів ПК шляхом стабілізації, лізису та гомогенізації клітин, додавання етанолу та зв'язування тотальної РНК, відмивки та DNase обробки, елюції тотальної РНК.

Синтез кДНК із зразків виділеної РНК проводився шляхом зворотної транскрипції за допомогою High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA). Набір містить реагенти, які при комбінуванні у відповідних кількостях (за стандартним протоколом) формують реакційну суміш 2×Reverse Transcription Master Mix (RT-MM). Рівні об'єми зразку РНК (10µl) та RT-MM (10µl) змішували та проводили реакцію зворотної транскрипції за допомогою термошейкера (Biosan, TS100). Для проведення ампліфікації, отриманий зразок кДНК з'єднували із реакційною сумішшю – PCR Master mix для генної експресії (Applied Biosystems, USA) та вносили отриманий зразок до мікропроточної TLDA плашки (Applied Biosystems, USA). Були використані 384-луночні мікропроточні плашки з 8-ма портами та специфічною конфігурацією нанесених в них наборів

реагентів TaqMan для дослідження експресії дослідних генів. Мікропроточну карту із внесеними зразками центрифугували за допомогою центрифуги Multifuge 3L (Heraeus, Germany), в результаті чого зразки рівномірно розподілялись по лунках.

Ампліфікація кДНК проводилась за допомогою роботизованого генетичного аналізатора 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Показники відносного рівня генної експресії (RQ) розраховували за допомогою  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  методу, де  $\Delta\Delta Ct = (Ct_{sample} - Ct_{ref})_{control} - (Ct_{sample} - Ct_{ref})_{irradiated}$ . Аналіз отриманих даних проводили за допомогою програмного забезпечення SDS 2.3 та RQManager 1.2.

**5. Результати дослідження відносної довжини теломер лімфоцитів периферичної крові працівників об'єкту «Укриття» та УЛНА на ЧАЕС 1986–1987 рр. в залежності від віку та дози опромінення**

Для характеристики процесу клітинного старіння та оцінки ступеню внеску радіаційної компоненти, проведений аналіз відносної довжини теломер імунокомпетентних клітин, які відіграють ключову роль у біології виживаності клітин, старіння та клітинної загибелі. Результати дослідження показали зниження показника RTL в групі УЛНА на ЧАЕС, опромінених у широкому діапазоні доз та в групі осіб, опромінених у професійних лімітах, порівняно із контрольною групою. Результати наведено у табл. 1. Зазначимо, що максимальне зниження показника відносної довжини теломер зафіксовано в групі УЛНА на ЧАЕС, опромінених у дозах до 100 мЗв.

Таблиця 1

Характеристика відносної довжини теломер лейкоцитів ПК осіб, опромінених у ранньому та віддаленому періодах

Показники (%)	Групи дослідження				
	Контрольна група (n=73)	Працівники об'єкту «Укриття» (n=43)	УЛНА на ЧАЕС 1986-87 рр.		
			I підгрупа (0<D≤100) (n=102)	II підгрупа (100<D≤500) (n=123)	III підгрупа (D>500) (n=43)
RTL	18,42±3,41	16,77±2,69	15,68±3,31	16,40±3,64	16,53±3,88
t-value	–	2,71	5,31	3,83	2,73
P	–	<0,007*	<0,001*	<0,001*	<0,007*

Примітка. \* – вірогідність розбіжностей з показниками контрольної групи

Довжина теломер соматичних клітин скорочується як під впливом різних ендогенних та екзогенних патогенетичних факторів, так і з віком. З метою встановлення та відокремлення вікових залежностей відносної довжини теломер, загальна когорта обстежених, опромінених як у ранній так і віддалений періоди була розподілена за віковим показником у наступні вікові групи: 1 – 20–30 років, 2 – 30–40 років, 3 – 40–50 років, 4 – 50–60 років, 5 – 60–70 років, 6 – 70–80 років. Групи 1 та 2 були сформовані за рахунок працівників об'єкту «Укриття», середній вік якої був нижчий за середній вік осіб віддаленого періоду, що надало можливість розглянути зміну показника RTL в різних вікових діапазонах. При розподілі загальної групи опромінених осіб за віковим показником продемонстровано зниження відносної дов-

жини теломер у лімфоцитах ПК осіб старше 50 років. Результати проілюстровано на рис. 1.

Проведено кореляційний аналіз між показником RTL та віку у загальній когорті УЛНА на ЧАЕС та встановлено наявність кореляції слабкої сили взаємодії. Коефіцієнт кореляції за Пірсоном становив  $r = -0,18$  ( $p < 0,05$ ). Отже, підтверджена зміна показника відносної довжини теломер з віком, що узгоджується з літературними даними.

З метою відокремлення модифікуючого впливу вікової та радіаційної компоненти на показник відносної довжини теломер, проведено дослідження кореляційних залежностей між показником RTL та дозою опромінення у підгрупах УЛНА на ЧАЕС 1986–1987 рр. Встановлено наявність зв'язків низької сили вірогідності в I підгрупі ( $0 < D \leq 100$ ) –  $r = 0,18$

та II підгрупі ( $100 < D \leq 500$ ) –  $r = -0,11$  УЛНА на ЧАЕС. Відмітимо, що характер дозових залежностей відрізнявся в різних дозових інтервалах. При низькодозовому опроміненні ( $0 < D \leq 100$ ) віддаленого періоду спостерігається позитивний характер зв'язків (тенденція подовження відносної довжини тело-

мер із дозою опромінення), а у дозових інтервалах  $100 < D \leq 500$  мЗв та  $D > 500$  мЗв характер кореляційних зв'язків змінюється на негативний. Таким чином, внесок радіаційної компоненти у зниження показника RTL та імовірно у процес клітинного старіння очевидний.

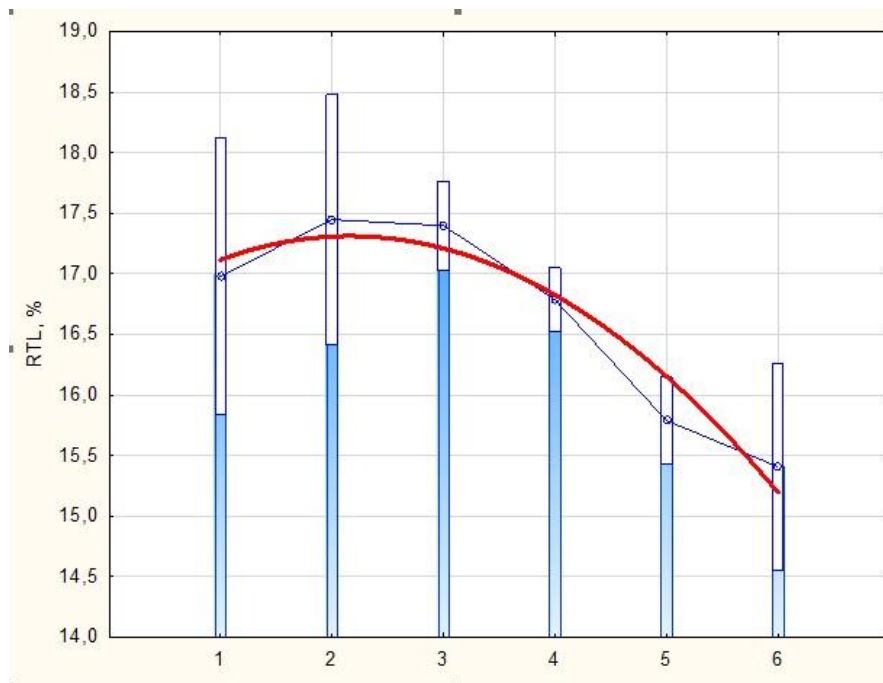


Рис. 1. Характеристика показника відносної довжини теломер лейкоцитів ПК опромінених осіб загальної когорти в залежності від віку. 1 – 20–30 років; 2 – 30–40 років; 3 – 40–50 років; 4 – 50–60 років; 5 – 60–70 років; 6 – 70–80 років

Був проведений аналіз характеру змін показника відносної довжини теломер та наявності кореляційних зв'язків з дозою опромінення при комбінації різних вікових та дозових інтервалів. Встановлено, що найбільш виражена негативна кореляція (відносна довжина теломер скорочується із дозою опромінення) присутня в групі УЛНА на ЧАЕС як у віковому інтервалі від 40 до 50 років так і у дозовому діапазоні від 100 до 1000 мЗв. Подальший аналіз показав, комбінація вищезазначених вікових (40–50 років) та дозових ( $100 < D < 1000$  мЗв) меж впливає на інтенсивність негативних зв'язків між дозою опромінення та відносною довжиною теломер.

Проаналізовано вікові та дозові залежності відносної довжини теломер лейкоцитів у ранньому періоді після опромінення у професійних лімітах. Аналіз впливу вікового фактору на показник RTL лейкоцитів ПК працівників об'єкту «Укриття» не продемонстрував наявності кореляційних зв'язків між відносною довжиною теломер та віком ( $r = -0,07$ ). Спостерігається лише тенденція до зниження показника RTL із віком у даного контингенту осіб. Імовірно, відсутність кореляційних зв'язків високого ступеню вірогідності пов'язано із молодшим віком осіб даної групи. При дослідженні наявності кореляційних зв'язків між показником відносної довжини теломер та дозою опромінення у групі працівників об'єкту «Укриття» статистично достовірних залежностей встановлено не було ( $r = 0,07$ ) Однак характер зв'язків

мав позитивний характер, на відміну від залежностей від віку. При проведенні кореляційного аналізу у групі працівники об'єкту «Укриття» у різних дозових діапазонах, характер зв'язків не змінювався (RTL зростає із підвищенням дози опромінення); було встановлено, що серед осіб, які працюють в особливо шкідливих та небезпечних умовах праці у віці від 40 до 50 років, спостерігається чітка залежність негативного характеру між показником RTL та дозою опромінення. Коефіцієнт кореляції за Пірсоном  $r = -0,10$ .

### 6. Результати дослідження експресії генів TERF1, TEF2 та TERT – регуляторів довжини теломер імунотетентних клітин периферичної крові працівників об'єкту «Укриття» та УЛНА на ЧАЕС 1986–1987 рр. в залежності від віку та дози опромінення

Ключову роль у регуляції довжини теломер та захисті хромосомних закінчень відіграють білкові компоненти нуклеопротеїнового комплексу, які пов'язані із дволанцюговими ділянками ДНК. Мутації теломер-зв'язуючих білків призводять до хромосомної нестабільності та синдрому передчасного старіння клітини. Гени *TERF1*, *TERF2* та білки, які ними кодуються, є основними негативними регуляторами довжини теломер, а дисбаланс у їх функціонуванні пов'язаний із розвитком злоякісної трансформації. У віддаленому періоді після опромінення встановлена загальна тенденція зниження середнього показника

RQ гену *TERF1* у широкому діапазоні доз. Статистично достовірне зниження експресії гену *TERF1* встановлено у II та III підгрупах УЛНА на ЧАЕС у порівнянні з контролем. Група працівників об'єкту «Укриття» характеризувалась змінами *TERF1* генної експресії подібної направленості, однак статистичною достовірністю не підтверджені. Результати проілюстровано на рис. 2.

Подібна картина зафіксована при дослідженні іншого гену негативного регулятора довжини теломер – *TERF2*. У віддаленому періоді після опромінення встановлена гіпоекспресія гену *TERF2* була статистично достовірною у всіх дозових підгрупах УЛНА на ЧАЕС. Однак найнижчий середній рівень *TERF2* генної експресії встановлено у групі осіб, опромінених у дозовому інтервалі більше 500 мЗв. Результати продемонстровано на рис. 3.

Ген *TERT* кодує білок – теломеразну зворотню транскриптазу, функціонування якого в нормі призводить до збереження довжини теломер на постійному рівні, компенсуючи таким чином кінцеву недореплікацію і дозволяючи клітині ділитися необмежено довго. Соматичні клітини позбавлені теломеразної активності в нормі, оскільки після певної кількості клітинних циклів, процес поділу порушується та відбувається запуск апоптозу. Активація теломерази в соматичній клітині призводить до можливості патологічного безлімітного поділу, що поряд з порушеннями протоонкогенів p53, Ras, Muc та ін. є вирішальним фактором для злякисного переродження клітини. З іншого боку, основним критерієм ефективності роботи теломерази є кількість теломерних повторів. Скорочення довжини теломер є ознакою багатьох захворювань та може бути як наслідком первинної дисфункції теломерази, так і результатом передчасної втрати теломер, індукованої іншими факторами [18].

Дослідження відносного рівня експресії гену *TERT* продемонструвало статистично достовірне ( $p < 0,001$ ) зростання середнього показника RQ у віддаленому періоді після опромінення у дозовому інтервалі більше 500 мЗв, тоді як у групі осіб раннього терміну після опромінення середній показник RQ гену *TERT* порівняно з контролем був знижений. Результати представлені на рис. 4.

Дослідження кореляційних залежностей між відносним рівнем експресії гену *TERT* та дозою опромінення підтвердили такий характер змін, а саме: III підгрупа УЛНА на ЧАЕС – встановлена кореляція середньої сили ( $r = 0,39$ ,  $p < 0,05$ ). На фоні гіперекспресії гену регулятора теломерази у віддаленому періоді після опромінення встановлено факт порушення регуляції довжини теломер за посередництвом генів інгібіторів теломерази – *TERF1* та *TERF2*.

Нами проаналізовано залежність встановлених порушень процесів генної регуляції теломеро-теломеразного комплексу від активації гену онкосупресору *TP53*. У ранньому періоді після опромінення встановлено позитивний характер кореляційних зв'язків високої сили взаємодії між відносними рівнями експресії генів *TERF1*, *TERF2* та *TP53* ( $r = 0,73$ ,  $p < 0,05$ ;  $r = 0,88$ ,  $p < 0,05$  відповідно). Однак, не встановлено зв'язку між експресією гену *TP53* та порушеннями експресії кодуючого гену зворотньої транскриптази *TERT*. У віддаленому періоді після опромінення у дозовому інтервалі до 500 мЗв встановлено позитивну кореляцію високої сили взаємодії між відносними рівнями експресії генів *TERF1*, *TERF2* та *TP53* (I підгрупа  $r = 0,33$ ,  $p < 0,05$ ;  $r = 0,39$ ,  $p < 0,05$ ; II підгрупа  $r = 0,70$ ,  $p < 0,05$ ;  $r = 0,53$ ,  $p < 0,05$  відповідно). Тоді як у групі УЛНА на ЧАЕС, опромінених у дозовому інтервалі більше 500 мЗв встановлено кореляцію лише між RQ генів *TERT* та *TP53* ( $r = 0,44$ ,  $p < 0,05$ ).

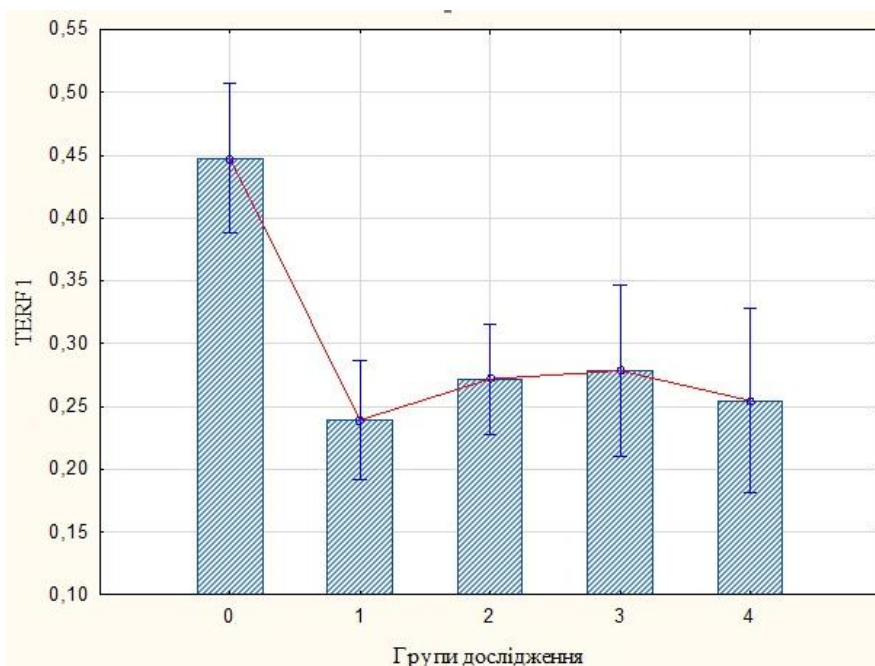


Рис. 2. Експресія гену *TERF1* в залежності від дози та характеру опромінення (ранній та віддалений періоди): 0 – контроль; 1 – УЛНА на ЧАЕС (I підгрупа); 2 – УЛНА на ЧАЕС (II підгрупа); 3 – УЛНА на ЧАЕС (III підгрупа); 4 – працівники об'єкту «Укриття»

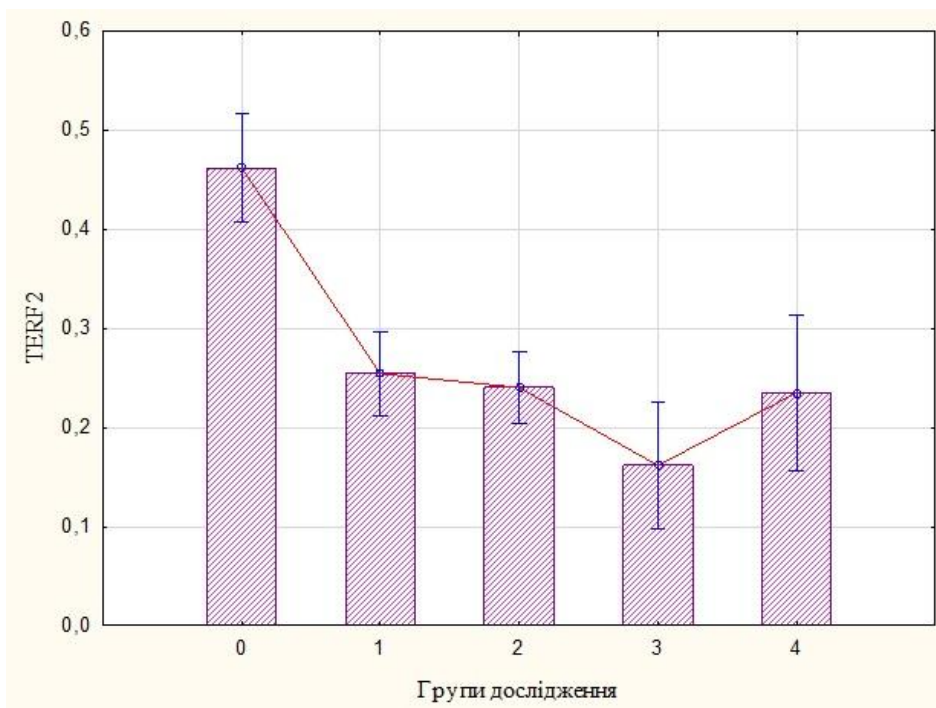


Рис. 3. Експресія гену *TERT1* в залежності від дози та характеру опромінення (ранній та віддалений періоди): 0 – контроль; 1 – УЛНА на ЧАЕС (I підгрупа); 2 – УЛНА на ЧАЕС (II підгрупа); 3 – УЛНА на ЧАЕС (III підгрупа); 4 – працівники об’єкту «Укриття»

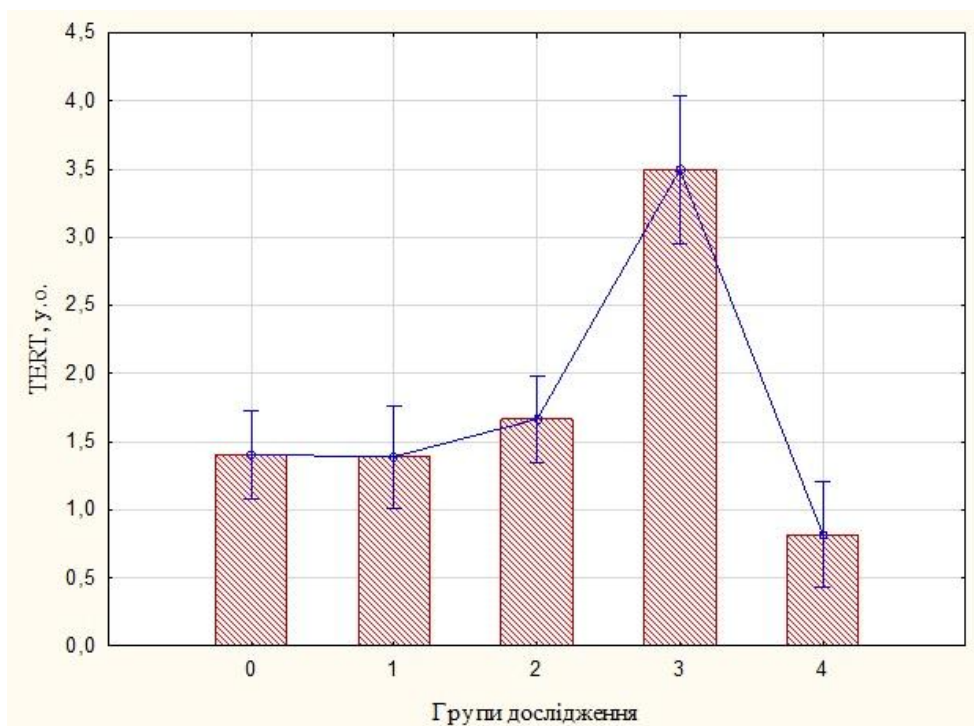


Рис. 4. Експресія гену-регулятора довжини теломер *TERT* в залежності від дози та характеру опромінення (ранній та віддалений періоди): 0 – контроль; 1 – УЛНА на ЧАЕС (I підгрупа); 2 – УЛНА на ЧАЕС (II підгрупа); 3 – УЛНА на ЧАЕС (III підгрупа); 4 – працівники об’єкту «Укриття»

### 7. Висновки

Таким чином, відносна довжина теломер у віддаленому періоді після опромінення залежить від віку та дози опромінення. Найбільшим є зниження RTL у дозовому інтервалі понад 500 мЗв. Загальна

тенденція зміни довжини теломер у когорті УЛНА на ЧАЕС в залежності від дози опромінення має позитивний характер, що є несприятливим фактором, оскільки може свідчити про порушення механізмів кінцевої недореплікації теломер та імовірність фор-

мування підґрунтя для злякисної трансформації клітини. Поряд з цим результати нашого дослідження показують, що процеси регуляції довжини теломер в різних вікових групах мають відмінності у віддаленому періоді після опромінення. Комбінація вікових (40–50 років) та дозових ( $100 < D < 1000$  мЗв) факторів впливає на інтенсивність негативних зв'язків між дозою опромінення та відносною довжиною теломер у бік їх скорочення. У ранньому періоді після опромінення встановлено лише тенденція до зниження показника RTL із віком, що імовірно пов'язано із молодшим віком осіб даної групи.

За результатами дослідження встановлено радіаційно-асоційоване порушення генної регуляції довжини теломер імункомпетентних клітин у ранньому та віддаленому періодах після опромінення. В інтервалі доз більше 500 мЗв встановлено дисбаланс у функціонуванні експресії генів TERC та TERC2, які кодують білки нуклеопротеїнового комплексу теломер на фоні активації р53-опосередкованої теломеразної активності. Імовірно, скорочення відносної довжини теломер є результатом р-53 активованого шляху запуску клітинного старіння в УЛНА на ЧАЕС, опромінених у широкому діапазоні доз. Ранній період після опромінення характеризувався порушеннями протекторної функції теломер.

#### Література

1. Blackburn, E. H. Switching and Signaling at the Telomere [Text] / E. H. Blackburn // *Cell*. – 2001. – Vol. 106, Issue 6. – P. 661–673. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00492-5
2. Chai, W. Human telomeres maintain their overhang length at senescence [Text] / W. Chai, J. W. Shay, W. E. Wright // *Molecular and Cellular Biology*. – 2005. – Vol. 25, Issue 6. – P. 2158–2168. doi: 10.1128/mcb.25.6.2158-2168.2005
3. Franco, S. Effectors of mammalian telomere dysfunction: a comparative transcriptome analysis using mouse models [Text] / S. Franco // *Carcinogenesis*. – 2005. – Vol. 26, Issue 9. – P. 1613–1626. doi: 10.1093/carcin/bgi107
4. Kurz, D. J. Telomere biology in cardiovascular disease [Text] / D. J. Kurz // *Cardiovascular Medicine*. – 2004. – Vol. 7. – P. 433–442.
5. LeBel, C. Telomeres: what's new at your end? [Text] / C. LeBel // *Journal of Cell Science*. – 2005. – Vol. 118, Issue 13. – P. 2785–2788. doi: 10.1242/jcs.02394
6. Herbig, U. Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story [Text] / U. Herbig, J. M. Sedivy // *Mechanisms of Ageing and Development*. – 2006. – Vol. 127, Issue 1. – P. 16–24. doi: 10.1016/j.mad.2005.09.002
7. Blasco, M. A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond [Text] / M. A. Blasco // *Nature Reviews Genetics*. – 2005. – Vol. 6, Issue 8. – P. 611–622. doi: 10.1038/nrg1656
8. Zhou, X. Z. The Pin2/TRF-interacting protein PinX1 is a protein telomerase inhibitor [Text] / X. Z. Zhou, K. P. Lu // *Cell*. – 2001. – Vol. 107, Issue 3. – P. 347–359. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00538-4
9. Москалев, А. А. Старение и гены [Текст] / А. А. Москалев. – СПб.: Наука, 2008. – 358 с.
10. Collado, M. Cellular senescence in cancer and aging [Text] / M. Collado, M. A. Blasco, M. Serrano // *Cell*. – 2007. – Vol. 130, Issue 2. – P. 223–233. doi: 10.1016/j.cell.2007.07.003
11. Engelhardt, M. Telomerase activity and telomere length in acute and chronic leukaemia, pre and post-ex vivo

culture [Text] / M. Engelhardt, K. Mackenzie, P. Drullinsky // *Cancer Res*. – 2000. – Vol. 1, Issue 60. – P. 610–617.

12. Deng, Y. Role of telomeres and telomerase in genomic instability, senescence and cancer [Text] / Y. Deng, S. Chang // *Laboratory Investigation*. – 2007. – Vol. 87, Issue 11. – P. 1071–1076. doi: 10.1038/labinvest.3700673

13. Мельникова-Хабло, Е. Е. Теломеры и теломеразная активность при злокачественных опухолях крови [Текст] / Е. Е. Мельникова-Хабло, Г. Д. Телегеев, С. А. Гусева // *Український журнал гематології та трансфузіології*. – 2006. – № 3. – С. 5–10.

14. Егоров, Е. Е. Теломеры, теломераза, канцерогенез и мера здоровья [Текст] / Е. Е. Егоров // *Клиническая онкогематология*. – 2010. – Т. 3, № 2. – С. 184–197.

15. Joo, O. H. Induction of telomerase activity and chromosome aberrations in human tumour cell lines following X-irradiation [Text] / O. H. Joo, M. P. Hande, P. M. Lansdorp, A. T. Natarajan // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 1998. – Vol. 401, Issue 1-2. – P. 121–131. doi: 10.1016/s0027-5107(97)00321-7

16. Hande, M. P. Induction of telomerase activity by in vivo X-irradiation of mouse splenocytes and its possible role in chromosome healing [Text] / M. P. Hande, P. M. Lansdorp, A. T. Natarajan // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 1998. – Vol. 404, Issue 1-2. – P. 205–214. doi: 10.1016/s0027-5107(98)00115-8

17. Report to the General Assembly, with scientific annexes Volume II: Scientific Annexes C, D and E Annex C: Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation [Text]. – United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR). – 2006. – 80 p. – Available at: <http://www.unscear.org>

18. Зверева, М. Э. Теломераза: структура, функции и пути регуляции активности [Текст] / М. Э. Зверева, Д. М. Щербакова, О. А. Донцова // *Успехи биологической химии*. – 2010. – Т. 50. – С. 155–202.

#### References

1. Blackburn, E. H. (2001). Switching and Signaling at the Telomere. *Cell*, 106 (6), 661–673. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00492-5
2. Chai, W., Shay, J. W., Wright, W. E. (2005). Human Telomeres Maintain Their Overhang Length at Senescence. *Molecular and Cellular Biology*, 25 (6), 2158–2168. doi: 10.1128/mcb.25.6.2158-2168.2005
3. Franco, S. (2005). Effectors of mammalian telomere dysfunction: a comparative transcriptome analysis using mouse models. *Carcinogenesis*, 26 (9), 1613–1626. doi: 10.1093/carcin/bgi107
4. Kurz, D. J. (2004). Telomere biology in cardiovascular disease. *Cardiovascular Medicine*, 7, 433–442.
5. LeBel, C. (2005). Telomeres: what's new at your end? *Journal of Cell Science*, 118 (13), 2785–2788. doi: 10.1242/jcs.02394
6. Herbig, U., Sedivy, J. M. (2006). Regulation of growth arrest in senescence: Telomere damage is not the end of the story. *Mechanisms of Ageing and Development*, 127 (1), 16–24. doi: 10.1016/j.mad.2005.09.002
7. Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 6 (8), 611–622. doi: 10.1038/nrg1656
8. Zhou, X. Z., Lu, K. P. (2001). The Pin2/TRF1-Interacting Protein PinX1 Is a Potent Telomerase Inhibitor. *Cell*, 107 (3), 347–359. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00538-4
9. Moskalev, A. A. (2008). Starenie i geni [Aging and genes]. Sankt-Peterburg: Nauka, 358.
10. Collado, M., Blasco, M. A., Serrano, M. (2007). Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell*, 130 (2), 223–233. doi: 10.1016/j.cell.2007.07.003



11. Engelhardt, M., Mackenzie, K., Drullinsky, P. (2000). Telomerase activity and telomere length in acute and chronic leukaemia, pre and post-ex vivo culture. *Cancer Res.*, 1 (60), 610–617.
12. Deng, Y., Chang, S. (2007). Role of telomeres and telomerase in genomic instability, senescence and cancer. *Laboratory Investigation*, 87 (11), 1071–1076. doi: 10.1038/labinvest.3700673
13. Melnikov-Hablo, E. E., Telegeev, G. D., Guseva, S. A. (2006). Telomeri i telomerasnaya aktivnost pri zlokachestvennih opuholyah krovi [Telomeres and telomerase activity in malignant tumors of blood]. *Ukrainian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, 3, 5–10.
14. Egorov, E. E. (2010). Telomeri, telomerase, kancerogenes i mera zdorovya [Telomeres, telomerase, cancerogenesis and health measure]. *Cinical oncohematology*, 3 (2), 184–197.
15. Joo, O. H., Hande, M. P., Lansdorp, P. M., Natarajan, A. T. (1998). Induction of telomerase activity and chromosome aberrations in human tumour cell lines following X-irradiation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 401 (1-2), 121–131. doi: 10.1016/s0027-5107(97)00321-7
16. Hande, M. P., Lansdorp, P. M., Natarajan, A. T. (1998). Induction of telomerase activity by in vivo X-irradiation of mouse splenocytes and its possible role in chromosome healing. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 404 (1-2), 205–214. doi: 10.1016/s0027-5107(98)00115-8
17. Report to the General Assembly, with scientific annexes Volume II: Scientific Annexes C, D and E Annex C: Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation (2006). United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR), 80. Available at: <http://www.unscear.org>
18. Zvereva, M. E., Scherbakova, D. M., Doncova, O. A. (2010). Telomerasa: struktura, funkcii i puti regulacii aktivnosti [Telomerase: structure, functions and pathways of regulation activity]. *Success of Biological Chemistry*, 50, 155–202.

*Дата надходження рукопису 18.02.2016*

**Ільєнко Ірина Миколаївна**, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, Лабораторія імуноцитології, відділ клінічної імунології, ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», вул. Мельникова, 53, м. Київ, Україна, 04050  
E-mail: [ilyenko@ukr.net](mailto:ilyenko@ukr.net)

**Базика Дмитрій Анатолійович**, Член-кореспондент НАМН України, доктор медичних наук, професор, Генеральний директор ДУ «Національного наукового центру радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», вул. Мельникова, 53, м. Київ, Україна, 04050  
E-mail: [bazyka@yahoo.com](mailto:bazyka@yahoo.com)