

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ РАДИОБИОЛОГИЯ

УДК 576.316.24:577.2:613.648:539.1.047

### ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ТЕЛОМЕРЫ

© 2022 г. В. С. Макеева<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Южно-Уральский институт биофизики, Озёрск, Россия

\*E-mail: clinic@subi.su

Поступила в редакцию 12.07.2021 г.

После доработки 01.11.2021 г.

Принята к публикации 09.11.2021 г.

На сегодняшний день длина теломер является информативным и важным биомаркером общего состояния здоровья человека, старения, влияния факторов окружающей среды, образа жизни и стресса. В последнее время многие исследования демонстрируют взаимосвязь между длиной теломер и радиационно-индуцированными эффектами. Рассмотрению этого вопроса будет посвящен настоящий обзор.

**Ключевые слова:** теломеры, теломераза, ионизирующее излучение, укорочение теломер

**DOI:** 10.31857/S0869803122010076

Термин “теломера” был предложен Германом Мёллером в 1932 г. и происходит от древнегреческих слов “telos – конец” и “meros” – часть.

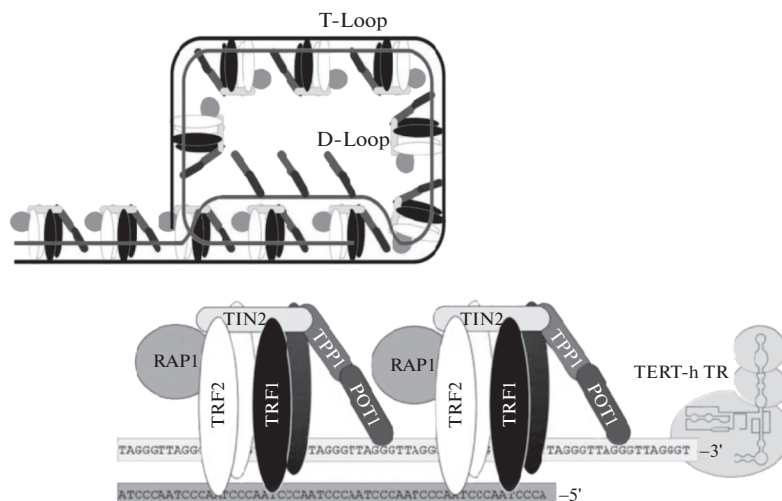
Теломеры – это специализированные нуклеопротеиновые комплексы, локализованные на концах хромосом эукариот, в форме “защитного колпачка”. У человека теломеры состоят из тандемных повторов 5'-TTAGGG-3' ДНК, не несущих генетической информации, и ассоциированных с ними белков [1]. Длина двухцепочечного “защитного колпачка” может составлять 2–20 kb [2].

Каждую тандемную нуклеотидную последовательность сопровождает протеиновый комплекс – *шелтерин (shelterin)*. Вместе они защищают хромосомные концы от распознавания как двухнитевого разрыва цепи (DSB, Double Strand Breaks) системой репарации и предотвращают активацию сверхочных точек повреждения ДНК [3]. Комплекс имеет форму Т-петли и включает шесть белков, ассоциированных с теломерной ДНК: TRF1, TRF2, TIN2, POT1, TPP1, RAP1. Каждый из этих белков выполняет специфичные функции, направленные на поддержание теломер. TRF1 и TRF2 связывают двухнитевые разрывы теломерной ДНК, а POT1 – однонитевые разрывы ДНК. Также POT1 взаимодействует с другими белками комплекса через связывающие белки TIN2 и TPP1. Многочисленные молекулы POT1–TPP1 покрывают длинные участки одноцепочечной ДНК, образуя компактные упорядоченные структуры, которые служат для защиты участков от доступа теломеразы и факторов ответа на повреждение ДНК (DDR – DNA Damage Response). TIN2 стабилизирует TRF1 и TRF2 на

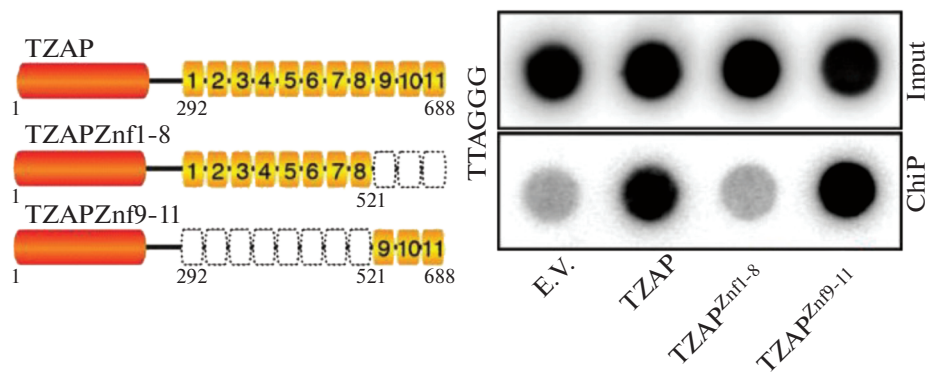
двухцепочечном участке ДНК, а TPP1 и POT1 – на одноцепочечном. RAP1 взаимодействует с TRF2 и подавляет DDR в теломерах (рис. 1) [4–6]. Помимо ДНК теломеры содержат РНК (TERRA, Telomeric Repeat containing RNA), являющуюся естественным лигандом и ингибитором теломеразы [7].

Недавно был обнаружен еще один белок, обладающий сродством к участкам 5'-TTAGGG-3' теломер. Это Kruppel-подобный белок с 11 цинковыми пальцами (ZBTB48). На основании его теломерспецифической локализации ZBTB48 был переименован в TZAP (Telomeric Zinc-finger Associated Protein – теломерный белок с цинковыми пальцами) (рис. 2). Наряду с шелтерином этот белок играет важную роль в гомеостазе теломер. TZAP прикрепляется к 5'-TTAGGG-3'-повторам теломер: связываясь с ДНК, он инициирует укорочение теломер, вырезая шестинуклеотидные повторы [8].

Выяснилось, что количество шелтерина (в том числе и его субъединицы TRF2) в клетке постоянно и не зависит от длины теломер. Поэтому на длинных теломерах могут “обнажаться” повторы -TTAGGG-, свободные от TRF2. С ними связывается TZAP. Причем конкурирует за субстрат он именно с TRF2, а не с TRF1. При повышенной экспрессии гена *TRF2* количество присоединенного к ДНК TZAP сокращается. В клетках с нормальным балансом TRF2/TZAP последний следит за тем, чтобы теломера не стала слишком длинной. Эту функцию TZAP выполняет и в эмбриональных стволовых клетках: при экспериментальной делеции генов *TZAP* теломеры в ство-



**Рис. 1.** Схема строения шелтерина и Т-петли теломер. Копия рисунка из работы [1].  
**Fig. 1.** Schematic structure of shelterin and telomere T-loop. Copied from [1].



**Рис. 2.** Структура и варианты белка TZAP. Для присоединения к теломерной ДНК TZAP требуются три последних цинковых пальца. Копия рисунка из работы [8].  
**Fig. 2.** TZAP protein structure and structural variants. To bind to telomeric DNA sequences, TZAP uses three last zink fingers. Copied from [8].

ловых клетках существенно удлинялись, а после введения экзогенного TZAP возвращались к норме. Известно, что слишком длинные теломеры могут способствовать трансформации клетки в раковую, разрешая ей большее количество делений. То есть TZAP, регулируя максимальную длину теломер, по-видимому, участвует в защите организма от возникновения опухолей [8].

По завершении каждой репликации ДНК теряется небольшое количество нуклеотидов (т.н. “концевая недорепликация” [9]) из-за того, что ДНК-полимеразная система оставляет недореплицированными 3'-концы материнских цепей ДНК, т.е. новые цепи оказываются укороченными с 5'- кондов. А так как теломерные повторы не несут генетической информации, то потеря некоторой части нуклеотидов не отражается на функ-

ционировании генома (в среднем теряется 200–300 н.п., а длина двухцепочечного теломерного участка индивидов может варьировать от 2 до 20 т.н.п) [10]; таким образом теломеры выполняют роль своеобразного буфера. Их общая протяженность на обе теломерные области составляет лишь 0.02% от всего генома [11].

После определенного количества клеточных делений теломеры укорачиваются до критических значений и перестают функционировать. В нормальных клетках с неповрежденными функциями белка p53 и сверхкороткими точками клеточного цикла эти сверхкороткие теломеры распознаются как повреждения ДНК, и запускаются пути DDR, который формирует очаги TIFs (Telomere Dysfunction-Induced foci) [11, 12]. Индукция факторов DDR, таких как ATM и γH2AX, обратно

коррелирует с уровнями белков шелтерина и длиной теломер [13]. В нормальных клетках с правильно функционирующими системами репарации может присутствовать небольшое количество теломер (до пяти) с дисфункцией [14]. Но при накоплении TIFs происходит следующее: DDR препятствует дальнейшему делению клетки, что приводит ее к блоку клеточного цикла и “репликативному старению” [15]. Однако клетки, которые утратили белки сверхочных точек (p53 и p16) для запуска DDR, перестают стареть: их клеточное старение откладывается, они продолжают пролиферировать с сопутствующим укорочением теломер, пока не наступит “теломерный кризис”, включающий в себя массивные хромосомные слияния и гибель клетки [16].

Таким образом, прогрессирующее укорочение теломер действует как “молекулярные часы”, которые ограничивают количество клеточных делений, тем самым регулируя продолжительности жизни клетки [9, 17].

Постоянное укорочение теломер в различных типах клеток может быть компенсировано двумя механизмами теломерного удлинения: посредством активации специализированной обратной транскриптазы – теломеразы (характерно для соматических и половых клеток) и через альтернативное удлинение теломер (ALT – Alternative Lengthening of Telomeres) путем гомологичной рекомбинации, независимой от активности теломеразы (характерно для некоторых раковых клеток) [18].

Теломераза – специализированная обратная транскриптаза, состоящая из каталитической субъединицы, обладающей активностью обратной транскриптазы (hTERT – human Telomerase Reverse Transcriptase), которая с помощью РНК-субъединицы (hTR или hTERC – human Telomerase RNA Component) (рис. 3) синтезирует теломерную ДНК *de novo*. Она удлиняет теломеры, присоединяя тандемные последовательности ДНК (-TTAGGG-) к 3'-концу цепи. Белок дискерин (DKC1) включается в состав теломеразного комплекса на стадии его формирования и регулирует активность теломеразы [19].

В частности, теломераза экспрессируется в стволовых и эмбриональных клетках; в тканях, способных к регенерации; в большинстве раковых клеток. Как правило, ее экспрессия инактивирована в дифференцированных клетках, таких как соматические, поэтому теломеры их хромосом укорачиваются после каждого клеточного деления [20].

Степень и сложность биологического повреждения, вызванного прямым воздействием ионизирующего излучения (ИИ), прямо пропорциональны распределению энергии излучения и линейной передаче энергии (ЛПЭ). При прямом воздействии ИИ характер хромосомного повре-

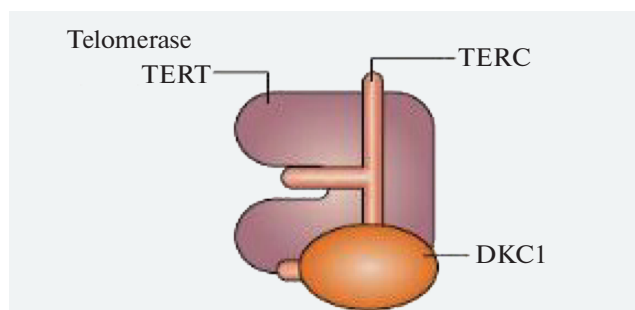
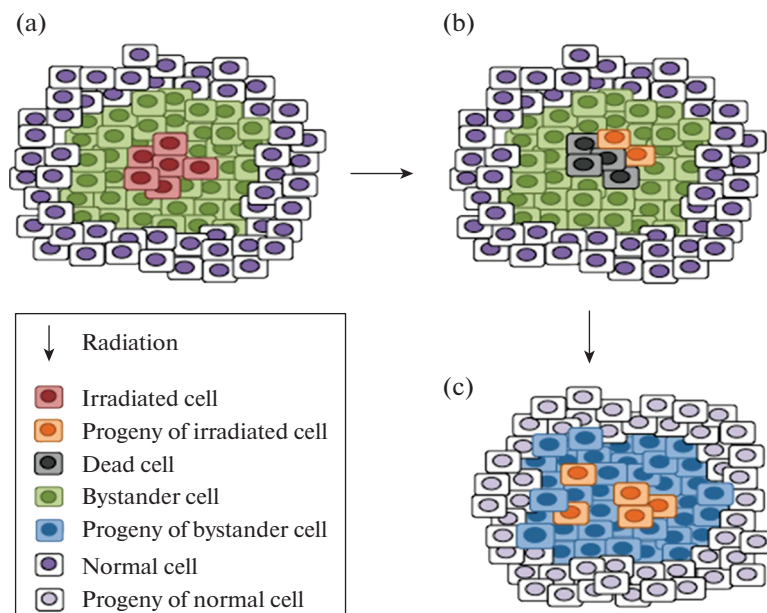


Рис. 3. Схема строения теломеразы. Копия рисунка из работы [20].

Fig. 3. Schematic structure of telomerase. Copied from [20].

ждения зависит от суммарной дозы, мощности излучения и ЛПЭ. ИИ с низкой ЛПЭ (высокоэнергетические рентгеновские кванты и  $\gamma$ -кванты от  $^{137}\text{Cs}$  и  $^{60}\text{Co}$ ) выделяют экспоненциально уменьшающееся количество энергии в зависимости от глубины проникновения в целевой материал (например, клетку, ткань, орган). Дозы излучения с низкой ЛПЭ приводят к равномерному облучению клеток ткани. Когда рентгеновские и  $\gamma$ -кванты поглощаются клетками или тканями, они взаимодействуют с атомами или молекулами, особенно с водой, которая составляет 80% клетки, с образованием свободных радикалов (например, гидроксильных, супероксидных радикалов) и других активных форм кислорода (АФК), которые затем повреждают критические цели в непосредственной близости, такие как ДНК [21]. Напротив, ИИ с высокой ЛПЭ (протоны, нейтроны,  $\alpha$ -частицы и тяжелые заряженные частицы) выделяют энергию, которая концентрируется вдоль радиационного трека; таким образом, локальная доза в центре трека может составлять десятки Гр, но на расстоянии всего лишь нескольких микрон (т.е. в соседней клетке) доза может быть близкой к нулю [22]. Следовательно, когда ИИ с высокой ЛПЭ проходит через живое вещество, оно вызывает прямые кластерные повреждения вдоль радиационного трека к критическим клеточным мишеням, таким как ДНК, что приводит к двухнитевым разрывам ДНК и другим сложным хромосомным повреждениям, степень повреждения которых зависит от конкретных физических характеристик излучения, таких как энергия и масса [21].

Радиационно-индуцированная геномная нестабильность в ее различных проявлениях в настоящее время и в течение многих лет является предметом всемирного интереса (хромосомные aberrации, изменения ploидности, образование микроядер, мутации и амплификации генов, нестабильность микросателлитов и пр.) [23, 24]. Хромосомные повреждения, вызванные прямым



**Рис. 4.** Модель замедленного действия ионизирующего излучения на клеточном уровне и ускоренного старения после облучения на тканевом уровне. Копия рисунка из работы [2].

(a) Клетки, подвергнутые воздействию ионизирующего излучения в высокой дозе (красные). Клетки-свидетели (зеленые), находящиеся вблизи непосредственно облученных клеток, будут подвергаться воздействию сигналов стресса, распространяемых облученными клетками посредством щелевых контактов и/или секрецией растворимых факторов. (b) Большинство непосредственно облученных клеток погибает, но немногие выжившие клетки могут сохранять повреждения, вызванные облучением. (c) Для пополнения пула ткани после гибели клеток и для компенсации медленного деления потомства непосредственно облученных клеток окружающие клетки-свидетели могут делиться интенсивнее, что приводит к более быстрому укорочению теломер и локализованному ускоренному старению в облученной ткани [2].

**Fig. 4.** Model for delayed radiation effects and accelerated aging following irradiation at the tissue level. Copied from [2]. (a) Cells are irradiated with a high dose of ionizing radiation.

(a) Bystander cells in the proximity of directly exposed cells would be subjected to stress signals propagated by the irradiated cells. (b) The majority of directly irradiated cells die, but the few surviving cells may harbor radiation-induced damages. (c) To replenish the tissue following death of directly irradiated cells and to compensate for the slower dividing progeny of directly irradiated cells, the surrounding bystander cells may divide more than they normally would without radiation exposure, leading to faster telomere shortening and localized, accelerated aging in the irradiated tissue [2].

и непрямым воздействием ИИ, могут привести к геномной нестабильности. К примеру, во время пролиферации хромосомное повреждение, вызванное ИИ, запускает DDR, а белки DDR тесно связаны с теломерными белками и тем самым могут влиять на гомеостаз теломер. Эти факторы могут приводить к серьезным последствиям для здоровья человека в отдаленный период [2, 25]. Можно предположить, что дисфункция теломер является важным фактором геномной нестабильности.

Воздействие ИИ может приводить к временному блоку митоза: облученные клетки продолжают пролиферировать, но значительно медленнее, чем необлученные. По мере заполнения ткани новыми клетками и для компенсации медленной пролиферации облученных клеток необлученные, соседние клетки, подверженные эффекту свидетеля (*bystander effect*), начинают делиться активнее нормальных необлученных. Это

приводит к быстрому укорочению теломер и ускоренному репликативному старению [2].

Дисфункция теломер маловероятна за счет прямого воздействия ИИ, поскольку теломеры составляют незначительную часть (0.02%) от всего генома. Поэтому основным механизмом радиационно-индуцированного повреждения теломер, по-видимому, является косвенное воздействие чрезмерных уровней активных форм кислорода (АФК), таких как  $H^{\cdot}$ ,  $OH^{\cdot}$ ,  $HO_2^{\cdot}$  [26], возникающих в результате митохондриальной дисфункции и радиолитиза; молекулярные структуры повреждаются ими напрямую и/или за счет эффекта свидетеля (рис. 4) [2].

Отдельно стоит отметить влияние АФК на теломеры. Свободные радикалы приводят к модификации азотистых оснований (в частности, гуанин превращается в *8-оксогуанин*; *8-oxoGua*) (рис. 5). Гуанин в ДНК, обладая самым низким среди природных азотистых оснований окисли-

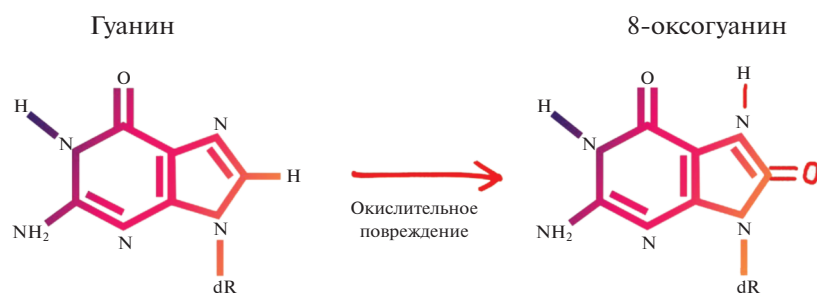


Рис. 5. Модификация гуанина в результате окисления.

Fig. 5. Oxidative modification of guanine.

тельно-восстановительным потенциалом (1.29 мВ относительно нормального водородного электрода [27]), легко окисляется в положении С8, образуя 8-охо-G [28]. Образование 8-охо-G (и продуктов его модификации) является наиболее распространенным видом окислительного повреждения нуклеиновых кислот [29]; 8-охо-G является одним из основных биомаркеров окислительного стресса [27, 30]. Окислительное повреждение азотистых оснований может привести к одноцепочечным разрывам ДНК и потере дистальных фрагментов теломерной ДНК в ходе репликации и к укорочению теломер. [31]. Высокая частота встречаемости остатков гуанина (-TTAGGG-) в теломерных последовательностях ДНК делает теломеры предпочтительными мишенями для окислительного повреждения.

В клетках млекопитающих реализуются два механизма репарации двухнитевых разрывов ДНК (ДНР): негомологичное воссоединение концов (NHEJ, Non-Homologous End Joining) и гомологичная репарация (HR, Homologous Recombination). Эти же механизмы ответственны за восстановление повреждений, возникающих в теломерах [20]. Поэтому в отдельных случаях, когда присутствует нарушение механизмов репарации теломер, происходит перегрузка общей системы репарации повреждений. Все это накладывается на естественное клеточное старение и рецессивные мутации, накапливаемые в геноме, и приводит к отдаленной геномной нестабильности.

На теломерном уровне постоянное укорочение в конечном итоге приводит к теломерной дисфункции через активацию сигналов DDR. Специфическая передача сигнала от поврежденных теломер запускает клеточное старение и угнетает пролиферацию [32]. Но данный процесс не является потенциально опасным для геномной стабильности. Однако если предположить, что несколько дисфункциональных теломер не индуцируют передачу DDR-сигнала и клетка не заблокирует пролиферацию и не запустит старение, а продолжит существовать и делиться, пока не укоротится до теломерного кризиса, то вероятность

развития геномной нестабильности сильно возрастает. После критического укорочения теломер хромосома может претерпеть крупное фракционирование или деградацию. Потеря теломеры может привести к потере гетерозиготности [14]. “Слишком” большая нестабильность может привести к преждевременному старению или гибели клетки, а “недостаточная” может замедлить пролиферацию и привести к канцерогенезу [33].

Чтобы оценить роль теломер в чувствительности организма к ионизирующему излучению, исследовали мышей с инактивированной теломеразой ( $mTR^{-/-}$ ). У этих грызунов отсутствует теломераза и наблюдается укорочение теломер со скоростью 4–5 т.н.п. с каждым поколением [34]. В схему исследования входили мыши дикого типа (WT) и мыши с инактивированной теломеразой ( $mTR^{-/-}$ ). Мыши пятого поколения ( $G5mTR^{-/-}$ ) обладали теломерами на 40% короче, чем дикий тип. Грызунов подвергали воздействию  $\gamma$ -излучения фракциями по 1.75 Гр с мощностью 1.14 Гр/мин в течение недели. Суммарная доза к концу недели составляла 10.5 Гр. В отличие от WT и предыдущих поколений, 60% мышей  $G5mTR^{-/-}$ , подвергшихся облучению, погибли после шестой фракции  $\gamma$ -облучения. У них наблюдались аплазия костного мозга, дегенерация париетальных клеток желудка, кистозные образования слизистой оболочки желудка, дегенерация ворсинок и крипт тонкого кишечника и лучевая нефропатия [34]. Дополнительно исследовали, какие изменения наблюдаются на клеточном уровне. До облучения у мышей были выделены спленоциты и стимулированы специфическим митогеном В-лимфоцитов (LPS). Через 48 ч спленоциты исследуемых групп были облучены в разных дозах: 1.75 и 4 Гр. В группе мышей  $G5mTR^{-/-}$  наблюдался выраженный апоптоз ( $63.9 \pm 8.9\%$ ) против  $36.0 \pm 6.2\%$  в группе WT (табл. 1) [34].

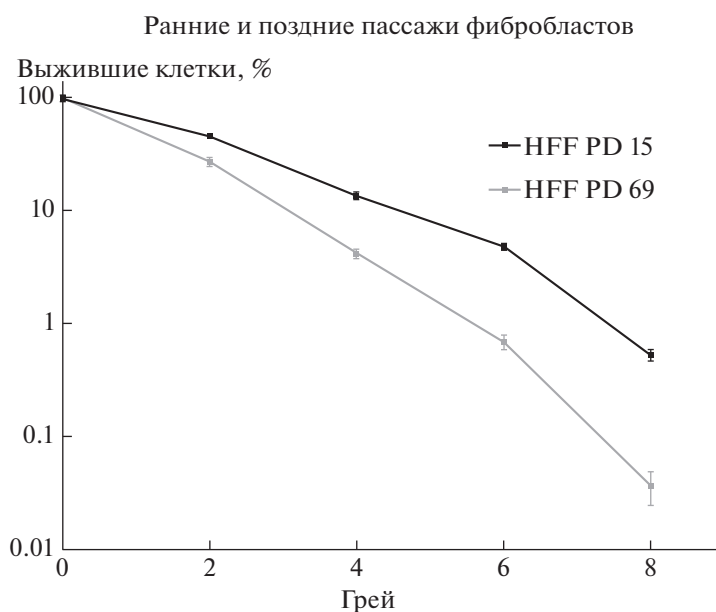
Чтобы лучше понимать связь между короткими теломерами и чувствительностью к воздействию ИИ [24], было исследовано влияние ИИ на компоненты DDR в нормальных человеческих фибробластах (HFFs). Для этого сравнили длину

**Таблица 1.** Апоптоз и профили клеточного цикла LPS-стимулированных необлученных и облученных спленоцитов мышей WT, G2, G5 и G6mTR<sup>-/-</sup> [34]**Table 1.** Apoptosis and cell cycle profiles in LPS-stimulated radiation exposed and unexposed splenocytes of WT, G2, G5 and G6mTR<sup>-/-</sup> mice [34]

Генотип (доза)	n	48 ч после стимуляции, %		
		апоптоз	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S/G <sub>2</sub>
WT (0 Гр)	5	9.6 ± 2.0	59.6 ± 13.3	32.2 ± 13.4
WT (1.75 Гр)	5	26.4 ± 8.3	46.8 ± 10.9	26.7 ± 12.2
WT (4 Гр)	5	36.0 ± 6.2	43.8 ± 6.2	19.9 ± 9.7
G2mTR <sup>-/-</sup> (0 Гр)	3	5.1 ± 3.7	58.0 ± 19.2	36.8 ± 16.6
G2mTR <sup>-/-</sup> (1.75 Гр)	3	26.3 ± 14.9	43.3 ± 7.1	29.9 ± 21.9
G2mTR <sup>-/-</sup> (4 Гр)	3	49.2 ± 15.9	32.9 ± 8.9	17.5 ± 12.3
G5mTR <sup>-/-</sup> (0 Гр)	5	10.1 ± 4.6	55.8 ± 11.6	34.0 ± 8.2
G5mTR <sup>-/-</sup> (1.75 Гр)	6	39.6 ± 17.4	36.0 ± 11.0	24.3 ± 12.5
G5mTR <sup>-/-</sup> (4 Гр)	5	63.9 ± 8.9	25.9 ± 7.7	10.1 ± 5.4
G6mTR <sup>-/-</sup> (0 Гр)	2	9.7 ± 8.8	55.7 ± 9.5	34.7 ± 2.5
G6mTR <sup>-/-</sup> (1.75 Гр)	2	40.0 ± 25.7	39.9 ± 15.1	19.6 ± 8.3
G6mTR <sup>-/-</sup> (4 Гр)	2	63.8 ± 2.1	26.0 ± 2.8	10.3 ± 2.1

теломер фибробластов раннего пассажа (PD15, с длинными теломерами) и позднего пассажа (PD69, с короткими теломерами) после облучения в дозах 2, 4, 6 и 8 Гр. Результаты показали, что поколение PD69 оказалось более радиочувствительным по сравнению с ранним поколением (рис. 6) [35].

Чтобы охарактеризовать кинетику замедленной репарации ДНК, наблюдаемую в поздних поколениях HFFs, исследовали роль ATM в DDR. В ходе DDR быстро фосфорилируется ATM, приводя к остановке клеточного цикла, старению клетки и апоптозу. Субстратами для ATM являются p53, NBS1, H2AX, 53BP1, BRCA1, SMC1 и

**Рис. 6.** Клетки с короткими теломерами более чувствительны к воздействию ионизирующего излучения. Копия рисунка из работы [35].**Fig. 6.** Cells with shortened telomeres demonstrate higher sensitivity to ionizing radiation. Copied from [35].

Chk2. Результаты исследования показали, что клетки позднего пассажа демонстрировали замедленное фосфорилирование белков-мишеней ATM, таких как H2AX, SMC1 и NBS1 [35].

Ограничены данные о долгосрочном влиянии ИИ на длину теломер *in vivo* в популяциях людей, о чем свидетельствуют противоречивые результаты нескольких представленных ниже исследований.

Чтобы определить, оказывает ли ИИ долгосрочное влияние на организм человека и на длину теломер, в частности, обследована группа ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС. Относительная длина теломер (RTL) была измерена в лейкоцитах периферической крови 595 ликвидаторов и 236 контрольных лиц, соответствующих по полу и возрасту, с использованием q-PCR (количественной ПЦР в реальном времени). Пристальное внимание было уделено году участия и задачам, которые выполнялись рабочими во время пребывания в Чернобыле, состоянию их здоровья. У ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС укорочение теломер не обнаружено; напротив, их RTL была больше, чем в контрольной группе ( $P = 0.001$ ). Причем более длинные теломеры были обнаружены в той группе ликвидаторов, кто выполнял наиболее “грязную” работу в 1986 г. (раскопки и дезактивация). Также длинные теломеры наблюдались у людей со злокачественными новообразованиями (ЗНО). Короткие теломеры часто регистрировались у людей с катарактой, остеопорозом, атеросклерозом и ишемической болезнью сердца [36]. Теломеры оказались длиннее у людей, подвергшихся более мощному воздействию ионизирующего излучения, вероятно, из-за активации теломеразы как механизма репарации хромосом после повреждения. В свою очередь, дефекты в регуляции теломеразы могут усиливать канцерогенез, что объясняет повышенную заболеваемость ЗНО среди ликвидаторов аварии ЧАЭС [36].

Противоположные результаты были получены при обследовании лиц, подвергшихся атомной бомбардировке Хиросимы и Нагасаки. Было обнаружено дозозависимое укорочение теломер лейкоцитов в группе лиц, которые на момент бомбардировки были моложе 12 лет. Эти данные демонстрируют негативное влияние ИИ на теломеры лейкоцитов даже через 50–68 лет после облучения [37]. В другом исследовании для когорты лиц, выживших после атомных бомбардировок Хиросимы и Нагасаки, установлена нелинейная зависимость между дозой облучения и длиной теломер Т-лимфоцитов. Наблюдалась тенденция к укорочению длины теломер при облучении в дозе  $>0.5$  Гр. Также выявлена корреляция между короткими теломерами Т-лимфоцитов и повышенным уровнем гликированного гемоглобина (HbA1c) и с жировым перерождением печени.

Выяснилось, что тенденция к укорочению теломер была менее выражена у индивидов с высоким уровнем липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) [38].

При изучении действия рентгеновского излучения *in vitro* на эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVECs) выяснили, что после воздействия на клетки низкими дозами рентгеновского излучения (0.5 Гр) в течение первых трех дней их теломеры претерпевают различные изменения. Клетки с длинными теломерами либо не претерпевали изменений, либо теломеры укорачивались незначительно. В отличие от них клетки со средней длиной теломер значительно укорачивались (4.4–6.6 т.н.п.) и становились клетками с наиболее короткими теломерами, тем самым пополнив пул клеток с короткими теломерами. Клетки с наиболее короткими теломерами на третий день после облучения либо погибали, либо их теломеры удлинялись. Важно, что по мере изменения длины теломер, практически не изменялась концентрация теломеразы и теломерных белков TRF1 и TRF2. Ученые связывают уменьшение длины теломер с избыточным радиационно-индуцированным оксидативным стрессом и повреждениями ДНК, в результате чего возникает реорганизация теломер. Случайные повреждения ДНК, вызванные ИИ, генотоксическими агентами, АФК ведут к активации DDR, который часто сохраняется в теломерах. Клетки с постоянно активированным DDR показывают радиочувствительный фенотип, который не зависит от экспрессии теломеразы [39].

По данным Rossiello активация DDR чаще встречалась в тканях у возрастных особей мышей и бабуинов по сравнению с молодыми особями. Высказано предположение, что обладание длинными теломерами в эволюционном плане может носить негативный характер для их обладателя, поскольку длинная теломерная ДНК является более обширной мишенью для случайных повреждений, которые не могут быть репарированы [40].

Персистирующее повреждение ДНК фиксируется флуоресцентной микроскопией за счет детекции гистона H2AX (его фосфорилированной модификации –  $\gamma$ H2AX) и адаптерного белка 53BP1 (p53-binding protein). Фокусы  $\gamma$ H2AX и 53BP1 указывают на наличие ДНР, поэтому оба могут использоваться как “суррогатные” маркеры ДНР. По данным Zhang et al., большая часть устойчивых к репарации повреждений ДНК, вызванных действием рентгеновского излучения, располагались на теломерах: процент связанных с теломерами персистирующих фокусов 53BP1 достигал 30% [41].

Для изучения природы катарактогенеза и определения роли ИИ облучали эмбриональные клетки хрусталика (HLE). Было показано, что в

отличие от фибробластных клеток, с увеличением пассажей длина теломер неожиданно увеличивалась. Для этих же клеток было показано снижение активности теломеразы с каждым пассажем. Исследователи предположили, что теломеры удлинялись за счет альтернативных механизмов (ALT), свойственных опухолевым клеткам. Но эта теория не подтвердилась. Затем клетки облучали в дозах 0.001–2 Гр. Было показано дозозависимое увеличение длины теломер: чем доза была выше, тем длиннее становились теломеры. При этом, несмотря на увеличение длины теломер, было показано дозозависимое увеличение фокусов  $\gamma$ -H2AX (в дозах свыше 0.2 Гр). Однако через 72 ч практически все фокусы  $\gamma$ -H2AX были репарированы (TIF с 4.65 до 0.07). Установлено, что активность теломеразы снижалась в зависимости от дозы. В этом же исследовании окислительный стресс измеряли через 2, 24, 72 ч и 7 сут; и показали, что через 2 ч он возрастал; к 24 ч снижался; а к 7-м суткам уровень АФК отличался у всех доноров. Полученные результаты авторы объяснили эмбриональной природой клеток. Увеличение длины теломер, по-видимому, было связано с начальной концентрацией теломеразы, которая оказалась неожиданно высокой в эмбриональных клетках хрусталика [42].

Для выяснения вклада окислительного стресса в радиационно-индуцированное повреждение теломер выполнялось сравнение уровней АФК и длины теломер после воздействия рентгеновского излучения. Выполнялось количественное измерение длины теломер фибробластов HFFF2 в течение 13 дней после рентгеновского облучения в дозе 4 Гр. Показано, что максимальный уровень АФК регистрировался на 3-и сутки после облучения и постепенно снижался к 8-м суткам. Причем, при предварительной обработке фибробластов антиоксидантом N-ацетилцистеином (NAC) не наблюдалось значительного увеличения уровня эндогенного АФК после облучения и длина теломер не изменялась. Для анализа изменения длины теломер в динамике проводили подробное измерение теломер фибробластов с 3-х по 13-е сутки с помощью Q-FISH. Было выявлено изменение длины теломер фибробластов HFFF2 в зависимости от времени, прошедшего после воздействия рентгеновского облучения в дозе 4 Гр: на 3-и сутки регистрировалась значительная эрозия теломер (за счет редукции доли длинных теломер); на 4-е сутки наблюдалась тенденция к удлинению (сократилась доля коротких теломер и увеличилась доля длинных); на 6-е сутки регистрировались резкое увеличение доли коротких теломер и сокращение доли длинных; с 7-х по 13-е сутки регистрировалось стабильное равномерное удлинение теломер.

Также интересен факт, что на 4-е, 8-е и 10-е сутки регистрировалось значимое увеличение кон-

центрации белков RAD51 и RPA2, ответственных за гомологичную репарацию (HR) ДНР, причем максимальная концентрация белков наблюдалась на 8-е сутки: трехкратное увеличение RAD51 и двухкратное RPA2 [43].

## ВЫВОДЫ

1. Данные, представленные в обзоре, свидетельствуют о том, что ионизирующее излучение может оказывать повреждающее действие на теломеры, приводя к их укорочению и дисфункции. В связи с этим можно предположить, что чем короче теломеры, тем организм или его структуры чувствительнее к повреждениям, вызванным ионизирующим излучением.

2. Основной вклад в модуляцию длины теломер после облучения, по мнению исследователей [2, 31, 43], вносит окислительное повреждение.

3. Некоторые метаболические состояния, образ жизни и болезни индивидуума способствуют укорочению теломер, тем самым повышая его восприимчивость к действию ионизирующего излучения [38].

4. Дальнейшее изучение влияния ионизирующего излучения на функцию теломер и их роль в патогенезе радиационно-индуцированных эффектов остается одной из важнейших задач радиобиологии.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shammas M.* Telomeres, lifestyle, cancer, and aging // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2011. V. 14. P. 28–32. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32834121b1>
2. *Shim G., Ricoul M., Hempel W. et al.* Crosstalk between telomere maintenance and radiation effects: A key player in the process of radiation-induced carcinogenesis // *Mutat. Res.* 2014. V. 760. P. 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.mrrrev.2014.01.001>
3. *De Lange T.* Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres // *Gen. & Develop.* 2005. V. 19. P. 2100–2110. <https://doi.org/10.1101/gad.1346005>
4. *Palm W., De Lange T.* How shelterin protects mammalian telomeres // *Annu. Rev. Genet.* 2008. V. 42. P. 301–334. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130350>
5. *Ye J., Donigian J.* TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 47264–47271. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409047200>
6. *Taylor D., Podell E.* Multiple POT1–TPP1 proteins coat and compact long telomeric single-stranded DNA // *J. Molec. Biol.* 2011. V. 410. P. 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.04.049>
7. *Zhdanova N., Minina J.* Mammalian telomere biology // *Molec. Biol.* 2012. V. 46. P. 539–555.



8. *Li J., Fuste M., Simavorian T.* TZAP: a telomere-associated protein involved in telomere length control // *Sci.* 2017. V. 355. P. 638–641.  
<https://doi.org/10.1126/science.aah6752>
9. *Olovnikov A.* A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon // *J. Theor. Biol.* 1973. V. 41. № 1. P. 181–90.  
[https://doi.org/10.1016/0022-5193\(73\)90198-7](https://doi.org/10.1016/0022-5193(73)90198-7)
10. *Harley C., Fitcher A.* Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts // *Nature.* 1990. V. 345. P. 458–460.  
<https://doi.org/10.1038/345458a0>
11. *Fumagalli M., Rosiello F.* Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation // *Nature Cell Biol.* 2012. V. 14. P. 355–365.  
<https://doi.org/10.1038/ncb2466>
12. *Takai H., Smogorzewska T.* DNA damage foci at dysfunctional telomeres // *Curr. Biol.* 2003. V. 13. P. 1549–1556.  
[https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(03\)00542-6](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00542-6)
13. *Raynaud C., Hernandez J.* DNA damage repair and telomere length in normal breast, preneoplastic lesions, and invasive cancer // *Am. J. Clin. Oncol.* 2010. V. 33. P. 341–345.  
<https://doi.org/10.1097/COC.0b013e3181b0c4c2>
14. *Kaul A., Cesare L.* Five dysfunctional telomeres predict onset of senescence in human cells // *EMBO Rep.* 2012. V. 13. P. 52–59.  
<https://doi.org/10.1038/embor.2011.227>
15. *D'Adda di Fagagna F., Reaper P.* A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence // *Nature.* 2003. V. 426. P. 194–198.  
<https://doi.org/10.1038/nature02118>
16. *Ducray C., Pommier J.* Telomere dynamics, end-to-end telomerase activation during the human fibroblast immortalization process // *Oncogene.* 1999. V. 18. P. 4211–4223.  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202797>
17. *Hayflick L., Moorhead P.* The serial cultivation of human diploid cell strains // *Experim. Cell Res.* 196. V. 25. P. 585–621.  
<https://doi.org/10.1016/0014-4827>
18. *Bryan T., Englezou A.* Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity // *EMBO J.* 1995. V. 14. P. 4240–4248.  
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00098.x>
19. *Smogorzewska A., de Lange T.* Regulation of telomerase by telomeric proteins // *Ann. Rev. Biochem.* 2004. V. 73. P. 177–208.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.071403.160049>
20. *Jeggo P.* DNA breakage and repair // *Advan. Genet.* 1998. V. 38. P. 185–218.  
[https://doi.org/10.1016/s0065-2660\(08\)60144-3](https://doi.org/10.1016/s0065-2660(08)60144-3)
21. *Hall E.* Radiobiology for the Radiologist, 6th edition // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2006. V. 66. P. 627.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2006.06.027>
22. *Cucinotta F., Nikjoo H., Goodhead D.* Model for radial dependence of frequency distributions for energy imparted in nanometer volumes from HZE particles // *Radiat. Res.* 2000. V. 153. P. 459–468.
23. *Baulch J.* Radiation-induced genomic instability, epigenetic mechanisms and the mitochondria: a dysfunctional ménage à trois? // *Int. J. Radiat. Biol.* 2019. V. 95. P. 516–525.  
<https://doi.org/10.1080/09553002.2018.1549757>
24. *Morgan W.* Radiation-induced genomic instability // *Health Phys.* 2011. V. 100. P. 280–281.  
<https://doi.org/10.1097/HP.0b013e3182082f12>
25. *Normatova M.* Chromatin structure and dna damage response // *Avicenna Bull.* 2017. V. 19. P. 120–124.  
<https://doi.org/10.25005/2074-0581-2017-19-1-120-124>
26. *Steenken S., Jovanovic S.* How easily oxidizable is DNA? One electron reduction potentials of adenosin and guanosine radicals in aqueous solution // *J. Am. Chem. Soc.* 1997. V. 119. P. 617–618.
27. *Marmiy N., Esipov D.* 8-oxo-2'-deoxyguanosine – Biomarker, Signal Molecule, Potential Pharmaceutical Agent // *Sci. J. VolSU. Nat. Sci.* 2018. V. 8. P. 49–52.  
<https://doi.org/10.15688/jvolsu11.2018.1.9>
28. *Burrows C.J., Muller J.G.* Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission // *Chem. Rev.* 1998. V. 98. P. 1109–1152.
29. *Cooke M., Evans M., Dizdaroglu M.* Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease // *FASEB J.* 2003. V. 17. P. 1195–1214.
30. *Kasai H.* Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis // *Mutat. Res.* 1997. V. 387. P. 147–163.
31. *Coluzzi E., Colamartino M., Cozzi R. et al.* Oxidative stress induces persistent telomeric DNA damage responsible for nuclear morphology change in mammalian cells // *PLoS ONE.* 2014. V. 9. № 10. P. 1–12.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110963>
32. *Harley C., Fitcher A.* Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts // *Nature.* 1990. V. 345. P. 458–460.  
<https://doi.org/10.1038/345458a0>
33. *Komarova N., Wodarcz D.* The optimal rate of chromosome loss for the inactivation of tumor suppressor genes in cancer // *Proc. Nation Acad. Sci.* 2004. V. 101. № 18. P. 7017–7021.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0401943101>
34. *Goytisolo F., Samper E.* Short telomeres result in organismal hypersensitivity to ionizing radiation in mammals // *J. Experim. Med.* 2000. V. 192. № 11. P. 1625–1636.  
<https://doi.org/10.1084/jem.192.11.1625>
35. *Drissi W., Wu J.* Telomere shortening alters the kinetics of the DNA damage response after ionizing radiation in human cells // *Cancer Prev. Res.* 2011. V. 4. № 12. P. 1973–1981.  
<https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0069>
36. *Reste J., Zvigule G., Zvagule T.* Telomere length in Chernobyl accident recovery workers in the late period after the disaster // *J. Radiat. Res.* 2014. V. 55. № 6. P. 1089–1100.  
<https://doi.org/10.1093/jrr/rru060>
37. *Lustig A., Shterev I.* Long term effects of radiation exposure on telomere lengths of leukocytes and its associated biomarkers among atomic-bomb survivors // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 26. P. 38988–38997.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.8801>

38. *Yoshida K., Misumi M.* Long-term effects of radiation exposure and metabolic status on telomere length of peripheral blood T-cells in atomic bomb survivors // *Radiat. Res.* 2016. V. 186. № 4. P. 367–376.
39. *Guan J., Guan W.* Changes in telomere length distribution in low-dose X-ray-irradiated human umbilical vein endothelial cells // *Molec. Cell. Biochem.* 2014. V. 396. P. 129–135.  
<https://doi.org/10.1007/s11010-014-2149-5>
40. *Rossiello F., Herbig U.* Irreparable telomeric DNA damage and persistent DDR signaling as a shared causative mechanism of cellular senescence and ageing // *Curr. Opin. Genet. Develop.* 2014. V. 26. P. 89–95.  
<https://doi.org/10.1016/j.gde.2014.06.009>
41. *Zhang X., Ye C., Sun F. et al.* Both complexity and location of DNA damage contribute to cellular senescence induced by ionizing radiation // *PLoS ONE.* 2016. V. 11. № 5. P. 1–16.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155725>
42. *Bains S., Chapman K.* Effects of ionising radiation on telomere length and telomerase activity in cultured human lens epithelium cells // *Int. J. Radiat. Biol.* 2019. V. 95. № 1. P. 54–63.  
<https://doi.org/10.1080/09553002.2018.1466066>
43. *De Vitis M., Berardinelli F., Coluzzi E.* X-rays activate telomeric homologous recombination mediated repair in primary cells // *Cells.* 2019. V. 8. № 7. P. 708–727.  
<https://doi.org/10.3390/cells8070708>

## Ionizing Radiation Effects on Telomeres

V. S. Makeeva<sup>a,#</sup>

<sup>a</sup>*Southern Urals Biophysics Institute, Ozyorsk, Russia*

<sup>#</sup>*E-mail: clinic@subi.su*

To date telomere length is an informative and important biomarker of the overall health, aging, effects of environmental and life-style factors and stress. Recently a number of studies have suggested a correlation between the telomere length and severity of radiation-induced effects. In this review this issue is explored.

**Keywords:** telomeres, telomerase, ionizing radiation, telomere shortening